

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EFECTO CITOTÓXICO Y ANTIMETASTÁSICO DE NANOPARTÍCULAS  
POLIMÉRICAS CARGADAS CON CURCUMINA Y GEMCITABINA SOBRE  
CÉLULAS A549 Y B16F10

POR

OSCAR ALBERTO ALVAREZ QUEZADA

Como requisito parcial para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

2025

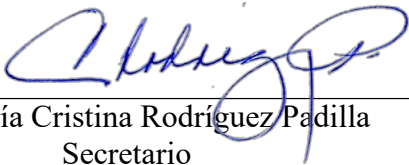
EFFECTO CITOTÓXICO Y ANTIMETASTÁSICO DE NANOPARTÍCULAS  
POLIMÉRICAS CARGADAS CON CURCUMINA Y GEMCITABINA SOBRE  
CÉLULAS A549 Y B16F10

Comité de tesis



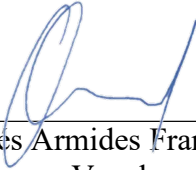
---

Dr. Pablo Zapata Benavides  
Presidente



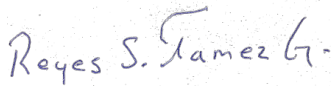
---

Dra. María Cristina Rodríguez Padilla  
Secretario



---

Dr. Moisés Armides Franco Molina  
Vocal



---

Dr. Reyes Tamez Guerra  
Vocal



---

Dra. Diana Ginette Zarate Triviño  
Vocal



---

Dra. Katushka Arevalo  
Subdirector de Posgrado

EFFECTO CITOTÓXICO Y ANTIMETASTÁSICO DE NANOPARTÍCULAS  
POLIMÉRICAS CARGADAS CON CURCUMINA Y GEMCITABINA SOBRE  
CÉLULAS A549 Y B16F10

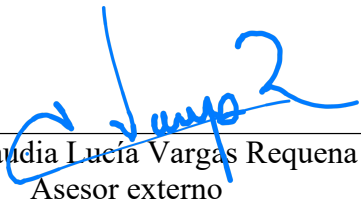
Esta tesis fue realizada por medio de una colaboración existente entre el Laboratorio de  
Inmunología y Virología de la UANL y el Laboratorio de Biotecnología de la UACJ.

**Dirección de tesis**



---

Dr. Pablo Zapata Benavides  
Director



---

Dra. Claudia Lucía Vargas Requena  
Asesor externo

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

## AGRADECIMIENTOS

**Dios:** *¡Alaben al Señor porque él es bueno, y su gran amor perdura para siempre!* 1 de Crónicas 16:34

**CONACYT:** Un Agradecimiento especial por la beca de manutención que me fue otorgada, número de apoyo 744432.

**A mis padres:** Ustedes siempre fueron y serán mi impulso a lo largo de mi vida. Sin duda alguna les agradezco haberme apoyado siempre en este mundo académico, por motivarme a buscar mis sueños y nunca cortar mis alas. ¡Todo lo que soy se los debo a ustedes!

**A mis hermanos:** Ustedes son el motor más importante que tengo en mi vida en este momento, gracias por su amor y apoyo siempre. Gracias por escucharme en esas largas charlas donde me apasiono platicando de lo que me gusta mucho la ciencia.

**Dr. Pablo:** Indiscutiblemente tengo que agradecer a una de las personas que más ha contribuido en mi formación académica. Toda mi admiración para usted siempre, gracias por recibirme una y otra vez en su laboratorio y compartir conmigo su conocimiento. Nunca voy a olvidar que me haya abierto las puertas de su espacio de trabajo desde que era yo un estudiante de licenciatura. Gracias por permitirme crear, equivocarme y aprender. Doc, gracias por su amistad, créame que la valoro infinitamente.

**Dra. Claudia:** Todo mi cariño y respeto para usted siempre. Le tengo una gran admiración como profesora, investigadora y como persona, espero en algún momento poder alcanzar esos estándares. Con su ejemplo, cada día trato de ser mejor investigador y mejor persona. Gracias por tanto apoyo siempre, por usted estoy en este camino de la investigación y su presencia en mi vida me ha ayudado a poder apreciar lo maravillosas que son las moléculas. Infinitas gracias por enseñarme que no existen los límites para los sueños y por siempre apoyar mis ideas que a veces sonaban muy locas o inalcanzables ¡Siempre me ayudó a aterrizarlas! Me siento muy afortunado de poder contar con su amistad ¡Gracias totales!

**Dra. Diana Zarate:** Quiero agradecerle el haber contribuido en mi formación en esta nueva rama de las formas farmacéuticas. Fue un camino difícil, pero ¡se logró! Gracias por las charlas y por las palabras de aliento que me daba cuando yo pensaba que las cosas no iban bien.

**Laboratorio de Inmunología y Virología:** Gracias por permitirme hacer uso de sus instalaciones y por arroparme como un estudiante más de su gran grupo de trabajo. Gracias a todos los doctores y compañeros que siempre están dispuestos a apoyar.

**Laboratorio de Biotecnología de la UACJ:** Gracias por ser mi primer hogar en la investigación, por permitirme realizar mis estancias, por el apoyo a mi trabajo y todo el aprendizaje adicional que obtuve. Cada vez que he regresado me han recibido con los brazos abiertos y eso es algo que valoro mucho.

**Al Dr. Edgar Mendoza, a la Dra. Cristina Rodríguez, al Dr. Reyes-Támez y al Dr. Moisés Franco:** Doctores, gracias por su colaboración en este trabajo, por su guía y por los comentarios hechos a este documento. Que honor contar con la enseñanza de personas tan profesionales, estoy seguro de que recibí la mejor educación.

**A mis amigos del laboratorio L5: Cecy, Juanma y Gerardo,** definitivamente tengo que agradecerles su amistad, tantos momentos de diversión, las charlas, su ayuda en mis experimentos y sus sugerencias en mi trabajo. Son unos genios y los admiro grandemente, espero que esta amistad y colaboración perdure a través de los años.

**Mara, Wendy y Rubén:** Mucha gracias por apoyarme cuando más lo necesite, por sus pláticas y sobre todo los buenos momentos que compartieron conmigo aun cuando el estrés era muy grande. ¡Espero que esta amistad que ha nacido con ustedes se mantenga siempre!

**Norayma:** Mi gran amiga, ¿qué puedo decir que no te haya dicho antes? Gracias por existir, gracias por ser mi roca en los momentos más difíciles, gracias por todo. Cuando el día se pone gris, sé que siempre puedo contar con tus palabras de aliento. No sé si algún día pueda contribuir grandemente en la terapia contra el cáncer, pero me motiva mucho saber que tu piensas que puedo lograrlo.

**A mis amigos Aracely, Janeth, Luisa, Alan, Abraham y Lupita:** Todo mi cariño y admiración siempre, gracias por sus palabras de aliento, por su compañía y por escucharme en todo este proceso del doctorado y en todos mis pesares de la vida. Con ustedes el tiempo se me pasa como un rayo, los buenos momentos parece que duran poco. Espero contar con su amistad hasta que los días de mi vida se terminen ¡les debo muchos amigos y nunca podre compensarlos por ello!

**A mi Shalom:** En cada paso que doy, siento sus oraciones para mi vida, mi salud y mi felicidad. Han dejado una huella imborrable en mí. Gracias por sostenerme en los momentos más difíciles que me tocó vivir en esta etapa. Siempre los llevo en mi corazón.

**A mi familia en Monterrey, ¡mis tíos y primos!:** Ustedes forman una parte tan elemental de todo esto, gracias por recibirme, por hacerme sentir en mi hogar. Con ustedes nunca hubo cabida para la tristeza y aunque extrañaba mi casa, siempre me sentí acompañado. Gracias por su amor infinito, llegue como un extraño con una bolsa llena de sueños que ahora se están haciendo realidad, gracias por compartir esta dicha conmigo.

**A mi familia:** A mis abuelos, tíos, primos y sobrinos. Nunca podría terminar de mencionarlos a todos, porque gracias a Dios soy bendecido con la dicha de tener una inmensa familia. Sin embargo, ustedes me han mantenido a flote toda mi vida. Gracias por su inmenso amor, por el orgullo que sienten por mí, por el apoyo y las palabras de aliento que me dan. He tenido una vida muy hermosa y muchos de esos momentos han sido con ustedes. Por muchos años más juntos.

**A mis estudiantes y tesisistas:** Que dicha y felicidad siento de haber podido conocerlos y contar con ustedes en todo momento. Siempre me agradecen por todo lo que les enseñe, pero lo que no saben es que yo también he aprendido mucho con ustedes. Los aprecio mucho y este éxito lo comparto con todos. ¿aprendieron algo hoy? Eso es lo más importante.

## DEDICATORIA

*A ti mi héroe, el hombre que más he amado. Papá, esto es por y para ti,  
espero que desde donde estes te sientas orgulloso de mi, te amo.*

*A mi mamá y mis hermanos, los amo con todo mi corazón y son mi razón  
para vivir.*

*A mis abuelos, que dicha tuve de conocerlos y disfrutarlos.*

*A mi familia, gracias por su apoyo y amor siempre.*

# ÍNDICE

|                                                                                          |             |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>AGRADECIMIENTOS .....</b>                                                             | <b>V</b>    |
| <b>DEDICATORIA .....</b>                                                                 | <b>VII</b>  |
| <b>ÍNDICE .....</b>                                                                      | <b>VIII</b> |
| <b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>                                                            | <b>XI</b>   |
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>                                                           | <b>XII</b>  |
| <b>RESUMEN .....</b>                                                                     | <b>XIV</b>  |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                                                    | <b>XV</b>   |
| <b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>                                                             | <b>1</b>    |
| <b>2. ANTECEDENTES .....</b>                                                             | <b>3</b>    |
| <b>2.1 Cáncer .....</b>                                                                  | <b>3</b>    |
| 2.1.1 Genes supresores de tumor .....                                                    | 3           |
| 2.1.2 Oncogenes .....                                                                    | 3           |
| <b>2.2 Curcumina .....</b>                                                               | <b>5</b>    |
| 2.2.1 Curcumina y los procesos de malignidad en cáncer .....                             | 6           |
| <b>2.3 Gemcitabina .....</b>                                                             | <b>7</b>    |
| 2.3.1 Gemcitabina y la malignidad en cáncer .....                                        | 7           |
| <b>2.4 Hormesis de los agentes quimioterapéuticos .....</b>                              | <b>8</b>    |
| 2.4.1 Hormesis de la curcumina .....                                                     | 8           |
| 2.4.2 Hormesis de la gemcitabina .....                                                   | 9           |
| <b>2.5 Biodisponibilidad de los quimioterapéuticos .....</b>                             | <b>10</b>   |
| 2.5.1 Biodisponibilidad de la curcumina .....                                            | 11          |
| 2.5.2 Biodisponibilidad de la gemcitabina .....                                          | 12          |
| <b>2.6 Nanopartículas de quitosano como sistemas de administración de fármacos .....</b> | <b>13</b>   |
| 2.6.1 Efecto del tamaño de la partícula en la internalización celular .....              | 14          |
| 2.6.2 Efecto de la carga de la partícula en la interacción con membrana .....            | 15          |
| 2.6.3 Efecto de la morfología de la partícula en la aceptación celular .....             | 16          |
| <b>2.7 Nanopartículas de quitosano y cáncer .....</b>                                    | <b>17</b>   |
| <b>2.8 Efectos de la nanoparticulación de curcumina en cáncer .....</b>                  | <b>18</b>   |
| <b>2.9 Efecto de la nanoparticulación de gemcitabina en cáncer .....</b>                 | <b>19</b>   |
| <b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>                                                            | <b>20</b>   |
| <b>4. HIPÓTESIS .....</b>                                                                | <b>21</b>   |
| <b>5. OBJETIVOS .....</b>                                                                | <b>22</b>   |

|           |                                                                                                                  |           |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.1       | Objetivo General .....                                                                                           | 22        |
| 5.1.1     | Objetivos específicos .....                                                                                      | 22        |
| <b>6.</b> | <b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>                                                                                | <b>23</b> |
| 6.1       | Formación de nanopartículas .....                                                                                | 23        |
| 6.2       | Caracterización de las nanopartículas .....                                                                      | 24        |
| 6.2.1     | Determinación de tamaño de partícula .....                                                                       | 24        |
| 6.2.2     | Determinación de la carga superficial (Potencial $\zeta$ ) .....                                                 | 24        |
| 6.2.3     | Identificación de grupos funcionales .....                                                                       | 24        |
| 6.2.4     | Microscopia electrónica de barrido por emisión de campo FE-SEM .....                                             | 25        |
| 6.2.5     | Ensayo de liberación farmacéutica .....                                                                          | 25        |
| 6.3       | Efecto sobre la viabilidad celular .....                                                                         | 26        |
| 6.3.1     | Cultivo de células adherentes .....                                                                              | 26        |
| 6.3.2     | Cultivo primario de células mononucleares de sangre periférica .....                                             | 26        |
| 6.3.3     | Ensayo de viabilidad celular por actividad metabólica (MTT) en células adherentes .....                          | 26        |
| 6.3.4     | Ensayo de viabilidad celular por actividad metabólica (resazurina) en CMSP .....                                 | 27        |
| 6.3.5     | Cálculo de la concentración media inhibitoria ( $CI_{50}$ ) y el índice de selectividad .....                    | 28        |
| 6.3.6     | Análisis de interacciones farmacológicas .....                                                                   | 28        |
| 6.4       | Evaluación de la activación de muerte celular .....                                                              | 28        |
| 6.4.1     | Análisis de la integridad de la membrana .....                                                                   | 28        |
| 6.4.2     | Determinación de muerte celular por tinción Anexina V/ Ioduro de propidio .....                                  | 29        |
| 6.5       | Expresión transcripcional de WT1 y Par-4 .....                                                                   | 29        |
| 6.5.1     | Extracción de RNA .....                                                                                          | 29        |
| 6.5.2     | Síntesis de cDNA .....                                                                                           | 30        |
| 6.5.3     | Reacción en cadena de la polimerasa en punto final .....                                                         | 30        |
| 6.6       | Implicaciones de los tratamientos en el potencial metastásico .....                                              | 31        |
| 6.6.1     | Movilidad celular - Ensayo de herida .....                                                                       | 31        |
| 6.6.2     | Determinación de la capacidad de invasión celular .....                                                          | 31        |
| 6.6.3     | Ensayo clonogénico .....                                                                                         | 32        |
| 6.7       | Análisis estadístico .....                                                                                       | 33        |
| <b>7</b>  | <b>RESULTADOS .....</b>                                                                                          | <b>34</b> |
| 7.1       | Selección de condiciones para la síntesis de nanopartículas por gelación iónica .....                            | 34        |
| 7.2       | Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas .....                                                        | 35        |
| 7.3       | Efecto citotóxico de curcumina-gemcitabina libres y nanoencapsuladas sobre células tumorales .....               | 38        |
| 7.4       | Determinación de las interacciones farmacológicas de curcumina-gemcitabina sobre las líneas tumorales .....      | 39        |
| 7.5       | Identificación de patrones de muerte celular inducidos por curcumina-gemcitabina libres y nanoparticuladas ..... | 41        |
| 7.6       | Modulación de la expresión de WT1 inducido por curcumina-gemcitabina libres y nanoparticulados .....             | 43        |
| 7.7       | Efecto de curcumina-gemcitabina libres y nanoparticulados sobre los parámetros de metástasis .....               | 45        |

|           |                                                          |            |
|-----------|----------------------------------------------------------|------------|
| <b>8</b>  | <b>DISCUSIÓN .....</b>                                   | <b>52</b>  |
| <b>9</b>  | <b>CONCLUSIONES .....</b>                                | <b>63</b>  |
| <b>10</b> | <b>PERSPECTIVAS.....</b>                                 | <b>64</b>  |
| <b>11</b> | <b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>                                | <b>65</b>  |
| <b>12</b> | <b>RESUMEN BIOGRÁFICO .....</b>                          | <b>98</b>  |
| <b>13</b> | <b>PRODUCTOS ENTREGABLES DE ESTA INVESTIGACIÓN .....</b> | <b>100</b> |

## ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla I.</b> Gradiente de elución de la fracción de saponinas obtenidas de sílice gel, en un sistema de alta resolución con fase reversa, C8. ....                           | 25 |
| <b>Tabla II.</b> Secuencias de oligonucleótidos, temperaturas de alineamiento y amplicones esperados para los transcritos WT1, PAR-4 y G3PDH. ....                              | 30 |
| <b>Tabla III.</b> Valores de tamaño, carga superficial e índices de polidispersidad de Np-Q, Np-Cur y Np-Gem antes y después de la liofilización en presencia de sacarosa. .... | 35 |
| <b>Tabla IV.</b> Intensidades características de los grupos funcionales del quitosano presentadas en el espectro de infrarrojo medio. ....                                      | 36 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Esquema del programa de amplificación de genes. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 31 |
| <b>Figura 2.</b> Análisis del tamaño y propiedades de las partículas. (A) Tamaño de partícula, (B) índice de polidispersidad, (C) propiedades espectroscópicas y (D) fluorescencia de diferentes soluciones de curcumina en DMSO y metanol, así como sus proporciones en ácido acético 0.1 N. ....                                                                                                                                                                                                                                              | 34 |
| <b>Figura 3.</b> Espectros obtenidos para quitosano comercial, Np-Q, Np-Cur y Np-Gem, con identificación de los grupos funcionales presentes. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 36 |
| <b>Figura 4.</b> Determinación de la morfología de Np-Q, Np-Cur y Np-Gem mediante microscopía electrónica de barrido. Se tomaron imágenes a un aumento de $\times 13,000$ . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 37 |
| <b>Figura 5.</b> Determinación de la presencia de curcumina y gemcitabina en las nanopartículas de quitosano. Se identificó la curcumina a un tiempo de retención de $7.40 \pm 0.4$ min, y se identificó la gemcitabina a un tiempo de retención de $2.38 \pm 0.4$ min. ....                                                                                                                                                                                                                                                                    | 37 |
| <b>Figura 6.</b> Evaluación de la viabilidad de las células A549, B16F10 y PBMC tratadas con curcumina libre (A) y Np-Cur (C) a concentraciones de 5, 10, 20 y 40 $\mu\text{M}$ ; gemcitabina libre (B) y Np-Gem (D) a concentraciones de 0.05, 0.1, 0.5 y 1 $\mu\text{M}$ ; y el control Np-Q (E y F). Todos los tratamientos se incubaron durante 48 h. ....                                                                                                                                                                                  | 39 |
| <b>Figura 7.</b> Tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio de células tratadas con Np-Q, Np-Cur (20 $\mu\text{M}$ ), Np-Gem (0.2 $\mu\text{M}$ ) y su combinación. Las micrografías se tomaron a un aumento de 20X después de 48 h de incubación con los tratamientos. ....                                                                                                                                                                                                                                                           | 42 |
| <b>Figura 8.</b> Análisis de la muerte celular por citometría de flujo, tinción con bromuro de propidio y anexina V de células A549 y B16F10, tratadas con curcumina libre y Np-Cur a una concentración 20 $\mu\text{M}$ ; gemcitabina libre y Np-Gem a concentraciones de 0.2 $\mu\text{M}$ ; la combinación de ambas concentraciones libres y nanoparticuladas, y el control de Np-Q. Todos los tratamientos se incubaron durante 48 h. ....                                                                                                  | 43 |
| <b>Figura 9.</b> Análisis de la expresión de WT1 y Par-4 en células B16F10 tratadas con curcumina (10 $\mu\text{M}$ ), gemcitabina (0.05 y 0.1 $\mu\text{M}$ ) y sus combinaciones, en su forma sin nanoparticular y nanoparticulada, con incubaciones a 48 h. La grafica se muestra con las medias y desviaciones estándar de los tratamientos, el ANOVA de 2 vías y las comparaciones múltiples de Dunnett y Sidak se presentan con una significancia de $p = 0.05$ . ....                                                                    | 44 |
| <b>Figura 10.</b> Análisis de la expresión de WT1 y Par-4 en células A549 tratadas con curcumina (10 $\mu\text{M}$ ), gemcitabina (0.05 y 0.1 $\mu\text{M}$ ) y sus combinaciones, en su forma sin nanoparticular y nanoparticulada, con incubaciones a 48 h. La grafica se muestra con las medias y desviaciones estándar de los tratamientos, el ANOVA de 2 vías y las comparaciones múltiples de Dunnett y Sidak se presentan con una significancia de $p = 0.05$ . ....                                                                     | 45 |
| <b>Figura 11.</b> Ensayo de cierre de herida presentado en monocapas de células B16F10 tratadas con curcumina (10 $\mu\text{M}$ ), gemcitabina (0.05 y 0.1 $\mu\text{M}$ ) y sus combinaciones, en su forma sin nanoparticular y nanoparticulada, con incubaciones a 48 h. Las micrografías fueron tomadas en un aumento de 10 X. La grafica se muestra con las medias y desviaciones estándar de los tratamientos, el ANOVA de 2 vías y las comparaciones múltiples de Dunnett y Sidak se presentan con una significancia de $p = 0.05$ . .... | 46 |
| <b>Figura 12.</b> Ensayo de cierre de herida presentado en monocapas de células A549 tratadas con curcumina (10 $\mu\text{M}$ ), gemcitabina (0.05 y 0.1 $\mu\text{M}$ ) y sus combinaciones, en su forma sin nanoparticular y nanoparticulada, con incubaciones a 48 h. Las micrografías fueron tomadas en un aumento de 10 X. La                                                                                                                                                                                                              |    |

grafica se muestra con las medias y desviaciones estándar de los tratamientos, el ANOVA de 2 vías y las comparaciones múltiples de Dunnett y Sidak se presentan con una significancia de  $p = 0.05$ . ..... 47

**Figura 13.** Evaluación del efecto del pretratamiento por 48 h con Curcumina (10  $\mu\text{M}$ ), Gemcitabina (0.05 y 0.1  $\mu\text{M}$ ) y sus combinaciones, en su forma sin nanoparticular y nanoparticulada, sobre la invasión de células B16F10. El proceso de invasión se realizó durante 6 h. A) Micrografías del ensayo de invasión de células B16F10. B) Análisis estadístico del ensayo de invasión. La grafica se muestra con las medias y desviaciones estándar de los tratamientos, el ANOVA de 2 vías y las comparaciones múltiples de Dunnett y Sidak se presentan con una significancia de  $p = 0.05$ . ..... 48

**Figura 14.** Evaluación del efecto del pretratamiento por 48 h con Curcumina (10  $\mu\text{M}$ ), Gemcitabina (0.05 y 0.1  $\mu\text{M}$ ) y sus combinaciones, en su forma sin nanoparticular y nanoparticulada, sobre la invasión de células A549. El proceso de invasión se realizó durante 6 h. A) Micrografías del ensayo de invasión de células A549. B) Análisis estadístico del ensayo de invasión. La grafica se muestra con las medias y desviaciones estándar de los tratamientos, el ANOVA de 2 vías y las comparaciones múltiples de Dunnett y Sidak se presentan con una significancia de  $p = 0.05$ . ..... 49

**Figura 15.** Evaluación del efecto del pretratamiento por 48 h con de Curcumina (10  $\mu\text{M}$ ), Gemcitabina (0.05 y 0.1  $\mu\text{M}$ ) y sus combinaciones, en su forma sin nanoparticular y nanoparticulada, sobre la invasión de células B16F10. El proceso de implantación fue monitoreado por 7 días. A) Micrografías del ensayo de invasión de células B16F10. B) Análisis estadístico del ensayo de invasión. La grafica se muestra con las medias y desviaciones estándar de los tratamientos, el ANOVA de 2 vías y las comparaciones múltiples de Dunnett y Sidak se presentan con una significancia de  $p = 0.05$ . ..... 50

**Figura 16.** Evaluación del efecto del pretratamiento por 48 h con Curcumina (10  $\mu\text{M}$ ), Gemcitabina (0.05 y 0.1  $\mu\text{M}$ ) y sus combinaciones, en su forma sin nanoparticular y nanoparticulada, sobre la invasión de células B16F10. El proceso de implantación fue monitoreado por 7 días. A) Micrografías del ensayo de invasión de células B16F10. B) Análisis estadístico del ensayo de invasión. La grafica se muestra con las medias y desviaciones estándar de los tratamientos, el ANOVA de 2 vías y las comparaciones múltiples de Dunnett y Sidak se presentan con una significancia de  $p = 0.05$ . ..... 51

## RESUMEN

El cáncer de pulmón es una de las neoplasias más frecuentes y la principal causa de muerte relacionada con cáncer a nivel mundial. Fármacos como la curcumina y la gemcitabina presentan limitaciones terapéuticas debido a su baja biodisponibilidad, ya sea por su hidrofobicidad o por la necesidad de transportadores específicos. En este trabajo se evaluó el efecto de la nanoencapsulación de curcumina y gemcitabina en nanopartículas de quitosano sobre la citotoxicidad, apoptosis, migración, invasión e implantación celular en líneas A549 (adenocarcinoma pulmonar) y B16F10 (melanoma murino). Las nanopartículas sintetizadas presentaron tamaños entre 180 y 197 nm, con cargas superficiales positivas entre 11.8 y 16.3 mV. Se realizaron caracterizaciones fisicoquímicas (UV-Vis, FT-IR, SEM), ensayos de viabilidad, citometría de flujo, análisis morfológicos de apoptosis, ensayos de cicatrización (migración), invasión en cámaras Transwell y clonogenicidad. La encapsulación nanométrica potenció el efecto citotóxico y apoptótico de los fármacos, especialmente en células A549. En células B16F10, dosis bajas de gemcitabina incrementaron características metastásicas, como la migración e implantación, efecto contrarrestado por la curcumina en ambas formas (libre y nanoparticulada). La combinación nanoparticulada (Np-Gem + Np-Cur) mostró un efecto inhibidor sinérgico en A549, atenuando comportamientos metastásicos. Estos resultados sugieren que la nanotecnología basada en quitosano puede optimizar la administración de quimioterapéuticos, reduciendo la dosis necesaria, minimizando efectos secundarios y modulando negativamente los efectos pro-metastásicos de algunos agentes citotóxicos, lo que representa una estrategia prometedora para mejorar la eficacia terapéutica en cáncer de pulmón y melanoma.

## ABSTRACT

Lung cancer is one of the most common malignancies and the leading cause of cancer-related death worldwide. Drugs such as curcumin and gemcitabine face therapeutic limitations due to their low bioavailability, stemming from their hydrophobic nature or the need for specific transport mechanisms. This study evaluated the effects of nanoencapsulated curcumin and gemcitabine in chitosan-based nanoparticles on cytotoxicity, apoptosis, migration, invasion, and implantation in A549 (lung adenocarcinoma) and B16F10 (murine melanoma) cell lines. The synthesized nanoparticles measured between 180 and 197 nm in size and exhibited positive surface charges ranging from 11.8 to 16.3 mV. Physicochemical characterization was performed using UV-Vis spectroscopy, FT-IR, and SEM. Cytotoxicity, flow cytometry for cell death mechanisms, morphological apoptosis assays, wound healing (migration), Transwell invasion, and clonogenic assays were conducted. Nanoformulation significantly enhanced the cytotoxic and pro-apoptotic effects of both drugs, particularly in A549 cells. In B16F10 cells, low-dose gemcitabine increased metastatic traits such as migration and implantation, which were mitigated by curcumin in both free and nanoparticulated forms. The combined nanoparticle formulation (Np-Gem + Np-Cur) showed a synergistic inhibitory effect in A549 cells, suppressing metastatic behavior. These findings suggest that chitosan-based nanotechnology can improve chemotherapeutic delivery by reducing required doses, minimizing side effects, and counteracting pro-metastatic responses, offering a promising strategy for enhancing therapeutic outcomes in lung cancer and melanoma.

## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón representa uno de los principales desafíos para la salud pública a nivel mundial, constituyendo aproximadamente el 12.4 % de todos los casos nuevos de cáncer y siendo la principal causa de muerte por enfermedades oncológicas (Siegel et al., 2022). Cada año se estiman alrededor de 1.6 millones de nuevos casos y cerca de un millón de muertes atribuibles a esta neoplasia (Siegel et al., 2024). El pronóstico de los pacientes con cáncer pulmonar es generalmente desfavorable, en especial en estadios metastásicos, donde la tasa de supervivencia a cinco años se reduce a menos del 4%. El tabaquismo, tanto activo como pasivo, continúa siendo el principal factor de riesgo asociado (Siegel et al., 2022; Walser et al., 2008). El tratamiento estándar para la enfermedad avanzada incluye agentes quimioterapéuticos como la gemcitabina, un análogo de nucleósido utilizado como fármaco de primera línea (Hayashi et al., 2011; Toschi et al., 2005). No obstante, su eficacia puede verse limitada por una captación intracelular deficiente, particularmente en células tumorales con baja expresión del transportador de nucleósidos hENT1 (Mini et al., 2006; Oguri et al., 2009; Vincenzi et al., 2017). Además, estudios recientes han revelado que algunos agentes quimioterapéuticos, incluida la gemcitabina, pueden inducir respuestas horméticas, caracterizadas por efectos bifásicos en los que dosis subletales favorecen la supervivencia celular y promueven fenómenos como la transición epitelio-mesenquimatoso (EMT), aumentando así el potencial metastásico (M. Chen et al., 2014; Y. Chen et al., 2022a; Garcia-Gil et al., 2021; Salinas-Jazmín et al., 2024; Sugisawa et al., 2019; R. Zhang et al., 2022). Estas respuestas adaptativas podrían contribuir tanto a la resistencia a la quimioterapia como a la recaída tumoral, en parte a través de la activación de vías promotoras de metástasis como el eje CXCL12/CXCR4, y las rutas de señalización Akt y ERK (Arora et al., 2013; S. Singh et al., 2010). Con el objetivo de contrarrestar estos efectos adversos, se ha estudiado el uso de curcumina, un compuesto polifenólico natural con propiedades antiinflamatorias, antiproliferativas y antimetastásicas (H. Chen et al., 2008; Gao et al., 2012; Killian et al., 2012; M. Li et al., 2023; Tang & Cao, 2022). La curcumina regula múltiples vías de señalización implicadas en la progresión tumoral y ha mostrado efectos sinérgicos cuando se combina con agentes

quimioterapéuticos (Dong et al., 2021; Epelbaum et al., 2010; P. Liu et al., 2020). Sin embargo, su aplicación clínica se ha visto limitada debido a su baja solubilidad en agua y escasa biodisponibilidad sistémica. En este contexto, las estrategias de nanoencapsulación, particularmente mediante polímeros biocompatibles como el quitosano, han emergido como alternativas prometedoras para mejorar la estabilidad, absorción y distribución de la curcumina (Asif et al., 2023; Jin et al., 2016; Pandya et al., 2020; Yoncheva et al., 2020). Además, los sistemas de liberación controlada basados en nanopartículas pueden optimizar las propiedades farmacocinéticas tanto de la curcumina como de la gemcitabina, permitiendo una modulación de las respuestas horméticas y una posible reducción de efectos adversos sistémicos (Haggag et al., 2018; Kim et al., 2006; Moreno et al., 2008, 2010; Sudhakar et al., 2020). En el presente estudio se evaluaron los efectos de formulaciones libres y nanoencapsuladas de curcumina y gemcitabina sobre los mecanismos de muerte celular y el comportamiento metastásico de las líneas celulares A549 (carcinoma pulmonar humano) y B16F10 (melanoma murino). Esta última se emplea frecuentemente como modelo experimental de metástasis pulmonar en ratones inmunocompetentes. Mediante el análisis de respuestas celulares y moleculares inducidas por dosis subletales de estos compuestos, se busca determinar si la formulación en nanopartículas puede mejorar la eficacia terapéutica y contrarrestar los efectos pro-metastásicos asociados a la quimioterapia convencional, en el contexto de neoplasias pulmonares y melanoma metastásico.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Cáncer**

El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizado por la presencia de mutaciones genéticas que pueden incluir sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos, afectando el ciclo celular y la apoptosis (Anoosha et al., 2016; Iengar, 2012; Waarts et al., 2022). La presencia de proteínas mutantes relacionadas con la reparación del ADN indica una predisposición al desarrollo de neoplasias (Iengar, 2012). Así, los genes asociados con el origen del cáncer se pueden clasificar en dos grandes grupos, genes supresores de tumores y oncogenes (Kontomanolis et al., 2020).

#### **2.1.1 Genes supresores de tumor**

Los genes supresores de tumores regulan negativamente los procesos de proliferación y crecimiento celular, además de promover la apoptosis en las células afectadas. Las mutaciones en estos genes inducen la pérdida de función de las proteínas que codifican, lo que facilita condiciones óptimas para el surgimiento de células tumorales a través de la proliferación descontrolada y la inhibición de la señalización de muerte celular (Meza-Junco et al., 2006; Ríos-Hernández & Hernández-Menéndez, 2001). Uno de los principales genes supresores de tumores es la proteína p53, que se localiza en el núcleo y es responsable de impedir la formación de células anormales. Esta proteína detecta daños en el ADN, inhibe la proliferación de las células afectadas y envía señales para activar la apoptosis (Finlay et al., 1989). El 87% de las mutaciones observadas en p53 derivan en la pérdida de su función y se presentan en neoplasias como las del mama, colon, pulmón y cerebro (Gomez-Lazaro et al., 2004; Meza-Junco et al., 2006; Ríos-Hernández & Hernández-Menéndez, 2001).

#### **2.1.2 Oncogenes**

Los oncogenes son genes dominantes que, al mutar, adquieren características tumorogénicas que provocan un aumento en el crecimiento y la proliferación celular (Vicente-Dueñas et al., 2013; Witsch et al., 2010). Dentro de los oncogenes, encontramos

a los factores de crecimiento, un grupo que incluye a c-sis, que promueve la formación del factor de crecimiento derivado de plaquetas; hst/K-fgf, que produce un factor de crecimiento angiogénico; y int-2, que induce la formación de otros factores de crecimiento (Meza-Junco et al., 2006; Witsch et al., 2010).

