



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES  
UNIDAD LEÓN

TÍTULO:

“NANOPARTÍCULAS DE  $\text{TiO}_2$  INCREMENTAN EL EFECTO  
DEL AGENTE ANTITUMORAL 5-FLUOROURACILO (5-FU) EN  
UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER ORAL DE ORIGEN  
LINFOIDE”

MODALIDAD DE TITULACIÓN:

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN ODONTOLOGÍA

P R E S E N T A:

RIVERA RODRIGUEZ MARCO ANTONIO

TUTOR: Dr. Ravichandran Manisekaran

ASESOR: Dr. René García Contreras

LEÓN, GUANAJUATO 2023





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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>DEDICATORIA</i> .....   | 4  |
| <i>AGRADECIMIENTOS</i> .....   | 5  |
| <i>RESUMEN</i> .....   | 6  |
| <i>ABSTRACT</i> .....  | 7  |
| <i>INTRODUCCIÓN</i> .....  | 8  |
| <b><i>CAPÍTULO 1</i></b> .....   | 10 |
| <i>MARCO TEÓRICO</i> .....   | 11 |
| Cáncer Oral.....   | 11 |
| Sitios de cáncer oral.....   | 11 |
| Otros tipos de cáncer en la cavidad oral y la orofaringe: Linfoma.....           | 12 |
| Histología de cáncer oral: Linfoma .....   | 12 |
| Carcinogénesis.....  | 12 |
| Factores de riesgo .....   | 13 |
| Enfoques terapéuticos y diagnóstico .....  | 14 |
| Nanotecnología .....   | 19 |
| Nanomedicina.....  | 20 |
| Nanopartículas teranósticas metálicas.....                                       | 23 |
| Nanopartículas de dióxido de titanio (TiO <sub>2</sub> ).....                    | 24 |
| Generalidades de los métodos de síntesis de NP's de TiO <sub>2</sub> .....       | 26 |
| Aplicaciones anticáncer de TiO <sub>2</sub> .....                                | 26 |
| Citotoxicidad de las NP's de TiO <sub>2</sub> en cultivo de células orales ..... | 27 |
| 5-Fluorouracilo (5-FU).....  | 28 |
| Vía catabólica y anabólica de transformación del 5-fluorouracilo.....            | 29 |
| <b><i>CAPÍTULO 2</i></b> .....   | 30 |
| Planteamiento del problema .....   | 31 |
| Pregunta de investigación .....  | 32 |
| Justificación .....  | 32 |
| Objetivos .....  | 33 |
| Objetivo general .....   | 33 |
| Objetivos específicos .....  | 33 |
| Hipótesis.....   | 33 |
| Hipótesis de investigación .....   | 33 |
| Hipótesis nula.....  | 33 |

|   |    |
|---|----|
| <b>CAPÍTULO 3</b> .....   | 34 |
| <b>MARCO METODOLOGICO</b> .....   | 35 |
| Universo de estudio/ muestra .....  | 35 |
| Criterio de selección de la muestra.....  | 35 |
| Variables de estudio.....   | 36 |
| <b>DISEÑO EXPERIMENTAL Y DESARROLLO DE LA METODOLOGIA</b> .....   | 38 |
| Síntesis y funcionalización de NP's TiO <sub>2</sub> -APTES.....  | 38 |
| Caracterización de las NP's de TiO <sub>2</sub> .....   | 39 |
| Carga de NP's TiO <sub>2</sub> -APTES a la solución de 5-FU.....  | 39 |
| Protocolo de preparación de la membrana para diálisis de celuloide.....                                   | 40 |
| Protocolo curva estándar 5-FU.....  | 41 |
| Protocolo de liberación de 5-FU cargado con NP's de TiO <sub>2</sub> en diferentes pH 7.4, 6.5 y 5.5..... | 42 |
| Protocolo de Cultivo celular .....  | 43 |
| Preparación de stock de 5-FU y nanoportador .....   | 43 |
| Subcultivo, cocultivo celular y tratamiento.....  | 44 |
| Crecimiento celular y citotoxicidad.....  | 45 |
| <b>ANALISIS ESTADISTICO Y REPRESENTACION DE DATOS</b> .....   | 47 |
| <b>CAPÍTULO 4</b> .....   | 48 |
| <b>RESULTADOS</b> .....   | 49 |
| Caracterización de NP's TiO <sub>2</sub> , 5-FU y nanocomposito 5-FU NP's TiO <sub>2</sub> .....          | 49 |
| Espectroscopia UV-Visible .....   | 49 |
| Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) .....  | 50 |
| Microscopía electrónica de transmisión (TEM) con mapeo elemental (EDAX) .....                             | 51 |
| Curva estándar de 5-FU espectrografia UV- Vis .....   | 52 |
| Liberación de fármaco 5-FU en nanocomposito a diferentes pH.....  | 53 |
| Análisis citotóxico de 5-FU <i>in vitro</i> .....   | 54 |
| Análisis citotóxico de nanoportador NP's TiO <sub>2</sub> en 5-FU .....                                   | 55 |
| <b>DISCUSION</b> .....  | 57 |
| <b>CONCLUSIONES</b> .....   | 58 |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....   | 59 |
| <b>ANEXOS</b> .....   | 63 |

## DEDICATORIA

*A mis padres, German y Ma. De Jesús que siempre me han brindado su apoyo incondicional, por sus palabras de aliento día con día y sobre todo por su amor y cariño.*

*A mis hermanos y hermanas que fueron mi inspiración para seguir adelante y me enseñaron que luchar por tus sueños vale la pena.*

*A la familia Escobar Reza que me brindo apoyo en los momentos difíciles, por acogerme en su hogar y por demostrarme su afecto.*

*A mis amigos de la universidad y aquellos que estuvieron conmigo en los buenos y malos momentos por su amistad y por hacer el mi camino más ameno.*

## AGRADECIMIENTOS

*Agradezco a la ENES UNAM unidad León por darme la oportunidad de ser parte de su comunidad.*

*En especial a mi tutor, Ravichandran Manisekaran por su confianza, paciencia, por el conocimiento que ha compartido conmigo y por inspirarme a descubrir más sobre el área de la investigación.*

*A mi asesor, Dr. René García Contreras por incluirme en este proyecto.*

*Al Mtro. Hugo Alvarado Garnica y la Mtra. Christian Andrea López Ayuso por asesorarme.*

*A mis pacientes que siempre confiaron en mí y sin ellos esta meta no se hubiera podido cumplir.*

*A todos aquellos que directa o indirectamente han contribuido a mi formación profesional.*

*Agradecemos el apoyo económico de la UNAM-DGAPA-PAPIME No. PE201622.*

*Gracias*

## RESUMEN

**Introducción:** La frecuencia de cáncer oral en la población mexicana representa entre el 1% y el 5% total de las neoplasias malignas. El 5-FU es un medicamento antitumoral recetado para tratar el cáncer oral. Problemas con la resistencia al 5-FU es obstáculo contra el tratamiento del cáncer. Por lo tanto, se requiere de un sistema novedoso de nanoportadores cargados de fármacos con un tamaño óptimo, que puedan llevar a cabo la liberación de drogas en el microambiente del tumor.

**Objetivo:** Identificar el efecto anticancerígeno del agente antitumoral 5-FU agregado con nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  frente a una línea celular de carcinoma oral de origen linfoide.

**Material y Métodos:** Se sintetizó y caracterizó el nanoportador (5FU- $\text{TiO}_2$ ). Se encontró que la liberación del fármaco era máxima a pH ácido. Posteriormente, se evaluó el efecto anticancerígeno del 5-FU de control HGF y líneas celulares CO de forma individual. Además, la línea celular de cocultivo (CO-HGF) se incubó con un nanoportador para ver su efecto. La evaluación de la citotoxicidad, el crecimiento celular y la viabilidad se determinó mediante el ensayo de reducción del compuesto MTT, que se realizó después de 24 h.

**Resultados y discusión:** La incubación del nanoportador aumenta el efecto antitumoral en la línea celular CO con mínima citotoxicidad al HGF. Cuando se evaluó con el cocultivo, la citotoxicidad fue mayor cuando se combinó el 5-FU con las nanopartículas. Resultados similares fueron reportados por Shiva y col., en el 2020, en los cuales fueron evaluadas el agente antitumoral 5-FU con nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  en una línea celular de AGS expresando una citotoxicidad alta mostrando una mayor cantidad de células con signos morfológicos de muerte comparados con la quimioterapia por si sola.

**Conclusión:** A partir de los resultados, concluimos que la liberación de iones de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  forma especies reactivas de oxígeno y radicales libres, y el 5-FU exhibe su efecto anticancerígeno. Por lo tanto, este sinergismo es responsable de una mayor eliminación de células cancerosas.

**Palabras clave:** Cáncer oral, nanoportador, citotoxicidad, efecto anticancerígeno.

## ABSTRACT

**Introduction:** The frequency of oral cancer in the Mexican population represents between 1% and 5% of all malignant neoplasms. 5-FU is an antitumoral drug prescribed to treat oral cancer. Problems with resistance to 5-FU is an obstacle against cancer treatment. Therefore, a novel system of drug-loaded nanocarriers with optimal size is required, they can carry out drug delivery once in the tumor microenvironment.

**Objective:** To identify the anticancer effect of the antitumoral agent 5-FU added with TiO<sub>2</sub> nanoparticles against an oral carcinoma cell line of lymphoid origin.

**Material and Methods:** The nanocarrier (5FU-TiO<sub>2</sub>) was synthesized and characterized. Drug release was found to be maximal at acidic pH. Subsequently, the anticancer effect of 5-FU from control HGF and CO cell lines was evaluated individually. In addition, the coculture cell line (CO-HGF) was incubated with a nanocarrier to see its effect. The evaluation of cytotoxicity, cell growth and viability is prolonged by the reduction assay of the MTT compound, which was carried out 24 h.

**Results and discussion:** The incubation of the nanocarrier increases the antitumor effect in the CO cell line with minimal cytotoxicity to HGF. When evaluated with coculture, cytotoxicity was higher when 5-FU was combined with nanoparticles. Similar results were reported by Shiva et al., in 2020, in which the antitumor agent 5-FU were evaluated with TiO<sub>2</sub> nanoparticles in an AGS cell line expressing high cytotoxicity showing a greater number of cells with morphological signs of death. comparisons with chemotherapy alone.

**Conclusion:** From the results, we conclude that the release of ions from TiO<sub>2</sub> nanoparticles forms reactive oxygen species and free radicals, and 5-FU exhibits its anticancer effect. Therefore, this synergism is responsible for a greater elimination of cancer cells.

**Keywords:** Oral cancer, nanocarrier, cytotoxicity, anticancer effect.

# INTRODUCCIÓN

Según el Instituto Nacional del Cáncer, el cáncer oral se define como la malignidad que surge del revestimiento epitelial de los tejidos de la cavidad oral o de la orofaringe (NCI 2018). En su mayoría son derivados de una lesión "potencialmente maligna" preexistente o, más comúnmente, del epitelio normal (Muhammad et al., 2020).

La incidencia de cáncer oral dentro de la población mexicana ha incrementado considerablemente en los últimos 10 años ya que de acuerdo con los reportes obtenidos representa entre el 1 y el 5% del total de las neoplasias malignas más comunes (De la Fuente et al., 2014). Su frecuencia elevada podría estar ligada a diferentes factores como ser un fumador activo, el consumo frecuente de alcohol, los hábitos alimenticios, una higiene oral deficiente, predisposición hereditaria, la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o el virus del papiloma humano (HPV) (Sun et al., 2022).

La resección quirúrgica es la modalidad de tratamiento estándar para el cáncer oral. La quimioterapia a menudo se realiza para pacientes con cáncer oral avanzado o recurrente (Chi et al., 2015). A pesar de los avances en la tasa de diagnóstico precoz, tratamientos con multifármacos, e intervenciones quirúrgicas, la tasa de supervivencia global a 5 años de los pacientes con cáncer oral avanzado sigue siendo baja (<25%) y se ha mantenido casi sin cambios en los últimos 30 años (L. Watts et al., 2016).

La aparición de resistencia a los medicamentos en el tumor a menudo conduce a la ineficacia del tratamiento. Los datos estadísticos indican que la resistencia al medicamento es responsable de más del 90% de las muertes y morbilidades en pacientes con cáncer (Si et al., 2019).

El cinco fluorouracilo (5-FU) es un medicamento antitumoral recetado para tratar varios tipos de cáncer, tales como como cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, y cánceres de cabeza y cuello (Qiao et al., 2020).

Sin embargo, resulta altamente tóxico para las células normales, administrada por vía intravenosa con una distribución no específica en los tejidos dentro del cuerpo, causando fácilmente mayores daños a los tejidos sanos con reacciones adversas graves (Kruijzer et al., 2002). Además, de una baja solubilidad, permeabilidad, y la escasa biodisponibilidad de estos fármacos anticancerígenos en los fluidos corporales, también se observan limitaciones para la quimioterapia oral (Zhang et al., 2020).

Los problemas relacionados con la aparición de resistencia a los medicamentos como el 5-FU son los principales obstáculos contra el tratamiento del cáncer. Por lo tanto, existe una necesidad

inmediata de una mayor elucidación en las vías moleculares implicadas en el desarrollo de la resistencia al 5-FU para mejorar la eficacia de la quimioterapia y mejorar el pronóstico del tratamiento (Qi et al., 2020).

Para abordar los problemas de la quimioterapia con agentes convencionales, terapias dirigidas molecularmente se requieren con urgencia para mejorar la eficiencia del fármaco y reducir la toxicidad potencial. Se requiere de un sistema novedoso controlado de nanoentrega, en donde las nanopartículas cargadas de fármacos con un tamaño óptimo pueden expresar la manipulación inteligente de los comportamientos de liberación de drogas una vez que el microambiente ha cambiado ligeramente, que se utiliza para una terapia dirigida. Los portadores de fármacos basados en la nanotecnología permiten métodos selectivos para el tratamiento de cáncer oral (Huang et al., 2011); (Calixto et al., 2014).

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue identificar el efecto anticancerígeno del agente antitumoral 5-FU agregado con nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  frente a una línea celular de cáncer oral de origen linfóide. Mediante la caracterización y funcionalización de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  para posteriormente ser cargadas al 5-fluorouracilo (5-FU). Una vez hecho lo anterior se estudió su estabilidad para finalmente ser aplicadas en un cultivo de cáncer oral de origen linfóide y tratamiento celular *in vitro*.

# CAPÍTULO 1

# MARCO TEÓRICO

## Cáncer Oral

Según el Instituto Nacional del Cáncer, los cánceres orales se definen como la malignidad que surge del revestimiento epitelial de los tejidos de la cavidad oral o de la orofaringe (NCI 2022). La mayoría de estos cánceres son carcinomas de células escamosas (84-97%) que en su mayoría son derivados de una lesión "potencialmente maligna" preexistente o, más comúnmente, del epitelio normal. (Muhammad et al., 2020).

El linfoma es la segunda neoplasia más frecuente de la cabeza y el cuello después del carcinoma de células escamosas. Casi el 50% de todos los linfomas ocurren en esta región. (Epstein et al., 2001) En términos generales, el Linfoma No Hodking tiene peor pronóstico que el Linfoma Hodking, ya que cuando se diagnostica, los pacientes muchas veces ya se encuentran en un estadio avanzado de la enfermedad, y estas neoplasias son más agresivas (Guevara et al., 2013).

## Sitios de cáncer oral

El cáncer oral generalmente abarca tumores derivados de los labios, los dos tercios anteriores de la lengua, la mucosa bucal, el paladar duro, el piso de la boca, las crestas alveolares superior e inferior, el triángulo retromolar y el área sublingual (Sundermann et al., 2017) . El anillo de Waldeyer es el sitio más común de linfomas que afectan la región oral (es decir, las amígdalas, la faringe y la base de la lengua), la órbita, los senos paranasales, las glándulas salivales y la tiroides. (Epstein et al., 2001).

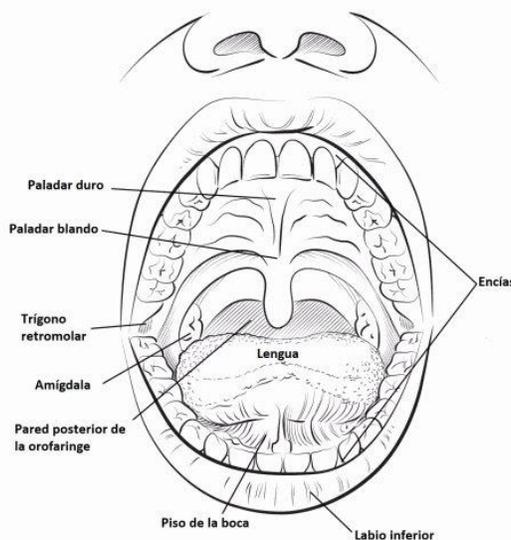


Figura 1. Cavidad Oral. Adaptado de Cáncer de orofaringe (garganta) y de cavidad oral (boca) [Ilustración], por American Cancer Society, 2023, Cancer.org (<https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-orofaringe-y-de-cavidad-oral/acerca/que-es-cancer-de-cavidad-oral.html>).

## Otros tipos de cáncer en la cavidad oral y la orofaringe: Linfoma

En las amígdalas y la base de la lengua se encuentra tejido de tipo linfoide correspondiente al sistema inmunitario, y debido a ello se pueden aparecer cánceres orales llamados “*linfomas*” (ACI 2023).

Linfoma es un término general para un grupo complejo de neoplasias malignas del sistema linforeticular. Estas neoplasias malignas surgen inicialmente dentro de los tejidos linfáticos y pueden progresar a una masa extranodular (linfoma no Hodgkin) o a una masa o masas no dolorosas en una región de ganglio linfático (linfoma de Hodgkin) que luego pueden diseminarse a otros grupos de ganglios linfáticos e involucrar la médula ósea (Epstein et al., 2001).

### Histología de cáncer oral: Linfoma

El cáncer surge con mayor frecuencia debido a una serie de anomalías y cambios de origen epigenético en las vías de señalización que dan como resultado múltiples fenotipos que facilitan el desarrollo de cáncer (Rivera y Venegas, 2014). Los linfomas son un grupo heterogéneo de neoplasias malignas que surgen de la proliferación clonal de subconjuntos de linfocitos de células B, células T y células asesinas naturales (NK) en diferentes etapas de maduración. (Mugnaini y N., 2016).

El LH está marcado histológicamente por células de Reed-Sternberg (células binucleadas o multinucleadas que se asemejan a "ojos de búho") y, en general, proporciona un mejor pronóstico en comparación con el LNH (Lima et al., 2015). Histológicamente, la lesión pasa por varias etapas, es decir, cambios preneoplásicos hasta la formación de cáncer. Sin embargo, no se debe considerar que todas las lesiones precancerosas o reactivas se convertirán eventualmente en tumores malignos (Suciu et al., 2014).

### Carcinogénesis

Dentro de los factores de riesgo que actúan como agentes promotores de cáncer, se encuentran las lesiones y condiciones precancerosas. Una lesión precancerosa es un tejido que se encuentra morfológicamente alterado, en etapas células que pueden ser de maduración y en la proliferación, y tienen una mayor posibilidad de evolucionar a cáncer en comparación con un tejido morfológicamente normal.

Este tipo de lesiones precancerosas es conocido como una lesión oral potencialmente maligna (LOPM), dentro de este grupo tenemos a la: leucoplasia, eritroplasia, leucoeritroplasia y queilitis actínica. Una LOPM pudiera ser irreversible, ya que presentan displasias epiteliales con diferentes alteraciones dentro de su citología y arquitectura y son factores predispuestos a una transformación maligna (carcinoma in situ), aunque se han encontrado regresiones espontáneas de lesiones LOPM

al discontinuar los hábitos relacionados a su aparición (De la Fuente et al., 2014). En general, el LH corresponde aproximadamente al 14% de todos los linfomas y el LNH al 86% de los linfomas (Guevara et al., 2013).

## Factores de riesgo

Los principales factores de riesgo de cáncer oral son el hábito de fumar y el consumo de alcohol; informan una fuerte asociación sinérgica entre el consumo de tabaco y el abuso de alcohol. Las LOPM son provocadas por hábitos relacionados con un estilo vida que dañan de manera local y extensa en diferentes tipos de mucosas dentro de las vías aéreas y digestivas superiores, entre estas la mucosa oral (De la Fuente et al., 2014).

También se ha descubierto que el consumo de nuez de areca, narcóticos y cannabis es un factor de riesgo para el cáncer oral (Thavarajah R, 2006). El cáncer oral es más común en hombres mayores, en grupos socioeconómicos más bajos y en grupos de minorías étnicas.

Otros factores que también juegan un papel importante incluyen:

- Una capacidad disminuida para reparar el ADN dañado por mutágenos.
- Una capacidad deteriorada para metabolizar carcinógenos.
- Carencias de vitaminas A, E o C o de oligoelementos.
- Defectos inmunológicos.

Existe un mayor riesgo de desarrollar cáncer oral en pacientes infectados por el VIH y pacientes sometidos a trasplantes de órganos y aquellos que están bajo terapia inmunosupresora (Markopoulos, 2012).

