

Efecto citotóxico de nanopartículas de MgO y ZnO en cultivo con células de cáncer oral: nanoacarreadores para tratamientos quimioterapéuticos[◇]

Cytotoxic effect of MgO and ZnO nanoparticles on oral cancer cell culture: nanocarriers for chemotherapeutic treatments

Valeria Estefanía Flores-Ramírez,* Benjamín Aranda-Herrera,*
Dulce Guzmán-Rocha,* René García-Contreras*,[†]

ABSTRACT: Oral cancer, one of the main causes of mortality worldwide, is commonly treated with chemoradiotherapy. However, these therapies have limitations. Recent research focuses on the use of nanoparticles like MgO and ZnO to improve treatment and to evaluate the nanocytotoxic effect of MgO and ZnO nanoparticles on lymphoblastic-origin cancer cells. Lymphoblastic-origin primary culture cancer cells characterized by immunohistochemistry (IHC) were used, and nanocytotoxicity tests were performed using MgO and ZnO nanoparticles at concentrations ranging from 0 to 1.33 mg/mL. Cell viability was measured using the MTT assay by UV-Vis. Statistical analysis was carried out using the t-student test and ANOVA ($p \leq 0.05$). Histopathological analyses confirmed the presence of oral lymphoblastic neoplastic lesions with specific characteristics, positive for cyclin D1 and negative for CD3. The results showed slight toxicity at the maximum dose for both nanoparticles (80% for MgO and 94% for ZnO) with statistically significant dose-dependent reduction ($p < 0.05$). MgO and ZnO nanoparticles have a slight cytotoxic effect on lymphoblastic cancer cells, so it is necessary to develop more effective chemotherapeutic treatments based on nanoparticles in combination with antitumor agents to confirm this hypothesis.

KEYWORDS: oral cancer, nanoparticles, anti-tumor, dose-response.

RESUMEN: El cáncer oral, una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial, se trata comúnmente con quimiorradioterapia. No obstante, estas terapias tienen limitaciones. Investigaciones recientes se enfocan en el uso de nanopartículas (NPs) como MgO y ZnO para mejorar el tratamiento. Y, para evaluar el efecto citotóxico de NPs de MgO y ZnO en células cancerígenas de origen linfoblástico, se utilizaron células cancerígenas de cultivo primario de origen linfoblástico caracterizadas por inmunohistoquímica (HIC) y se realizaron pruebas de citotoxicidad utilizando NPs de MgO y ZnO en concentraciones de 0 a 1.33 mg/mL. La viabilidad celular se midió mediante el ensayo MTT por UV-Vis. El análisis estadístico fue mediante la prueba de *t-student* y ANOVA ($p \leq 0.05$). Los análisis histopatológicos confirmaron la presencia de lesiones neoplásicas linfoblásticas orales con características específicas, positivo a ciclina D1 y negativo a CD3. Los resultados mostraron ligera toxicidad a la máxima dosis para ambas NPs (80% MgO y 94% ZnO) reducción estadísticamente significativa ($p < 0.05$) dosis-dependiente. Las NPs de MgO y ZnO tienen un ligero efecto citotóxico en células cancerosas linfoblásticas, por lo cual es

Recibido: 19 de febrero, 2024. Aceptado: 5 de agosto, 2024. Publicado: 26 de noviembre, 2024.

* Universidad Nacional Autónoma de México, Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES) Unidad León, Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria (LIJ), Área de nanoestructuras y Biomateriales.

[†] Autor de correspondencia: rgarciac@enes.unam.mx



necesario desarrollar tratamientos quimioterapéuticos más efectivos basados en nanopartículas en combinación con agentes antitumorales para confirmar esta hipótesis.

PALABRAS CLAVE: nanopartículas, cáncer oral, anti-tumor, dosis-respuesta.

Introducción

El cáncer continúa siendo un significativo problema de salud pública y una de las principales causas de mortalidad y morbilidad a nivel mundial. En Estados Unidos, se proyecta para el año 2023 un registro de aproximadamente 1,958,310 nuevos casos de cáncer y 609,820 fallecimientos debido a esta enfermedad (Siegel *et al.*, 2023). Las neoplasias hematológicas ocupan el tercer lugar en incidencia, después de los cánceres de pulmón y mama. En México, el cáncer es la novena causa de muerte, siendo los linfomas, las leucemias y los mielomas los tipos más comunes, representando el 10% de todos los diagnósticos de cáncer (Alsahafi *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2022).