Otro grupo de proto-oncogenes está constituido por los receptores de factores de crecimiento, que incluyen erb-B1, erb-B2, met, c-fms, trk, kit, ret y sea. Las mutaciones en estos receptores conducen a su activación en ausencia de ligandos, lo cual puede ocurrir debido a cambios conformacionales o procesos de oligomerización (Meza-Junco et al., 2006; Vicente-Dueñas et al., 2013). Los principales factores de crecimiento relacionados con el cáncer son el EGF y el TGF- $\alpha$ , cuya función es promover la angiogénesis y el posterior desarrollo de metástasis (Meza-Junco et al., 2006). Otros factores ampliamente descritos en la angiogénesis son los factores de crecimiento del endotelio vascular. Estos factores son liberados por las células tumorales y sirven como señales para las células endoteliales, facilitando la formación de nuevos capilares que permiten la irrigación y nutrición del tumor (Mercurio, 2013; Selgas et al., 2001).

Un grupo importante de oncogenes es el que transporta señales de la membrana al núcleo. Este grupo incluye aquellos que codifican proteínas citoplasmáticas de tipo proteína-quinasa (Sever & Brugge, 2015; Vicente-Dueñas et al., 2013). Dentro de estas proteínas se encuentran fes, ick, abl, frg, src, pim-1, raf-1, yes y mos, así como las proteínas unidas a GTP, como H-ras, K-ras, N-ras, gip-2 y gsp, entre otras. Las mutaciones en los genes que codifican estas proteínas unidas a GTP alteran la función de sus dominios de regulación negativa, obstaculizando así la fosforilación de los sustratos por parte de estas proteínas (Meza-Junco et al., 2006; Sever & Brugge, 2015).

Finalmente, el grupo más grande de oncogenes está formado por los reguladores de la transcripción. Estos genes poseen diversos dominios funcionales, incluyendo aquellos que permiten la unión al ADN y las interacciones proteína-proteína. A través de estos dominios, se activa la transcripción de genes que estimulan la replicación del ADN (Vishnoi et al., 2020). Entre estos se encuentran los genes de la familia myc, como c-myc,

L-myc y N-myc, además de otros como erbA-1, erbA-2, ets-1, ets-2, fos, jun, myb, rel, ski, HOX11, E2A y WT1 (Meza-Junco et al., 2006; Vishnoi et al., 2020).

## 2.2 Curcumina

La curcumina, o (1E, 6E)-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona, es un compuesto polifenólico aislado de la *Curcuma longa* (Milobedeska et al., 1910). Está compuesto por dos segmentos de o-metoxifenol conectados por un enlace de siete carbonos a una fracción dicetona alfa, beta-insaturada (Milobedeska et al., 1910; Priyadarsini, 2014). Esta estructura hace que la curcumina sea una molécula hidrofóbica, lo que la hace soluble en solventes como metanol, dimetilsulfóxido, acetona e isopropanol (Cui et al., 2021).

Al tener resonancia la curcumina absorber luz en la región UV-Visible, con picos entre los 250-270 nm y 350-450 nm y alcanzando un máximo de absorción en los 422 nm (Kadam et al., 2013; Priyadarsini, 2014). También se ha identificado que exhibe autofluorescencia detectable a partir de los 470 nm (Priyadarsini, 2014). Estas propiedades espectroscópicas pueden variar según el solvente en el que se encuentre disuelta o dispersa (Patra & Barakat, 2011), un fenómeno observado también en otros curcuminoides estructuralmente similares (Gracetto et al., 2011; Makwana et al., 2011). La variabilidad en las propiedades espectroscópicas se debe a que los solventes favorecen diferentes formas moleculares de la curcumina, la forma enólica o la cetónica (Kazakova et al., 2022). Por ejemplo, el metanol favorece la formación de la forma cetónica, mientras que el DMSO favorece la forma enólica (Ivanova et al., 2015; Rege et al., 2019). La forma cetónica es la más estable y se le atribuye un potente efecto antioxidante, mientras que la forma enólica es susceptible a la degradación y presenta menores efectos terapéuticos (Rege et al., 2019).

Además de su amplio uso como colorante en alimentos, la curcumina se emplea como principio activo en diversos tratamientos. Entre sus propiedades se incluyen su actividad antioxidante, antiinflamatoria, antiproliferativa, antiangiogénica, antimicrobiana, antiparasitaria e inmunomoduladora. También es capaz de suprimir la trombosis, proteger

contra el infarto de miocardio y reducir los niveles de azúcar en sangre en humanos (Aggarwal & Harikumar, 2009; Vieira-de-Melo et al., 2018).

### **2.2.1 Curcumina y los procesos de malignidad en cáncer**

La curcumina es una molécula capaz de inducir procesos de muerte celular, como la apoptosis, necroptosis y autofagia, en células cancerosas (Endo et al., 2020; Y. C. He et al., 2019; Lee et al., 2021; Mackenzie et al., 2008), además de provocar alteraciones en el ciclo celular (Y. C. He et al., 2019; Mackenzie et al., 2008). Se ha observado que puede influir en procesos clave en la malignidad del cáncer, como la metástasis y la angiogénesis. Mediante ensayos de movilidad celular, se ha determinado que la curcumina puede inhibir el movimiento de células tumorales de cáncer de colon (HCT-116, LoVo y CT26) y cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231). También se ha demostrado que puede inhibir la expresión de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9 (Cao et al., 2017; Shakibaei et al., 2007; Swarnakar et al., 2005), proteínas implicadas en la degradación de la matriz extracelular durante la migración de células tumorales (Bachmeier et al., 2001; Gialeli et al., 2011; Hosono et al., 2000). La expresión de MMP-9 está regulada por WT1 (Katuri et al., 2014; Marcet-Palacios et al., 2007), y se ha observado que la curcumina reduce la expresión de WT1. Este podría ser uno de los mecanismos por los cuales este antioxidante se asocia con la inhibición de la metástasis (Anuchapreeda et al., 2006).

Otras moléculas reguladas por WT1 incluyen la E-cadherina y la vimentina (Brett et al., 2013; Han et al., 2020; B. Huang et al., 2012), las cuales están estrechamente relacionadas con la transición epitelio-mesenquimal (EMT), un proceso asociado a la progresión del cáncer. De igual manera, se ha identificado que los tratamientos con curcumina regulan la expresión de estos genes; también se ha demostrado que reduce la expresión de NF-kappa B y aumenta la expresión de E-cadherina en células de carcinoma nasofaríngeo (Wong et al., 2010). Un fenómeno similar se observó al analizar el efecto de la curcumina en la migración e invasión de células madre de MCF-7, donde la curcumina incrementó la expresión de E-cadherina, lo que bloqueó la transición EMT (Mukherjee et al., 2014). Así mismo, se ha observado que en células Caco-2, una concentración de 10  $\mu$ M induce el

incremento en la expresión de proteínas como Claudina-1 y ZO-1, que facilitan la unión célula-célula (X. Zhou et al., 2021).

## **2.3 Gemcitabina**

La gemcitabina, también conocida como 4-amino-1-[(2R, 4R, 5R)-3,3-difluoro-4-hidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il] pirimidin-2-ona, es un antimetabolito y análogo de la desoxicitidina. Este compuesto presenta dos átomos de flúor en lugar del hidroxilo que se encontraría en la ribosa (Hui & Reitz, 1997). Es un compuesto que es soluble en metanol, etanol, isopropanol, n-propanol, agua y acetato de etilo (P. Li et al., 2024). La presencia de los dobles enlaces contenidos en la base nitrogenada le confiere un máximo de absorción a 275 nm (R. Singh et al., 2015). La gemcitabina es un inhibidor nucleosídico que se utiliza solo o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos como tratamiento de diversos tipos de cáncer, como el de pulmón de células no pequeñas, de páncreas, vejiga y mama (Toschi et al., 2005).

### **2.3.1 Gemcitabina y la malignidad en cáncer**

La gemcitabina es un antimetabolito que bloquea la progresión de las células en el límite de la fase G1/S, con lo cual induce la apoptosis (Hamed et al., 2013; Namima et al., 2020). Es una molécula utilizada como terapia de primera línea en pacientes con cáncer metastásico de páncreas, mama y vejiga (Blackstein et al., 2002; Greenhill, 2011; Zeng et al., 2023). Suele ser utilizada en combinación con otros quimioterapéuticos a base de platino, antraciclinas y algunos taxanos, lo que ha permitido un incremento en su eficacia en comparación con su uso individual (Laessig et al., 2006; Von Hoff et al., 2013; Wilson et al., 2021). En combinación con cisplatino se utiliza como terapia de primera línea en el cáncer de pulmón de células no pequeñas (Brodowicz et al., 2006). La eficacia de estos esquemas combinados ha aumentado hasta un valor entre el 58% y 92% en tratamientos que incluyen gemcitabina, antraciclinas como la doxorrubicina y el paclitaxel (Bellmunt et al., 2000; Zielinski, 2003). Se ha demostrado que la gemcitabina también puede ser un agente sensibilizador al efecto de la inmunoterapia (Principe et al., 2020).

Análisis sobre eficacia de gemcitabina en pacientes con cáncer de mama avanzado, han demostrado que mejora la supervivencia general, la supervivencia libre de la progresión y la tasa de respuesta objetiva (Xie et al., 2018). Sin embargo, se ha establecido que es levemente toxica, aunque no se ha relacionado su presencia con daño hepático, renal o insuficiencia cardiaca (Tonato et al., 1995). Así mismo, algunos estudios han demostrado que no produce toxicidad hematológica en pacientes con edades mayores de 70 años (Crombag et al., 2014).

## **2.4 Hormesis de los agentes quimioterapéuticos**

La respuesta bifásica de los compuestos quimioterapéuticos define su dualidad en el comportamiento frente a las células cancerígenas; es decir, la capacidad de presentar efectos beneficiosos y citotóxicos dependientes de la concentración (Calabrese, 2001; Jodynisliefert & Kujawska, 2020). Esta respuesta incluye el fenómeno de la hormesis, donde bajas concentraciones de un agente quimioterapéutico pueden ser beneficiosas, mientras que a concentraciones altas se produce toxicidad (Bordonaro & Lazarova, 2024; Mattson, 2008). Aunque pocas investigaciones se han centrado en aclarar estos efectos, existe evidencia de que los quimioterapéuticos en bajas concentraciones pueden inducir mecanismos de rescate frente a la citotoxicidad o desencadenar la transición epitelio-mesenquimal. Estos procesos han sido ampliamente estudiados en modelos de cáncer de mama, páncreas y pulmón (M. Chen et al., 2014; Y. Chen et al., 2022a; Garcia-Gil et al., 2021; Salinas-Jazmín et al., 2024; Subramanian et al., 2019; Sugisawa et al., 2019; R. Zhang et al., 2022).

### **2.4.1 Hormesis de la curcumina**

Los efectos beneficiosos de la curcumina sobre células cancerosas suelen observarse a concentraciones menores a 10  $\mu\text{M}$ , donde predomina su potencial antioxidante (Disilvestro et al., 2012; Gomes et al., 2021; Manson, 2005). Aunque este efecto antioxidante tiene una acción antitumoral, también se ha identificado que la regulación de las especies reactivas de oxígeno (ERO) esta vinculadas a un aumento en la progresión y metástasis tumoral (Cockfield & Schafer, 2019; Hawk et al., 2016).

En células de neuroblastoma tratadas con curcumina se identificó un aumento en la expresión del factor nuclear eritroide 2 (Nrf2), una proteína que regula la activación de genes encargados de proteger a la célula del daño causado por los radicales libres (Ashrafizadeh et al., 2020; H. Wang et al., 2016). La expresión de este factor ha demostrado incrementar los mecanismos de resistencia a quimioterapéuticos y favorecer la proliferación de células tumorales (Y. Guo & Shen, 2017; Kitamura & Motohashi, 2018).

En las células CaCo-2 tratadas con dosis de 100  $\mu$ M se ha observado un incremento en la producción de la HSP70, una proteína de choque térmico que ayuda en la integridad celular y que inhibe mecanismos de muerte como la apoptosis y autofagia (Dudeja et al., 2009; M. Guo et al., 2021; Witkin et al., 2017). Esta misma concentración las células CaCo-2 han presentado citotoxicidad celular. Esto sugiere que, mientras se inducen los mecanismos de muerte celular, también podrían estar activándose mecanismos de supervivencia (Qin et al., 2023). Un ejemplo de esto es el caso del uso de 25  $\mu$ M de curcumina en células de hepatocarcinoma humano Huh-7, donde se produjo apoptosis y al mismo tiempo, se activaba la autofagia como un mecanismo de supervivencia. Este proceso se identificó que la autofagia se encargó de eliminar las mitocondrias desestabilizadas por la apoptosis, evitando así que la muerte celular se llevara a cabo (Moustapha et al., 2015).

#### **2.4.2 Hormesis de la gemcitabina**

Aunque se ha demostrado que la gemcitabina puede inhibir el desarrollo de tumores sólidos, en modelos ortotópicos de cáncer de páncreas puede generar un incremento en la metástasis. Mientras que el uso de dosis de 125 mg/kg no mostraron cambios en la tasa de metástasis, el uso de 25 mg/kg durante 6 semanas la incremento (Sugisawa et al., 2019). Esto se debe a que la gemcitabina promueve la supervivencia de las células pancreáticas mediante la inducción de la unión del ligando CXCL12 al receptor CXCR-4. Esta interacción activa las vías de señalización de Akt y ERK, que contribuyen a la adquisición de quimiorresistencia y la inducción de la metástasis (Arora et al., 2013; S. Singh et al., 2010). Adicionalmente, el uso de gemcitabina en los ratones C57BL/6 KPC produce un

incremento del inhibidor tisular de metaloproteinasas de matriz 1 (TIMP1), lo que permitió la aparición de neoplasias intraepiteliales pancreáticas, la supervivencia clonogénica, la implantación hepática y un incremento en la densidad vascular (D'Costa et al., 2017).

En células de cáncer de mama MCF-7, se ha demostrado que la gemcitabina revierte los efectos citotóxicos de agentes quimioterapéuticos, como la protopina (Garcia-Gil et al., 2021). Por otro lado, en células de cáncer de mama triple negativas MDA-MB-231, se ha encontrado que la exposición prolongada a dosis bajas de gemcitabina activa la autofagia, actuando como un mecanismo de supervivencia que rescata a las células de los efectos apoptóticos (M. Chen et al., 2014). De igual forma, el uso de concentraciones de 0.001 gemcitabina y 0.001-0.00005  $\mu$ M de gemcitabina-cisplatino sobre células B16F10, MCF-7 y T-47D, provocaron un aumento en la proliferación celular, migración e invasión, así como una inhibición de los mecanismos de apoptosis. En estudios *in vivo*, se observó que los tumores de células B16F10 implantados en ratones C57BL/6J tratados con 1.25 mg/kg de gemcitabina o 0.6/0.03 mg/kg de gemcitabina/cisplatino mostraron un aumento en la expresión de los receptores de crecimiento endotelial vascular 1 y 2, así como de la VE-cadherina. Por otro lado, la terapia con gemcitabina sola incrementó la expresión de la MMP-9 (Y. Chen et al., 2022a).

## **2.5 Biodisponibilidad de los quimioterapéuticos**

La biodisponibilidad presentada por los quimioterapéuticos constituye uno de los principales desafíos en el diseño y administración de terapias oncológicas eficaces. Este parámetro, definido como la fracción del principio activo que se encuentra en circulación sanguínea de forma inalterada y en una concentración ubicada en la ventana terapéutica, se ve alterado por la solubilidad, estabilidad química y propiedades fisicoquímicas de las moléculas administradas (Bertram-Ralph & Amare, 2023; Paul, 2019; Quinlan, 2024). Así pues, una de las principales limitaciones de algunos agentes terapéuticos suele ser su baja solubilidad en medios acuosos, además de su escasa estabilidad en condiciones fisiológicas como pH, actividad enzimática digestiva y la oxidación (Glassman & Muzykantov, 2019; Vinarov et al., 2021; Vllasaliu, 2025). Estas condiciones no solo

comprometen su disponibilidad, sino que alteran su perfil de toxicidad, su selectividad celular y la eficacia terapéutica. Aunado a ello, las formulaciones tradicionales suelen presentar una baja distribución selectiva, induciendo un incremento en la toxicidad sistemática y limitando las dosis máximas tolerables (Glassman & Muzykantov, 2019; Ku, 2008; Verma et al., 2010).