En los últimos años se ha informado de un aumento en el número de casos de cáncer oral en personas jóvenes (45 años de edad, en promedio) sin ser fumadores o bebedores frecuentes, pero con presencia del virus HPV. En la última década se ha encontrado relación del HPV con la presencia de lesiones orales pre malignas y con el cáncer oral ya que se ha observado un predominio del 43.5%, entre los cuales destacan genotipos HPV-16 y HPV-18. Estos virus tienen especial afinidad a los epitelios de células escamosas (epiteliotropismo), en donde llevan a cabo su ciclo reproductivo (De la Fuente et al., 2014).

Mientras que para el linfoma oral los factores de riesgo más destacados incluyen exposición a pesticidas y radiación, inmunosupresión a largo plazo y enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico y el síndrome de Sjögren. Se han sugerido varios virus como posibles causas de esta enfermedad, incluido el virus de Epstein-Barr (EBV), el virus linfotrópico de células T humanas 1 (HTLV-1), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus

del herpes humano tipo 8 (HHV-8, HVSK) y los virus de la hepatitis B, C y G (HBV, HCV y HGV) se han relacionado con un mayor riesgo de LNH y pueden actuar en múltiples clones de células linfocitarias, contribuyendo a su transformación neoplásica. Otros microorganismos implicados en la génesis del LNH son *Helicobacter pylori* y la *Chlamydia* (Guevara et al., 2013).

## Enfoques terapéuticos y diagnóstico

La detección temprana del cáncer oral puede ayudar a reducir la propagación de tumores malignos, ayudando así en la prevención y el tratamiento temprano del cáncer oral. La detección temprana de cáncer oral comienza con un examen regular e indoloro que implica una simple exploración de los labios, las encías, el paladar duro y blando, el área de las amígdalas, la mucosa bucal y el piso de boca para detectar cambios en el color y la textura (p. ej., úlceras) que se puede realizar durante los exámenes dentales regulares.

Además, los biomarcadores resultantes de múltiples mutaciones genéticas, como la sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), la telomerasa, la survivina y la supresión o inactivación de genes supresores de tumores como FHIT, p53, BAG-1 (proteína antiapoptótica BCL2), p27 se puede utilizar en el diagnóstico precoz del cáncer oral (Mahendra et al., 2014).

El diagnóstico de linfoma se obtiene mediante una biopsia de tejido, la mayoría de las veces facilitada por el médico de atención primaria. En orden de cantidad creciente de material obtenido, las opciones para la biopsia de tejido incluyen aspiración con aguja fina, biopsia central, biopsia por incisión/en cuña y biopsia por escisión. En general, cuanto más tejido se puede obtener mejor. De hecho, la ventaja de una biopsia por escisión es que permite la evaluación de la arquitectura de los ganglios linfáticos completos. Cuando sea posible, es mejor obtener tejido donde la actividad de la enfermedad sea mayor (Mugnaini y N., 2016).

De acuerdo con el Instituto Nacional del Cáncer, las etapas de cáncer oral, es decir, desde la etapa 0 hasta la etapa 4, se clasifican según el tamaño del tumor, la invasión de los tejidos y la diseminación a los ganglios linfáticos (Tabla 1) (Tanaka y Ishigamori, 2017).

Tabla 1. Estadios de cáncer oral.

|                   |  |
|-------------------|--|
| <b>0</b>          | El cáncer está aislado y no ha viajado a capas más profundas de tejidos o ganglios linfáticos.   |
| <b>I</b>          | El tumor mide menos de 2 cm y no se ha propagado a los ganglios linfáticos del área.   |
| <b>II</b>         | El tumor mide entre 2 cm y 4 cm y no se ha propagado a los ganglios linfáticos de la zona.   |
| <b>III</b>        | El tumor mide más de 4 cm o<br>Es de cualquier tamaño y se ha desplazado a un solo ganglio linfático del mismo lado de la cabeza y el cuello. El tumor que contiene ganglios linfáticos mide 3 cm o menos.   |
| <b>IV</b>         | El tumor es de cualquier tamaño y se ha diseminado a los labios o la cavidad bucal y ha penetrado profundamente en los tejidos faciales, los músculos o las mandíbulas. El cáncer se diseminó a más de un ganglio linfático en ambos lados del cuello. El cáncer que contiene ganglios linfáticos mide más de 6 cm. Además, el cáncer se ha propagado a otras partes del cuerpo. |
| <b>RECURRENTE</b> | El cáncer oral puede reaparecer en la cavidad oral o en otra parte del cuerpo después del tratamiento.   |

*Nota. Adaptado de "Oral Squamous Cell Carcinoma Current Treatment Strategies and Nanotechnology-Based Approaches for Prevention and Therapy"., por Gharat, S., Momin, M., y Bhavsar, C. (2016). Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems, 33(4), 363-400.*

Tabla 2. Clasificación de Lucano. Sistema de estadificación revisado de los linfomas ganglionares primarios.

| Etapa                 | Afectación   | Estado extraganglionar   |
|-----------------------|--|--|
| <b>Limitado</b>       |  |  |
| <b>I</b>              | Un ganglio o un grupo de ganglios adyacentes   | Lesiones extraganglionares únicas sin afectación ganglionar                            |
| <b>II</b>             | Dos o más grupos ganglionares en el mismo lado del diafragma                               | Etapa I o II por extensión ganglionar con afectación contigua extraganglionar limitada |
| <b>II voluminoso*</b> | Como los anteriores, con enfermedad "voluminosa"   | No aplica  |
| <b>Avanzado</b>       |  |  |
| <b>III</b>            | Ganglios en ambos lados del diafragma; ganglios sobre el diafragma con afectación del bazo | No aplica  |
| <b>IV</b>             | Afectación adicional no contigua extralinfática  | No aplica  |

*Nota. Adaptado de "Generalidades sobre linfomas." por Pérez J.M., Aguilar C., Álvarez J.L., Augusto M. y col. Hematol Méx. 2018 octubre-diciembre;19(4):174-188.*

El tratamiento del cáncer oral depende de varios factores, como la etapa de la enfermedad, el sitio de la enfermedad y el estado general de salud del paciente. Para los pacientes con cáncer oral en estadio 1 y estadio 2, el tratamiento inicial preferido es una terapia de línea única mediante radioterapia o cirugía.

Antes de 1980, la cirugía y/o la radioterapia eran la primera línea de tratamiento para los pacientes con cáncer en estadios avanzados 3 y 4. Sin embargo, estas modalidades tradicionales dieron malos resultados. Por lo tanto, para mejorar la eficacia del tratamiento, aumentar el control local y aumentar la tasa de supervivencia, la quimioterapia sistémica se introdujo a mediados de la década de 1970 como parte del tratamiento combinado. El tratamiento combinado terapéutico y profiláctico siempre se ha utilizado para un mejor control del cáncer oral. Además, se ha demostrado que la terapia complementaria como seguimiento de las medidas preventivas mejora el manejo de la enfermedad (Gharat et al., 2016).

### A. Quimioterapia

La primera línea de tratamiento de cáncer oral es la quimioterapia con medicamentos como cisplatino, carboplatino, 5-fluorouracilo, docetaxel, paclitaxel y metotrexato. La quimioterapia es eficaz en el cáncer oral cuando se usa en combinación con otras modalidades de tratamiento, especialmente con radioterapia. La quimioterapia y la radioterapia, cuando se usan simultáneamente, brindan un beneficio sinérgico contra el cáncer oral. Además, este enfoque se asocia con un alto nivel de respuesta en etapas inoperables de la enfermedad. Al lograr el control locorregional sin resección quirúrgica de estructuras anatómicas, la quimioradioterapia es eficaz como método de espaciamiento de órganos. Sin embargo, ambas terapias se enfrentan al gran inconveniente de la muerte celular inespecífica que produce mucositis, mielosupresión y alopecia como efectos secundarios principales (Savita et al., 2014).

### B. Intervenciones quirúrgicas

La extirpación quirúrgica del tumor se realiza si el tumor es lo suficientemente pequeño y si es probable que la cirugía produzca resultados funcionalmente satisfactorios. La quimioradioterapia a menudo se usa con cirugía, especialmente cuando un tumor es inoperable. Después de la cirugía, la mayoría de los pacientes con cáncer bucal dependen de una sonda de alimentación para su nutrición. Muchos pacientes con cáncer oral están desfigurados y sufren efectos a largo plazo que incluyen fatiga, problemas del habla, dificultades para tragar, debilidad, mareos, pérdida de la audición y daño en los senos paranasales. Los tipos de cirugías incluyen maxilectomía, mandibulectomía, glosectomía, cirugía de Mohs con disección radical de cuello y una combinación de glosectomía y laringectomía realizadas juntas. Es posible que se requiera cirugía reconstructiva adicional, como injertos óseos y colgajos quirúrgicos del antebrazo, para reconstruir las estructuras extirpadas durante la escisión del cáncer (Gharat et al., 2016).

### C. Inhibidores de EGFR

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es un receptor unido a la membrana asociado con diversas actividades celulares, como la proliferación, la diferenciación, la supervivencia celular y la muerte. Activa múltiples vías de señalización celular, incluido el RAS/Vía RAF/MEK/ERK $\frac{1}{2}$ . La sobreactividad de esta vía se considera un factor en el desarrollo del cáncer, la metástasis y la resistencia a la quimioterapia (Okamoto, 2010). Los inhibidores de EGFR solos o en combinación con quimioradioterapia han demostrado ser efectivos contra cáncer oral en ensayos clínicos. Los inhibidores de EGFR como nimotuzumab y cetuximab exhiben propiedades antiangiogénicas al inhibir la migración y la invasión de células cancerosas orales; también reducen significativamente la formación de células endoteliales. El pretratamiento de cáncer oral con factor de crecimiento epidérmico (EGF) aumenta su sensibilidad; por lo tanto, la expresión de EGFR y su vía de señalización juegan un papel importante en la determinación de la sensibilidad a los agentes quimioterapéuticos o la irradiación (Ribeiro et al., 2014).

Hiraishi et al. 2008 llevaron a cabo estudios utilizando líneas celulares de cáncer oral para investigar si el inhibidor de EGFR mejora la sensibilidad al cisplatino del cáncer oral. Evaluaron el efecto de una combinación de AG 1478 (inhibidor de EGFR) con cisplatino en líneas celulares cáncer oral cultivadas y sublíneas resistentes al cisplatino. Sus resultados sugieren que la inhibición de EGFR mejora la sensibilidad al cisplatino de las líneas celulares de cáncer oral (Gharat et al., 2016).

#### D. Inhibidores de la COX-2

Las ciclooxigenasas (COX) son enzimas limitantes de la velocidad que actúan como catalizadores en la síntesis de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico. COX-1 y COX-2 son dos isoformas de COX de las cuales COX-2 es una enzima inducible que se eleva durante la inflamación y en varios tejidos cancerosos. La COX-2 es inducida por carcinógenos, factores de crecimiento, mitógenos, citoquinas, ésteres de forbol promotores de tumores (Urade, 2008). En el cáncer oral, los niveles medios de ARNm de COX-2 aumentan 150 veces en comparación con la mucosa normal. La sobreexpresión de COX-2 inhibe la apoptosis y la vigilancia inmunitaria, promueve la angiogénesis y aumenta la metástasis; por lo tanto, la COX-2 se considera un objetivo importante en el tratamiento del cáncer oral. Los efectos antimetastásicos de ciertos inhibidores de la COX-2 sugieren que estas moléculas tienen una utilidad crítica en el tratamiento de los cánceres orales (Santoro et al., 2020). Los estudios *in vivo* han demostrado que la inhibición selectiva de COX-2 suprime el crecimiento de células tumorales. El uso combinado de quimiorradioterapia con un enfoque dirigido a la COX-2 ha demostrado su eficacia debido a su efecto sinérgico. (Yamamoto et al., 2015) estudio el efecto de la nimesulida en ratas Fisher 344 con carcinomas de células escamosas de lengua inducidos. Estos agentes redujeron la incidencia de lesiones en la lengua.

#### E. Terapia fotodinámica

La terapia fotodinámica es un nuevo enfoque que se está estudiando para el manejo de cáncer oral. Los resultados de varios estudios clínicos pequeños han demostrado que esta terapia es eficaz en el tratamiento de lesiones epiteliales premalignas y carcinomas superficiales. Los derivados de hematoporfirina y sus conjugados 103 o 5-ALA 104 se administran por vía tópica o intravenosa. Estos agentes actúan como agentes fotosensibilizadores y se dirigen específicamente a las células cancerosas. La activación de estos fotosensibilizadores ocurre cuando el tejido objetivo se expone a una onda de luz específica. El fotosensibilizador activado luego transfiere su energía al oxígeno molecular, lo que causa daño tisular al generar especies reactivas de oxígeno. Aunque la terapia está asociada con la fotosensibilidad cutánea como su principal efecto secundario, los agentes fotosensibilizantes más nuevos como el 5-ALA muestran una menor incidencia de esta complicación (Gharat et al., 2016). (Bhuvaneswari et al., 2015) evaluaron la eficacia de la terapia fotodinámica con clorina-e6 en combinación con un inhibidor de EGFR, nimotuzumab, en líneas celulares de cáncer oral y un modelo de tumor xenoinjertado. Los resultados de esta terapia combinada mostraron una proliferación celular reducida, regulación a la baja de EGFR, ki-67 y CD31, y crecimiento tumoral retrasado sinérgicamente en comparación con los tumores de control y tratados con TFD.

## Nanotecnología

La nanotecnología se define como la comprensión y el control de la materia en dimensiones entre 1 y 100 nm donde los fenómenos únicos permiten aplicaciones novedosas. En un período de tiempo de aproximadamente medio siglo, la nanotecnología se ha convertido en la base de notables aplicaciones industriales y un crecimiento exponencial. Por ejemplo, en las comunidades de práctica farmacéutica, la nanotecnología ha tenido un profundo impacto en los dispositivos médicos, como los biosensores de diagnóstico, los sistemas de administración de fármacos y las sondas de imágenes. En las industrias de alimentos y cosméticos, el uso de nanomateriales se ha incrementado dramáticamente para mejorar la producción, el empaque, la vida útil y la biodisponibilidad (Hulla et al., 2015).

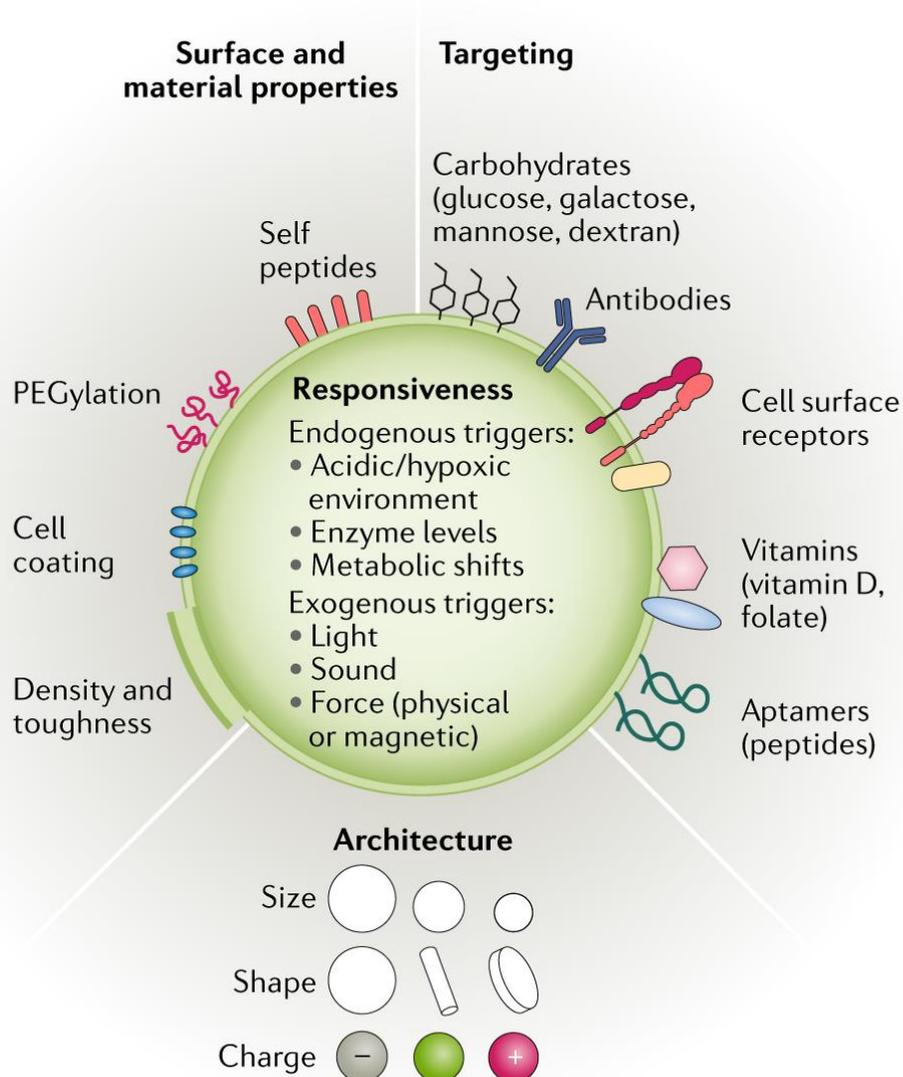


Figura 2. Propiedades de la superficie de NP's comúnmente diseñadas que permiten una entrega mejorada. Adaptado de "Engineering precision nanoparticles for drug delivery." [Ilustración] por Mitchell, M.J., Billingsley, M.M., Haley, R.M. et al. *Nat Rev Drug Discov* 20, 101–124 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>.

## Nanomedicina

La nanomedicina, que incluye subsectores como la ingeniería de tejidos, biomateriales, biosensores y bioimágenes, se desarrolló para estudiar los beneficios y riesgos de los nanomateriales utilizados en medicina y dispositivos médicos. Algunos de los beneficios potenciales de los nanomateriales médicos incluyen una mejor administración de fármacos, revestimientos antibacterianos de dispositivos médicos, reducción de la inflamación, mejor cicatrización del tejido quirúrgico y detección de células cancerosas circulantes (Hulla et al., 2015).

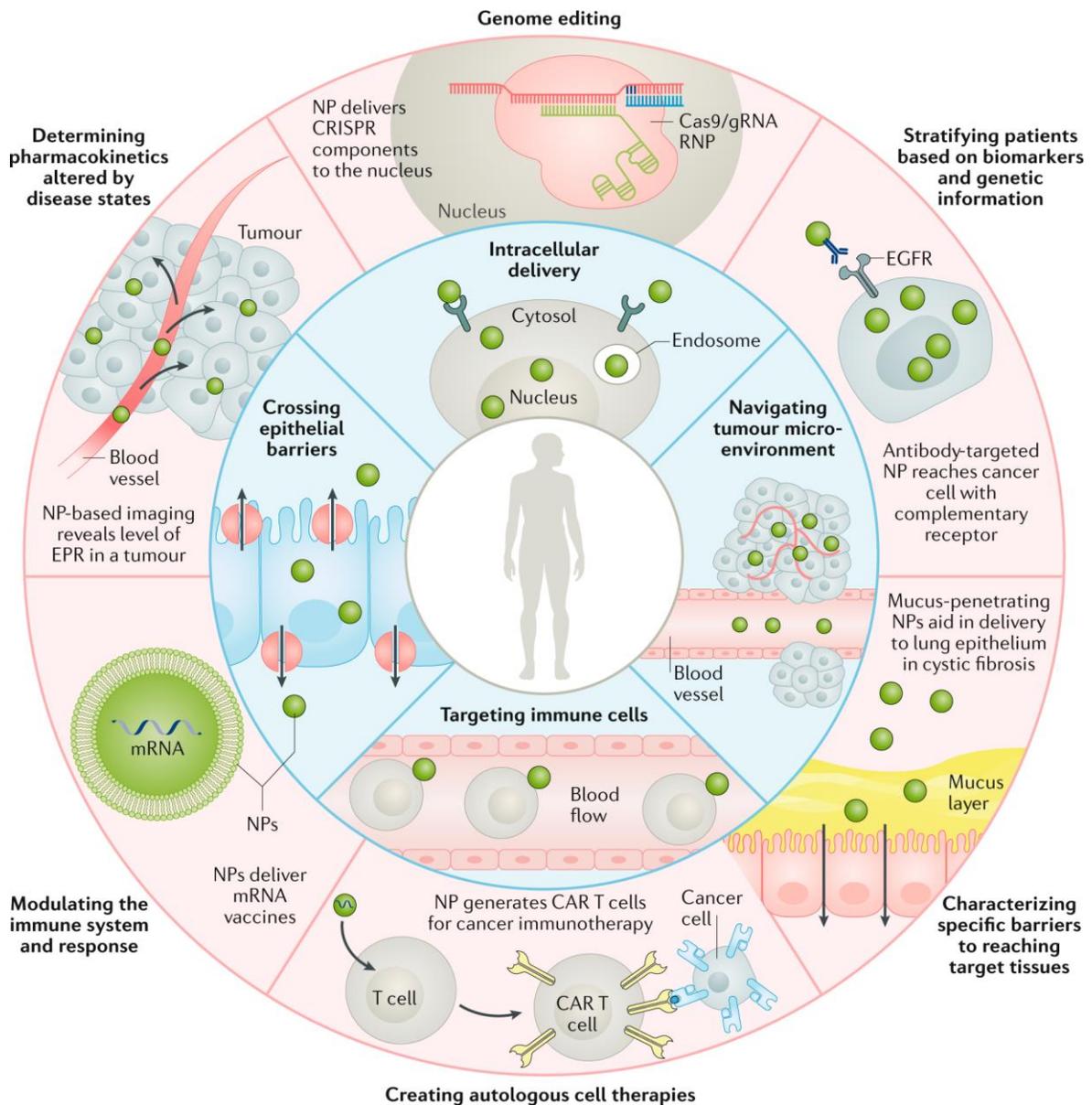


Figura 3. Barreras biológicas aplicación precisa de nanomedicina. Adaptado de "Engineering precision nanoparticles for drug delivery." [Ilustración] por Mitchell, M.J., Billingsley, M.M., Haley, R.M. et al. Nat Rev Drug Discov 20, 101–124 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>.