En los últimos tiempos, la nanotecnología ha ganado cada vez más importancia en el diagnóstico y tratamiento del cáncer, con el objetivo de mejorar la calidad de vida de los pacientes. Este campo ha experimentado un significativo avance, con la aprobación de más de 50 fármacos, basados en nanotecnología, por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA). Estos fármacos han demostrado su potencial para mejorar la eficacia del tratamiento del cáncer y reducir al mínimo los efectos secundarios (Song *et al.*, 2022). Las neoplasias malignas de cabeza y cuello son tradicionalmente tratadas mediante cirugía, radioterapia o una combinación de ambas, dependiendo del tamaño, tipo y ubicación del tumor (Taneja *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2008). En años recientes, las nanopartículas (NPs) han recibido una atención creciente debido a sus características únicas y prometedoras.

Las terapias convencionales para el cáncer oral, como la cirugía, radioterapia y quimioterapia, han sido pilares en el tratamiento durante años. Sin embargo, presentan limitaciones haciéndolas menos idóneas para este propósito. El tratamiento intensivo del cáncer puede generar efectos tóxicos en las células normales, y la mucosa oral es particularmente vulnerable debido a su rápida renovación celular (Keefe *et al.*, 2007; Lalla *et al.*, 2011). Tanto la quimioterapia como la radioterapia pueden impactar directa e indirectamente en la cavidad oral, debido a factores como la alta tasa de renovación celular, la compleja microflora y el trauma asociado con la función oral. Estos tratamientos pueden desencadenar complicaciones orales reflejando los efectos en todo el sistema gastrointestinal.

La nanotecnología ha emergido como una herramienta innovadora en este campo, superando las restricciones de las terapias convencionales. La literatura científica actual ha demostrado que diversas NPs, tanto orgánicas como inorgánicas, se han empleado como vehículos o acarreadores para liberar fármacos en diversos tipos de cáncer, incluyendo el carcinoma de cé-

lulas escamosas en lengua y cabeza y cuello, entre otros. Estos estudios han indicado que medicamentos como cisplatino, 5-fluoracilo, metotrexato, doxorubicina, entre otros, al ser recubiertos con nanopolímeros ofrecen resultados superiores en comparación con las drogas convencionales para el tratamiento del cáncer de interés (Yang *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2008).

Las NPs y los nanoacarreadores (NCs) son prometedores para inhibir el crecimiento de células cancerosas al inducir la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y activar rutas de apoptosis. Esto los convierte en una opción atractiva en el tratamiento del cáncer y ha llevado a investigaciones adicionales. Evaluar sus propiedades y mecanismos en condiciones de laboratorio es crucial antes de su uso clínico. Junto con la nanomedicina, estos tratamientos aprovechan nanomateriales inorgánicos como NPs ZnO y NPs MgO, demostrando selectividad citotóxica e inducción de ROS. Los NCs reducen células cancerosas viables, afectando su morfología y expresión de proteínas tumorales (García-Contreras *et al.*, 2014; Behzadi *et al.*, 2018; Mendoza-Martínez *et al.*, 2023). Sin embargo, la literatura sobre estudios relacionados con estos nanoacarreadores es limitada, lo cual resalta la necesidad de más investigación para comprender completamente su potencial en la terapia contra el cáncer.

El objetivo de la presente investigación fue el de evaluar el efecto citotóxico de las NPs de MgO y ZnO en contacto con las células cancerígenas de origen linfoblástico en un modelo de cultivo celular primario y proponer el mecanismo celular de la muerte celular de la interacción célula con las NPs.

Materiales y métodos

Caracterización NPs ZnO y MgO

Las NPs de ZnO [≤ 50 nm, peso molecular (g/mol): 81.39, Sigma-Aldrich] y MgO [≤ 50 nm, peso molecular (g/mol): 40.31, Sigma-Aldrich] en polvo comerciales se caracterizaron por difracción de rayos X (DRX) para verificar su estructura cristalina con los patrones de difracción establecidos en las cartas cristalográficas correspondientes a estos materiales.