La vía oral es una de las formas más utilizadas de administración, en especial para terapias ambulatorias o crónicas (Casado et al., 2023; Koselke et al., 2015). Esta preferencia es debida a su facilidad de uso, a su menor costo y a ser poco invasiva (Alqahtani et al., 2021; des Rieux et al., 2006). Sin embargo, también presenta varios inconvenientes, particularmente en la administración de agentes quimioterapéuticos. Ejemplo de ello es la hidrólisis o desnaturalización de principios activos sensibles a medios ácidos, tomando en cuenta que el estómago humano presenta valores de pH en un intervalo entre 1.5 y 2 (Beasley et al., 2015). Además, muchos agentes anticancerígenos son ionizables, y su grado de ionización depende del pKa de la molécula y del pH del medio en el que se encuentran (Alfarouk et al., 2015; Yu et al., 2007). Este fenómeno afecta considerablemente la capacidad para difundir sobre las membranas biológicas, ya que las estructuras no ionizadas suelen ser lipofílicas y por tanto absorbibles (Alagga et al., 2025). Por otro lado, en el intestino delgado, el principal lugar donde se da la absorción, también se genera un entorno adverso por su elevada actividad enzimática, alta presencia de transportadores de eflujo como las glicoproteínas P (P-gp), y la facilidad de generación de interacciones entre los principios activos y los alimentos. Por todo ello, muchos agentes antineoplásicos presentan baja biodisponibilidad y reducida eficacia terapéutica (Drozdzik et al., 2020; Mai et al., 2021).

### **2.5.1 Biodisponibilidad de la curcumina**

La curcumina es una molécula con baja biodisponibilidad, tras la administración oral de hasta 1 g/kg no es detectable en suero ni en plasma sanguíneo en hasta 24 horas (Ravindranath & Chandrasekhara, 1980; Wahlström & Blennow, 1978). Luego de su administración oral, la mayor parte de la curcumina se elimina en las excretas la porción absorbida se metaboliza rápidamente en el hígado (Hoehle et al., 2006). Al analizar la

presencia de curcumina en el tejido intestinal, se encontró que hasta un 80% se desintegra en la luz intestinal y solo un 3% fue cuantificado en el tejido (Ravindranath & Chandrasekhara, 1981). Asimismo, se han detectado concentraciones traza en los riñones y el hígado, lo que indica una distribución pobre hacia estos órganos (Ravindranath & Chandrasekhara, 1980).

La curcumina es susceptible a la inestabilidad química provocada por el pH. Se ha observado que, al exponerse a un pH superior a 7 durante 30 minutos o más, se descompone formando trans-6-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-2,4-dioxo-5-hexanal, ácido ferúlico, feruloilmetano y vainillina (Ahuja & Pathak, 2009; Kumavat et al., 2013; Tønnesen & Karlsen, 1985). En el organismo humano, la saliva, cerebro, corazón, testículos, huesos, páncreas, vías biliares, riñones, vejiga, útero, músculo y sangre presentan un pH superior a 7 (Gaohua et al., 2021). Esta degradación contribuye a la disminución de las concentraciones de curcumina en plasma, suero y tejidos.

### **2.5.2 Biodisponibilidad de la gemcitabina**

La gemcitabina administrada por vía oral presenta una biodisponibilidad de solo el 10%, debido a su conversión a 2',2'-difluorodesoxiuridina en el metabolismo de primer paso a través de la citidina desaminasa (Beumer et al., 2008; Bjånes et al., 2020; Veltkamp et al., 2008). Por tal motivo, la gemcitabina presenta un tiempo de vida medio entre 7 y 18 min luego de una administración intravenosa (Schoppmeyer et al., 2005). Aunado a ello, su naturaleza hidrofílica obstaculiza su difusión pasiva en las membranas celulares (Sharifian Gh., 2021), por lo que requiere el uso del transportador de nucleósidos equilibrativo humano-1 (hENT1), (García-Manteiga et al., 2003). Algunas células tumorales pueden suprimir la expresión de este transportador obstaculizando así la internalización de la gemcitabina (Y. Liu et al., 2017), e incluso su expresión puede ser utilizada como un marcador de mal pronóstico y resistencia durante su uso como tratamiento (Dede et al., 2013; Santini et al., 2010; Vincenzi et al., 2017).

## **2.6 Nanopartículas de quitosano como sistemas de administración de fármacos**

El uso de formas farmacéuticas no convencionales está abriendo un nuevo panorama en la terapia de diversas enfermedades, como el cáncer. Uno de los principales objetivos es lograr la administración de fármacos con diferentes polaridades (Kevadiya et al., 2018; Topete et al., 2020), así como optimizar las dosis para aumentar su efectividad y reducir los efectos adversos (Ghazal et al., 2024; Papachristos et al., 2023). Con base en estas formulaciones, se pueden administrar fármacos de manera eficiente y localizada. Esto puede representar una forma de disminuir los efectos adversos ocasionados por la administración sistémica y asegurar la mayor absorción por parte del tejido diana (Khalid et al., 2018; X. Zhang et al., 2018).

Una de las formas farmacéuticas más estudiadas en la actualidad son las nanopartículas, debido a su alta estabilidad, alta capacidad de portador, fácil traslado de moléculas no solubles en sistemas acuosos, su fácil administración y asimilación por el organismo (Ashouri & Samadi, 2019; Gelperina et al., 2005; Ozakar et al., 2019; Sandhya et al., 2017; Sultan et al., 2022; Vaughan et al., 2021). Estos sistemas nanoparticulados se han utilizado para la aplicación de terapia génica y para el traslado de moléculas no solubles. Además de su eficacia en la entrega de fármacos, las nanopartículas presentan una baja capacidad de inducir reacción inmunológica, debido a que para su síntesis se utilizan elementos inocuos como la proliprolactona y el quitosano (Del Prado-Audelo et al., 2019; Snehalatha et al., 2008).

El quitosano es un polisacárido derivado de la desacetilación de la quitina, compuesto por unidades repetidas de glucosamina y N-acetilglucosamina unidas mediante enlaces glucosídicos  $\beta(1\rightarrow4)$  (Ojeda-Hernández et al., 2020; Rinaudo, 2006). Este polímero natural destaca por su biocompatibilidad, biodegradabilidad y su carga positiva en ambientes ligeramente ácidos, lo que le permite establecer interacciones electrostáticas con membranas celulares, mucosas, ácidos nucleicos y fármacos con carga negativa (Gagliardi et al., 2023; Pilipenko et al., 2019; Ways et al., 2022). Estas propiedades han

posicionado al quitosano como uno de los principales materiales para el diseño de nanopartículas y nanocápsulas, capaces de transportar y liberar principios activos en respuesta a estímulos específicos del microambiente tumoral, como la actividad enzimática, el potencial redox intracelular o la acidificación del medio (Gohil et al., 2021; Laaraibi et al., 2018; Maleki et al., 2024).

Las nanopartículas basadas en quitosano han demostrado una notable capacidad para proteger los principios activos frente a la degradación enzimática y química, preservando su integridad hasta alcanzar el sitio blanco (Ozakar et al., 2019; Sultan et al., 2022; Vaughan et al., 2021). Además, gracias a su habilidad para favorecer la endocitosis mediada por receptores, incrementan la permeabilidad celular, facilitando la absorción intracelular de los compuestos encapsulados (Guan et al., 2023; Tahara et al., 2009). Estas nanopartículas permiten también una liberación sostenida del fármaco, lo que puede potenciar el efecto terapéutico y, al mismo tiempo, reducir los efectos adversos sistémicos (N. X. Chen et al., 2023; Hou et al., 2012; Lin et al., 2024).

Por otra parte, los grupos amino libres ( $-NH_2$ ) presentes en la estructura del quitosano permiten su funcionalización química con diversos ligandos de reconocimiento molecular, como péptidos, transferrina, anticuerpos monoclonales o moléculas pequeñas como el ácido fólico (Gabold et al., 2023; Myat et al., 2024; Sathiyaseelan et al., 2022; Tangthong et al., 2021). Esta modificación superficial permite desarrollar sistemas de liberación dirigidos, capaces de reconocer receptores sobreexpresados en células tumorales, incrementando así la especificidad terapéutica y reduciendo la afectación de células sanas (dos Santos et al., 2025; Gabold et al., 2023; Myat et al., 2024).

### **2.6.1 Efecto del tamaño de la partícula en la internalización celular**

El tamaño de las nanopartículas es un elemento determinante en la eficacia de su internalización celular. Diversos estudios han demostrado que las nanopartículas con tamaños menores a los 200 nm suelen internalizarse de forma más adecuada en células no fagocíticas y que estos mecanismos mayormente presentados son la endocitosis mediada por clatrin y caveolinas (Chithrani et al., 2010; W. Jiang et al., 2008; Tahara et al.,

2009; Tammam et al., 2015). Así mismo, son partículas que tienen a presentar mayor estabilidad coloidal lo que permite una fácil escapada de la captación por el sistema reticular, lo que prolonga su tiempo en circulación y favorece la liberación de su contenido y su acumulación en tumores a través del efecto de permeabilidad y retención mejorada (EPR) (Hasan et al., 2019; Maeda et al., 2000; Nair et al., 2019). De forma contraria, se ha observado que las partículas que presentan tamaños en micras suelen ser más fácilmente internalizadas por células fagocíticas, esto debido a que son los tamaños que suelen presentar los organismos susceptibles a la fagocitosis como son las bacterias y las levaduras (Champion et al., 2008; Tahara et al., 2009).

En las nanopartículas de quitosano sintetizadas mediante gelación iónica, se ha determinado que múltiples parámetros impactan de manera significativa en el tamaño final de las partículas. Entre estos, la polaridad de los solventes empleados durante la síntesis desempeña un papel crucial, al modificar la hidrofobicidad general del sistema. Asimismo, la viscosidad de la solución precursora y la velocidad de agitación proporcionada durante la etapa de formación de nanopartículas afectan la dinámica de nucleación y crecimiento de estas (Subedi et al., 2016; Vaezifar et al., 2013). Finalmente, la fuerza centrífuga aplicada durante el proceso de graneamiento puede inducir diferentes grados de compactación entre las partículas formadas, generando alteraciones sustanciales en su tamaño hidrodinámico final (Büyük et al., 2020; Sari et al., 2018).

### **2.6.2 Efecto de la carga de la partícula en la interacción con membrana**

La carga superficial de las nanopartículas es un factor determinante en su interacción con las membranas celulares, lo que influencia procesos como la adhesión, internalización, distribución y toxicidad. Esta carga es expresada comúnmente como potencial zeta ( $\zeta$ ), parámetro electrocinético que refleja la diferencia entre el potencial de la superficie de la partícula y el medio en el que se encuentra embebida (C. He et al., 2010; Magalhaes & Glogauer, 2009; Yue et al., 2011). La interacción de las partículas con las membranas se ve promovida por las propias características estructurales de esta bicapa, donde la presencia de fosfatidilserina, ácido siálico u otros fosfolípidos aniónicos le confieren un potencial basal entre los -65 y -80 mV (C. He et al., 2010; McCormick, 2004).

La naturaleza negativa de las membranas plasmáticas ha permitido que sean las partículas con carga positiva las que generan una mejor interacción y que, por ende, se propicien los mecanismos de internalización como la endocitosis mediada por clatrininas o caveolinas (C. He et al., 2010; Tahara et al., 2009). Sin embargo, cargas mayores a los 30 mV pueden generar efectos citotóxicos debido a la inducción de desestabilización de la membrana y la formación de poros, además de ser identificadas y eliminadas por el sistema inmunológico (Dahal et al., 2025; Shao et al., 2015). Por el contrario las nanopartículas con carga negativa suelen ser repelidas por las membranas, pero pueden ser fácilmente internalizadas por mecanismos como la fagocitosis (Champion et al., 2008; Tahara et al., 2009). Este proceso tiene explicación en que las bacterias y algunos hongos suelen presentar cargas negativas debidas a los componentes de sus paredes celulares y capsulas (Boyles et al., 2015; C. He et al., 2010).

### **2.6.3 Efecto de la morfología de la partícula en la aceptación celular**

La morfología de las partículas se refiere a la forma que estas adquieren, la cual puede ser esférica, cilíndrica, discoidal, entre otras. Dentro de este parámetro también puede considerarse la textura superficial, que puede clasificarse como lisa o rugosa. Estas características tienen un impacto directo en el reconocimiento, adhesión, internalización y tráfico intracelular de las nanopartículas (J. Khan et al., 2021; Mukherjee et al., 2014). Las nanopartículas esféricas son las que presentan una mejor aceptación celular, ya que facilitan los procesos de endocitosis mediada por clatrininas. Aunado a ello, este tipo de partículas presentan una menor resistencia al flujo sanguíneo, lo que mejora su circulación y reduce su captación inespecífica por el sistema mononuclear fagocítico (Asha & Srivastava, 2025; L. Zhang, Wang, et al., 2019).

Por su parte, las nanopartículas no esféricas, como cilíndricas o en forma de bastón, pueden presentar ventajas en ciertos contextos, como una mayor facilidad de internalización por fagocitos. Esto tiene explicación en la analogía morfológica que este tipo de partículas pueden tener por algunos organismos patógenos como las bacterias bacilares. Los fagocitos, especialmente los macrófagos, han evolucionado para identificar e internalizar eficientemente partículas de esta forma. Por tanto, al encontrarse con una

partícula de dichas características pueden interpretarlo como una amenaza, por lo cual el proceso de fagocitosis se realizaría con mayor eficiencia (Tscheka et al., 2015; L. Zhang, Su, et al., 2019; L. Zhang, Wang, et al., 2019).

## **2.7 Nanopartículas de quitosano y el cáncer**

El quitosano es un polisacárido natural obtenido mediante la desacetilación parcial de la quitina, un biopolímero presente en los exoesqueletos de los crustáceos y en la pared celular de diversos hongos. Es una molécula biodegradable, no tóxica y e inmunológicamente aceptable. Su estructura contiene grupos amino libres, lo que le confiere un carácter catiónico (Tsigos et al., 2000). Esta propiedad favorece su interacción con las membranas celulares, que suelen ser de carga aniónica, facilitando así diversos mecanismos de internalización celular (Boyles et al., 2015; Magalhaes & Glogauer, 2009; Nogueira et al., 2013).

El quitosano ha demostrado la capacidad de inducir apoptosis intrínseca y extrínseca a través de la perturbación mitocondrial o de la estimulación de receptores de muerte como Fas. Además, es un inductor de especies reactivas de oxígeno que pueden inducir el daño oxidativo de mitocondrias, ADN y membranas celulares lo que contribuye aún más en la inducción de la apoptosis (Adhikari & Yadav, 2018; Wimardhani et al., 2014). Así mismo, se ha identificado que el quitosano puede suprimir la expresión de metaloproteasas, del VGEF y del mecanismo de señalización de mTOR-Akt, por lo que puede ser un supresor de la angiogénesis, la metástasis y la supervivencia tumoral (Fang et al., 2021; X. Huang et al., 2021; Kong et al., 2010). Finalmente, se ha determinado que los grupos amino de carga positiva en el quitosano tiene la capacidad de generar perturbaciones electrostáticas en las membranas y con ello inducir la necrosis celular (Qi et al., 2005; Wei et al., 2015).

Las nanopartículas de quitosano se diseñan principalmente como sistemas para encapsular o vehiculizar diversos agentes antitumorales, como genes, proteínas y compuestos naturales. Estas partículas incrementan el tiempo de vida de los principios activos protegiéndolos de la degradación prematura, además de permitir una liberación sitio-

dirigida y sostenida en el sitio tumoral. Este enfoque permite una reducción en los efectos secundarios sistemáticos y una mejora en la eficacia terapéutica (Alvizo-Báez et al., 2022; Jin et al., 2016; Sari et al., 2018; Sudhakar et al., 2020). La presencia de los grupos amino expuestos permite que estas partículas puedan ser funcionalizadas en su superficie con anticuerpos, péptidos y ligandos específicos que reconocen receptores sobre expresados en las células cancerosas, de esta manera favorecen la liberación activa y específica (Sakhi et al., 2022).

## **2.8 Efectos de la nanoparticulación de curcumina en cáncer**

La curcumina ha sido ampliamente investigada por sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antitumorales. No obstante, su aplicación clínica se ha visto limitada por su baja solubilidad en ambientes acuosos, lo que limita su estabilidad química y produce su rápida degradación metabólica (Anand et al., 2007; Kurien & Scofield, 2009). Para superar estas barreras, se han desarrollado diversas formulaciones basadas en nanotecnología, como nanopartículas poliméricas, liposomas, micelas y nanogeles (Asif et al., 2023; Diomedea et al., 2021; Grafeneder et al., 2022; Sarma et al., 2024). Estas nanoestructuras permiten mejorar la estabilidad de la curcumina, prolongar su tiempo de circulación y aumentar su acumulación en tejidos tumorales mediante el efecto de permeabilidad y retención aumentada (Yallapu et al., 2012, 2015)

Estudios *in vitro* han demostrado que nanopartículas de curcumina inducen apoptosis, detienen el ciclo celular y disminuyen la migración celular en múltiples líneas tumorales, incluyendo células de pulmón, mama y páncreas (Calibasi-Kocal et al., 2019; Endo et al., 2020; Esfahani et al., 2019; Mackenzie et al., 2008; Yang et al., 2022). En modelos *in vivo*, las nanopartículas han logrado reducir significativamente el crecimiento tumoral y la angiogénesis, con mínima toxicidad sistémica (Astinfeshan et al., 2019; Calibasi-Kocal et al., 2019). Entre los sistemas más estudiados se encuentran las nanopartículas de PLGA, PEG-PLA y quitosano, todas con potencial para ser usadas como coadyuvantes en quimioterapia, ya que potencian la actividad citotóxica de fármacos convencionales y modulan rutas moleculares como NF- $\kappa$ B, Akt y MAPK (Parenti et al., 2014; Shakibaei et al., 2007; Yallapu et al., 2010; Yao et al., 2015). Estas evidencias respaldan el desarrollo

de sistemas nanoparticulados de curcumina como estrategia terapéutica efectiva contra el cáncer.