## Tecnología de entrega de medicamentos basada en nanoportadores

Lidiar con el cáncer es un desafío porque la destrucción no selectiva por parte de los agentes terapéuticos conduce al deterioro de órganos vitales. Actualmente, los tratamientos convencionales de quimioterapia y radioterapia son ampliamente aceptados para el tratamiento y/o manejo de cáncer oral. Los beneficios de estas terapias deben equilibrarse con un margen de seguridad. El campo de la nanotecnología depara soluciones a las limitaciones de las mencionadas. Este campo se explora ampliamente para la administración de agentes anticancerígenos y también para atacar el tumor (Gharat et al., 2016).

La nanotecnología ofrece los medios para dirigir las quimioterapias directa y selectivamente a las células cancerosas y los neoplasmas, guiar en la resección quirúrgica de tumores y mejorar la eficacia terapéutica de las modalidades de tratamiento basadas en la radiación y otras actuales. Todo esto puede sumarse a una disminución del riesgo para el paciente y una mayor probabilidad de supervivencia (NCI 2017).

Se están desarrollando varios sistemas portadores basados en nanotecnología eficaces ampliamente investigados por su potencial para administrar agentes anticancerígenos específicamente a las células cancerosas. Aunque estas estructuras son muy pequeñas en comparación con la célula, son lo suficientemente grandes como para unir múltiples restos funcionales a la superficie celular, modificando las propiedades de la superficie celular y los patrones de distribución.

Las nanopartículas, además de reducir los efectos secundarios de los fármacos, también mejoran la modalidad de tratamiento mediante el control de su entrega dirigida, facilitando constante y cantidades uniformes de fármaco en el sitio de la lesión cancerosa en la cavidad oral. El aumento de la concentración en el sitio facilita la penetración del fármaco en el tumor. La quimioterapia convencional se enfrenta a un gran problema, el desarrollo de farmacorresistencia, en breve después del tratamiento inicial reduce la eficacia de los agentes terapéuticos convencionales y agentes terapéuticos dirigidos (Gharat et al., 2016).

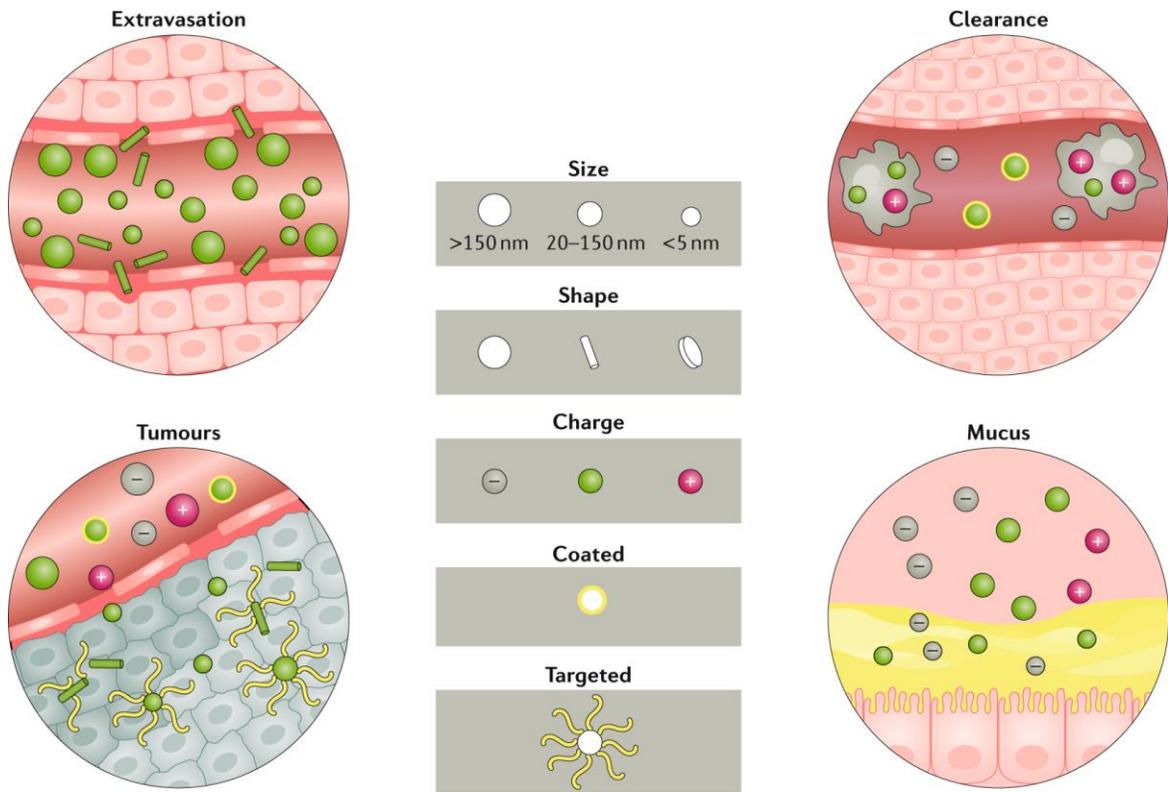


Figura 4. Distribución e impacto de las características de NP's. Adaptado de "Engineering precision nanoparticles for drug delivery." [Ilustración] por Mitchell, M.J., Billingsley, M.M., Haley, R.M. et al. *Nat Rev Drug Discov* 20, 101–124 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>.

## Nanopartículas teranósticas metálicas

Las nanopartículas metálicas como las nanopartículas de oro, las nano jaulas y las nanocápsulas, las nanopartículas de plata y las nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético (SPION, por sus siglas en inglés) han surgido como candidatos prometedores para diversas aplicaciones biomédicas, como la administración de fármacos dirigidos a las células cancerosas, los agentes de contraste para resonancia magnética, la terapia fototérmica, la terapia génica y como agentes en la detección temprana del cáncer. El tamaño nanométrico de estas partículas y la modificación de sus grupos funcionales para una mayor vinculación con anticuerpos, ligandos, fármacos y agentes de diagnóstico permite la orientación específica del sitio (Mody et al., 2010).

Las nanopartículas de oro (GNP) se encuentran actualmente bajo investigación intensiva para aplicaciones de administración de fármacos debido a su potencial para maximizar la eficacia de los fármacos contra el cáncer y minimizar los efectos secundarios fuera del objetivo. Las propiedades ópticas y fototérmicas únicas de los GNP, además de la sencilla funcionalización de su superficie, los convierten en herramientas extremadamente prometedoras en la quimioterapia contra el cáncer. Además, mejoraron la administración transdérmica de varios medicamentos. Los GNP también mostraron resultados prometedores en la terapia fototérmica y la terapia fotodinámica del cáncer de piel.

Las partículas de oro coloidal son de gran interés en el campo del cáncer. Debido a sus interesantes propiedades ópticas, su solución es de un color rojo intenso (para partículas <100 nm) o de un color amarillento sucio (para partículas >100 nm). Actualmente, se han aprobado dos terapias basadas en nanopartículas de oro para estudios clínicos: partículas de oro sólido para la administración de fármacos y nanocápsulas de oro para terapia fototérmica. Las nanocáscaras de oro son una de las primeras nanoestructuras estudiadas para la terapia fototérmica. *In vivo* los estudios en ratones muestran que el tratamiento con nanocápsulas de oro produce altas tasas de supervivencia. Los ensayos clínicos han estado en proceso desde 2008, evaluando la seguridad, toxicidad y eficacia de nanopartículas de oro cargadas de fármacos (Murphy et al., 2018).

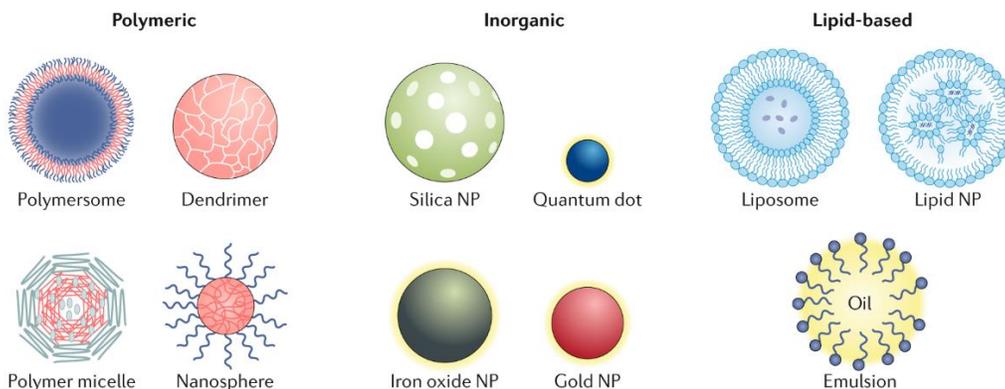


Figura 5. Distribución e impacto de las características de NP's. Adaptado de "Engineering precision nanoparticles for drug delivery." [Ilustración] por Mitchell, M.J., Billingsley, M.M., Haley, R.M. et al. *Nat Rev Drug Discov* 20, 101–124 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>.

## Nanopartículas de dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>)

El dióxido de titanio (óxido de titanio (IV), titania, TiO<sub>2</sub>) es un compuesto inorgánico que debe su reciente aumento de interés científico debido a la fotoactividad. Después de la iluminación en medios acuosos con luz ultravioleta, el TiO<sub>2</sub> produce una serie de especies reactivas de oxígeno (ROS). La capacidad de producir ROS y, por lo tanto, inducir la muerte celular ha encontrado aplicación en la terapia fotodinámica (PDT) para el tratamiento de una amplia gama de enfermedades, desde la psoriasis hasta el cáncer. Las NP's de dióxido de titanio se estudiaron como agentes fotosensibilizadores en el tratamiento de tumores malignos, así como en la inactivación fotodinámica de bacterias resistentes a los antibióticos. Tanto las propias NP's de TiO<sub>2</sub> como sus compuestos y combinaciones con otras moléculas o biomoléculas pueden utilizarse con éxito como fotosensibilizadores en la TFD. Además, se pueden injertar varios compuestos orgánicos en nanopartículas de TiO<sub>2</sub>, lo que da lugar a materiales híbridos. Estas nanoestructuras pueden revelar una mayor absorción de luz, lo que permite su uso posterior en terapia dirigida en medicina. Con el fin de mejorar las terapias anticancerígenas y antimicrobianas eficientes muchos enfoques que utilizan dióxido de titanio (Ziental et al., 2020).

Las NP's de TiO<sub>2</sub> poseen un tamaño a microescala, el cual les facilita su incorporación a las células por la vía de endocitosis y una vez dentro de esta las NP's atraviesan su membrana, y así es posible interrumpir funciones celulares e inducir la muerte. En el campo odontológico, la utilización de las NP's ha adquirido un gran potencial para el desarrollo de nuevos materiales como los de biomecánica de restauración, sustancias para facilitar la irrigación de conductos, implantes dentales compatibles con el organismo entre otras, debido a que poseen propiedades antimicrobianas y terapéuticas.

También se han incorporado NP's de TiO<sub>2</sub> a cementos de ionómero de vidrio, ya que han demostrado su mayor resistencia a la flexión y compresión, así como su microdureza y brindar un efecto antimicrobiano, así mismo estas NP's no interfieren con la adhesión de los tejidos dentales. Es posible identificar al dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>) en tres diferentes estructuras cristalinas de tipo

polimórfico: anatasa, rutilo y brookita. La fase anatasa con un tamaño promedio=3-5 nm es químicamente más reactiva y puede llegar a generar seis veces más especies reactivas de oxígeno (ROS) que el rutilo después de su ser expuesto a la luz UV, por lo tanto, la fase anatasa es considerada la de mayor potencial citotóxico. Sin embargo, la capacidad de esta para producir ROS en dicha fase no representa ningún peligro al ser expuesto en condiciones normales de luz (Argueta-Figueroa et al., 2018).



Figura 6. Aplicaciones actuales y uso potencial futuro de  $\text{TiO}_2$ . Adaptado de "Titanium Dioxide Nanoparticles: Prospects and Applications in Medicine." [Ilustración] por Ziental, D., Czarczynska-Goslinska, B., Mlynarczyk, D. T., Glowacka-Sobotta, A., Stanisz, B., Goslinski, T., y Sobotta, L. *Nanomaterials*, (2020). 10(2), 387. <https://doi.org/10.3390/nano10020387>

## Generalidades de los métodos de síntesis de NP's de TiO<sub>2</sub>

El método de síntesis del material es considerado uno de los aspectos más importantes que se debe de tener cuando se quiere hacer uso de NP's, ya que este nos ayudara a mejorar los resultados respecto al tamaño, morfología y la superficie de las NP's. Hay una amplia variedad de métodos de síntesis que pueden ser utilizados para obtener NP's de TiO<sub>2</sub>; desde métodos físicos hasta de tipo biológico, por lo que hay que tener en consideración el uso final de esta para así decidir el método con el cual se elaboraran. Si lo que se desea es tener un buen control estequimétrico, la forma y el tamaño, el método químico será el más adecuado, entre los que podemos destacar la deposición química de vapor, método sol-gel, la micro-emulsión, y el método hidrotérmico. Aunque este tipo de métodos cuenta con desventajas como son un uso de precursores caros, síntesis final en periodos largos y, presencia de impurezas en algunos casos. Por lo que el método de sol-gel, que se realiza en base húmeda; origina una reacción de hidrólisis del alcóxido o haluro en metal precursor, pasando así a la fase de condensación inorgánica; es uno de los métodos más utilizados. Revisado esto el método de sol-gel es el que sería el más recomendado para la síntesis de nanopartículas en monodispersión, este es un punto importante si lo que se busca es un beneficio del material en escala nanométrica y para que dichas NP's puedan ser utilizadas dentro de aplicaciones biológicas.

También se debe mencionar que un estudio previo de toxicidad detallada y de biocompatibilidad de las NP's diseñadas es de suma importancia antes de pasar a cualquier uso biológico, ya que no se cuenta con literatura específica enfocada en el uso de aplicaciones no biológicas de TiO<sub>2</sub> (Argueta-Figueroa et al., 2018).

## Aplicaciones anticáncer de TiO<sub>2</sub>

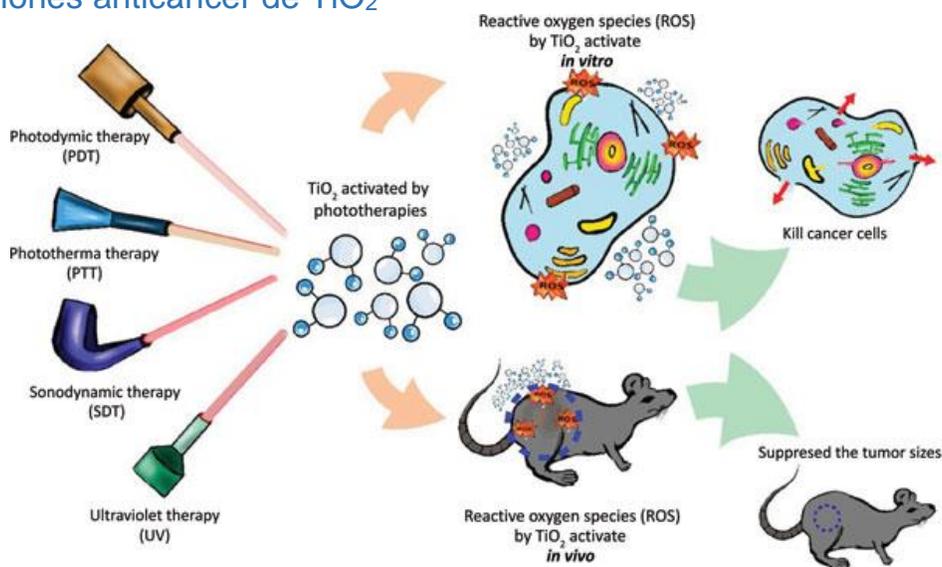


Figura 7. Potencial del efecto de TiO<sub>2</sub> activado mediante foto terapias contra tumores y células cancerosas. Adaptado de "Review of Therapies using TiO<sub>2</sub> Nanomaterials for Increased Anticancer Capability." [Ilustración] por Rodríguez N., Anaya M. L., Villagrán-de la Mora Z., Sánchez A. J. and Pérez A., *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 2022; 22(12) . <https://dx.doi.org/10.2174/1871520622666211228112631>.

## Citotoxicidad de las NP's de TiO<sub>2</sub> en cultivo de células orales

Tabla 3. Cuadro comparativo de los estudios de citotoxicidad de TiO<sub>2</sub> sobre células de la cavidad oral.

| Fase cristalina  | Morfología     | Tamaño de partícula                  | de | Concentraciones probadas              | Línea celular/ Tejido                        | Prueba/Evaluación                                  | Viabilidad celular  |
|--|----------------|--------------------------------------|----|---------------------------------------|--|--|---|
| <b>Rutilo</b>  | Cuasi-esférica | 21,8±9,6 nm en agregados (≤300nm)    |    | 50-200 µg/mL                          | hGEPs  | WST-1  | En todas las concentraciones ≥100%.   |
| <b>Mezcla de rutilo y anatasa</b>  | Film           | Grosor de 380nm                      | de | NA                                    | Tejido circundante al implante dental        | Tinción azul de toluidina (en cortes histológicos) | No se observa muerte celular ni zonas inflamatorias   |
| <b>Rutilo</b>  | Esférica       | 1819±61,56nm                         |    | 50-200µg/mL                           | Células TR146                                | MTS  |   |
| <b>Anatasa</b>   | Esférica       | <25nm                                |    | 0,05-3nM                              | HGF  | MTT  | En todas las concentraciones ≥100%.   |
| <b>Mezcla de anatasa: rutilo 80:20.</b>                                  | Cuasi-esférica | 1)28,5 ± 9,8 nm y, 2)183,2 ± 73,9 nm |    | 0,031-0,25% w/v.                      | H376   | MTT  | En todas las concentraciones ≥100%.   |
| <b>ND</b>  | Nanotubular    | Diámetro de 120±15nm                 | de | Film sobre placas de titanio          | HGF  | MTT  | En todas las concentraciones ≥100%.   |
| <b>ND</b>  | Nanotubular    | 588,85±3,92                          |    | Film sobre placas de titanio          | HGF  | MTT  | ≥100%.  |
| <b>Mezcla de anatasa: rutilo 80:20.</b>                                  | Cuasi-esférica | 29,8 nm                              |    | 1pg/L-1g/L                            | HBEC   | Tinción celular de yoduro de propidio              | En todas las concentraciones probadas fue ≥75%.   |
| <b>Anatasa</b>   | Esférica       | <25nm                                |    | 0,05-3,2 mM                           | HSC-2  | MTT  | 100±5%  |
| <b>Anatasa</b>   | Esférica       | <25nm                                |    | GIC + TiO <sub>2</sub> (3% y 5%, w/w) | HPC, HGF, HPLF, HSC-2, HSC-3, HSC-4 y Ca9-22 | MTT  | La incorporación de TiO <sub>2</sub> al 3% disminuye la citotoxicidad de GIC, mientras que al 5% ésta aumenta notoriamente. |
| <b>ND</b>  | ND             | ND                                   |    | MTA+TiO <sub>2</sub> (1%w/w)          | HGF  | MTT  | ≥100%   |
| <b>Anatasa</b>   | Esférica       | <25nm                                |    | 0,8-3,2mM                             | HGF  | MTT  | 100±5%  |
| <b>1)Pigmento anatasa, 2)NPs anatasa, 3)NPs anatasa 80% y rutilo 20%</b> | Cuasi-esférica | 34±15nm<br>28±8nm<br>36±10nm         |    | 50-200 µg/mL                          | HBEC   | MTS  | En todas las concentraciones probadas fue 100±5%  |

Nota. Adaptado de "Biocompatibilidad y toxicidad de nanopartículas de dióxido de titanio en la cavidad oral: Revisión sistemática." por Argueta L., Torres N., Scougall, R., y García, R. (2018). *Investigación clínica*, 59, 352.