Los patrones de difracción de rayos X para todas las muestras sintetizadas se obtuvieron usando un equipo D2 Phaser (Bruker, Billerica, MA, EUA), con barridos en el rango 2θ de 20° a 80° e incrementos de 0.02° , con una fuente de radiación $\text{CuK}\alpha 1$ ($\lambda = 0.15405$ nm) a 30 kV, 20 mA. Las muestras se usaron en forma de polvos.

Subcultivo celular

Las células fueron aisladas, cultivadas y caracterizadas como se reportó por Mendoza-Martínez *et al.* (2023), en una investigación previa del grupo de investigación. El protocolo de aislamiento celular, registrado bajo el número CE_16_004_SN, fue aprobado por el comité de bioética. Esta aprobación garantiza el cumplimiento de las leyes nacionales de salud y la Declaración de

Helsinki, incluyendo los procedimientos de consentimiento informado obtenidos antes del procedimiento de extracción. Se obtuvieron las células cancerígenas de origen linfoblástico del *stock* del banco del Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria (LII) de la ENES Unidad León, UNAM. Se descongelaron y se subcultivaron en un plato para cultivo celular de 10 cm con medio de cultivo MEM suplementado (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), el cual contenía 10% de suero fetal bovino (SFB, Sigma-Aldrich), 1% antibiótico (penicilina G y estreptomicina, 100,000 UI/mL 100 mg/mL, Penstrep, Sigma-Aldrich), 1% de aminoácido (L-Glutamina, Sigma-Aldrich). Se dejó 15 días en la incubadora realizando un cambio de medio cada 48 horas para el mantenimiento de la viabilidad y confluencia celulares del 90%.

Ensayo de citotoxicidad

Las células fueron subcultivadas, con una división celular 9-12, en placas de 96 pocillos a una densidad celular de 1×10^5 células/mL por exclusión de azul de tripano (Sigma-Aldrich) en un microscopio invertido de contraste de fases (Leica, Wetzlar, Germany) durante 48 horas para lograr un adhesión y confluencia celular. Las NPs de ZnO y MgO fueron expuestas a radiación ultravioleta (253.7 nm, $52 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, Germicidal T8, General Electric, Lynn, Massachusetts, USA), durante 30 minutos para su esterilización. Las NPs de ZnO y MgO fueron suspendidas en medio de cultivo MEM e inoculadas en las células de forma independiente con una dosis de 0 a 1.33 mg/mL (Mendoza-Martínez *et al.*, 2023). La viabilidad celular se evaluó con bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT, Sigma-Aldrich), el cual se incubó con las células durante 7 horas. Después de la incubación, el formazán producido se disolvió con dimetilsulfóxido (DMSO, Karal, León, Guanajuato, México), y la absorbancia a 570 nm se midió utilizando un lector de espectrofotometría de microplacas (Multiskan Go, Thermo-scientific, Helsinki, Finlandia). La citotoxicidad se evaluó de acuerdo con la norma ISO 10993-5:2009.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante el cálculo de la media, desviación estándar y porcentaje. Posteriormente, se sometieron a pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk y pruebas de *t-student* y ANOVA. La significación se estableció con un $p \leq 0.05$.

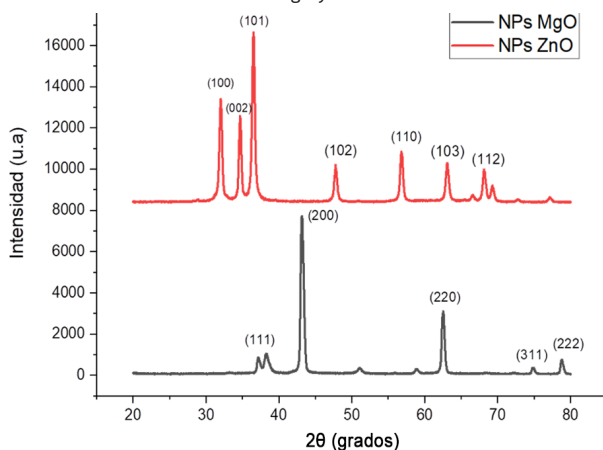
Resultados

Caracterización estructural de las NPs ZnO y MgO

La figura 1 muestra los patrones de difracción de las NPs de ZnO y MgO. El difractograma obtenido para MgO presenta a los ángulos 2θ a 36.80° , 42.85° , 62.23° , 74.56° y 78.52° y los planos corresponde a las reflexiones