## **2.9 Efecto de la nanoparticulación de gemcitabina en cáncer**

La gemcitabina presenta una eficacia clínica comprometida por su corta vida media plasmática, rápida desaminación hepática y distribución no selectiva, lo que genera toxicidad sistémica significativa (Hryciuk et al., 2017; Thompson et al., 2020). Además, su captación celular depende de transportadores de nucleósidos específicos, como los transportadores equilibrativos (ENT1, ENT2) y concentrativos (CNT1, CNT3), cuya baja expresión o disfunción en ciertos tumores ha sido asociada a resistencia intrínseca o adquirida (Y. Jia & Xie, 2015; Mini et al., 2006; Oguri et al., 2009; Vincenzi et al., 2017).

Para superar estas limitaciones, se han desarrollado formulaciones nanoparticuladas que encapsulan gemcitabina en polímeros como PLGA, quitosano y dendrímeros (Ramalho et al., 2024; C. Zhang et al., 2017). Estas formulaciones permiten una liberación sostenida, protegen al fármaco de su degradación enzimática y mejoran su acumulación en el tejido tumoral (Aydemir et al., 2024; Kakwere et al., 2020). Además, estudios recientes han mostrado que la coencapsulación o coadministración de gemcitabina con compuestos naturales, como la curcumina, potencia la citotoxicidad sobre células tumorales resistentes, disminuye la migración e invasión, e incluso revierte respuestas adaptativas compatibles con hormesis (Thongpon et al., 2024).

Las nanopartículas de gemcitabina han demostrado inducir una mayor apoptosis, reducir la clonogenicidad y activar vías como p53 y Bax (Behl et al., 2022; Yuan et al., 2017). Estos hallazgos apoyan la utilidad de la nanotecnología no solo como vehículo para mejorar la farmacocinética de la gemcitabina, sino también como plataforma para terapias combinadas más eficientes y dirigidas contra procesos metastásicos y resistentes.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de pulmón representa una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial, con un pronóstico particularmente desfavorable en etapas metastásicas (Siegel et al., 2022, 2024; Walser et al., 2008). El uso de agentes quimioterapéuticos como la gemcitabina suele representar la primera línea de tratamiento, sin embargo, su efectividad se ve limitada por factores como la baja captación celular, la rápida degradación y la resistencia generada por las células tumorales (Hayashi et al., 2011; Stoll et al., 2007; Toschi & Cappuzzo, 2009; Vincenzi et al., 2017). Aunado a ello, recientemente se ha demostrado que la exposición a concentraciones subletales de fármacos quimioterapéuticos puede inducir respuestas horméticas, favoreciendo la transición epitelio-mesénquima (EMT), favoreciendo la metástasis (Y. Chen et al., 2022b; Salinas-Jazmín et al., 2024; Sugisawa et al., 2019). Por otro lado, la curcumina, un compuesto natural con propiedades antitumorales, ha mostrado potencial para modular diversas rutas de señalización implicadas en la proliferación, invasión y migración celular (Calibasi-Kocal et al., 2019; Endo et al., 2020). Sin embargo, su escasa solubilidad en agua y baja biodisponibilidad han limitado su uso terapéutico (Asif et al., 2023; Pandya et al., 2020; Yoncheva et al., 2019). La nanoencapsulación de curcumina y gemcitabina, utilizando polímeros como el quitosano, puede ofrecer una estrategia eficaz para mejorar la estabilidad, biodistribución y absorción de ambos compuestos, a la vez que mitiga los efectos indeseables de la quimioterapia convencional. Este estudio es relevante porque integra el conocimiento sobre los efectos bifásicos de la quimioterapia con una estrategia de liberación controlada y dirigida mediante nanotecnología, evaluando su impacto sobre la viabilidad y el comportamiento metastásico en modelos celulares de cáncer pulmonar y melanoma. Comprender cómo la formulación nanoparticulada de curcumina y gemcitabina afecta los mecanismos celulares de muerte y metástasis puede abrir nuevas posibilidades para el desarrollo de terapias más eficaces y seguras contra el cáncer.

#### **4. HIPÓTESIS**

La nanoparticulación de curcumina y gemcitabina incrementa su citotoxicidad y reduce el comportamiento metastásico de las células de cáncer de pulmón A549 y de melanoma B16F10, en comparación con las formas libres de ambos compuestos.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo General**

Evaluar el efecto de la nanoencapsulación de curcumina y gemcitabina sobre la viabilidad celular y el potencial metastásico de las líneas celulares A549 (cáncer de pulmón) y B16F10 (melanoma).

#### **5.1.1 Objetivos específicos**

1. Evaluar el efecto citotóxico de curcumina y gemcitabina en su forma libre sobre células tumorales y células no tumorales.
2. Determinar las condiciones óptimas para la nanoencapsulación conjunta de curcumina y gemcitabina.
3. Analizar el impacto de los fármacos nanoencapsulados sobre los mecanismos de muerte celular en A549 y B16F10.
4. Identificar el efecto de las nanopartículas cargadas con curcumina y gemcitabina sobre la migración, invasión e implantación de las células A549 y B16F10.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Formación de nanopartículas

Las nanopartículas de quitosano (Np-Q), curcumina encapsulada (Np-Cur) y gemcitabina encapsulada (Np-Gem) se sintetizaron mediante el método de gelificación ionotrópica. Todas las soluciones utilizadas durante la síntesis se filtraron previamente con membranas de 0.22  $\mu\text{m}$  (Corning™, 431218). Para ello, se utilizó quitosano de peso molecular medio (75-85% de desacetilación, Sigma-Aldrich®) y tripolifosfato de sodio (TPP, FUJIFILM, 195-03645) como agente entrecruzante. En un vaso de precipitados, se mezclaron 20 mg de quitosano con 20 mL de ácido acético 0.1 N (Sigma-Aldrich®, A6283), y se dejó en agitación a 900 rpm durante 30 min (Corning™ 6796-420D). Posteriormente, la mezcla se dejó reposar durante toda la noche. Al término de este tiempo, la suspensión se centrifugó a 3,000 rpm durante 5 min (Eppendorf™, 5810 R), se recolectó el sobrenadante y su pH se ajustó a 5.0 (Jenway, 3510) utilizando NaOH 0.1 M (Sigma-Aldrich®, S5881). Esta solución se puso nuevamente en agitación a 900 rpm utilizando un agitador magnético en forma de cruz (Scicalife, 1M02993380K). En este punto, se puede adicionar a la mezcla de quitosano 400  $\mu\text{L}$  de una solución de curcumina (2.5 mg/mL en metanol grado reactivo) o 1.25  $\mu\text{L}$  de gemcitabina (40  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  en NaCl al 0.9% en agua) para la síntesis de Np-Cur y Np-Gem, respectivamente. Una vez añadido el principio activo se incorporaron, a razón de 1 gota cada 5 segundos, 4 mL de una solución de TPP a una concentración de 2 mg/mL (FUJIFILM, 195-03645), manteniéndose la agitación durante 10 min a temperatura ambiente. La mezcla completa se centrifugó a 3,000 rpm durante 15 min (Eppendorf, 5417 C) para granular las nanopartículas. El sobrenadante recuperado se suplementó con sacarosa al 5% (relación p/v) y luego se sometió a liofilización durante 24 h (Labconco®, freeze dryer/shell freeze system). El producto final se conservó a temperatura ambiente dentro de un desecador.

## **6.2 Caracterización de las nanopartículas**

### *6.2.1 Determinación de tamaño de partícula*

El tamaño de las partículas se determinó mediante un análisis de dispersión dinámica de luz (DLS). Para ello, se realizaron diluciones de la muestra en agua Milli-Q, en relaciones de 1:100 y 1:1000. El análisis se llevó a cabo con el equipo Zetasizer ZS90 (Malvern), utilizando un láser de He-Ne de 4 mW, junto con un detector de fotodiodo de avalancha con una eficiencia cuántica (Q.E) superior al 50% a 633 nm. La muestra se colocó en celdas cuadradas de poliestireno de 12 mm (Malvern, DTS0012), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se emplearon valores de índice de refracción y absorción de 1.330 y 0.001, respectivamente, los cuales corresponden al quitosano. Para el dispersante (agua), se utilizaron un valor de viscosidad de 0.8872 y un índice de refracción de 1.330. Los resultados obtenidos se presentan en términos del diámetro hidrodinámico calculado en nanómetros (nm). El análisis de las mediciones se realizó con el software Zetasizer, versión 7.11.

### *6.2.2 Determinación de la carga superficial (Potencial $\zeta$ )*

Para la determinación de carga superficial se realizó una dilución de la muestra, en una relación 1:10 con agua miliQ. El análisis de movimiento electroforético de partículas fue realizado en el equipo Zetasizer ZS90 Malvern, antes mencionado, utilizando celdas capilares plegadas (Malvern, DTS1070). Los valores de índice de refracción y absorción utilizados en las mediciones se indican en el apartado anterior. La medición se realizó con base en el modelo de Smoluchowski, los resultados obtenidos de las tres mediciones se reportan en una gráfica de potencial zeta, indicando el valor de carga superficial en mV. El Software utilizado para las mediciones fue el Zetasizer Software versión 7.11.

### *6.2.3 Identificación de grupos funcionales*

Para identificar la interacción entre los componentes de los biomateriales, se analizaron 5 mg de muestra utilizando el equipo Nicolet 6700 (Thermo Scientific). Este análisis se realizó mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR). Se realizó

un barrido en un rango de 4,000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ , con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$  y un promedio de 32 escaneos. Los datos obtenidos fueron procesados con el software OMNIC FTIR.

#### 6.2.4 Microscopia electrónica de barrido por emisión de campo FE-SEM

Para el análisis de la morfología de las partículas, se utilizaron portaobjetos sumergidos en ácido sulfúrico al 1% en agua destilada por 24 h. Al finalizar la preparación, los portaobjetos se lavaron con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente. Las muestras se aplicaron sobre los portaobjetos en diluciones de 1:10 y 1:100. Posteriormente, se analizaron en un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (JEOL, JSM-7000F) con un voltaje de aceleración de 15 kV. Las imágenes obtenidas fueron procesadas con el software Scandium de Olympus, de ResAlta Research Technologies.

#### 6.2.5 Ensayo de liberación farmacéutica

El ensayo de liberación se llevó a cabo mediante cromatografía de fase reversa, utilizando una columna ZPR BAX SB-C8 en un sistema de alta resolución (Agilent 1220 Infinity, LC System). Para ello, se diluyeron 15 mg de nanopartículas en 50  $\mu\text{L}$  de metanol y 450  $\mu\text{L}$  de ácido acético al 2% en agua, y posteriormente se centrifugaron a 3,000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se recuperó y se analizó utilizando un detector UV-Vis a longitudes de onda de 422 nm para la curcumina y 275 nm para la gemcitabina. La elución se realizó empleando un gradiente de 0 a 100% de acetonitrilo durante 3 min, seguido de un cambio de 70 a 30% de acetonitrilo durante 9 min (ver Cuadro 1), con un flujo de 0.3 mL/min.

**Tabla I.** Gradiente de elución de la fracción de saponinas obtenidas de sílice gel, en un sistema de alta resolución con fase reversa, C8.

| Tiempo (min) | Ácido acético 2% (%) | Acetonitrilo (%) |
|--------------|----------------------|------------------|
| 0.00         | 100                  | 0                |
| 3.00         | 0                    | 100              |
| 3.10         | 30                   | 70               |
| 12.00        | 70                   | 30               |
| 12.10        | 100                  | 0                |
| 15.00        | 0                    | 0                |

### **6.3 Efecto sobre la viabilidad celular**

#### *6.3.1 Cultivo de células adherentes*

Las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar de células pequeñas humanas (A549) y melanoma murino (B16F10) se obtuvieron de la colección American Type Culture Collection (ATCC®). Estas líneas celulares se cultivaron en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Caisson Labs, DMP15), suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB; Biowest, BIO-S1820-050) y un 1% de antibiótico-antimicótico (A-A: 10 U de penicilina, 0.01 mg de estreptomicina y 0.025 µg de anfotericina B; Sigma-Aldrich®, A5955). La incubación se realizó en condiciones de cultivo a 37°C, con un 50% de humedad relativa y un 5% de CO<sub>2</sub> (SHELLAB, SL2406). Cuando los cultivos alcanzaron una proliferación del 70% o más, se llevó a cabo el proceso de disgregación celular, comúnmente conocido como pase. Para ello, se utilizó Accutase (StemPro®, Accutase®) y un amortiguador salino de fosfatos (PBS) a pH 7.4, compuesto por 0.8% de NaCl, 0.02% de KCl, 0.114% de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0.02% de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Tras realizar tres pases, se consideró que el metabolismo celular estaba normalizado y que las células estaban listas para su uso en ensayos posteriores.

#### *6.3.2 Cultivo primario de células mononucleares de sangre periférica*

Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se obtuvieron mediante una venopunción a un donante sano y colectada en un tubo con EDTA. El aislamiento de las CMSP se realizó a través del protocolo de Histopaque® y se cultivaron en medio RPMI (Sigma–Aldrich®, R8758) suplementado con un 10% de suero fetal bovino y un 1% de mezcla de antibióticos y antimicótico.

#### *6.3.3 Ensayo de viabilidad celular por actividad metabólica (MTT) en células adherentes*

Con el objetivo de evaluar el efecto de los tratamientos sobre las líneas celulares, se realizó un ensayo de MTT. Se sembraron 5,000 células por pozo en placas de 96 pozos y se mantuvieron en condiciones de cultivo durante 24 h. Las células A549 se cultivaron con

un 10% de suero fetal bovino (SFB), mientras que las B16F10 se cultivaron con un 5% de SFB. Después de este periodo, se aplicaron los tratamientos con curcumina (Sigma-Aldrich®, C1386) en su forma libre y nanoparticulada en concentraciones de 5, 10, 20 y 40  $\mu$ M. Por otro lado, se probó la gemcitabina (AccogemMR, Accord) en su forma libre y nanoparticulada en concentraciones de 0.05, 0.1, 0.5 y 1  $\mu$ M. Todos los tratamientos se prepararon en dilución con medio de cultivo DMEM, que incluía un 5% de SFB y un 1% de antibiótico-antimicótico (A-A), con un porcentaje de metanol de 0.6%. Las muestras se incubaron durante 48 h en las condiciones de cultivo establecidas.

Al finalizar las incubaciones, se añadieron a cada pozo 20  $\mu$ L de una solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (Sigma-Aldrich®, M2128) a una concentración de 5 mg/mL, diluida en PBS a pH 7.4. La placa se incubó nuevamente durante 1 hora a 37°C. A continuación, se descartó el medio de cultivo de los pocillos por decantación y se disolvieron los cristales de formazán con 100  $\mu$ L de DMSO (Sigma-Aldrich®, 472301), aplicando agitación suave durante 1 minuto. La absorbancia de las muestras se midió en un lector de microplacas (Benchmark Plus™ BioRAD) a una longitud de onda de 570 nm. Los valores obtenidos se transformaron en porcentajes de viabilidad en relación con el control, y cada tratamiento se evaluó en sextuplicado. El análisis de los datos se realizó utilizando el programa GraphPad Prism, versión 6.0.

#### *6.3.4 Ensayo de viabilidad celular por actividad metabólica (resazurina) en CMSP*

La evaluación citotóxica comenzó colocando células en una placa de 96 pozos a una densidad de  $4 \times 10^4$  células por pozo. Las concentraciones utilizadas fueron de 5 a 40  $\mu$ M para la curcumina y de 0.05 a 1  $\mu$ M para la gemcitabina. Las muestras se incubaron durante 48 h. Posteriormente, se añadió 10  $\mu$ L de una solución de resazurina (Invitrogen™, R12204), y la mezcla se incubó durante 4 h adicionales. Las muestras se analizaron mediante un fluorómetro (ThermoFisher Varioskan lux) con una longitud de onda de excitación de 560 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm.

#### *6.3.5 Cálculo de la concentración media inhibitoria (CI<sub>50</sub>) y el índice de selectividad*

El cálculo de la CI<sub>50</sub> se determinó mediante el análisis de regresión no lineal del logaritmo de la concentración del tratamiento utilizado, contra el porcentaje de viabilidad obtenido para dicha concentración. El análisis se llevó a cabo mediante el software Quest Graph™ IC50 Calculator. El índice de selectividad se obtuvo dividiendo el valor del CI<sub>50</sub> de los HDFn, sobre el CI<sub>50</sub> obtenido para las células tumorales. Se considera selectivo cuando tiene un valor mayor de 1.