## 5-Fluorouracilo (5-FU)

El 5-fluorouracilo (5-FU) se encuentra entre los agentes básicos para los cánceres de los órganos digestivos incluyendo el cáncer oral, y tiene una amplia aplicación clínica. Los ARN no codificantes tienen un impacto central en la determinación de la respuesta de los pacientes al 5-FU. Estas transcripciones a través de la modulación de las vías relacionadas con el cáncer, la apoptosis celular, la autofagia, la transición epitelial-mesenquimatosa y otros aspectos del comportamiento celular pueden afectar la respuesta celular al 5-FU.

El 5-FU y sus profármacos orales, incluidos S1 y capecitabina, se encuentran entre los componentes principales de la mayoría de los regímenes quimioterapéuticos cuya eficacia se ha establecido en el tratamiento de varias neoplasias, como el carcinoma de células escamosas (COCE) de cabeza y cuello, (SCC) sarcoma gastrointestinal y adenocarcinoma (ADC), y SCC del cuello uterino. Este agente fue introducido por Heidelberger et al. durante la década de 1950 (Harada et al., 2014).

El efecto citotóxico del 5-FU se induce principalmente a través de la inhibición de la timidilato sintasa (TS) celular que conduce a la prevención de la replicación del ADN y también a la inhibición de la síntesis de ARN mediante la integración de sus metabolitos en el ARN después de la activación intracelular. El monofosfato de fluorodesoxiuridina (FdUMP), el trifosfato de fluorodesoxiuridina (FdUTP) y el trifosfato de fluorouridina (FUTP) son todos los metabolitos activos finales del 5-FU que se producen después del transporte activo del 5-FU a las células por el sistema de transporte de uracilo además de las rutas pasivas paracelular y transcelular y también de difusión pasiva. Cada uno de estos metabolitos impide el crecimiento celular de una manera específica. FdUMP inhibe la TS, lo que provoca daños indirectos en el ADN por desequilibrios de desoxinucleótidos y niveles elevados de trifosfato de desoxiuridina. Sin embargo, FdUTP daña el ADN directamente al incorporarse incorrectamente en él.

Además, (Yang y Pan, 2015) han demostrado que el tratamiento de células de cáncer gástrico humano con 5-FU resultó en la inhibición de la proliferación celular a través del proceso autofágico resultante de la supresión de miR-30 relacionada con 5-FU y la regulación positiva de Beclin-1. (Focaccetti et al., 2015) mostraron claros signos de autofagia junto con un aumento significativo de la apoptosis en células endoteliales y cardiomiocitos tras el tratamiento con 5-FU. Curiosamente, más recientemente se propone la autofagia como una forma potencial de resistencia adquirida de las células tumorales hacia el 5-FU.

## Vía catabólica y anabólica de transformación del 5-fluorouracilo

5-FU es un análogo de uracilo con un átomo de flúor en la posición C-5. Después de la administración intravenosa de 5-FU, este medicamento puede ingresar rápidamente a las células objetivo utilizando el mismo mecanismo de transporte que el uracilo. El 5-FU puede transformarse en los siguientes metabolitos activos en las células diana: 1) trifosfato de fluorodesoxiuridina (FdUTP) que podría combinarse en ADN en lugar de trifosfato de desoxitimidina (dTTP); 2) trifosfato de fluorouridina (FUTP) que podría combinarse en ARN en lugar de trifosfato de uridina (UTP). FUTP altera la función y el procesamiento del ARN, y FdUTP y FdUMP pueden inducir daños en el ADN. Ambos procedimientos tienen un profundo efecto sobre el ARN y el ADN que desencadenan la muerte celular en las células tumorales; y 3) FdUMP suprime la función de la timidilato sintasa (TS) en el complejo ternario. La administración oral de 5-FU en forma de profármacos de 5-FU (FP orales) podría dar como resultado una biodisponibilidad imperfecta y desordenada debido a la variación en la función de DPYD. Por lo tanto, se correlaciona con niveles impredecibles de 5-FU en el plasma debido a la notable mutabilidad intra e inter paciente en su adsorción/ eliminación (Longley et al., 2003)

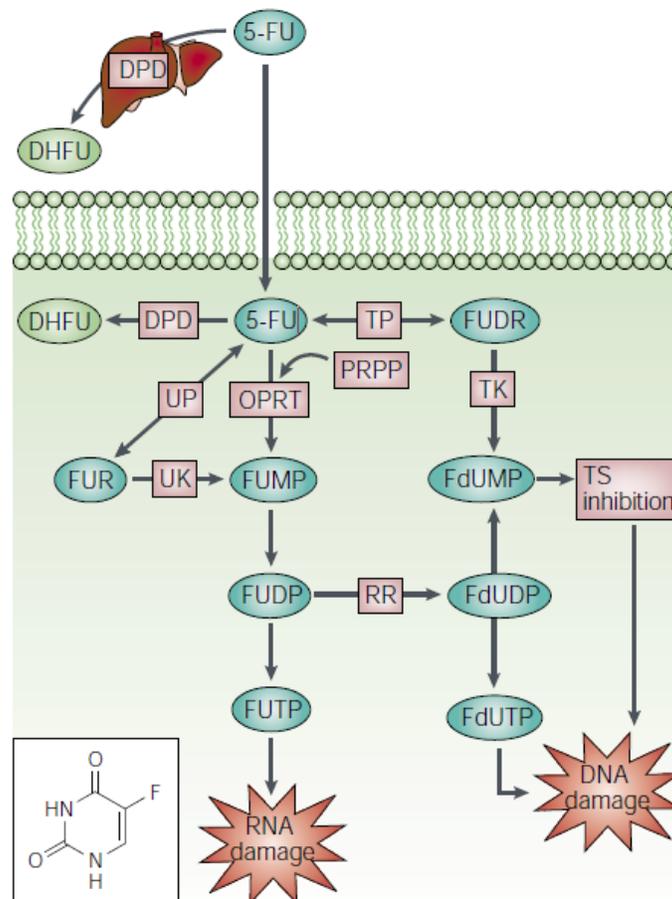


Figura 8. Metabolismo del 5-FU. Adaptado de "5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies." [Ilustración] por Longley, D. B., Harkin, D. P., y Johnston, P. G. (2003). 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 330–338. <https://doi.org/doi:10.1038/nrc1074>

# CAPÍTULO 2

## Planteamiento del problema

Se ha estimado que el cáncer bucal se ubica en el mundo entre el lugar seis respecto a las neoplasias malignas (Tolossa et al., 2021). Entre los tipos de neoplasias malignas que afectan la región de cabeza y cuello, el cáncer oral de células escamosas (COCE) representa el 90-95%. El linfoma es la segunda neoplasia más común de cabeza y cuello después del carcinoma de células escamosas. En México el cáncer oral se ha incrementado en las últimas décadas y se registran entre el 1 y el 5% su incidencia. El cáncer oral es definido por Organización Mundial de la Salud como la neoplasia epitelial invasiva con diferentes grados de diferenciación y con alta posibilidad de metastatizar a los ganglios linfáticos en estadio temprano, se presenta con mayor frecuencia entre los 5ta y la 6ta década de vida. En 2020, Globocan informó que existen 186 746 casos nuevos de cáncer, de los cuales 4 052 corresponden a cáncer oral, con 586 muertes asociadas; la Secretaria de Salud informó que el registro histopatológico de tumores de labio, cavidad bucal y la faringe en el 2006 sumaron 1 369, mostrando así un aumento en la frecuencia de este tipo de cáncer. En México, entre 1979 y 2003, el número de muertes relacionadas con el cáncer oral fue de 15 579, y actualmente es considerado un problema de salud pública (Torres et al., 2020).

La nanotecnología es la ciencia que se encarga del estudio de materiales con dimensiones de 1 a 100 nanómetros (nm). En el área de la medicina, se ha investigado el uso de múltiples NP's como acarreadoras para liberación de fármacos, para tratamiento del cáncer, detección, diagnóstico y otros tratamientos terapéuticos. Específicamente, las NP's  $\text{TiO}_2$  se han utilizado como un potencial agente fotosensibilizador en terapia fotodinámica. Un aspecto que debe tomarse en consideración es que las NP's poseen un tamaño diminuto, el cual facilita su incorporación a las células por vía de endocitosis y una vez que las NP's han traspasado la membrana, pueden afectar las funciones celulares e inducir la muerte (Argueta-Figueroa et al., 2018).

En el campo odontológico, la utilización de las NP's ha adquirido un gran potencial para el desarrollo de nuevos materiales como los de biomecánica de restauración, sustancias para facilitar la irrigación de conductos, implantes dentales compatibles con el organismo, debido a sus propiedades antibacteriales y terapéuticas (Argueta-Figueroa et al., 2018).

El 5-fluorouracilo (5-FU) se ha utilizado para los tratamientos del carcinoma oral de cabeza y cuello y la adquisición de resistencia por parte de este es el principal problema para el éxito en el tratamiento del cáncer oral (Fatemeh et al., 2021).

Es por esto, que en este estudio se evaluará la acción citotóxica del 5-fluorouracilo (5-FU) incorporado a las NP's de  $\text{TiO}_2$  en una línea celular de cáncer oral de origen linfoide.

## Pregunta de investigación

¿El agente antitumoral 5-fluorouracilo (5-FU) agregado a nanopartículas de TiO<sub>2</sub> incrementara el efecto anticancerígeno en una línea celular de cáncer oral de origen linfoide?

## Justificación

El cáncer es un problema de salud mundial responsable de una de cada seis muertes en todo el mundo (Tolossa et al., 2021). La revisión de la base de datos de Globocan proporciona una imagen mundial de las incidencias de cáncer oral, en cuanto a México se estima que en 2020 se presentaron 4 052 nuevos casos de cáncer en la región de labios y cavidad oral con una mortalidad de 586 casos (Torres et al., 2020).

El tratamiento del cáncer ha sido un proceso muy complejo. Se han utilizado enfoques de tratamiento convencionales, como la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia, mientras que en los últimos tiempos se están logrando avances significativos, que incluyen la terapia dirigida, las nanopartículas entre otras (Tolossa et al., 2021).

Los avances recientes en la comprensión de la quimioterapia han producido nuevas estrategias para el uso de agentes quimioterapéuticos en un papel principal, algunos estudios sugieren que en el 40% de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello, incluido el cáncer oral, la quimioterapia seguida de radioterapia era comparable a la cirugía y radioterapia.

Aunque se cree que el tratamiento estándar para el cáncer oral es una operación quirúrgica, a menudo seleccionamos quimioterapia para pacientes con cáncer oral avanzado o recurrente (Fatemeh et al., 2021).

Entre los fármacos contra el cáncer, el 5-fluorouracilo (5-FU) es un fármaco básico para los cánceres de los órganos digestivos, incluido el cáncer de cabeza y cuello, y tiene una amplia aplicación clínica. Después del descubrimiento del 5-FU por Heidelberger en 1957, el 5-FU se ha utilizado durante más de 50 años (Harada et al., 2014). Sin embargo, la resistencia al 5-FU es un problema importante para el éxito del tratamiento del cáncer, y el mecanismo de la resistencia al 5-FU en los cánceres aún no está claro (Fatemeh et al., 2021).

Por tanto, se desean nuevas estrategias terapéuticas adyuvantes, como las derivadas de la nanomedicina. Las nanopartículas (NP's) han recibido una atención considerable para la terapia del cáncer debido a sus propiedades fisicoquímicas únicas en el tamaño de nanoescala (1–100 nm), que les permiten penetrar la membrana celular y localizarse en sitios tumorales más altos que los medicamentos de rutina.

Las NP's de TiO<sub>2</sub> mostraron actividades antitumorales en varios modelos *in vitro* e *in vivo* de cánceres, mediando mecánicamente la inducción de la respuesta al estrés oxidativo y el daño del ADN, lo que conduce a la activación de vías de muerte celular apoptótica y/o necrótica (Azimeea et al., 2020).

## Objetivos

### Objetivo general

Identificar el efecto anticancerígeno del agente antitumoral 5-fluorouracilo (5-FU) agregado con nanopartículas de TiO<sub>2</sub>, su acción citotóxica y potencialización frente a una línea celular de cáncer oral de origen linfoide.

### Objetivos específicos

1. Sintetizar y funcionalizar NP's TiO<sub>2</sub>-APTES.
2. Caracterizar las NP's TiO<sub>2</sub>.
3. Incorporar 5-FU a la solución de NP's TiO<sub>2</sub>-APTES.
4. Analizar la liberación de NP's de TiO<sub>2</sub> cargadas con 5-FU en diferentes pH 7.4, 6.5 y 5.5.
5. Establecer un co-cultivo celular.
6. Evaluar el crecimiento celular y la citotoxicidad

## Hipótesis

### Hipótesis de investigación

La adición de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> al agente antitumoral 5-FU incrementará sus propiedades anticancerígenas en una línea celular de cáncer oral de origen linfoide.

### Hipótesis nula

La adición de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> al agente antitumoral 5-FU no incrementará sus propiedades anticancerígenas en una línea celular de cáncer oral de origen linfoide.

# CAPÍTULO 3

## MARCO METODOLOGICO

Tipo de estudio: Experimental *in vitro*.

Diseño de estudio: Puro, descriptivo, prospectivo.

### Universo de estudio/ muestra

#### Universo de estudio:

1. 5-FU con nanopartículas de TiO<sub>2</sub>.
2. Agente antitumoral 5-FU.
3. Número de células de fibroblastos gingivales humanos (HGF) cultivados.
4. Número de células de cáncer oral de origen linfocítico cultivadas.

Muestra: No probabilístico.

Tamaño de muestra. Triplicado de experimentos independientes (n=9).

### Criterio de selección de la muestra

#### Criterios de inclusión

Nanopartículas de TiO<sub>2</sub> en fase anatasa.

Nanopartículas de TiO<sub>2</sub> con un tamaño  $\leq 25$  nm.

HGF con una densidad celular mínima de  $1 \times 10^4$  cel/mL.

#### Criterios de exclusión

Muestras en las que la funcionalización no se llevó a cabo adecuadamente.

HGF con más de 15 divisiones celulares.

#### Criterios de eliminación

Cultivos celulares contaminados.

Muestras de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> contaminadas.

Muestras de 5-FU contaminadas.

Nanopartículas  $\geq 25$  nm.

## Variables de estudio

### Variables dependientes

| Variable           | Definición conceptual   | Definición operacional  | Tipo de variable | Escala de medición          |
|--------------------|---|---|------------------|-----------------------------|
| Tumoración         | Células del cuerpo que se multiplican sin control y se diseminan a otras partes del cuerpo formando bultos de tejido. | Las células se visualizaron al microscopio y se contaron utilizando una placa por cuadrante de manera manual. | Cuantitativa.    | De razón de viabilidad (%). |
| Efecto antitumoral | Relacionado con lo que impide el crecimiento anormal de las células.  | Se evaluó ensayo MTT por contacto directo e indirecto de viabilidad celular según la norma ISO 10993 a 24 h.  | Cuantitativa.    | De razón Viabilidad (%).    |
| Liberación         | Proceso mediante cual el principio activo presente en una forma farmacéutica queda libre para ser absorbido.          | Se evaluó mediante el uso de espectrofotometría   | Cuantitativa     | De razón Absorbancia.       |
| Citotoxicidad      | El número de células sanas en una muestra determina la cantidad de células que están vivas o muertas basándose en     | Se evaluó ensayo MTT por contacto directo e indirecto de viabilidad celular según la norma ISO 10993 a 24 h.  | Cuantitativa.    | De razón Viabilidad (%).    |

|  |                              |  |  |  |
|--|------------------------------|--|--|--|
|  | la muestra total de células. |  |  |  |
|--|------------------------------|--|--|--|

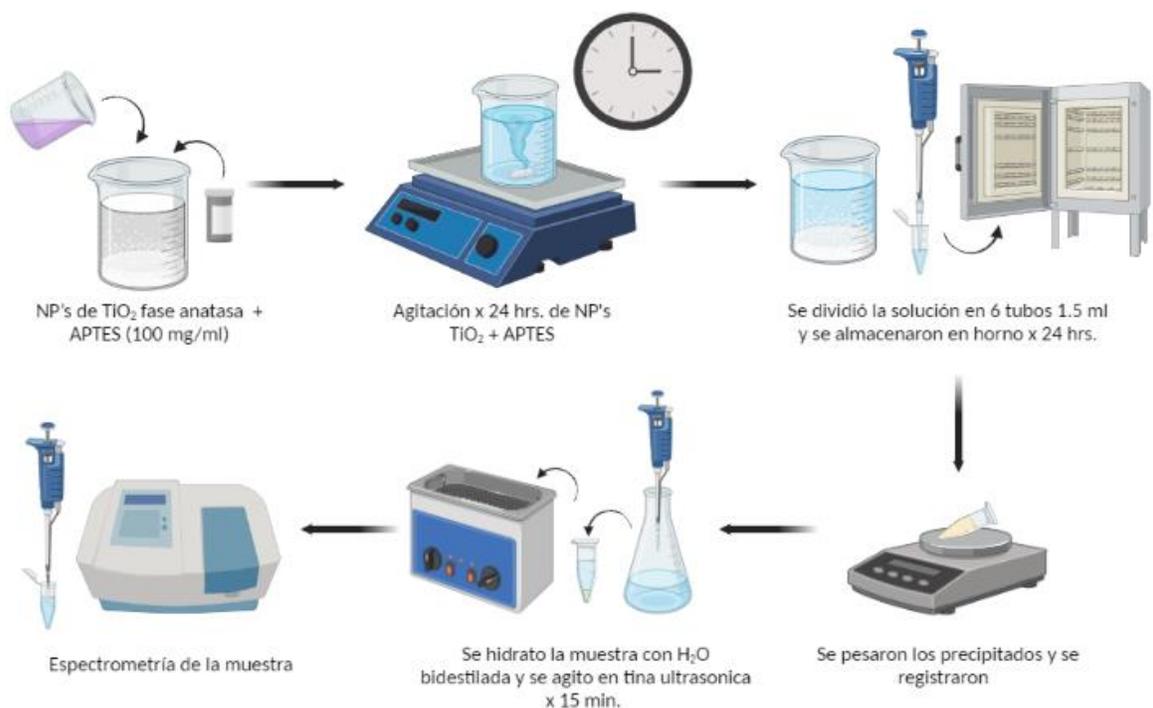
**Variables independientes**

| Variable      | Definición conceptual  | Definición operacional  | Tipo de variable | Escala de medición       |
|---------------|--|---|------------------|--------------------------|
| Concentración | La cantidad de un producto o de una sustancia química presente en una cantidad dada de suelo, agua, aire o cualquier otro medio. | Masa de soluto (g) / Volumen de disolución (L)(Es decir, gramos de soluto por litro de disolución). | Cuantitativa.    | De razón<br>Absorbancia. |

# DISEÑO EXPERIMENTAL Y DESARROLLO DE LA METODOLOGIA

## Síntesis y funcionalización de NP's $\text{TiO}_2$ -APTES

Se mezcló solución acuosa de 3-Aminopropyl triethoxysilane (APTES) (10 mL) con NP's  $\text{TiO}_2$  (1 gr) bajo agitación magnética. El color de la solución se volvió blanco. A continuación, la solución se agitó vigorosamente durante 24 h., posteriormente la solución se dividió en 6 tubos con 1.5 mL de solución y estos se dejaron en el horno a temperatura de 45 °C durante 24 h. para eliminar el exceso de agua. El peso de los precipitados recolectados se registró y se midió la pureza de las NP's en esta fase añadiendo agua destilada (1.5 mL) a cada tubo y agitando mediante la tina ultrasónica durante 15 minutos. Para el estudio de absorbancia se tomó una muestra de la disolución de las NP's de  $\text{TiO}_2$  (350 nm) se midió utilizando un lector (Thermo Scientific®, Finlandia).



Created in BioRender.com

Figura 9. Funcionalización de las NP's de  $\text{TiO}_2$ . Autoría propia (2023) creado en BioRender.com

## Caracterización de las NP's de TiO<sub>2</sub>

Se utilizaron NP's de TiO<sub>2</sub> fase Anatasa (99.7% anatasa; 0–25 nm) Aldrich Chemistry, Inc. La morfología y el tamaño de las NP's fueron determinados por microscopía electrónica de transmisión (TEM) con mapeo elemental (EDAX). Se preparó una solución de NP's de TiO<sub>2</sub> con (3-Aminopropyl) triethoxysilane (APTES) (100 mg/mL). La absorbancia de las NP's de TiO<sub>2</sub> (350 nm) en APTES se midió utilizando un lector (Thermo Scientific®, Finlandia). Todas las medidas se realizaron a temperatura ambiente.