(111), (200), (220), (311) y (222), respectivamente. Todos estos datos corresponden a la carta cristalográfica N°00-045-0946 de la JCPDS de una fase periclase, la cual es típica para materiales a base de magnesio. Para el caso del difractograma de ZnO se observan los siguientes ángulos en 2θ : 31° , 34° , 36° , 48° , 56° , 63° y 68° , los planos correspondientes a estos ángulos son: (100), (002), (101), (102), (110) y (103) y (112), respectivamente. Estos patrones de difracción corresponden a una estructura cristalina Wurtzita de acuerdo con la carta cristalográfica N°36-1451.

FIGURA 1. Patrones de difracción de las NPs de MgO y ZnO.



Los picos característicos corresponden a las fases periclase y Wurtzita, respectivamente, según las cartas cristalográficas JCPDS N° 00-045-0946 y N° 36-1451.

Fuente: Elaboración de los autores.

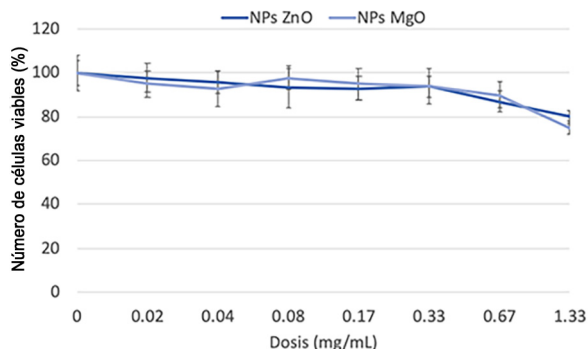
Ensayo de citotoxicidad

La figura 2 muestra la actividad citotóxica en cultivo con células cancerígenas de origen linfoblástico con una reducción estadísticamente significativa ($p < 0.05$) dosis-dependiente en contacto con NPs ZnO y MgO (viabilidad a $1.33 \text{ mg/mL} = 80 \pm 3.3\%$ y $73 \pm 3.5\%$, respectivamente) en comparación con el grupo control y con una ligera citotoxicidad (50-75%) a la dosis máxima y sin diferencia significativa entre NPs ZnO y MgO en las mismas concentraciones.

Discusión

El uso de NPs de óxidos metálicos ha sido estudiado anteriormente (Kumar *et al.*, 2015; DeLong *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2020;), especialmente las de ZnO, en el tratamiento de varios tipos de cáncer, como el cervical, de mama, de pulmón y de cabeza y cuello, con resultados prometedores. No obstante, se destaca la escasez de estudios con exploración en el uso de nanopartículas

FIGURA 2. Actividad citotóxica de las NPs ZnO y MgO en cultivo con células cancerígenas de origen linfoblástico.



Las células se inocularon a una densidad 1×10^5 células/mL las cuales se pusieron en contacto con las NPs de 0-1.33 mg/mL durante 24 horas. Después de la incubación, se determinó el número relativo de células viables mediante el ensayo MTT. Cada valor representa la media $\pm$ desviación estándar de ensayos triplicados ($n = 9$), prueba *t-student* (NPs ZnO y MgO), ANOVA (Control, NPs ZnO y MgO), MTT = Bromuro de tetrazolio 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio; NPs ZnO = nanopartículas de óxido de zinc; NPs MgO = nanopartículas de óxido de magnesio.
 Fuente: Elaboración de los autores.