#### *6.3.6 Análisis de interacciones farmacológicas*

La determinación de las interacciones farmacológicas se llevó a cabo mediante el ensayo de MTT, previamente descrito. Para ello, se realizaron tratamientos con todas las permutaciones posibles entre la combinación de curcumina (5 y 10 µM) y gemcitabina (0.05 y 0.1 µM). Cada mezcla se evaluó por triplicado y con una incubación de 48 h. La determinación de la interacción farmacológica se llevó a cabo mediante el programa CompuSyn. Se consideró que un valor de índice de interacción (II) menor a 0.9 es indicativo de un efecto sinérgico sinergia, valores entre 0.9 a 1.1 indica efecto aditivo, y valores superiores a 1.1 indican un efecto antagónico (Chou & Martin, 2004).

### **6.4 Evaluación de la activación de muerte celular**

#### *6.4.1 Análisis de la integridad de la membrana*

Para este protocolo, se incubaron 15,000 células por pozo en cajas de 12 pozos, sobre cubreobjetos redondos de 18 mm (Pearl) durante 24 h. Posteriormente, las células se trataron con curcumina (20 µM) y gemcitabina (0.2 µM), así como con combinaciones de ambos, y se realizó una incubación adicional de 48 h. Al finalizar esta incubación, se lavaron los pozos con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se suplementaron con 10 µL de una solución de 100 µg/mL de naranja de acridina (Sigma-Aldrich®, 235474) y 100 µg/mL de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich®, E1510). Finalmente, se visualizaron las muestras con un microscopio de fluorescencia (Carl Zeiss Axio Observer, LLC), y las imágenes se evaluaron utilizando el programa ImageJ de FIJI.

#### 6.4.2 *Determinación de muerte celular por tinción Anexina V/ Ioduro de propidio*

Las células tumorales se sembraron a  $2 \times 10^4$  células por pozo en una placa de 24 pozos y se incubaron durante 24 h. Luego, fueron tratadas con 20  $\mu$ M de curcumina, 0.2  $\mu$ M de gemcitabina o su combinación, y se incubaron durante 24 h adicionales. Las células se tiñeron con una mezcla de Annexin V-FITC (2.5  $\mu$ L) y 7-AAD (5  $\mu$ L) en 200  $\mu$ L de PBS 1X a pH 7.4 con una incubación incubaron durante 15 min a 4°C en oscuridad. Posteriormente, las muestras se analizaron mediante un citómetro de flujo (BD Accuri™ C6), el análisis de datos se realizó utilizando el software FlowJo™ de Becton Dickinson.

### 6.5 Expresión transcripcional de WT1 y Par-4

#### 6.5.1 *Extracción de RNA*

El ARN total se extrajo de las células A549 y B16F10 tratadas con curcumina (20  $\mu$ M), gemcitabina (0.05 o 0.1  $\mu$ M) y sus combinaciones. Para ello, se sembraron 1 millón de células y se incubaron durante 24 h en condiciones de cultivo. Luego, se expusieron a los principios activos durante 48 h adicionales. Al finalizar la incubación, se recuperaron las células y se lavaron con PBS 1X. La extracción se realizó mediante el método de fenol-cloroformo (Chomczynski & Sacchi, 1987).

Los sedimentos celulares fueron tratados con 500  $\mu$ L de Trizol® y se almacenaron a -80°C hasta su uso posterior. Después, se adicionaron 133  $\mu$ L de cloroformo a las muestras, que se agitaron por inversión continua durante 15 segundos. Luego, las muestras reposaron a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente, se centrifugaron a 12,000 rpm durante 15 min a 4°C. Se recuperaron las fases acuosas y se suplementaron con 333  $\mu$ L de isopropanol frío para inducir la precipitación del ARN. Después, se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 min a 4°C. Se descartaron los sobrenadantes y se añadieron 500  $\mu$ L de etanol al 75% en H<sub>2</sub>O-DPEC. Luego, se centrifugaron a 7,500 rpm durante 5 min a 4 °C. Se decantaron los sobrenadantes y se secaron las muestras a temperatura ambiente durante 5 min. Finalmente, se resuspendió el ARN en 30  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O-DPEC y se almacenó a -80°C para su uso posterior.

### 6.5.2 Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se llevó a cabo utilizaron 1000 ng de RNA total, cuantificado utilizando el espectrofotómetro ND-2000. La reacción se llevó a cabo mediante el kit Promega ImProm-II® Rv Transcription System siguiendo la metodología y las condiciones propuestas por el proveedor.

### 6.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa en punto final

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando 200 ng de cDNA diluido en agua estéril, previamente cuantificado en el espectrofotómetro ND-2000. Las mezclas de reacción se formaron mediante 12.5 µL de GoTaq® Green Master Mix 2X (400 µM de dATP, 400 µM de dGTP, 400 µM de dCTP, 400 µM de dTTP y 3 mM de MgCl<sub>2</sub>), 1 µL de cada oligonucleótido (20 µM) y aforando con agua estéril 25 µL de reacción. Las reacciones de llevaron a cabo mediante la utilización del equipo Multigene Mini18 siguiendo el esquema general de PCR ejemplificado en la Figura 1. Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2%, a 100 V por 30 min. Los geles fueron fotografiados y la densitometría se llevó a cabo mediante el programa ImageJ de FIJI. Los datos fueron analizados mediante el programa GraphPad Prism versión 6.0.

**Tabla II.** Secuencias de oligonucleótidos, temperaturas de alineamiento y amplicones esperados para los transcritos WT1, PAR-4 y G3PDH.

| Gen   | Oligonucleótidos                   | °Tm   | Amplicón (bases) |
|-------|------------------------------------|-------|------------------|
| WT1   | Fw: 5'-GATAACCACACAACGCCCATC-3'    | 63°C  | 90               |
|       | Rv: 5'-CACACGTCGCACATCCTGAAT-3'    |       |                  |
| PAR-4 | Fw: 5'-GTCAACATCCCTGCCGCAGA-3'     | 54 °C | 254              |
|       | Rv: 5'-GGGAACCCACTTCTATCTGTTCGA-3' |       |                  |
| G3PDH | Fw: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'     | 60°C  | 452              |
|       | Rv: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'     |       |                  |

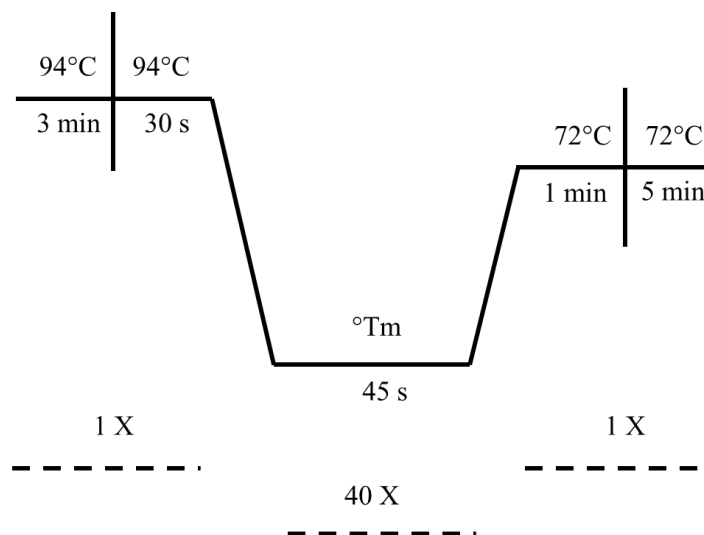


**Figura 1.** Esquema del programa de amplificación de genes.

## 6.6 Implicaciones de los tratamientos en el potencial metastásico

### 6.6.1 Movilidad celular - Ensayo de herida

Las células fueron sembradas en cajas de 6 pocillos, a relación de 200 000 células por pocillo. Se procedió a incubar en condiciones de cultivo hasta observar una confluencia aproximada del 80%. Al finalizar la incubación se retiró el medio de cultivo y se sustituyó por medio suplementado con SFB al 2% y mitomicina a 5 µg/mL (Mitole<sup>®</sup>, Lemery), realizando una incubación de 1 h. Luego, el medio con mitomicina fue retirado y se hizo un rayado en la monocapa de células con una punta de micropipeta amarilla, los pocillos fueron lavados PBS estéril. Posteriormente, a los pozos se les adicionaron los tratamientos de curcumina (10 µM), gemcitabina (0.05 y 0.1 µM) y las combinaciones (10-0.05 y 10-0.1 µM) diluidos en medio suplementado con 2% de SFB. Las muestras se incubaron y se tomaron fotografías en los tiempos 24, 48 y 72 h. Las imágenes se evaluaron utilizando el programa ImageJ de FIJI, utilizando el complemento de análisis de cierre de heridas (Suarez-Arnedo et al., 2020).

### 6.6.2 Determinación de la capacidad de invasión celular

La capacidad de migración celular se realizó utilizando los dispositivos Transwell<sup>®</sup> con poros de 8 µm (Corning<sup>®</sup>, CLS3422). Para ello, los filtros fueron recubiertos con 10 µg

de colágeno de tendón bovino (Sigma-Aldrich®, 9007-34-5) diluido en 100 µL de ácido acético 0.1 N a pH 3.5 y se dejaron incubar por 12 h. Al cabo de este tiempo, los filtros fueron lavados con PBS estéril. A la par de esto, se incubaron 15,000 células en placas de 24 pozos y se retaron con las drogas y sus combinaciones por 48 h. Posteriormente, el medio con los principios activos fue retirado y las células se lavaron con PBS estéril, se disgregaron de las cajas y el contenido completo de células fue depositado en la cámara superior del Transwell®, diluidas en 400 µL medio de cultivo suplementado con 2% SFB. En la cámara inferior se colocaron 700 µL de medio de cultivo suplementado con 10% de SFB y las muestras se dejaron incubar por 6 h. Enseguida, los filtros fueron lavados con PBS esteril, las células presentes en la parte apical fueron removidas con un hisopo de algodón y las presentes en la parte basal fueron fijadas paraformaldehído al 2% y teñidas con cristal violeta. El exceso de colorante fue removido mediante lavados con agua destilada, finalmente se analizaron los campos para conocer las células que lograron atravesar el filtro Transwell®. Las muestras se dejaron secar por 24 h y posteriormente se determinó la cantidad de células que lograron atravesar el filtro Transwell®.

### 6.6.3 Ensayo clonogénico

El ensayo comenzó con la incubación de 15,000 células, en placas de 24 pozos, en condiciones de cultivo durante 24 h. Al término de este tiempo, las células retadas a los tratamientos y sus combinaciones por un periodo de 48 h. Enseguida, las células fueron colectadas y sembradas en nuevas cajas de cultivo de 6 pozos en una relación de 200 células por pozo y diluidas en 2 mL de medio de cultivo suplementado al 5% con SFB. Estas muestras se dejaron incubar por 8 días en condiciones de cultivo. Al termino de este tiempo, el medio de cultivo fue retirado de los pozos y se realizó un lavado con PBS. Los conglomerados celulares fueron fijados paraformaldehído al 2% y teñidas con cristal violeta, el exceso de colorante fue removido mediante lavados con agua destilada. Los preparados se secaron a temperatura ambiente y enseguida se contaron el número unidades formadoras de colonias (UFC), considerando solo las formadas por >50 células.

## **6.7 Análisis estadístico**

Los análisis de varianza de dos vías (ANOVA) y las comparaciones múltiples de Dunnet y Sidak fueron elaboradas con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ . El análisis de los datos y la elaboración de los gráficos se realizaron con el programa GraphPad Prism versión 6.0.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Selección de condiciones para la síntesis de nanopartículas por gelación iónica

La curcumina es difícil de integrar en el sistema de gelación iónica debido a su naturaleza hidrofóbica, lo que requiere un método para mejorar su dispersión. Se utilizaron metanol y DMSO como disolventes para mantener una suspensión estable de curcumina. En soluciones de 2.5 mg/mL, la curcumina sedimentó a 2,500 y 5,000 rpm, pero se mantuvo uniformemente suspendida a 1,000 rpm. El análisis del tamaño de partícula reveló que la dilución de curcumina-DMSO y sus mezclas con ácido acético presentaban tamaños de partícula menores en comparación con las diluciones de curcumina-metanol y sus mezclas con ácido acético (Figura 2A). Sin embargo, el metanol resultó en tamaños de partícula más homogéneos con índices de polidispersidad más bajos que el DMSO (Figura 2B). En las evaluaciones espectroscópicas y de autofluorescencia, la mezcla de curcumina-DMSO y sus diluciones presentaron valores de absorbancia y fluorescencia mayores que la mezcla de curcumina-metanol (Figura 2C y 2D). Finalmente, la gelación iónica no pudo lograrse en presencia de DMSO, lo que llevó a seleccionar el metanol como agente dispersante para la curcumina (Tabla III).

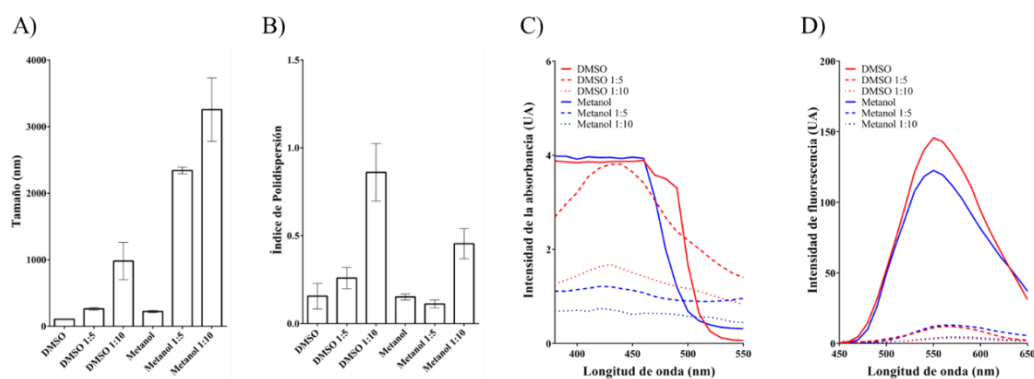


**Figura 2.** Análisis del tamaño y propiedades de las partículas. (A) Tamaño de partícula, (B) índice de polidispersidad, (C) propiedades espectroscópicas y (D) fluorescencia de diferentes soluciones de curcumina en DMSO y metanol, así como sus proporciones en ácido acético 0.1 N.

## 7.2 Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas

Las propiedades fisicoquímicas de las partículas de quitosano (Np-Q), quitosano con curcumina (Np-Cur) y quitosano con gemcitabina (Np-Gem) se analizaron después de su síntesis y liofilización. El tamaño de las partículas sintetizadas varió entre 180.80 y 188.86 nm, mientras que los tamaños de las partículas liofilizadas con sacarosa (Np-Q+S, Np-Cur+S y Np-Gem+S) oscilaron entre 181.2 y 197.83 nm. Solo Np-Cur y Np-Gem mostraron una diferencia significativa de tamaño entre los dos procesos ( $p = 0.001$ ). La carga superficial de las partículas osciló entre 15.7 y 16.33 mV, mientras que la carga superficial de las partículas liofilizadas varió entre 11.83 y 13.1 mV. La sacarosa redujo significativamente la carga superficial en los tres casos ( $p = 0.001$  y  $p = 0.0001$ ). El índice de polidispersidad fue  $<0.3$  en todos los casos (Tabla III).

**Tabla III.** Valores de tamaño, carga superficial e índices de polidispersidad de Np-Q, Np-Cur y Np-Gem antes y después de la liofilización en presencia de sacarosa.

| Nanoparticle | Size             | Z potential      | PDI           |
|--------------|------------------|------------------|---------------|
| Np-DMSO      | 7847 ± 8878 nm   | -9.31 ± 14.45 mV | 0.805 ± 0.785 |
| Np-Q         | 180.89 ± 6.4 nm  | 15.7 ± 0.48 mV   | 0.240 ± 0.035 |
| Np-Cur       | 180.8 ± 6.6 nm   | 16.33 ± 1.10 mV  | 0.225 ± 0.033 |
| Np-Gem       | 188.56 ± 9.33 nm | 16.26 ± 0.61 mV  | 0.220 ± 0.019 |
| Np-Q+S       | 197.83 ± 2.99 nm | 11.83 ± 0.32 mV  | 0.218 ± 0.003 |
| Np-Cur+S     | 181.2 ± 1.34 nm  | 12.43 ± 0.60 mV  | 0.264 ± 0.008 |
| Np-Gem+S     | 197.3 ± 2.92 nm  | 13.1 ± 0.36 mV   | 0.215 ± 0.020 |

Para corroborar la interacción entre el quitosano y el TPP en la gelación ionotrópica, se realizó un análisis de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier. El análisis de los espectros de las tres partículas (Np-Q, Np-Cur y Np-Gem) reveló que eran completamente idénticos. Se observó una deformación en la intensidad del grupo amino a  $1,650\text{ cm}^{-1}$ . La gelación iónica fue evidente por la deformación del grupo amino ubicado en la región de  $1,550\text{--}1,600\text{ cm}^{-1}$  (Tabla IV, y Figura 3), la cual se desplazó hacia la izquierda e incrementó su intensidad (Figura 3). Además, se observó un aumento en la intensidad entre  $3,500\text{ y }3,000\text{ cm}^{-1}$ . La microscopía electrónica de barrido reveló que las nanopartículas presentaban una morfología ovoide (Figura 4).