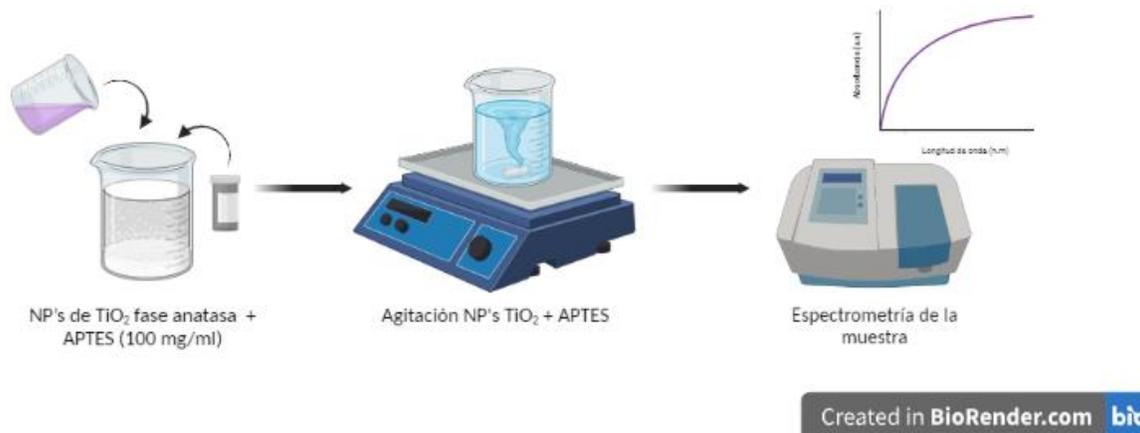


Figura 10. Caracterización de las NP's de TiO<sub>2</sub>. Autoría propia (2023) creado en BioRender.com

## Carga de NP's TiO<sub>2</sub>-APTES a la solución de 5-FU

Las NP's TiO<sub>2</sub>-APTES (100 mg/mL) se cargaron a través de interacciones electrostáticas entre cargas catiónicas APTES y aniónicas 5-FU. Se realizó sumergiendo NP's TiO<sub>2</sub>-APTES en una solución concentrada del fármaco 5-FU (3 mg/mL) a temperatura ambiente durante 24 h. para asegurar la difusión de las moléculas del fármaco en los poros. A intervalos de tiempo de 0, 1, 3, 5, 7, 24, 26 y 30 h., se extrajo 0.5 mL de la solución, se centrifugó y recolectó el sobrenadante para análisis UV-Vis (Thermo Scientific®, Finlandia) a una longitud de onda de 266 nm mientras que el precipitado de 5-FU cargado con NP's TiO<sub>2</sub>-APTES se volvió a colocar en el compuesto. La carga de TiO<sub>2</sub> en el 5-FU se calculó restando la cantidad de 5-FU en el sobrenadante de la cantidad en la carga de fármaco original solución.

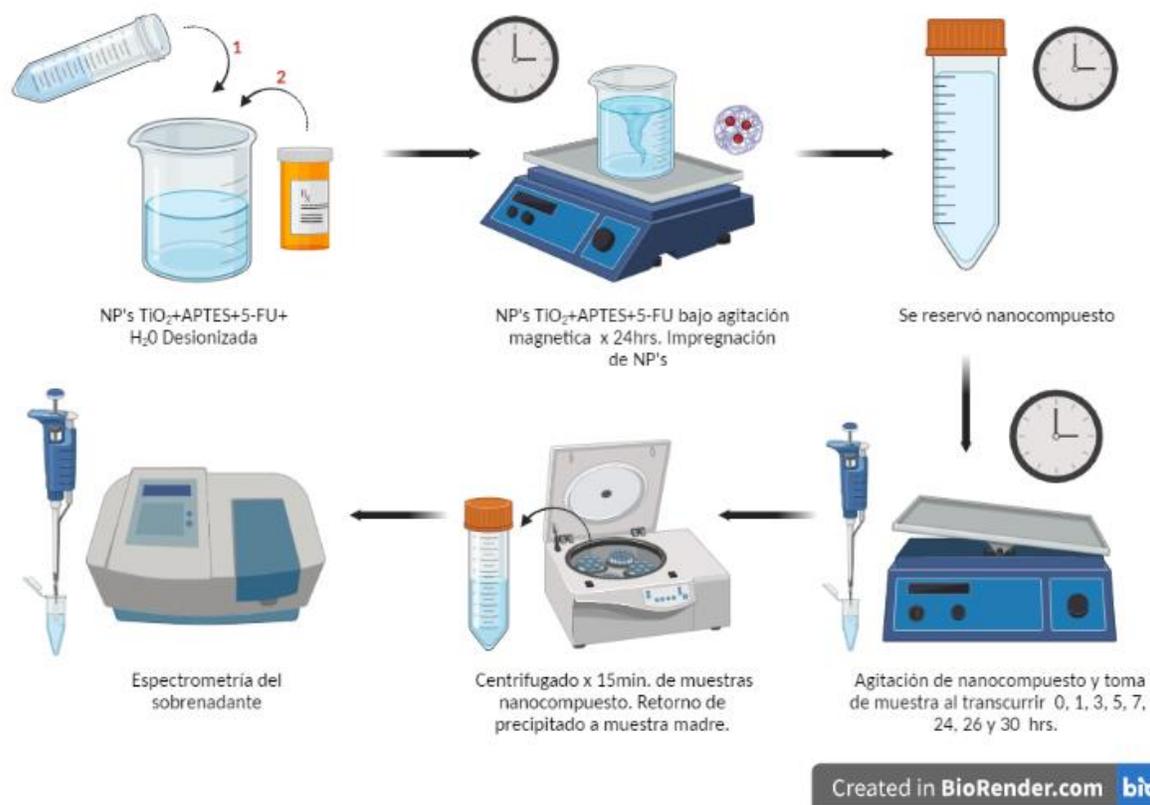
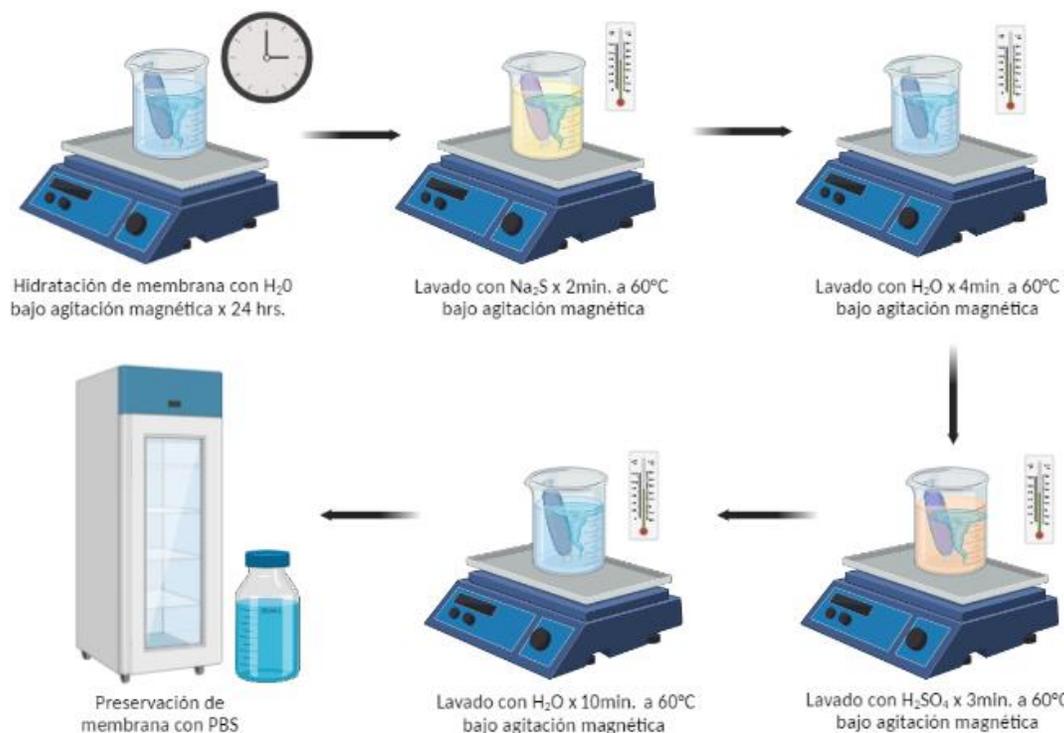


Figura 11. Carga de NP's  $\text{TiO}_2$ -APTES-5-FU. Autoría propia (2023) creado en BioRender.com

## Protocolo de preparación de la membrana para diálisis de celuloide

Se utilizó tubo de membrana para diálisis de celuloide Aldrich Chemistry, Inc., un aproximado de 60 cm. La remoción del glicerol incluido como humectante se logró lavando con agua destilada (30 mL aproximadamente) durante 24 horas en agitación magnética. El proceso dio como resultado la presencia de sales de sulfato residuales en el rango de ppm. La eliminación de las sales de sulfato se logró tratando la membrana con una solución de sulfuro de sodio al 0,6% (p/v); (0.6g) en 200 mL de agua destilada a 60 °C durante 2 minutos en agitación magnética. Posteriormente se lavó con agua caliente (60 °C) durante 4 minutos, seguido de la acidificación con una solución al 0,4% (v/v) de ácido sulfúrico; (400  $\mu\text{L}$ ) en 200 mL de agua destilada durante 3 minutos en agitación magnética, luego se realizó un enjuague con agua caliente (60 °C) para eliminar el ácido durante 10 minutos. La membrana se preservó en 100 mL de PBS estéril hasta el momento de uso.

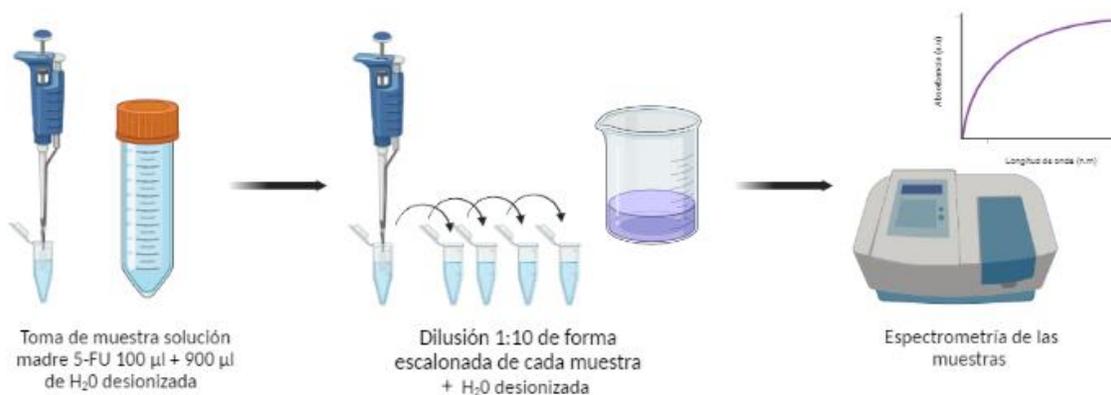


Created in BioRender.com **bio**

Figura 12. Protocolo de preparación de membrana para diálisis de celuloide. Autoría propia (2023) creado en BioRender.com

## Protocolo curva estándar 5-FU

Se realizó tomando una muestra inicial de 100  $\mu$ L de la solución madre de 5-FU 3 mg/mL la cual fue diluida con 900  $\mu$ L de agua desionizada. Posteriormente se realizó una serie de soluciones 1:10 para obtener concentraciones de 0.3; 0.03; 0.003; 0.0003 las cuales fueron analizadas con rayos UV-Vis utilizando el espectrofotómetro (Thermo Scientific®, Finlandia) a una longitud de onda de 266 nm.



Created in BioRender.com **bio**

Figura 13. Protocolo curva estándar 5-FU. Autoría propia (2023) creado en BioRender.com

## Protocolo de liberación de 5-FU cargado con NP's de TiO<sub>2</sub> en diferentes pH 7.4, 6.5 y 5.5

El efecto del pH sobre la eficiencia de retención de 5-FU fue evaluado ajustando el pH de PBS (18 mL) a 7.4, 6.5, 5.5 utilizando HCl 1 N o NaOH 1 N. Las mezclas se dejaron en refrigeración hasta el momento de uso. Se añadieron 10 mL de la muestra de PBS con pH de 7.4, 6.5 y 5.5 en tubos de 15 mL de capacidad, dentro de este se añadió una membrana de diálisis de aproximadamente 5 cm con la mezcla de 5-FU cargado con NP's de TiO<sub>2</sub> (1.5 mL) dejándose en agitación angular a velocidad de 80 rpm. A intervalos de tiempo de 1, 3, 5, 7, 22, 24, 48 y 50 horas, se extrajo 1 mL de muestra y posteriormente se añadió 1 mL de la solución de PBS a diferentes concentraciones de pH 7.4, 6.5 y 5.5 como ya fue descrito.

Con las muestras tomadas se realizaron diluciones que consistieron en 2 mL de agua desionizada junto con 1 mL de muestra y posteriormente en la cubeta de espectrofotometría se colocó 0.5 mL de la disolución creada junto con 2.5 mL de agua desionizada. Este procedimiento se realizó a los 8 tubos de muestras para las diferentes concentraciones de pH 7.4, 6.5, 5.5.

Las muestras fueron analizadas con rayos UV-Vis utilizando el espectrofotómetro (Thermo Scientific®, Finlandia) a una longitud de onda de 266 nm.

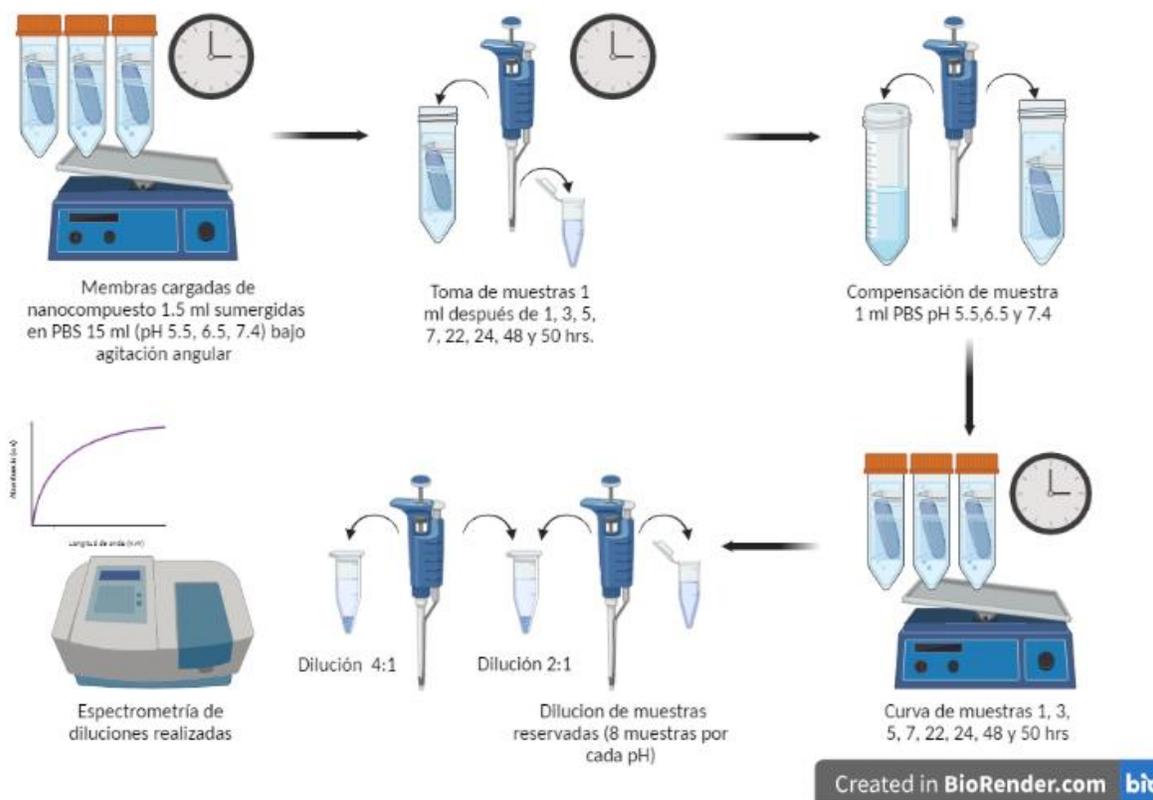
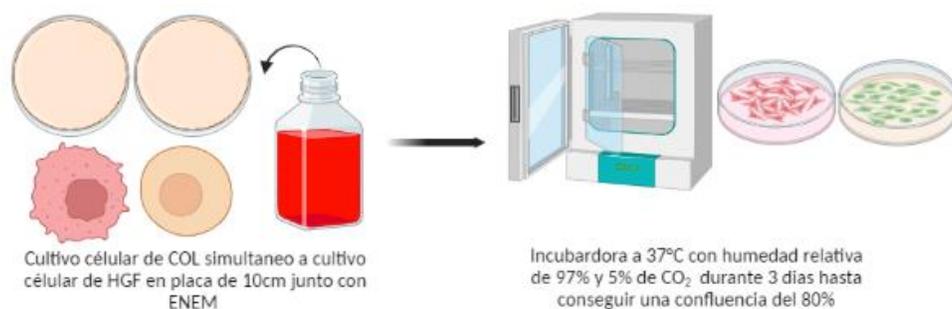


Figura 14. Protocolo de liberación de nanoportador en diferentes pH 7.4, 6.5 y 5.5. Autoría propia (2023) creado en BioRender.com

## Protocolo de Cultivo celular

La línea celular cáncer oral de origen linfoide se cultivó en placa de 10cm (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, EE. UU.) junto con medio EMEM suplementado con suero fetal bovino (10%, v/v, FBS, Gibco®), glutamina (1%, v/v, Glutamax, Gibco®) y antibióticos (100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin, Sigma-Aldrich) a 37°C y en condiciones de humedad relativa de 97% con 5% de CO<sub>2</sub> (Binder, Tuttlingen, Alemania) durante 3 días hasta que se obtuvo una monocapa celular del 80%. Simultáneamente se realizó un cultivo de una línea celular de fibroblastos gingivales humanos (HGF) en placa de 10cm (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, EE. UU.) medio EMEM suplementado con suero fetal bovino (10%, v/v, FBS, Gibco®), glutamina (1%, v/v, Glutamax, Gibco®) y antibióticos (100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin, Sigma-Aldrich) a 37 °C y en condiciones de humedad relativa de 97% con 5% de CO<sub>2</sub> (Binder, Tuttlingen, Alemania) durante 3 días hasta que se obtuvo una monocapa celular del 80%.

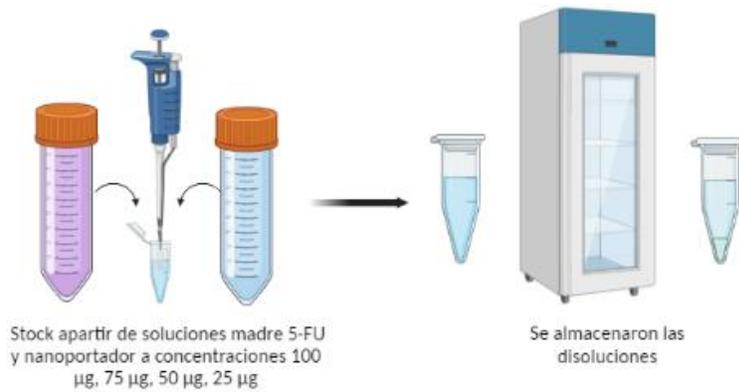


Created in BioRender.com 

Figura 15. Protocolo de Cultivo celular. Autoría propia (2023) creado en BioRender.com

## Preparación de stock de 5-FU y nanoportador

Se preparó un stock a partir de la solución madre de 5-FU (3 mg/ml) así como del nanoportador (5-FU- NP's TiO<sub>2</sub>-APTES 10 mg/ml) bajo las siguientes concentraciones de cada uno 100 µg, 75 µg, 50 µg, 25 µg. El stock 500 µL (+ 0.50 µL) de la solución que se realizó cumple con la cantidad necesaria para abarcar 9 pocillos en la cual se agregaron 0.50 µL de esta.