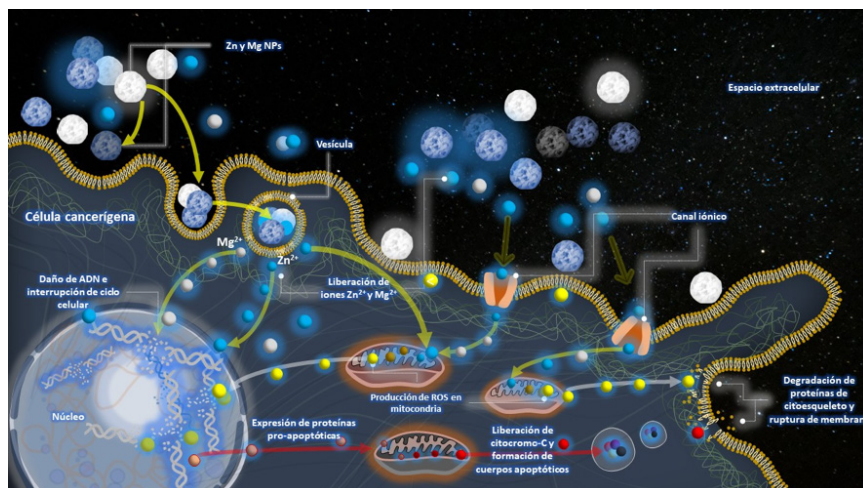
de ZnO como nanoacarreadores de fármacos antineoplásicos y evaluando su eficacia. De manera similar, Deng *et al.* (2021) llevaron a cabo un estudio en esferoides tumorales tratados con doxorrubicina conjugada con NPs de Zn y Cu y encontraron ser los conjugados de antineoplásicos con NPs de Zn significativamente más citotóxicos a una concentración de 0.01 mg/mL (10 μ g/mL).

Mientras tanto, se ha observado (Chia *et al.*, 2015) una disminución de la viabilidad celular a dosis de 6.12 y 12.5 μ g/mL en cultivo celular 2D utilizando NPs impregnadas con platino, mostrando citotoxicidad significativa a partir de una dosis mayor a 0.25 mg/mL (250 μ g/mL), indicando diferencias en la efectividad de las dos formulaciones de NPs. En otro estudio (Franke *et al.*, 2018), la administración de cisplatino a través de NPs resultó en una inducción significativa de daño al ADN a dosis bajas (0.015 mg/mL), contrastando con nuestros hallazgos, los cuales mostraron un efecto citotóxico a una concentración mayor de 0.03 mg/mL, resaltando la importancia de comprender los matices de las diferentes formulaciones de nanopartículas-fármacos para lograr los resultados terapéuticos deseados. Mendoza-Martínez *et al.* reportaron en 2023 el uso de nanoportadores de NPs de ZnO y MgO en combinación con agentes antineoplásicos como el 5-fluorouracilo y el cisplatino en cultivos 3D de esferoides de células cancerígenas. Observaron una reducción en la viabilidad celular y una disminución en la actividad tumoral en los esferoides de células cancerígenas de origen linfoide.

Se ha reportado que las NPs de ZnO y MgO reducen significativamente la viabilidad de células cancerígenas mediante el mecanismo de apoptosis por la vía intrínseca, también conocida como la vía mitocondrial (figura 3),

(Wong *et al.*, 2011; Carneiro *et al.*, 2020; Kashyap *et al.*, 2021), el cual es un mecanismo celular complejo y altamente regulado activándose en respuesta a señales de estrés intracelular tales como daño al ADN, estrés en el retículo endoplásmico (RER), o la falta de factores de crecimiento (Xu *et al.*, 2019). Este proceso comienza con la detección de estrés celular, el cual desencadena cambios en el equilibrio de las proteínas de la familia BCL-2 en la membrana mitocondrial. Estas proteínas son clave en la regulación de la apoptosis y son sintetizadas en la célula a través del proceso de expresión génica que involucra la transcripción y traducción del gen BCL2 (Rautureau *et al.*, 2010; Goldar *et al.*, 2015).

FIGURA 3. Internalización celular de las NPs de ZnO y MgO y muerte celular.



Se ilustra la vía de internalización en células tumorales a través de la vía endocítica, y el destino intracelular de los iones de Zn²⁺ y/o Mg²⁺ liberados, con consecuencia en la integridad del ADN y de la actividad mitocondrial. El núcleo celular, muestra daño en el ADN, correlacionándose con las alteraciones en el ciclo celular asociadas con el cáncer; además, la liberación de iones de zinc y magnesio de las NPs perturban la homeostasis iónica y junto con el daño al ADN y el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS), se activa la proteína p53. Esta activación conduce a la expresión de proteínas pro-apoptóticas como Bax y Bak. Se destacan los sitios de producción de ROS en las mitocondrias induciendo a estrés oxidativo inducido por las NPs y la liberación de citocromo C, dando paso a la formación del apoptosoma, como resultado de la activación de la caspasa-9 y la formación de cuerpos apoptóticos, lo cual indica el proceso de muerte celular programada en acción. Por último, se visualiza la ruptura de la membrana celular y la degradación del citoesqueleto, como las etapas finales de la apoptosis.