**Tabla IV.** Intensidades características de los grupos funcionales del quitosano presentadas en el espectro de infrarrojo medio.

| Intensities ( $\text{cm}^{-1}$ ) | Functional group               |
|----------------------------------|--------------------------------|
| 3384                             | OH (hydroxyl)                  |
| 2938                             | C-H (Alkyls)                   |
| 1669                             | C=O (ester)                    |
| 1598                             | NH <sub>2</sub> (Amino group*) |
| 1445                             | CH-OH                          |
| 1394                             | CH <sub>2</sub> -OH            |
| 1050                             | C-O-C (ether)                  |

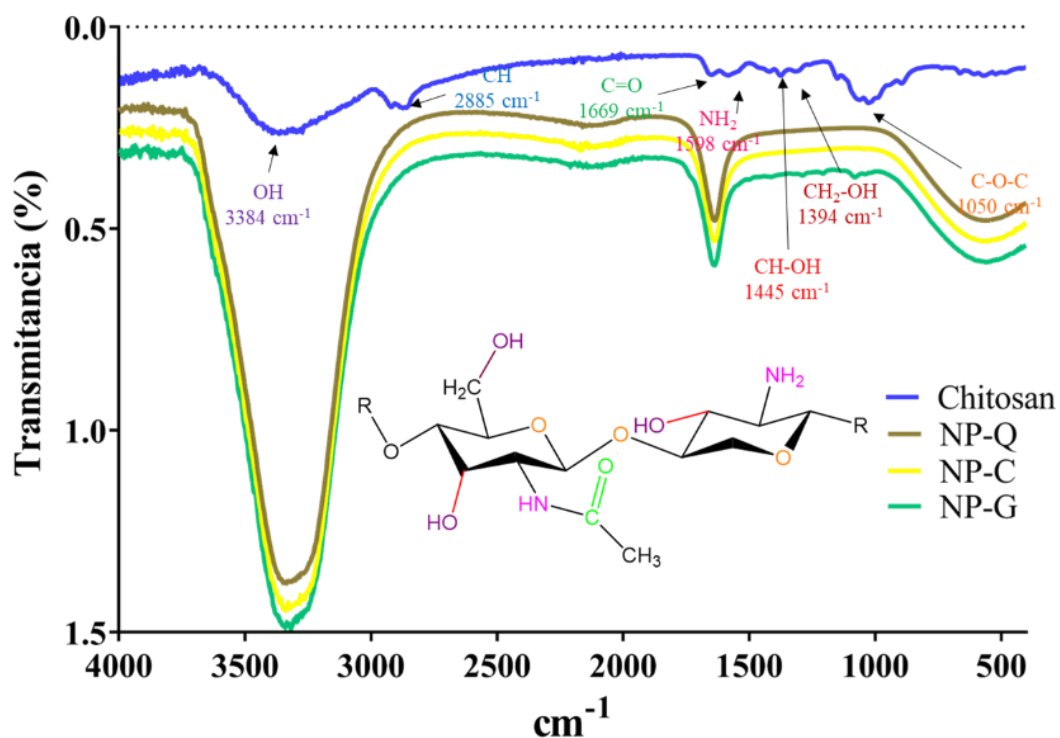


**Figura 3.** Espectros obtenidos para quitosano comercial, Np-Q, Np-Cur y Np-Gem, con identificación de los grupos funcionales presentes.

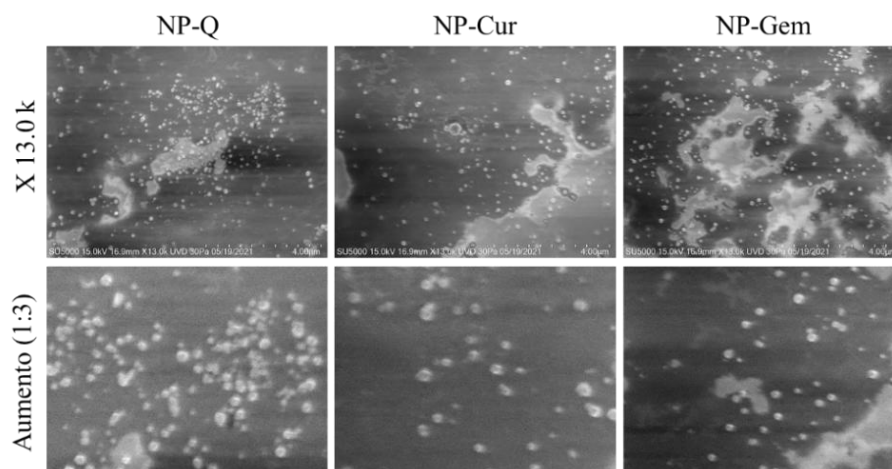


**Figura 4.** Determinación de la morfología de Np-Q, Np-Cur y Np-Gem mediante microscopía electrónica de barrido. Se tomaron imágenes a un aumento de  $\times 13,000$ .

La cuantificación de curcumina y gemcitabina mediante cromatografía de fase reversa se basó en las curvas estándar de curcumina y gemcitabina, con valores R de 0.9941 y 0.9822, respectivamente. La curcumina tuvo un tiempo de retención de  $7.40 \pm 0.4$  min, y la gemcitabina tuvo un tiempo de retención de  $2.38 \pm 0.4$  min (Figura 5).

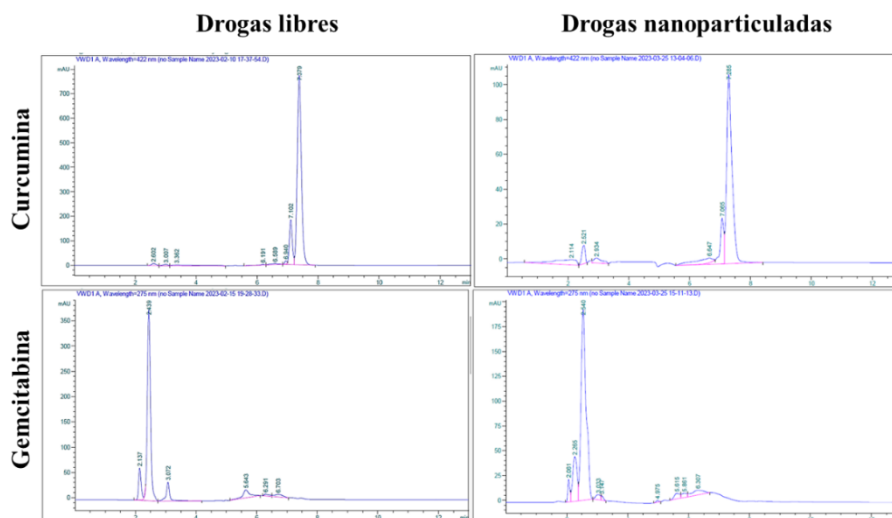


**Figura 5.** Determinación de la presencia de curcumina y gemcitabina en las nanopartículas de quitosano. Se identificó la curcumina a un tiempo de retención de  $7.40 \pm 0.4$  min, y se identificó la gemcitabina a un tiempo de retención de  $2.38 \pm 0.4$  min.

### 7.3 Efecto citotóxico de curcumina-gemcitabina libres y nanoencapsuladas sobre células tumorales

Para evaluar los efectos citotóxicos de la curcumina y la gemcitabina en las líneas celulares A549 y B16F10, se trató a las células con diferentes concentraciones de los fármacos. La curcumina fue más efectiva en la línea celular B16F10, con un  $CI_{50}$  de 8.89  $\mu M$  (Figura 6A), mientras que la línea celular A549 mostró mayor resistencia, con un  $CI_{50}$  de 21.17  $\mu M$ . Por otro lado, la gemcitabina indujo una disminución de la viabilidad de manera dependiente de la dosis. Las células A549 presentaron un  $CI_{50}$  de 1.1285  $\mu M$ , mientras que en las células B16F10, el  $CI_{50}$  fue de 4.69  $\mu M$  (Figura 6B). Se utilizaron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de individuos sanos como controles. Las PBMCs no mostraron efectos citopáticos significativos al ser tratadas con nanopartículas de curcumina o gemcitabina. Comparado con el tratamiento con curcumina libre, el tratamiento con Np-Cur en células B16F10 tuvo un  $CI_{50}$  de 11.973  $\mu M$ , lo que indica una ligera disminución del 34.68% en el potencial citotóxico (Figuras 6A y 6B).

En contraste, en células A549, el valor de  $CI_{50}$  fue de 14.6852  $\mu M$ , lo que representa un aumento del potencial citotóxico del 30.63% en comparación con el  $CI_{50}$  calculado para la curcumina libre, como se muestra en la Figura 7B. En comparación con las células tratadas con fármacos libres, los valores de  $CI_{50}$  de Np-Gem en las células A549 y B16F10 fueron de 0.3404 y 0.4098  $\mu M$ , respectivamente, lo que indica reducciones del 69.83% y 91.26% en los valores de  $CI_{50}$  (Figura 6D y 6E).

Se observó un resultado interesante a concentraciones de 0.05 y 0.1  $\mu M$ , donde Np-Gem indujo un aumento en la viabilidad celular, alcanzando valores de  $114.75 \pm 3.79\%$  y  $115.43 \pm 3.85\%$ , respectivamente. Finalmente, Np-Q causó una pérdida de viabilidad a partir de una masa equivalente a 5  $\mu M$  de Np-Cur y continuó hasta una masa equivalente a 40  $\mu M$  (Figura 6C). En el caso de Np-Q con una masa equivalente a Np-Gem, se observó una ligera disminución en la viabilidad, que siempre se mantuvo por encima del  $82.12 \pm 3.48\%$  en ambos tipos de células (Figura 6F).

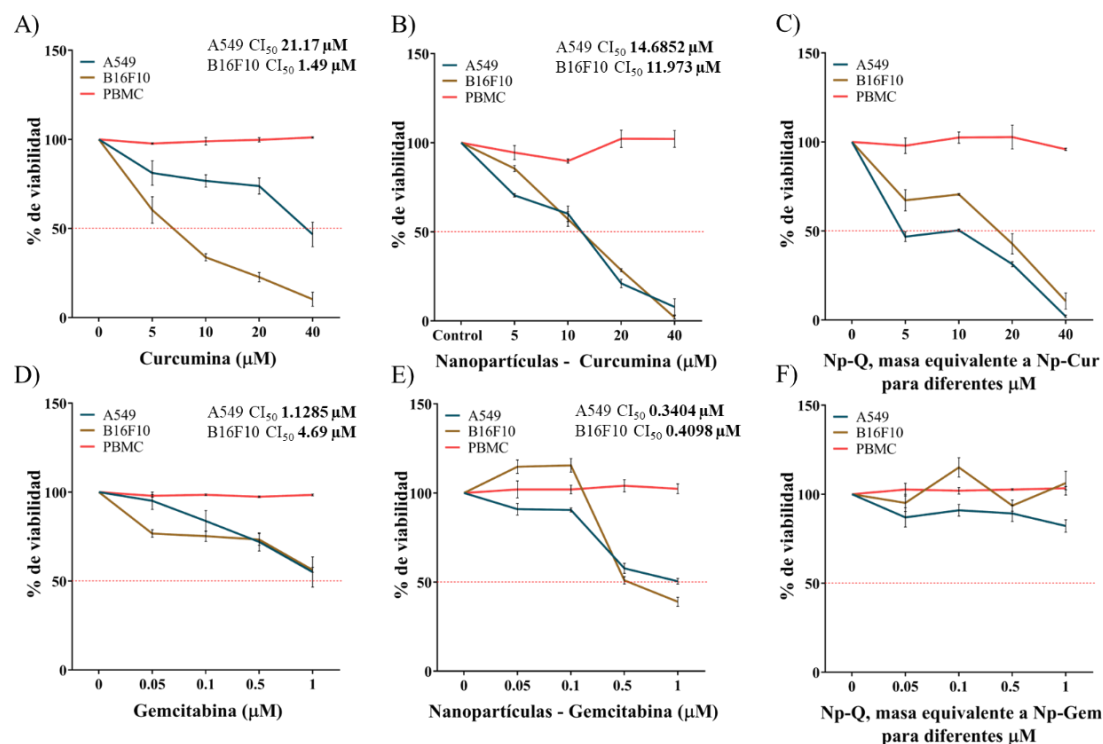


**Figura 6.** Evaluación de la viabilidad de las células A549, B16F10 y PBMC tratadas con curcumina libre (A) y Np-Cur (C) a concentraciones de 5, 10, 20 y 40 μM; gemcitabina libre (B) y Np-Gem (D) a concentraciones de 0.05, 0.1, 0.5 y 1 μM; y el control Np-Q (E y F). Todos los tratamientos se incubaron durante 48 h.

#### 7.4 Determinación de las interacciones farmacológicas de curcumina-gemcitabina sobre las líneas tumorales

El análisis de interacción farmacológica reveló una respuesta diferencial entre las líneas celulares B16F10 y A549 al ser expuestas a combinaciones de curcumina y gemcitabina. En las células A549 se observó predominantemente un efecto antagonista, con valores de  $II$  superiores a 1.1. Particularmente, la combinación de 10 μM de curcumina con 0.05 μM de gemcitabina arrojó un  $II$  de 4.57, lo que indica un antagonismo fuerte. Por el contrario, la combinación de 5 μM de curcumina con 0.1 μM de gemcitabina mostró un efecto aditivo. En las células B16F10, las combinaciones de 5 μM de curcumina con 0.05 y 0.1 μM de gemcitabina exhibieron efectos sinérgicos. Mientras tanto, las combinaciones que contenían 10 μM de curcumina resultaron en interacciones aditivas, con valores de  $II$  que oscilaron entre 0.9 y 1.1 (Tabla V).

**Tabla V.** Perfil de Interacción Terapéutica entre Curcumina y Gemcitabina en Células de Cáncer de Melanoma Murino (B16F10) y de Pulmón Humano (A549).

| Tratamientos              | A549    |                | B16F10  |                |
|---------------------------|---------|----------------|---------|----------------|
|                           | II      | Interpretación | II      | Interpretación |
| Cur+Gem (5-0.05 $\mu$ M)  | 2.20488 | Antagonismo    | 0.55550 | Sinergismo     |
| Cur+Gem (5-0.1 $\mu$ M)   | 1.13272 | Aditivo        | 0.58804 | Sinergismo     |
| Cur+Gem (10-0.05 $\mu$ M) | 4.57571 | Antagonismo    | 1.04992 | Aditivo        |
| Cur+Gem (10-0.1 $\mu$ M)  | 1.72771 | Antagonismo    | 1.06454 | Aditivo        |

Los análisis de interacción farmacológica de las formulaciones nanoencapsuladas revelaron un perfil predominantemente antagonista en ambas líneas celulares, aunque con distintos grados de intensidad. En las células A549, todas las combinaciones mostraron efectos antagonistas, siendo el más pronunciado el de la combinación de 5  $\mu$ M de curcumina con 0.1  $\mu$ M de gemcitabina, con un valor de II de 17.22. Las células B16F10 también exhibieron efectos antagonistas con las combinaciones que contenían 10  $\mu$ M de curcumina, aunque estos fueron menos intensos que los observados en A549. Sin embargo, las combinaciones que contenían 5  $\mu$ M de curcumina mostraron efectos aditivos, con valores de II cercanos a 1 (Tabla VI).

**Tabla VI.** Perfil de Interacción Terapéutica de Nanopartículas Cargadas con Curcumina y Gemcitabina en Células de Cáncer de Melanoma Murino (B16F10) y de Pulmón Humano (A549).

| Tratamiento Np            | A549    |                | B16F10  |                |
|---------------------------|---------|----------------|---------|----------------|
|                           | II      | Interpretación | II      | Interpretación |
| Cur+Gem (5-0.05 $\mu$ M)  | 5.50028 | Antagonismo    | 0.98355 | Aditivo        |
| Cur+Gem (5-0.1 $\mu$ M)   | 17.2274 | Antagonismo    | 1.07224 | Aditivo        |
| Cur+Gem (10-0.05 $\mu$ M) | 1.89723 | Antagonismo    | 1.62405 | Antagonismo    |
| Cur+Gem (10-0.1 $\mu$ M)  | 4.84362 | Antagonismo    | 2.04832 | Antagonismo    |

### **7.5 Identificación de patrones de muerte celular inducidos por curcumina-gemcitabina libres y nanoparticuladas**

La tinción con AO/EB permitió la evaluación simultánea de la viabilidad celular, la integridad de la membrana y la morfología nuclear en las líneas celulares A549 y B16F10 tras el tratamiento con nanopartículas cargadas con curcumina (Np-Cur), nanopartículas cargadas con gemcitabina (Np-Gem) y su combinación (Np-Cur-Gem). Las células viables mostraron fluorescencia verde (membranas íntegras), mientras que las células no viables presentaron fluorescencia roja, lo que indica pérdida de la integridad de la membrana plasmática. En la línea celular B16F10, el grupo control mostró un  $92.41 \pm 2.05\%$  de células viables. El tratamiento con Np-Cur incrementó significativamente la proporción de células no viables hasta un  $51.50 \pm 10.74\%$ . Np-Gem indujo un efecto citotóxico más moderado, con un  $20.07 \pm 7.52\%$  de células no viables. Al igual que en las células A549, el tratamiento combinado (Np-Cur-Gem) generó el mayor nivel de citotoxicidad, con un  $60.09 \pm 7.83\%$  de células no viables. Se observaron signos de daño nuclear avanzado y una alteración extensa de la membrana.