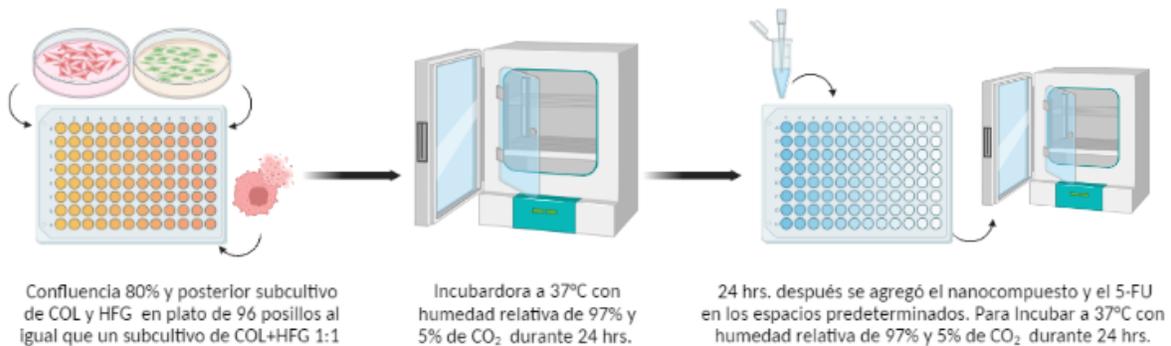


Created in BioRender.com **bio**

Figura 16. Preparación de stock de 5-FU y nanoportador. Autoría propia (2023) creado en BioRender.com

## Subcultivo, cocultivo celular y tratamiento

Una vez que la confluencia de nuestros cultivos realizados alcanzó un 80% y una densidad promedio de  $2.8 \times 10^5$  cél/mL para cáncer oral de origen linfóide y de  $3.2 \times 10^5$  cél/mL para HGF se procedió a realizar un subcultivo estas células de igual manera se preparó un cocultivo de CO-HGF 1:1 aproximadamente. Los subcultivos se realizaron bajo flujo laminar (Lumistell®) aspirando el medio de cultivo del plato gentilmente hasta eliminar los excesos una vez realizado esto se lavó dos veces utilizando PBS 3 mL. Para el desprendimiento de las células fueron lavadas con tripsina 0.5 mL, EDTA-2Na al 0,05% (Sigma-Aldrich). Posteriormente se inactivó la tripsina utilizando 1 mL de medio de cultivo una vez inactivado se realizó el subcultivo celular de cáncer oral de origen linfóide y HGF junto con el cocultivo CO- HGF en una placa de 96 pocillos ocupando los espacios como se muestra (imagen 1). Una vez realizado lo anterior se dejó la placa de 96 pocillos en la incubadora a 37°C y en condiciones de humedad relativa de 97% con 5% de CO<sub>2</sub> (Binder, Tuttlingen, Alemania) durante 24 horas. Al haber transcurrido 24 h. se añadió la cantidad de nanoportador y 5-FU necesarios en los espacios como se muestra (imagen 1) preservando en la incubadora a 37°C y en condiciones de humedad relativa de 97% con 5% de CO<sub>2</sub> (Binder, Tuttlingen, Alemania) durante 24 h.



Created in BioRender.com **bio**

Figura 17. Protocolo de Cultivo celular y tratamiento. Autoría propia (2023) creado en BioRender.com

|          | 1 | 2                 | 3 | 4 | 5                   | 6 | 7 | 8                 | 9 | 10 | 11                  | 12 |
|----------|---|-------------------|---|---|---------------------|---|---|-------------------|---|----|---------------------|----|
| <b>A</b> | ← | <b>HGF</b>        | → |   | 50 µg               |   |   | NP's<br>100<br>µg |   |    | 25 µg               |    |
| <b>B</b> |   | 5-FU<br>100<br>µg |   |   | 25 µg               |   |   | 75 µg             |   | ←  | <b>CO -<br/>HGF</b> | →  |
| <b>C</b> |   | 75 µg             |   | ← | <b>CO -<br/>HGF</b> | → |   | 50 µg             |   |    | NP's<br>100<br>µg   |    |
| <b>D</b> |   | 50 µg             |   |   | 5-FU<br>100<br>µg   |   |   | 25 µg             |   |    | 75 µg               |    |
| <b>E</b> |   | 25 µg             |   |   | 75 µg               |   | ← | <b>CO</b>         | → |    | 50 µg               |    |
| <b>F</b> | ← | <b>CO</b>         | → |   | 50 µg               |   |   | NP's<br>100<br>µg |   |    | 25 µg               |    |
| <b>G</b> |   | 5-FU<br>100<br>µg |   |   | 25 µg               |   |   | 75 µg             |   |    |                     |    |
| <b>H</b> |   | 75 µg             |   | ← | <b>HGF</b>          | → |   | 50 µg             |   |    |                     |    |

Imagen 1. Representación de la placa de 96 pocillos HGF: ocupa las primeras cuatro columnas de la placa y representa el control mientras que 5-FU 100 µg; representa el medicamento utilizado junto con la dosis asociada a este. De igual manera funciona para las siguientes tres dosis 75 µg; 50 µg; 25 µg. En este orden secuencial asociamos las cantidades de dosis administrada y el fármaco, así como la célula subcultivada para CO y para el cocultivo CO-HGF.

## Crecimiento celular y citotoxicidad

Después de haber pasado 24 horas la citotoxicidad celular se determinó mediante el ensayo de reducción del compuesto MTT. Se añadió MTT (0.2 mg/mL, bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difeniltetrazolio) a las células de control y tratadas y se dejó incubar (Binder, Tuttlingen, Alemania) durante 7 h. en condiciones de cultivo celular. El colorante de tetrazolio MTT se puede reducir a cristales de formazán azul púrpura en las células viables con lo cual se verificó usando un microscopio de luz invertida como se muestra en la fotografía 1. (-). El formazán fue disuelto con dimetilsulfóxido y analizado en un lector de microplaca (Thermo Scientific Fisher, Finlandia) a una longitud de onda de 570 nm.

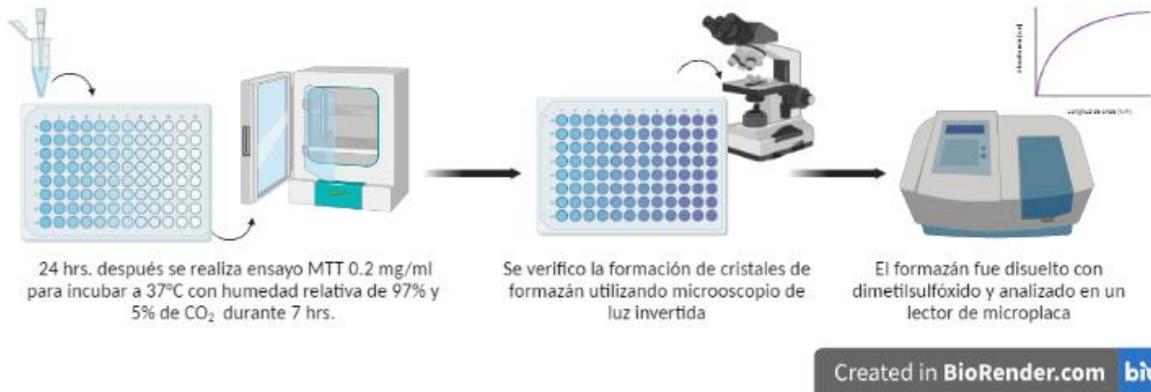
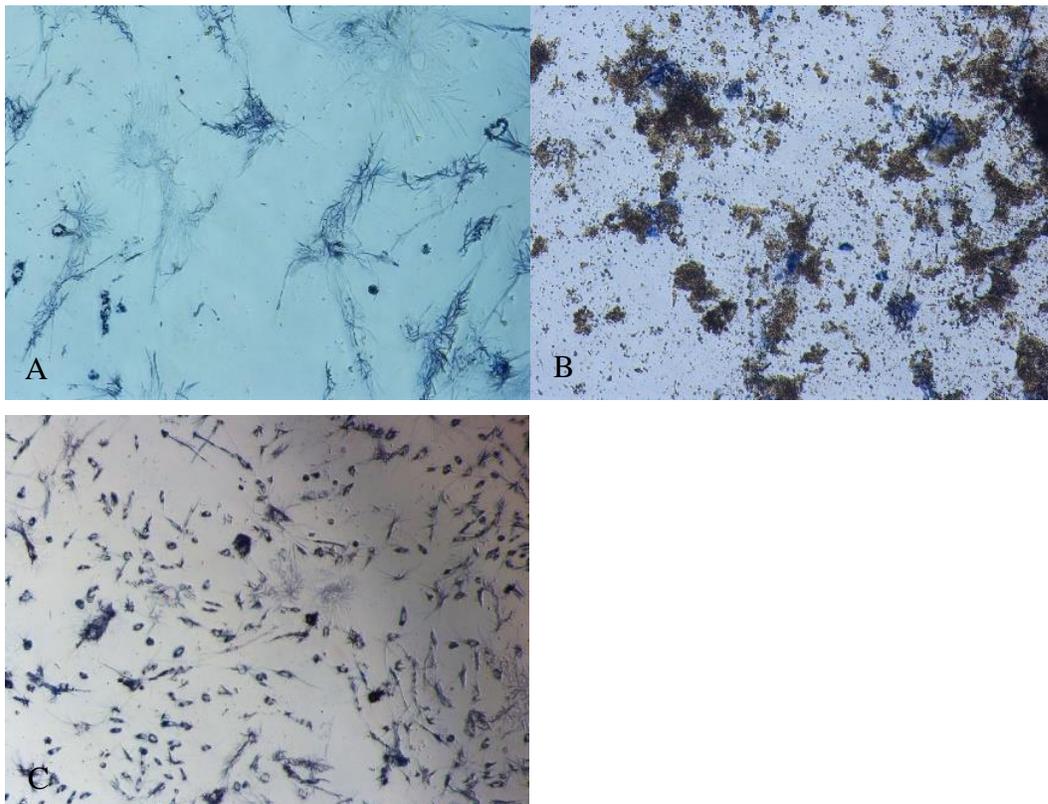


Figura 18. Crecimiento celular y citotoxicidad. Autoría propia (2023) creado en BioRender.com



Fotografía 1. A. Se observan células de CO tratadas con 5-FU lo que pareciera ser cristales de formazan son más visibles en este, B. para las células de CO tratadas con nanoportador la posible formación de cristales puede observarse en menor cantidad al igual que aglomerados del mismo, C. mientras que para el cocultivo CO-HGF tratado con el nanoportador podemos ver lo que podrían ser cristales de formazan en mayor número al igual que pequeños puntos de aglomerados de nanoportador..

## ANALISIS ESTADISTICO Y REPRESENTACION DE DATOS

El ensayo se realizó por triplicado en dos experimentos independientes ( $n=9$ ). Se calcularon porcentajes, promedio y desviación estándar. Los datos obtenidos fueron analizados con el programa Origin Pro. Los datos fueron representados con gráficas de polígonos de frecuencias.

# CAPÍTULO 4

## RESULTADOS

### Caracterización de NP's $\text{TiO}_2$ , 5-FU y nanocomposito 5-FU NP's $\text{TiO}_2$ Espectroscopia UV-Visible

Se caracterizaron las nanoparticulas de  $\text{TiO}_2$  obtenidas previamente, así como el nanocomposito y el 5-FU adquirido mediante espectrofotometria UV-Vis con el propósito de verificar la estabilidad de las nanoparticulas así como la pureza del medicamento 5-FU.

En la figura 19 podemos observar que para las nanoparticulas  $\text{TiO}_2$  (negro) presentan un punto máximo de absorción a una longitud de onda en 348 nm lo que nos indica que fue sintetizado a partir de una fase pura de  $\text{TiO}_2$  resultados que de acuerdo con (Vella Durai et al., 2021) las nanoparticulas de  $\text{TiO}_2$  en esta fase presentan un pico máximo de absorción a una longitud de onda similar al obtenido. Para el 5-FU (rojo) se mostró un pico máximo de absorción a 266 nm con alta absorbancia que presenta el anticancerígeno por si solo como expresa (Su et al., 2008) . En el caso del nanoportador, podemos ver una curva que presenta dos picos de absorción máxima a 271 nm lo que sugiere la presencia del medicamento 5-FU con un pequeño desplazamiento a 355 nm debido a que la absorbancia de las nanoparticulas es mayor indicando la existencia del  $\text{TiO}_2$ , con esto se confirma que el nanoportador cuenta con la presencia de NP's  $\text{TiO}_2$  y 5-FU al igual que los resultados obtenidos por (Su et al., 2008) ya que reporta resultados similares.

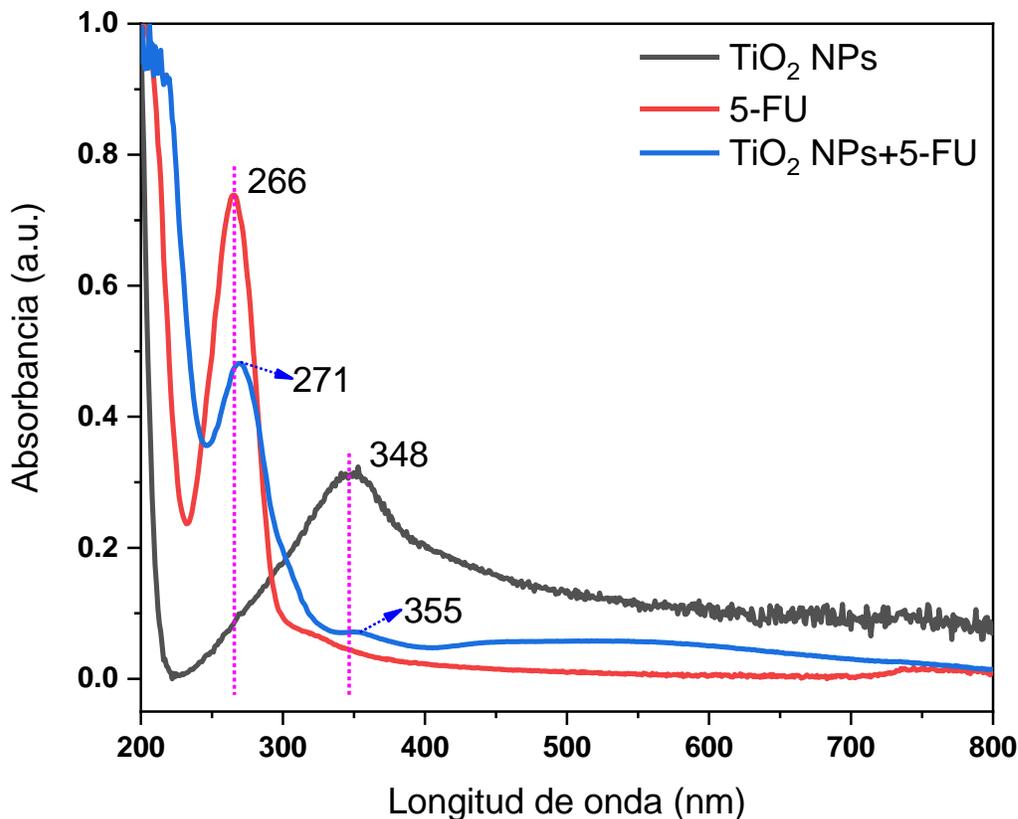


Figura 19. Espectro UV- Vis. (Negro) NP's  $\text{TiO}_2$ ; (rojo) 5-FU; (azul) NP's  $\text{TiO}_2$ -5-FU.

## Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia por transformada de Fourier se utilizó para determinar los grupos funcionales que están presentes en el nanoportador y 5-FU, y corroborar la formación del nanocomposito 5-FU-NP's.

La figura 20 muestra el espectro FTIR de las nanoparticulas  $\text{TiO}_2$  junto con el APTES (negro) con una banda de vibración de estiramiento a  $1510\text{ cm}^{-1}$  que corresponde al grupo amina  $\text{N-H}_3$  perteneciente al APTES, también muestra una banda de vibración asimétrica a  $1470\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento asimétrico del  $\text{Ti-O-Ti}$ . En el caso del nanoportador (rojo), se muestra una banda ancha de vibración simétrica y asimétrica de los grupos de  $\text{N-H}$  del 5-FU que va desde  $3388\text{ cm}^{-1}$  a  $3450\text{ cm}^{-1}$ . Se puede visualizar una segunda banda de estiramiento simétrica a  $1632\text{ cm}^{-1}$  perteneciente al grupo  $\text{N-H}$ , también se observa que las vibraciones pertenecientes a  $\text{Ti-O-Ti}$  y de APTES no se presentan lo que confirma claramente que la conjugación del 5-FU cubriendo la nanopartícula por completo (Vella Durai et al., 2021).

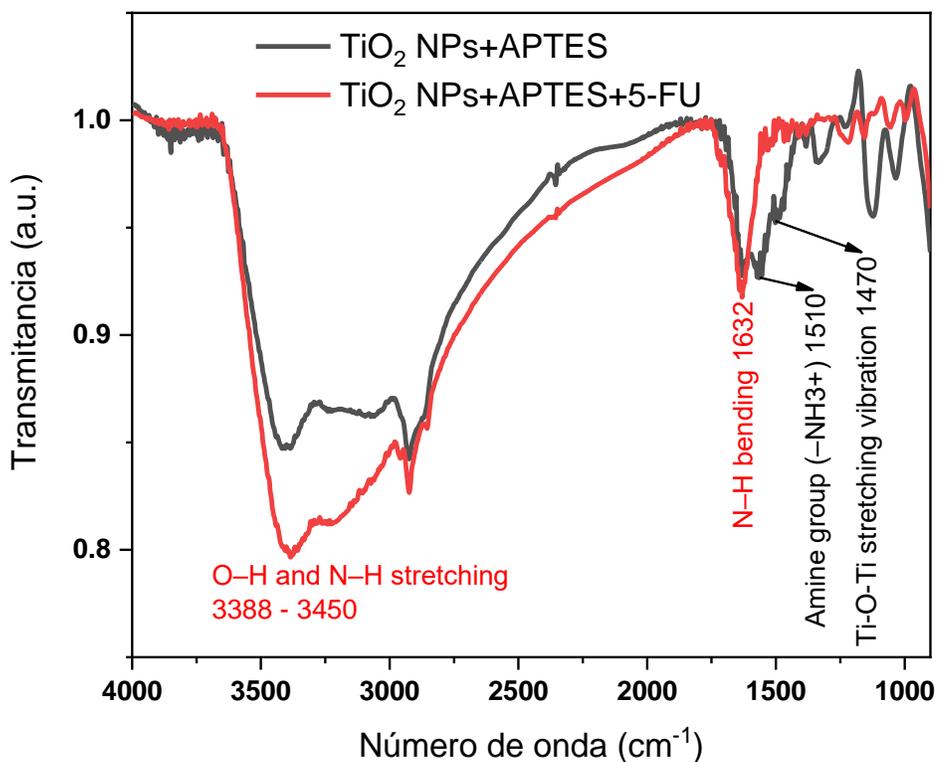


Figura 20. Espectro FTIR. (Negro) NP's  $\text{TiO}_2$ - APTES; (rojo) nanocompuesto NP's  $\text{TiO}_2$ - 5-FU.

## Microscopía electrónica de transmisión (TEM) con mapeo elemental (EDAX)

Las siguientes micrografías de transmisión electrónica (figura 21, “imágenes procesadas con ImageJ”) confirmaron el tamaño y morfología de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$ . Podemos observar en la figura 21a una aglomeración de nanopartículas con un diámetro aproximado de 200 nm. En la figura 21b podemos observar a 50 nm de diámetro que las nanopartículas comienzan mostrar una morfología más clara. Se observan nanopartículas en figura 21c de morfología aparentemente esférica y con un tamaño dentro del rango de 20-25 nm.

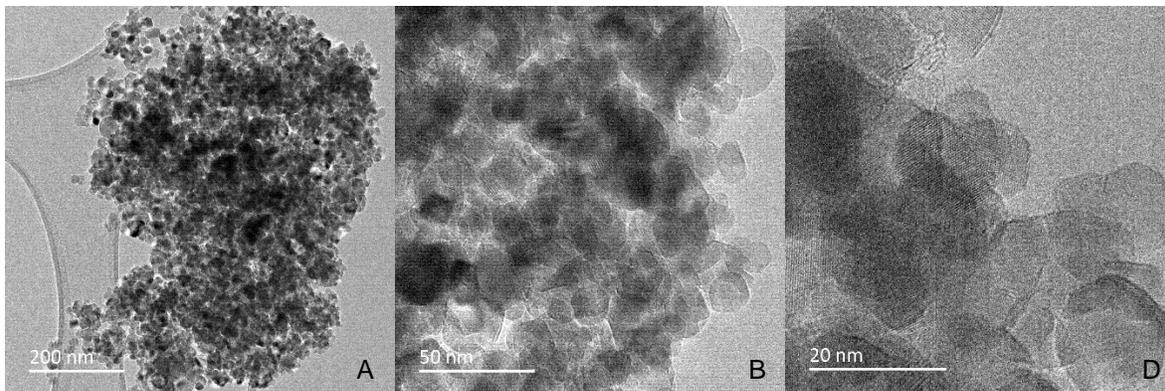


Figura 21. Fotografías TEM de las muestras NP's  $\text{TiO}_2$  tomadas. (a) Aglomeración de NP's de diámetro 200 nm; (b) a los 50 nm de podemos comenzar a diferenciar su morfología con mayor definición; (c) denotamos una su morfología esférica de un tamaño aproximado de 20-25 nm, imágenes procesadas en <https://imagej.net/ij/>.

El análisis de composición elemental superficial fue realizado mediante EDAX figura 22a confirma las cantidades estequiométricas de Ti y O en  $\text{TiO}_2$ . La composición elemental mostró la presencia de los elementos Ti y O. Los picos adicionales para el Cu, son debido a que se usó una rejilla de cobre. La distancia entre dos planos reticulares adyacentes coincidía con el plano de reflexión (101) el cual nos indica la morfología cristalográfica del  $\text{TiO}_2$  en su estado anatasa figura 22b.