Fuente: Elaboración de los autores.

Cuando se activan las proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2, como Bax, Bak y Bid, estas translocan la membrana mitocondrial y pueden formar poros o alterar su permeabilidad, llevando a la liberación de factores pro-apoptóticos desde el espacio intermembrana mitocondrial al citosol. El citocromo c es el más significativo de estos factores, y una vez liberado en el citosol, se une a Apaf-1 en presencia de ATP o dATP. Esta unión induce a

Apaf-1 a oligomerizar y formar el apoptosoma, un complejo que sirve como plataforma para la activación de la caspasa-9. La caspasa-9, al activarse, procesa las caspasas ejecutoras, como la caspasa-3 y la caspasa-7, que son responsables de desencadenar la serie de eventos bioquímicos y morfológicos los cuales caracterizan la apoptosis, incluyendo la fragmentación del ADN y la formación de cuerpos apoptóticos (Kiraz *et al.*, 2016; Rautureau *et al.*, 2010). Este proceso está regulado por varios puntos de control, incluyendo las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) y factores de supervivencia que pueden modular la actividad de las proteínas BCL-2 y la integridad de la membrana mitocondrial. La función de BCL-2 es inhibir la apoptosis y mantener la integridad de la membrana mitocondrial, previniendo la liberación de citocromo c y otros factores pro-apoptóticos. Las proteínas BCL-2, esenciales en células del sistema inmunitario como los linfocitos, también se encuentran en otras células que experimentan alto estrés o renovación. La expresión de BCL2 es inducida por factores de crecimiento y citoquinas a través de rutas de señalización como la vía PI3K/AKT y la vía RAS/RAF/MEK/ERK, así como por la activación transcripcional dependiente de NF- κ B. La traducción de BCL-2 puede ocurrir tanto en el citosol como en el RER, y la localización subcelular de la proteína BCL-2 puede variar, encontrándose en la membrana mitocondrial externa, el RER y la membrana nuclear (Mohammadinejad *et al.*, 2019). La regulación de la actividad de BCL-2 y su expresión es crítica, pues las alteraciones pueden llevar a patologías como el cáncer, donde la resistencia a la apoptosis representa un problema clínico significativo. Por ende, BCL-2 es un importante objetivo terapéutico para tratar ciertos tipos de cáncer y enfermedades donde la regulación de la apoptosis es fundamental. La formación del apoptosoma, si bien está vinculada con la función mitocondrial, ocurre en el citosol y no en la mitocondria, convirtiendo la liberación de citocromo c en un enlace crucial entre el estrés celular y la activación de la maquinaria apoptótica citosólica.

El equilibrio entre la supervivencia y la muerte celular es esencial para el desarrollo de los organismos. Sin embargo, su alteración conduce a enfermedades, incluyendo el cáncer. La muerte celular programada, en particular la apoptosis, observada por primera vez en el desarrollo de sapos en la década de 1840, es fundamental en este equilibrio. La apoptosis tiene dos vías principales: la extrínseca, iniciada a través de receptores de muerte, y la intrínseca o mitocondrial, la cual involucra una interacción compleja entre las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas de la familia BCL-2. Las células cancerosas evaden la apoptosis utilizando proteínas anti-apoptóticas BCL-2. Este proceso es regulado finamente por varios mecanismos en las células cancerígenas. Un regulador clave es el supresor tumoral p53, conocido como el *guardián del genoma*, el cual juega un papel crucial en la prevención de la tumorigénesis e inhibición del progreso del cáncer (Hao *et al.*, 2023), funciona como un factor de transcripción y un inductor de apoptosis. Sin embargo, la activación inapropiada de p53 puede causar anomalías en el desarrollo y en-

fermedades como las ribosomopatías. El papel de p53 en la apoptosis ha sido extensamente estudiado, con investigaciones recientes descubriendo nuevos genes objetivo de p53 los cuales mejoran la interacción entre p53 y BCL-XL en las mitocondrias, aumentando la apoptosis (Marei *et al.*, 2021).