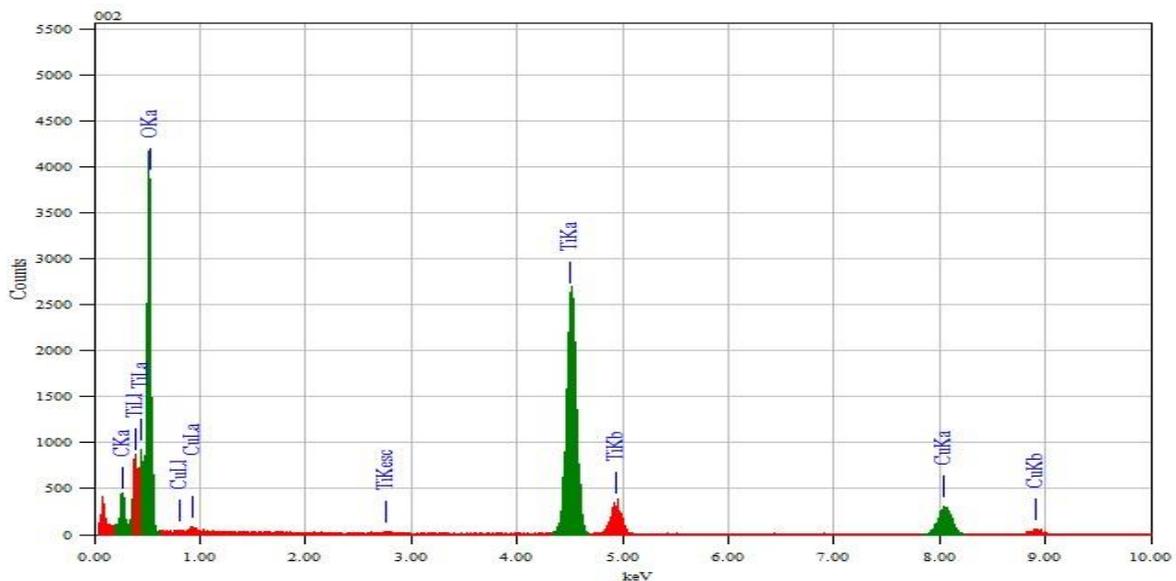


Figura 22 (a). Mapeo de NP's de TiO<sub>2</sub>.

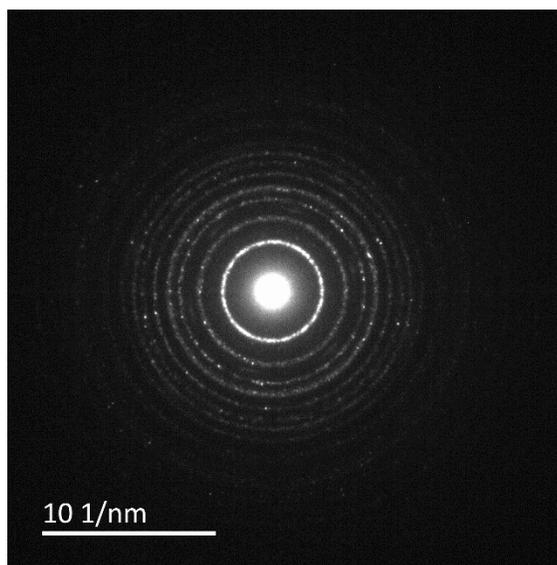


Figura 22 (b). Imagen EDAX de NP's TiO<sub>2</sub> en fase anatasa.

## Curva estándar de 5-FU espectrografía UV- Vis

Las muestras estándar se prepararon a partir de la solución madre (3 mg/mL) agregando un volumen apropiado de agua destilada para hacer varias muestras estándar (6.25 - 100 µg/mL). Se construyó una curva de calibración utilizando 260 nm para análisis UV- Vis. figura 23. La curva de calibración se construyó trazando el área del pico frente a cada concentración de 5-FU para las cinco soluciones estándar en agua. En las condiciones experimentales descritas anteriormente, se encontró una correlación lineal entre el área del pico y la concentración aplicada en el rango de 6.25 a 100 µg/mL.

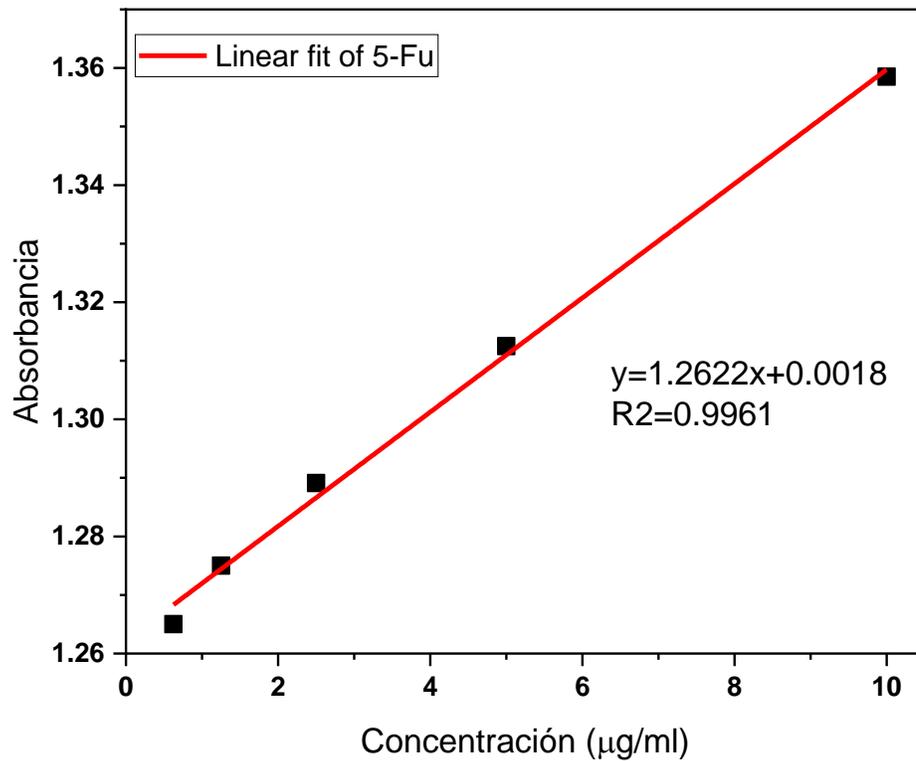


Figura 23. Espectro UV- Vis. Curva de calibración de 5-FU 266 nm para las diferentes concentraciones de 6.25- 100µg/ml.

### Liberación de fármaco 5-FU en nanocomposito a diferentes pH

A varios intervalos de tiempo, el 5-FU liberado de la membrana de diálisis se recogió y analizó usando espectro UV-Vis (266 nm). El efecto del pH sobre la liberación de 5-FU de las NP's TiO<sub>2</sub> se muestra en la figura 24. La solución acuosa de 5-FU, utilizada en un pH de 7.5, tuvo una liberación rápida dentro las primeras 6 horas, pero no completa de aproximadamente el 40% después de 48 horas. La velocidad de liberación del fármaco más lenta se detectó a un pH 7.5, probablemente debido a la ionización considerable de 5-FU que provocó interacciones iónicas estrechas con APTES-TiO<sub>2</sub>. Una disminución del pH a 6.5 y 5.5 dio como resultado una velocidad de liberación más rápida. Después de 24 horas a pH 5.5, el fármaco se liberó en un porcentaje más alto aproximadamente el 80%. La liberación más rápida de 5-FU en medio ácido podría atribuirse a una ionización reducida de 5-FU que conduce a interacciones iónicas debilitadas con APTES y, a su vez, a una disociación compleja (Lungu et al., 2016).

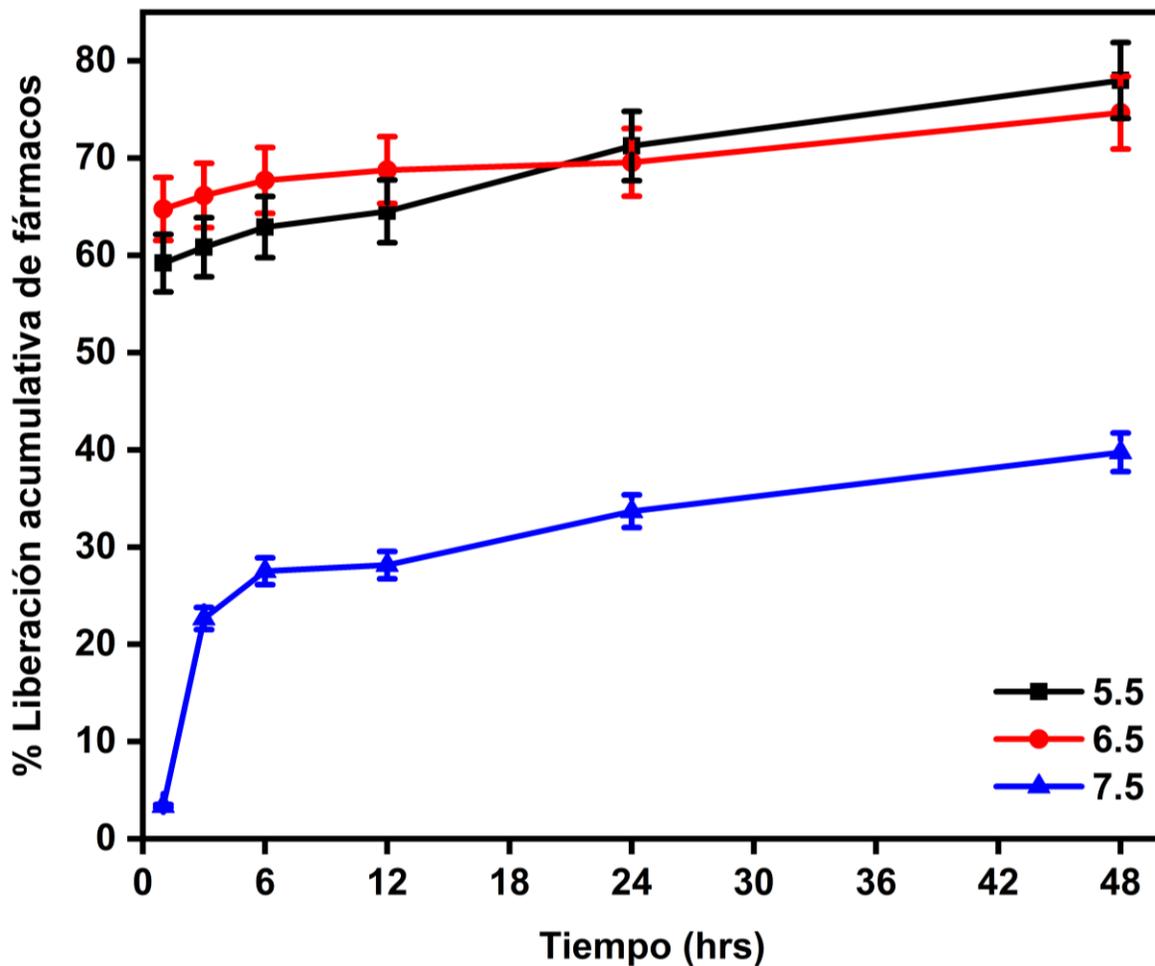


Figura 24. Espectro UV- Vis 266 nm. Liberación de 5-FU del nanoportador. (Azul) pH 7.5; (rojo) pH 6.5; (negro) pH 5.5

### Análisis citotóxico de 5-FU *in vitro*

Para probar los efectos citotóxicos del 5-FU (25–100  $\mu\text{g}$ ) sobre las células HGF, CO y CO-HGF; utilizamos el ensayo de reducción del compuesto MTT. En la figura 25 podemos observar un gráfico, en él se puede verificar que las células HGF tratadas con 5-FU en una concentración de 100  $\mu\text{g}$  muestra 80% lo cual refleja que una citotoxicidad muy normal en las células sanas. Mientras que cuando las células de cáncer oral de origen linfoide son tratadas con 5-FU el efecto resulta ser ligeramente citotóxico, a dosis de 100  $\mu\text{g}$  observamos un mayor porcentaje muerte celular el cual disminuye en dosis como las de 25  $\mu\text{g}$  demostrando que el medicamento es efectivo. Para el cocultivo (CO-HGF) tratado únicamente con 5-FU observamos un resultado de mayor muerte celular 40% aproximadamente a un porcentaje de 30%, con un decrecimiento del 10% entre estas similar al patrón que se ve en las células de cáncer oral de origen linfoide.

|          |                          |
|----------|--------------------------|
| 100-75%  | No citotóxico            |
| 74.9-50% | Ligeramente citotóxico   |
| 49.9-25% | Moderadamente citotóxico |
| 24.9-0%  | Severamente citotóxico   |

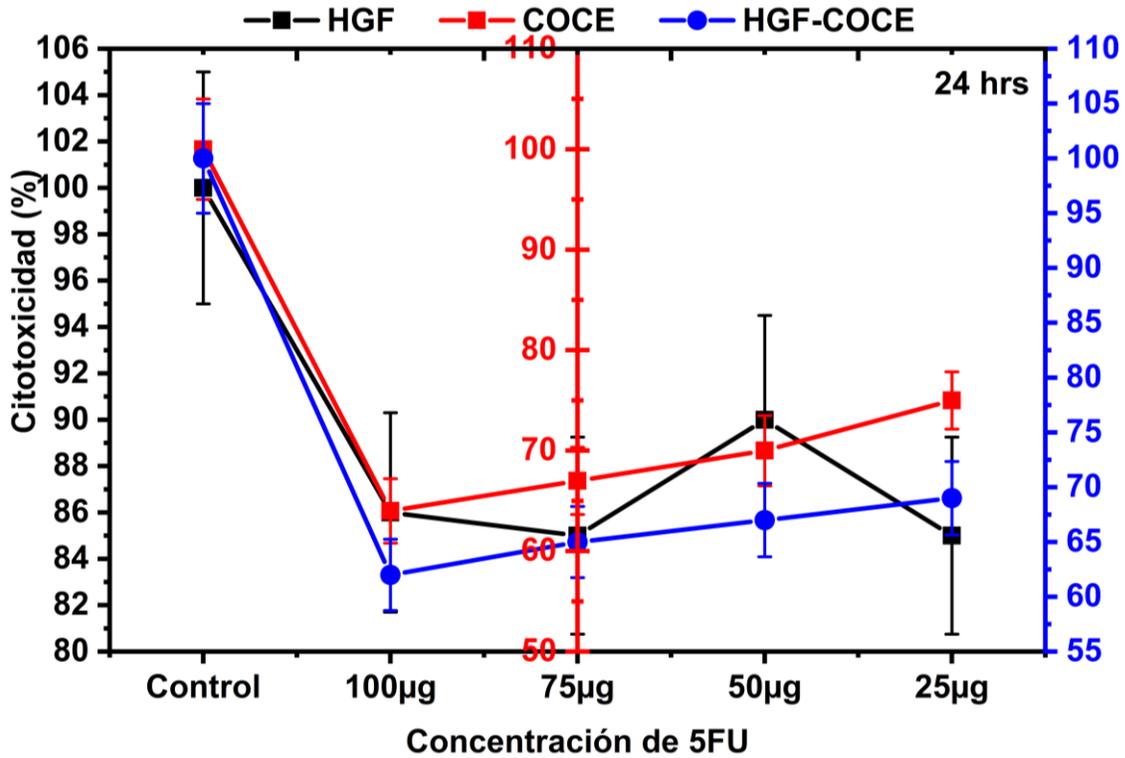


Figura 15. Efecto de citotoxicidad de 5-FU en células. (Negro) HGF; (rojo) CO; (azul) cocultivo HGF-CO.

### Análisis citotóxico de nanoportador NP's TiO<sub>2</sub> en 5-FU

En la figura 26 podemos observar los efectos citotóxicos del nanoportador NP's TiO<sub>2</sub> a diferentes concentraciones (25–100 µg) con los datos obtenidos del ensayo de reducción MTT. En este caso, podemos detectar que el nanoportador incremento la citotoxicidad en todas las células debido al efecto sinérgico de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> y el fármaco 5-FU. Para las células HGF el efecto fue mayor que cuando se trató únicamente con el 5-FU. Mientras que para las células CO tratadas con el nanoportador reflejaron una citotoxicidad dependiente de la dosis. A mayor concentración, se mejoró el efecto de destrucción de células. Para concluir en el cocultivo (CO-HGF) la viabilidad celular se redujo mucho, para una dosis 100 µg tenemos una muerte celular de aproximadamente el 40% la cual se redujo un 20% en una dosis de 25 µg. Esto demuestra el efecto sinérgico del anticancerígeno y el nanocompuesto diseñado.

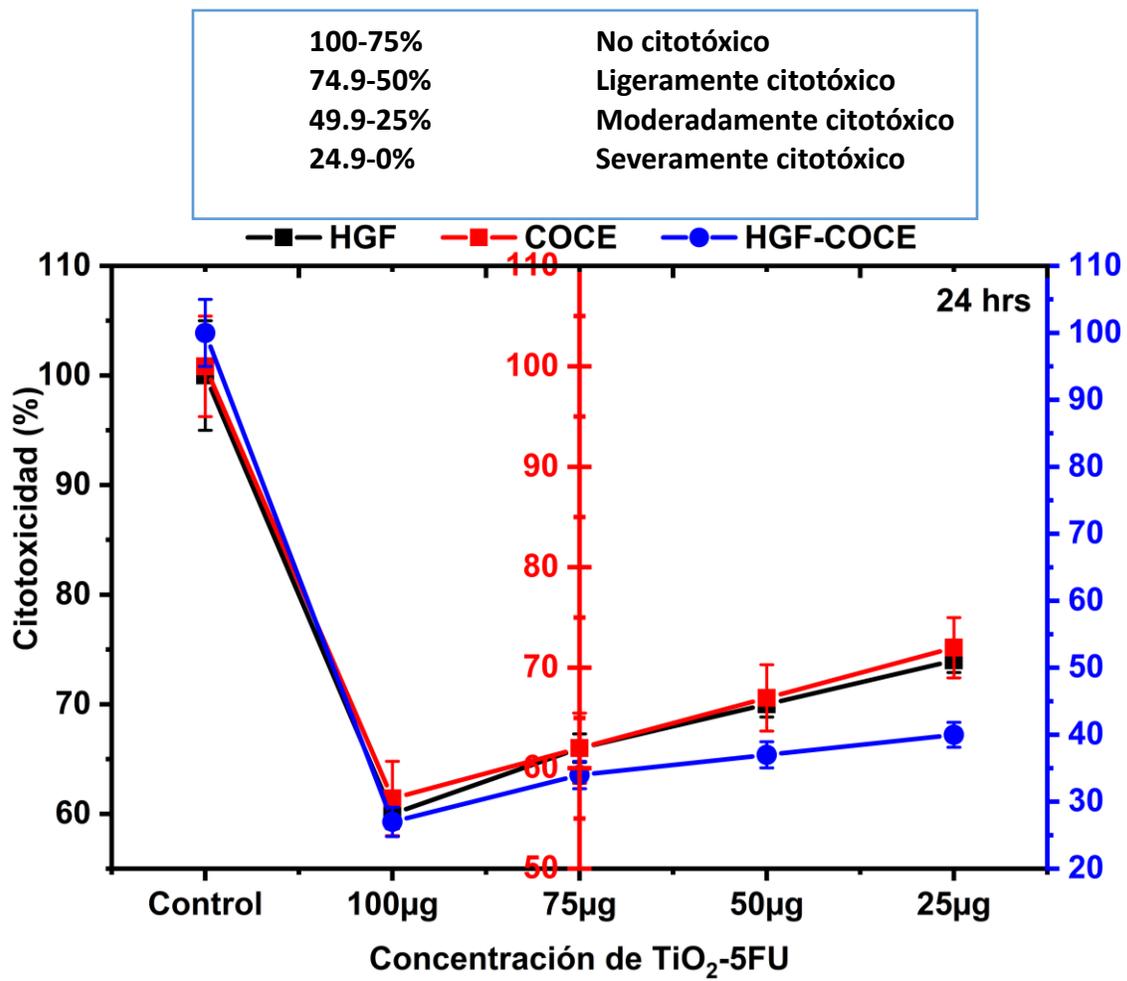


Figura 26. Efecto de citotoxicidad de nanoportador en células. (Negro) HGF; (rojo) CO; (azul) cocultivo CO-HGF.

## DISCUSION

A pesar de las mejoras en el tratamiento del cáncer, la adquisición a la resistencia de los medicamentos hacen que el manejo terapéutico de la enfermedad continúe siendo uno de los principales desafíos (Holohan et al., 2013).

Las NP's de TiO<sub>2</sub> se consideran materiales naturales y se utilizan ampliamente en la industria y la medicina. Los efectos biológicos de las NP's se relacionan con la inducción del estrés oxidativo que es responsable de la lesión mitocondrial y la posterior activación de una serie de genes apoptóticos (Petković et al., 2011).

En estudios previos se indica que el efecto sobre la proliferación y apoptosis celular de las NP's de TiO<sub>2</sub> depende del tipo de célula y la concentración de la nanopartícula (Valdiglesias et al., 2013); (Botelho et al., 2014); (Pandurangan et al., 2016 ); (Rahmani et al., 2018).

En este estudio evaluamos la citotoxicidad de las NP's de TiO<sub>2</sub> en conjunto con el agente antitumoral 5-FU en una línea celular de CO.