Conclusiones

Las nanopartículas de ZnO y MgO muestran un gran potencial en el tratamiento del cáncer cuando se combinan con agentes antineoplásicos, sugiriendo así una terapia primaria contra la mayoría de los tumores malignos. Un punto crucial para considerar en relación con los nanotransportadores es su capacidad de internalización en las células cancerosas a través de la endocitosis. Por lo tanto, numerosos informes destacan la eficacia de las NPs inorgánicas como vehículos de agentes anticancerígenos, y están impulsando la investigación hacia el futuro de la nanomedicina.

Contribución de autorías

Conceptualización, diseño del artículo, desarrollo metodológico: Valeria Estefanía Flores-Ramírez, egresada de la licenciatura en odontología.

Desarrollo metodológico, análisis e interpretación, revisión y edición final del texto: Benjamín Aranda-Herrera, Dulce Araceli Guzmán-Rocha.

Conceptualización, diseño del artículo, desarrollo metodológico, minería de datos, análisis e interpretación, redacción del borrador original y revisión y edición final del texto: René García-Contreras.

References

- Alsahafi, E., Begg, K., Amelio, I., Raulf, N., Lucarelli, P., Sauter, T., Tavassoli, M. (2019). Clinical update on head and neck cancer: molecular biology and ongoing challenges. *Cell Death and Disease*, 10(8): 540. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1769-9>.
- Behzadi, E., Sarsharzadeh, R., Nouri, M., Attar, F., Akhtari, K., Shahpasand, K., Falahati, M. (2018). Albumin binding and anticancer effect of magnesium oxide nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 14: 257-270. <https://doi.org/10.2147/IJN.S186428>.
- Carneiro, B. A., El-Deiry, W. S. (2020). Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 17(7): 395-417. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0341-y>.
- Chia, S. L., Tay, C. Y., Setyawati, M. I., Leong, D. T. (2015). Biomimicry 3D gastrointestinal spheroid platform for the assessment of toxicity and inflammatory effects of zinc oxide nanoparticles. *Small*, 11(6): 702-712. <https://doi.org/10.1002/smll.201401915>.
- DeLong, R. K., Comer, J., Mathew, E. N., Jaber-Douraki, M. (2019). Comparative

- molecular immunological activity of physiological metal oxide nanoparticle and its anticancer peptide and RNA complexes. *Nanomaterials*, 9(12): 1670, Basilea, Suiza. <https://doi.org/10.3390/nano9121670>.
- Deng, H., Yang, Y., Zuo, T., Fang, T., Xu, Y., Yang, J., Zhang, J., Shen, Q. (2021). Multifunctional ZnO@CuS nanoparticles cluster synergize chemotherapy and photothermal therapy for tumor metastasis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 34: 102399. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2021.102399>.
- Franke, C. E., Czapar, A. E., Patel, R. B., Steinmetz, N. F. (2018). Tobacco mosaic virus-delivered cisplatin restores efficacy in platinum-resistant ovarian cancer cells. *Molecular Pharmaceutics*, 15(8): 2922-2931. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00466>.
- García-Contreras, R., Scougall-Vilchis, R. J., Contreras-Bulnes, R., Ando, Y., Kanda, Y., Hibino, Y., Nakajima, H., Sakagami, H. (2014). Effects of TiO₂ nanoparticles on cytotoxic action of chemotherapeutic drugs against a human oral squamous cell carcinoma cell line. *In Vivo*, 28(2): 209-215.
- Goldar, S., Khaniani, M. S., Derakhshan, S. M., Baradaran, B. (2015). Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(6): 2129-44. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.6.2129>.
- Hao, Q., Chen, J., Lu, H., Zhou, X. (2023). The ARTS of p53-dependent mitochondrial apoptosis. *Journal of Molecular Cell Biology*, 29: 14(10):mjac074. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjac074>.
- Kashyap, D., Garg, V. K., Goel, N. (2021). Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 125: 73-120. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2021.01.003>.
- Keefe, D. M., Schubert, M. M., Elting, L. S., Sonis, S. T., Epstein, J. B., Raber-Durlacher, J. E., Migliorati, C. A., McGuire, D. B., Hutchins, R. D., Peterson, D. E. (2007). Updated clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis. *Cancer*, 109(5): 820-831. <https://doi.org/10.1002/cncr.22484>.
- Kiraz, Y., Adan, A., Kartal Yandim, M., Baran, Y. (2016). Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumour Biology*, 37(7): 8471-86. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5035-9>.
- Kumar, R., Gokulakrishnan, N., Kumar, R., Krishna, V. M., Saravanan, A., Supriya, S., Somanathan, T. (2015). Can be a bimetal oxide ZnO-MgO nanoparticles anticancer drug carrier and deliver? Doxorubicin adsorption/release study. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 15(2): 1543-1553. <https://doi.org/10.1166/jnn.2015.8915>.
- Lalla, R. V., Brennan, M. T., Schubert, M. M. (2011). Oral complications of cancer therapy. En Yagiela, J. A., Dowd, F. J., Johnson, B. S. et al. (eds.), *Pharmacology and therapeutics for dentistry*. 6a ed. Mosby Elsevier, 782-98.
- Li, X., Li, R., Qian, X., Ding, Y., Tu, Y., Guo, R., Hu, Y., Jiang, X., Guo, W., Liu, B. (2008). Superior antitumor efficiency of cisplatin-loaded nanoparticles by intratumoral delivery with decreased tumor metabolism rate. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70(3): 726-34. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.06.016>.

- Marei, H. E., Althani, A., Affi, N. (2021). p53 signaling in cancer progression and therapy. *Cancer Cell International*, 21: 703. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02396-8>.
- Mendoza-Martínez, N. L., Cadena-Galeana, A. D., Villanueva-Sánchez, F. G., Pérez-Cornejo, N., Avelar-Juárez, K. M., Ramos-Baena, J. D., Cruz-Monroy, E. A., Vázquez-Zúñiga, U., García-Contreras, R. (2023). Efficacy of antineoplastic nanocarriers on 3D oral cancer spheroids. *In Vivo*, 37(4): 1658-1665. <https://doi.org/10.21873/invivo.13251>.
- Mohammadinejad, R., Moosavi, M. A., Tavakol, S., Vardar, D. Ö., Hosseini, A., Rahmati, M., Dini, L., Hussain, S., Mandegary, A., Klionsky, D. J. (2019). Necrotic, apoptotic and autophagic cell fates triggered by nanoparticles. *Autophagy*, 15(1): 4-33. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1509171>.
- Rautureau, G. J., Day, C. L., Hinds, M. G. (2010). Intrinsically disordered proteins in bcl-2 regulated apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4): 1808-24. <https://doi.org/10.3390/ijms11041808>.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., Jemal, A. (2023). Cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 73(1): 17-48. <https://doi.org/10.3322/caac.21763>.
- Singh, T. A., Das, J., Sil, P. C. (2020). Zinc oxide nanoparticles: a comprehensive review on its synthesis, anticancer and drug delivery applications as well as health risks. *Advances in Colloid and Interface Science*, 286: 102317. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102317>.
- Song, W., Jia, P., Zhang, T., Dou, K., Liu, L., Ren, Y., Liu, F., Xue, J., Hasanin, M. S., Qi, H. y Zhou, Q. (2022). Cell membrane-camouflaged inorganic nanoparticles for cancer therapy. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(1): 289. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01475-w>.
- Taneja, N., Alam, A., Patnaik, R. S., Taneja, T., Gupta, S., Sunil, M. K. (2021). Understanding nanotechnology in the treatment of oral cancer: a comprehensive review. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 38(6): 1-48. <https://doi.org/10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2021036437>.
- Wong, R. S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30: 87. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-87>.
- Xu, X., Lai, Y., Hua, Z. C. (2019). Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience Reports*, 18(1): 39. <https://doi.org/10.1042/BSR20180992>.
- Yang, L., Xu, J., Xie, Z., Song, F., Wang, X., Tang, R. (2021). Carrier-free prodrug nanoparticles based on dasatinib and cisplatin for efficient antitumor *in vivo*. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 16(6): 762-771. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2021.08.001>.