Debido a que la capacidad de las nanoparticulas puede verse influenciada por el tamaño, forma, carga de la superficie, pureza y estructura cristalina una vez expuesta en la célula, primero caracterizamos las nanoparticulas. En el cual encontramos que el tamaño de nuestras nanoparticulas fue de 20-25 nm. Lo que coincide con el diámetro aproximado de 20nm el cual es más estable en las NP's de TiO<sub>2</sub> para inducir una respuesta celular una vez expuestas realizado por (Rahmani Kukia et al., 2018).

En nuestro ensayo de viabilidad celular MTT encontramos que la citotoxicidad es dependiente de la concentración de nuestra dosis. Este resultado es similar al en el que se utilizaron las NP's de TiO<sub>2</sub> con las mismas características fisicoquímicas, el en cual fue encontrado que la respuesta a la autofagia depende de la dosis y el tiempo de exposición y concentraciones constantes en periodos cortos de 24 horas producen esta respuesta (Azimeea et al., 2020).

Además, en nuestro estudio realizado a diferentes pH observamos que liberación del nanocomposito es mayor a pH ácido 6.5 y 5.5 y la respuesta a la administración de NP's de TiO<sub>2</sub> en presencia a un pH ácido en es potenciada por el estrés oxidativo, esta mejora podría estar asociada con los efectos directos producidos por las NP's en las células ya que liberan radicales libres y otros oxidantes (Fujiwara et al., 2015). Esto podría sugerir que las NP's de TiO<sub>2</sub> son efectivas en el tratamiento del CO.

Recientemente se ha mostrado que las vías de la autofagia podrían promover los efectos del 5-FU en diferentes cánceres como lo son el cáncer de colon, carcinoma escamoso de piel. El potencial de estos posibles efectos del 5-FU sugieren que el efecto sinérgico junto con las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> tendrían mayor efectividad contra el cáncer.

## CONCLUSIONES

Se logró la funcionalización de las NP's de TiO<sub>2</sub> junto al agente antitumoral 5-FU, los estudios realizados que nos permitieron corroborar dicha funcionalización se lograron mediante espectroscopia UV-Visible y la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Fue posible conocer la morfología de las nanopartículas de tipo esférica y aparentemente cristalina mediante Microscopía electrónica de transmisión (TEM) así como su composición elemental con el estudio de mapeo elemental (EDAX). Por lo tanto, el método utilizado para la conjugación del nanoportador se realizó de manera exitosa. Se demostró que la combinación de NP's de TiO<sub>2</sub> con el 5-FU promueven la citotoxicidad. La liberación de 5-FU dependió del pH, donde se observó una liberación más rápida en medios ácidos. Este nanoportador genera estrés oxidativo y con esto la sinergia del medicamento lo cual conduce a la muerte celular. Estos resultados son prometedores ya que nos brindan la posibilidad para desarrollar su posible aplicación y con esto reducir los efectos secundarios, mejorar los efectos terapéuticos y el pronóstico del paciente.

## BIBLIOGRAFÍA

- Argueta-Figueroa, L., Torres-Gómez, N., Scougall-Vilchis, R., & Garcia-Contreras, R. (2018). Biocompatibilidad y toxicidad de nanopartículas de dióxido de titanio en la cavidad oral: Revisión sistemática. *Investigación clínica*, 59, 352.
- Azimeea, S., Rahmatic, M., Fahimib, H., & Moosavia, M. A. (2020). TiO<sub>2</sub> nanoparticles enhance the chemotherapeutic effects of 5-fluorouracil in human AGS gastric cancer cells via autophagy blockade. *Life Sciences*, 248(117466). <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117466>
- Bhuvanewari, R., Ng, Q., Thong, P., & Soo, K. (2015). Nimotuzumab increases the anti-tumor effect of photodynamic therapy in an oral tumor model. *Oncotarget*, 6(15), 13487-13505. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3622>.
- Botelho, M., Costa, C., Silva, S., Costa, S., Dhawan, A., Oliveira, P., & Teixeira, J. (2014). Effects of titanium dioxide nanoparticles in human gastric epithelial cells in vitro. *Biomed Pharmacother*, 8(1), 59-64. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2013.08.006>
- Calixto, G., Bernegossi, J., Fonseca-Santos, B., & Chorilli, M. (2014). Nanotechnology-based drug delivery systems for treatment of oral cancer: a review. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 3719-3735. <https://doi.org/doi:10.2147/IJN.S61670>
- Chi, C. A., A Day, T. D., & Neville, W. B. (2015). Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma--an update. *Cancer journal for clinicians*, 65(5), 401-421. <https://doi.org/10.3322/caac.21293>
- De la Fuente, H. J., Muñoz, M. P., Patron, B. C., Ramirez, T. M., Rojas, M. H., & Acosta, T. L. (2014). Aumento de la incidencia de carcinoma oral de células escamosas. *Salud(i)Ciencia*, 20, 636-642.
- Epstein, J. B., Epstein, J. D., Le, N. D., & Gorsky, M. (2001). Characteristics of oral and paraoral malignant lymphoma: A population-based review of 361 cases. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 92(5), 519–525. <https://doi.org/10.1067/moe.2001.116062>
- Fatemeh, A., Nafiseh, V., Parya, E., Shirin, F., & Ladan, P. (2021). Drug resistance against 5-fluorouracil and cisplatin in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review. *Journal Dental Reserch Dental Clinics Dental Prospects*, 15(3), 2019-2025. <https://doi.org/10.34172/joddd.2021.036>
- Focaccetti, C., Bruno, A., Magnani, E., Bartolini, D., Principi, E., Dallaglio, K., & Albini, A. (2015). Effects of 5-Fluorouracil on Morphology, Cell Cycle, Proliferation, Apoptosis, Autophagy and ROS Production in Endothelial Cells and Cardiomyocytes. *Plos One*, 10(2). <https://doi.org/doi:10.1371/journal.pone.0115686>
- Gharat, S., Momin, M., & Bhavsar, C. (2016). Oral Squamous Cell Carcinoma Current Treatment Strategies and Nanotechnology-Based Approaches for Prevention and Therapy. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 33(4), 363-400.
- Guevara, C. J., Morales, V. R., SJ, S. C., C, B. C., Montes, G. J., Cava, V. C., . . . MD, C. (2013). Malignant lymphoma the oral cavity and the maxillofacial

- region overall survival prognostic factors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 18(4), 619-626. <https://doi.org/10.4317/medoral.18903>
- Harada, K., Ferdous, T., & Ueyama, Y. (2014). Establishment of 5-fluorouracil-resistant oral squamous cell carcinoma cell lines with epithelial to mesenchymal transition changes. *International Journal of Oncology*, 44(4), 1302-1308. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2270>
- Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D. B., & Johnston, P. G. (2013). Tumour resistance to chemotherapy and molecularly targeted therapies limits the effectiveness of current cancer therapies. Toxicity to normal tissues limits the amount of drug that can be systemically administered, and pharmacokinetic effects (absorption,. *Nature Reviews Cancer*, 13(10), 714–726 . <https://doi.org/10.1038/nrc3599>
- Huang, C., Barua, S., Sharma, G., Dey, S. K., & Reg, K. (2011). Inorganic nanoparticles for cancer imaging and therapy. *Journal of Controlled Release*, 155(3), 344-355. <https://doi.org/doi:10.1016/j.jconrel.2011.06.004>
- Hulla, J., Sahu, S., & Hayes, A. (2015). Nanotechnology: History and future. *Human and Experimental Toxicology*, 34(12), 1318–1321. <https://doi.org/10.1177/0960327115603588>
- Johnson, N. W., Jayasekara, P., & Amarasinghe, A. A. (2011). Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. *Periodontology 2000*, 57, 19-37. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2011.00401.x>
- Kruijzer, C., Beijnen, J., & Schellens, J. (2002). Improvement of Oral Drug Treatment by Temporary Inhibition of Drug Transporters and/or Cytochrome P450 in the Gastrointestinal Tract and Liver: An Overview. *The Oncologist*, 7, 516-530. <https://doi.org/doi.org/10.1634/theoncologist.7-6-516>
- L. Watts, T., Cui, R., Szanislo, P., A. Resto, V., W. Powell, D., & V. Pinchuk, I. (2016). PDGF-AA mediates mesenchymal stromal cell chemotaxis to the head and neck squamous cell carcinoma tumor microenvironment. *Journal of Translational Medicine*, 114(337). <https://doi.org/doi.org/10.1186/s12967-016-1091-6>
- Lima, P. D., Tetzner, F. D., & Roger, S.-S. A. (2015). Intraosseous Non-Hodgkin Lymphoma Mimicking. *Journal Of Endodontics*, 41(10), 1738-1742. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.06.001>
- Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. (2003). 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 330–338. <https://doi.org/doi:10.1038/nrc1074>
- Lungu, I. I., Rădulescu, M., Mogoșanu, G. D., & Grumezescu, A. M. (2016). pH sensitive core-shell magnetic nanoparticles for targeted drug delivery in cancer therapy. *Rom J Morphol Embryol*, 57(1), 23–32.
- Mahendra, A., Shreedhar, B., Kamboj, M., Singh, A., Singh, A., Agrawal, A., . . . Kabiraj, A. (2014). Epidermal Growth Factor Receptor Protein: A Biological Marker for Oral Precancer and Cancer. *Journal of Dental Surgery*, 2014. <https://doi.org/doi.org/10.1155/2014/158709>
- Markopoulos, K. (2012). Current Aspects on Oral Squamous Cell Carcinoma. *The Open Dentistry Journal*, 6, 126-130.

- Mody, V., Siwale, R., Singh, A., & Mody, H. (2010). Introduction to metallic nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2(4), 282-289. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.72127>
- Mugnaini, E., & N., & G. (2016). Lymphoma. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 43(4), 661–675. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2016.07.012>
- Muhammad, A. Y., Wan Muhamad, A. W., Nor, A. A., Sami, A., Sayed, F. J., & Ashfaq Ur, R. (2020). Oral squamous cell carcinoma: review of incidence and risk factors. *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*, 07(11), 7967-7978.
- Murphy, C. J., Gole, A. M., Stone, J. W., Sisco, P. N., Alkilany, A. M., Goldsmith, E. C., & Baxter, S. C. (2018). Gold Nanoparticles in Biology: Beyond Toxicity to Cellular Imaging. *Accounts of Chemical Research*, 41(12), 1721-1730.
- Okamoto, I. (2010). Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR targeted anticancer therapy. *FEBS Journal*, 277(2), 309- 315. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07449.x>.
- Pandurangan, M., Enkhtaivan, G., Young, J., Hoon, H., Lee, H., Lee, S., . . . DH. (2016). In Vitro Therapeutic Potential of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles Against Human Cervical Carcinoma Cells. *Biol Trace Elem Res*, 171(1), 293-300. <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0551-9>
- Petković, J., Žegura, B., Stevanović, M., Drnovšek, N., Uskoković, D., Novak, S., & Filipič, M. (2011). DNA damage and alterations in expression of DNA damage responsive genes induced by TiO<sub>2</sub> nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. *Nanotoxicology*, 5(3), 341-353. <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.507316>
- Qi, Y., Qi, W., Liu, S., Sun, L., Ding, A., Yu, G., . . . Lv, J. (2020). TSPAN9 suppresses the chemosensitivity of gastric cancer to 5-fluorouracil by promoting autophagy. *Cancer Cell International*, 20(4). <https://doi.org/doi.org/10.1186/s12935-019-1089-2>
- Qiao, L.-I., Yao, W.-J., Zhang, Z.-Q., Yang, X., & Zhao, M.-X. (2020). The Biological Activity Research of the Nano-Drugs Based on 5-Fluorouracil-Modified Quantum Dots. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 2765-2776. <https://doi.org/10.2147/IJN.S244693>
- Rahmani Kukia, N., Rasmi, Y., Abbasi, A., Koshoridze, N., Shirpoor, A., Burjanadze, G., & Saboory, E. (2018). Bio-Effects of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles on Human Colorectal Cancer and Umbilical Vein Endothelial Cell Lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 19(10), 2821-2829. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2018.19.10.2821>
- Rahmani, K. N., Rasmi, Y., Abbasi, A., Koshoridze, N., Shirpoor, A., Burjanadze, G., & Saboory, E. (2018). Bio-Effects of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles on Human Colorectal Cancer and Umbilical Vein Endothelial Cell Lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 19(10), 2821-2829. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2018.19.10.2821>
- Ribeiro, F., Noguti, J., Oshima, C., & Ribeiro, D. (2014). Effective targeting of the epidermal growth factor receptor (EGFR) for treating oral cancer: a promising approach. *Anticancer Research*, 34, 1547-1552.
- Rivera, C., & Venegas, B. (2014). Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). *Oncology Letters*, 8, 7-11. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.2103>

- Santoro, A., Bufo, P., Russo, G., Cagiano, S., Papagerakis, S., Bucci, P., . . . Pannone, G. (2020). Expression and clinical implication of cyclooxygenase-2 and E-cadherin in oral squamous cell carcinomas. *Cancer Biology & Therapy*, 21(8), 667-674.
- Savita, L., Moras, K., J. G., Mahesh, B., Hegde, S., Brijes, S., & Neil, L. (2014). Role of concomitant chemoradiation in locally advanced head and neck cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(10), 4147-4152. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2014.15.10.4147>.
- Si, W., Shen, J., Huilin, Z., & Weimin, F. (2019). The role and mechanisms of action of microRNAs in cancer drug resistance. *Clinical Epigenetics*, 11(25). <https://doi.org/doi.org/10.1186/s13148-018-0587-8>
- Su, L., Anxun, W., Wenqi, J., & Zhongzhen, G. (2008). Pharmacokinetic characteristics and anticancer effects of 5-Fluorouracil loaded nanoparticles. *BMC Cancer*, 8(103). <https://doi.org/10.1186/1471-2407-8-103>
- Suciu, M., Morariu, S., Ormenișan, A., Grigoraș, R., Bostan, R., Mocanu, S., . . . Cotoi, O. (2014). Oral squamous cell carcinoma of the maxilla, a second malignancy after a right ethmoido-maxillary chondrosarcoma. *Romanian Journal of Morphology & Embryology*, 55(3), 1247-1251.
- Sun, Z., Sun, X., Chen, Z., Du, J., & Wu, Y. (2022). Head and neck squamous cell carcinoma risk factors, molecular alterations, immunology and peptide vaccines. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 18(19). <https://doi.org/doi.org/10.1007/s10989-021-10334-5>
- Sundermann, B., Uhlmann, L., Hoffmann, J., Freier, K., & Thiele, O. (2017). The localization and risk factors of squamous cell carcinoma in the oral cavity: A. *Journal of Cranio Maxillo Facial Surgery*, 46(2), 177-182. <https://doi.org/doi:10.1016/j.jcms.2017.10.019>
- Tanaka, T., & Ishigamori, R. (2017). Understanding Carcinogenesis for Fighting Oral Cancer. *Journal of Oncology*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2011/603740>
- Thavarajah R, R. A. (2006). Oral lesions of 500 habitual psychoactive substance users in Chennai, India. *Arch Oral Biol*, 51, 512-519.
- Tolossa, D. D., Muzazu, S. G., Digamo, H. K., Tayamika, N. M., Woldemedhin, M. B., Chilot, H. D., . . . Manyazewal, T. (2021). New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE Open Medicine*, 9, 1-10. <https://doi.org/10.1177/20503121211034366>
- Torres, R., Torres, N., Hernández, J., Yobana, P., Hernández, A., & Liliana, A. (2020). Epidemiología reportada de cáncer de labio, cavidad oral y orofaringe en México. *Revista medica del instituto mexicano del seguro social*, 58(4), 494-507. <https://doi.org/10.24875/RMIMSS.M20000075>
- Urade, M. (2008). Cyclooxygenase (COX)-2 as a potent molecular target for prevention and therapy of oral cancer. *Japanese Dental Science Review*, 44(1), 57–65. <https://doi.org/doi:10.1016/j.jdsr.2007.10.003>
- Valdiglesias, V., Costa, C., Sharma, V., Kiliç, G., Pásaro, E., Teixeira, J., . . . Laffon, B. (2013). Comparative study on effects of two different types of titanium dioxide nanoparticles on human neuronal cells. *Food Chem Toxicol*, 57, 352-61 . <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.04.010>.
- Vella Durai, S., C, Kumar, E., & Muthuraj, D. (2021). Investigations on structural, optical, and impedance spectroscopy studies of titanium dioxide

- nanoparticles. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, 35 (1).  
<https://doi.org/151-160>
- Yamamoto, J., Ogura, S.-I., Shimajiri, S., Nakano, Y., Akiba, D., Kitagawa, T., & Nishizawa, S. (2015). Aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX with multi-dose ionizing irradiation enhances host antitumor response and strongly inhibits tumor growth in experimental glioma in vivo. *Molecular Medicine Reports*, 11(3), 1813-1819.  
<https://doi.org/doi:10.3892/mmr.2014.2991>
- Yang, C., & Pan, Y. (2015). Fluorouracil induces autophagy-related gastric carcinoma cell death through Beclin-1 upregulation by miR-30 suppression. *Tumor Biology*, 37(12), 15489- 15494. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3775-6>
- Zhang, M., Lian, J., Yang, Y., Liang, H., Jia, H., & Li, D. (2020). Current Trends of Targeted Drug Delivery for Oral Cancer Therapy. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(618931). <https://doi.org/doi:10.3389/fbioe.2020.618931>
- Ziental, D., Czarczynska-Goslinska, B., Mlynarczyk, D. T., Glowacka-Sobotta, A., Stanisz, B., Goslinski, T., & Sobotta, L. (2020). Titanium Dioxide Nanoparticles: Prospects and Applications in Medicine. *Nanomaterials*, 10(2), 387. <https://doi.org/10.3390/nano10020387>

# ANEXOS



Departamento de Ciencias Médicas, División de Ciencias de la Salud  
Universidad de Guanajuato, Campus León

## XXII Reunión Internacional de Ciencias Médicas

24-26 Agosto 2022

OTORGA LA PRESENTE  
CONSTANCIA

A:

**MARCO ANTONIO RIVERA**

POR SU PARTICIPACIÓN CON EL TRABAJO LIBRE:  
**EFEECTO ANTITUMORAL DE NANO-TiO<sub>2</sub> FUNCIONALIZADAS CON  
5-FLUOROURACILO EN UNA LÍNEA CELULAR DE CARCINOMA ORAL DE  
CÉLULAS ESCAMOSAS**

EN COAUTORÍA CON:  
**RAVICHANDRAN MANISEKARAN . RENÉ GARCÍA . HUGO ALVARADO .  
LAURA SUSANA ACOSTA .**

24, 25 y 26 de Agosto del 2022 en León, Gto.  
"LA VERDAD OS HARÁ LIBRES"

Dr. Tonatliu García Campos  
Director de División de  
Ciencias de la Salud

Dra. Claudia Luévano Contreras  
Directora del Departamento de  
Ciencias Médicas

Dra. Lorena del Rocio Ibarra Reynoso  
Coordinadora de la Maestría  
en Ciencias Médicas

Dra. María Luisa Lazo de la Vega Monroy  
Coordinadora del Doctorado  
en Ciencias Médicas



# 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

Rivera Rodríguez Marco Antonio, Ravichandran Manisekaran, René  
García Contreras, Hugo Alvarado Garnica & Laura Susana Acosta Torres

Por su participación académica con el trabajo  
“EFECTO ANTITUMORAL DE NANO-TIO<sub>2</sub> FUNCIONALIZADAS CON  
5-FLUOROURACILO EN UNA LÍNEA CELULAR DE CARCINOMA ORAL”

llevada a cabo el

30 de septiembre de 2022

en el marco del

Greater Expo ARIC Dental 2022

“Por mi Raza Hablará el Espíritu”

León, Guanajuato, a 30 de septiembre de 2022

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

  
Lic. Juan José Ulloa García  
Presidente  
Greater ARIC Dental 2022

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



ENESL-UNAM-DECI-ARC22-0026



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

Otorga la presente

## CONSTANCIA

a

Marco Antonio Rivera Rodríguez

por su asistencia al  
**1º Congreso Internacional en  
Bio Nano Materiales**  
llevado a cabo del  
19 al 21 de octubre de 2022  
con valor curricular de 10 horas

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”  
León, Guanajuato, a 17 de noviembre 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-IICBN22-082



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



Otorgan el presente

## RECONOCIMIENTO

A **MARCO ANTONIO RIVERA RODRÍGUEZ, RAVICHANDRAN MANISEKARAN ., RENÉ GARCÍA  
CONTRERAS, HUGO ALVARADO GARNICA**

Categoría: BÁSICA , Nivel: LICENCIATURA

Por su participación académica con la presentación en cartel  
**EFFECTO ANTITUMORAL DE NANO-TIO<sub>2</sub> FUNCIONALIZADAS CON 5-FLUOROURACILO EN UNA LÍNEA CELULAR DE  
CARCINOMA 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 42109112228

**“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.



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



Otorgan la presente

## CONSTANCIA

A

**Marco Antonio Rivera Rodríguez**

Por su asistencia al

XXX Encuentro Nacional y XXI Iberoamericano  
de Investigación en Odontología

efectuado los días 9 · 10 y 11 de noviembre de 2022.

Valor Curricular de 24 horas crédito de Educación Continua, FO, UNAM

Folio 421091122235

“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.