En la línea celular A549, el grupo control mostró una alta proporción de células viables ( $99.24 \pm 0.5\%$ ) con morfología fusiforme típica. El tratamiento con Np-Cur redujo la viabilidad a  $86.80 \pm 4.03\%$ , mientras que Np-Gem provocó una muerte celular del  $9.33 \pm 2.52\%$ . En contraste, el tratamiento combinado (Np-Cur-Gem) produjo un efecto citotóxico pronunciado, con un  $67.80 \pm 8.23\%$  de células no viables. Este grupo presentó condensación y fragmentación nuclear, así como una intensa fluorescencia roja, además de un subgrupo de células con fluorescencia roja/amarilla intermedia, indicativa de daño celular progresivo (Figura 7).

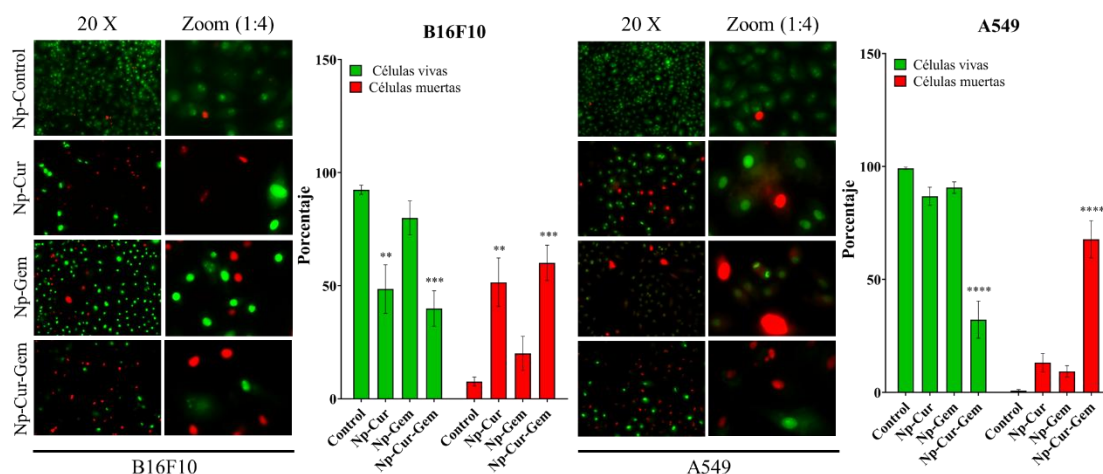


**Figura 7.** Tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio de células tratadas con Np-Q, Np-Cur (20  $\mu$ M), Np-Gem (0.2  $\mu$ M) y su combinación. Las micrografías se tomaron a un aumento de 20X después de 48 h de incubación con los tratamientos.

Para evaluar la muerte celular inducida por nanopartículas de curcumina y gemcitabina en las líneas celulares, se utilizó tinción con Anexina V/PI. El tratamiento con curcumina o gemcitabina, ya sea en forma libre o encapsuladas en nanopartículas, produjo efectos marcadamente diferentes en la inducción de muerte celular en ambas líneas celulares. La línea celular B16F10 fue más sensible a los tratamientos que la línea A549. También se observaron diferencias en los patrones de tinción, siendo que las células B16F10 mostraron una mayor proporción de células doble positivas (Anexina V y PI) tras el tratamiento con nanopartículas en comparación con los fármacos libres.

En contraste, las células A549 mostraron una mayor proporción de células positivas solo para Anexina V en los distintos tratamientos. Además, el tratamiento con gemcitabina libre y encapsulada resultó en un mayor porcentaje de células positivas únicamente para PI, como se muestra en la Figura 8.

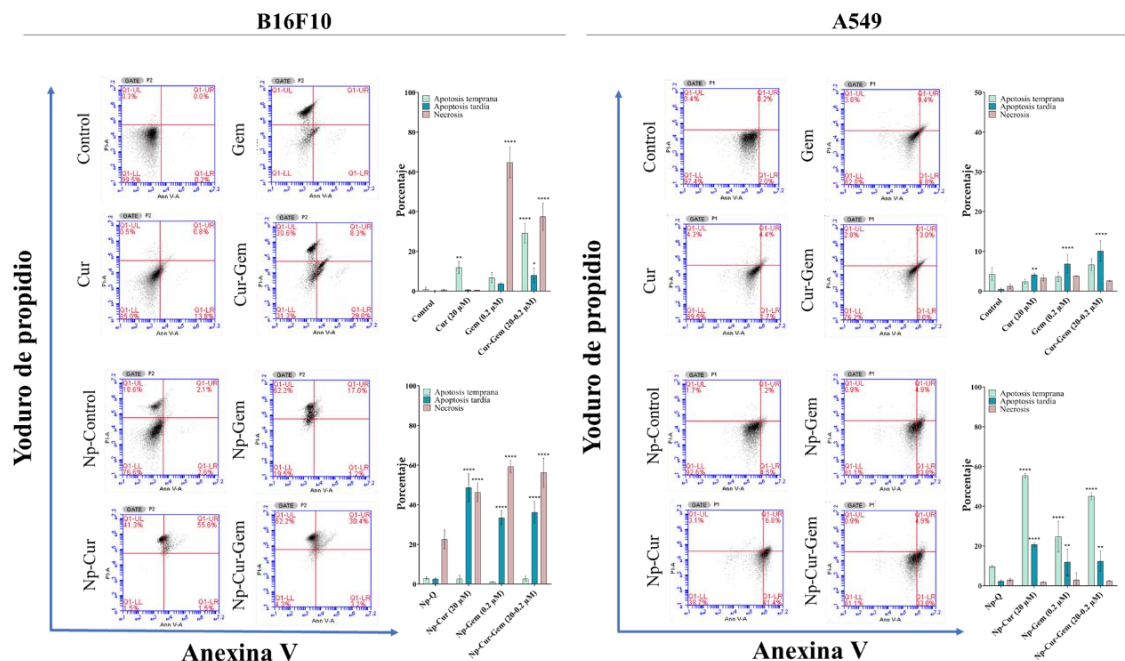


**Figura 8.** Análisis de la muerte celular por citometría de flujo, tinción con bromuro de propidio y anexina V de células A549 y B16F10, tratadas con curcumina libre y Np-Cur a una concentración 20  $\mu\text{M}$ ; gemcitabina libre y Np-Gem a concentraciones de 0.2  $\mu\text{M}$ ; la combinación de ambas concentraciones libres y nanoparticuladas, y el control de Np-Q. Todos los tratamientos se incubaron durante 48 h.

## 7.6 Modulación de la expresión de WT1 inducido por curcumina-gemcitabina libres y nanoparticulados

Al observar la inducción de citotoxicidad en las células B16F10 y A549 por curcumina y gemcitabina, se decidió evaluar la participación de WT1 y Par-4 en este proceso. Las combinaciones de curcumina-gemcitabina libres (10-0.05  $\mu\text{M}$  y 10-0.1  $\mu\text{M}$ ) indujeron un incremento en la expresión de WT1 en las células B16F10, siendo la última la que provocó un aumento de hasta 7 veces. Por otro lado, en los tratamientos con nanopartículas, el uso de Np-Cur (10  $\mu\text{M}$ ) y las combinaciones Np-Cur-Np-Gem (10-0.05  $\mu\text{M}$  y 10-0.1  $\mu\text{M}$ ) también incrementaron la expresión de WT1 en comparación con el control. En cuanto a la expresión de Par-4 en las células B16F10, solo la combinación libre de curcumina-gemcitabina (10-0.1  $\mu\text{M}$ ) indujo un aumento. Finalmente, en los tratamientos nanoparticulados, la curcumina (10  $\mu\text{M}$ ), la gemcitabina (0.1  $\mu\text{M}$ ) y las combinaciones

(10-0.05  $\mu\text{M}$  y 10-0.1  $\mu\text{M}$ ) también incrementaron la expresión de Par-4 en comparación con el control (Figura 9).

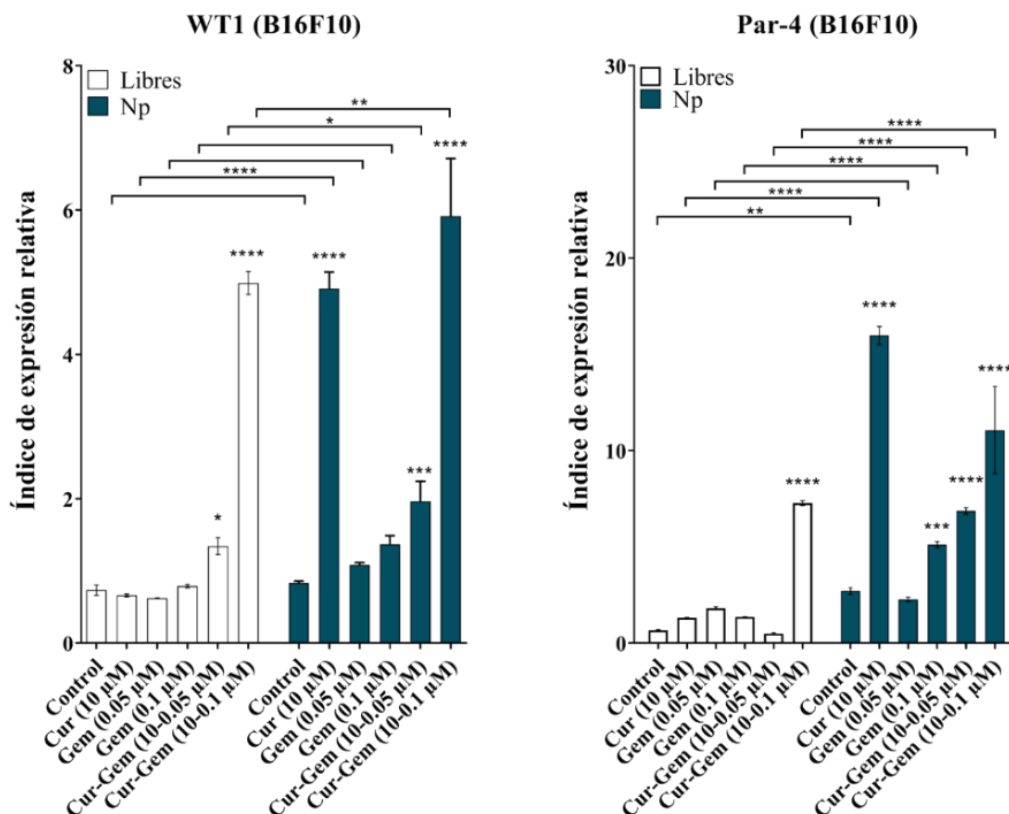


**Figura 9.** Análisis de la expresión de WT1 y Par-4 en células B16F10 tratadas con curcumina (10  $\mu\text{M}$ ), gemcitabina (0.05 y 0.1  $\mu\text{M}$ ) y sus combinaciones, en su forma sin nanoparticular y nanoparticulada, con incubaciones a 48 h. La grafica se muestra con las medias y desviaciones estándar de los tratamientos, el ANOVA de 2 vías y las comparaciones múltiples de Dunnett y Sidak se presentan con una significancia de  $p = 0.05$ .

En el caso de A549 se observó un incremento en la expresión de WT1 al retar a las células ante las combinaciones de curcumina-gemcitabina libres (10-0.05  $\mu\text{M}$  y 10-0.1  $\mu\text{M}$ ). De manera contraria la curcumina (10  $\mu\text{M}$ ) indujo una supresión en su expresión. Por otro lado, en los tratamientos con nanopartículas, el uso Np-Gem (0.05  $\mu\text{M}$ ) indujo una reducción en la expresión de WT1. Por otro lado, Np-Gem (0.1  $\mu\text{M}$ ) y las combinaciones Np-Cur-Np-Gem (10-0.05  $\mu\text{M}$  y 10-0.1  $\mu\text{M}$ ) incrementaron la expresión de WT1 en comparación con el control. En cuanto a la expresión de Par-4 en las células A549, el uso

de curcumina libre (10  $\mu$ M) redujo su expresión, mientras que el resto de los tratamientos indujeron su sobreexpresión. Finalmente, todos los tratamientos nanoparticulados incrementaron la expresión de Par-4 con respecto al control (Figura 10).

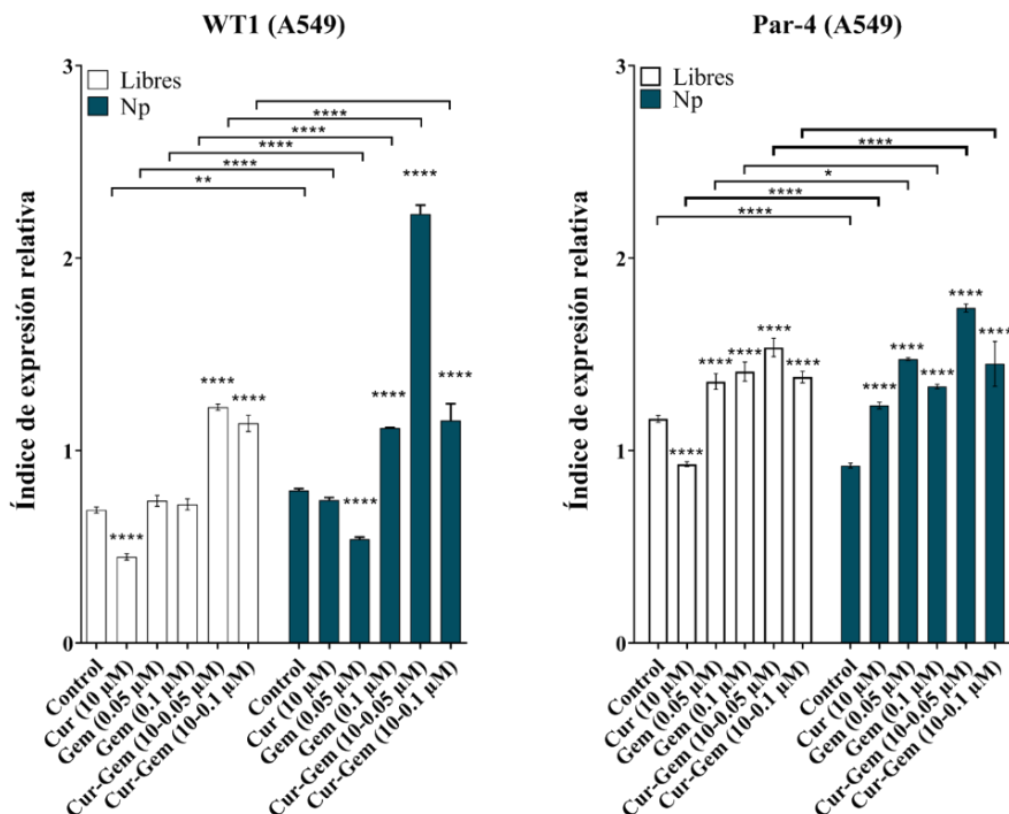


**Figura 10.** Análisis de la expresión de WT1 y Par-4 en células A549 tratadas con curcumina (10  $\mu$ M), gemcitabina (0.05 y 0.1  $\mu$ M) y sus combinaciones, en su forma sin nanoparticular y nanoparticulada, con incubaciones a 48 h. La gráfica se muestra con las medias y desviaciones estándar de los tratamientos, el ANOVA de 2 vías y las comparaciones múltiples de Dunnett y Sidak se presentan con una significancia de  $p = 0.05$ .

### 7.7 Efecto de curcumina-gemcitabina libres y nanoparticulados sobre los parámetros de metástasis

Los análisis de metástasis comenzaron con un ensayo de cierre de herida, utilizando mitomicina como inhibidor de la proliferación celular. Las células B16F10 mostraron un porcentaje de cierre de herida del  $65.46 \pm 16.35\%$ . Al evaluar los tratamientos, se identificó que la curcumina a 10  $\mu$ M, la gemcitabina a 0.5  $\mu$ M, y ambas combinaciones

de curcumina-gemcitabina redujeron el proceso de cierre de la herida. Por otro lado, se observó que el uso de gemcitabina a 0.1  $\mu\text{M}$  incrementó significativamente el cierre de la herida, alcanzando un valor de  $86.01 \pm 8.49\%$ . Los tratamientos con nanopartículas, por su parte, mostraron una inhibición total del cierre de la herida, incluida la Np-Q (Figura 11).

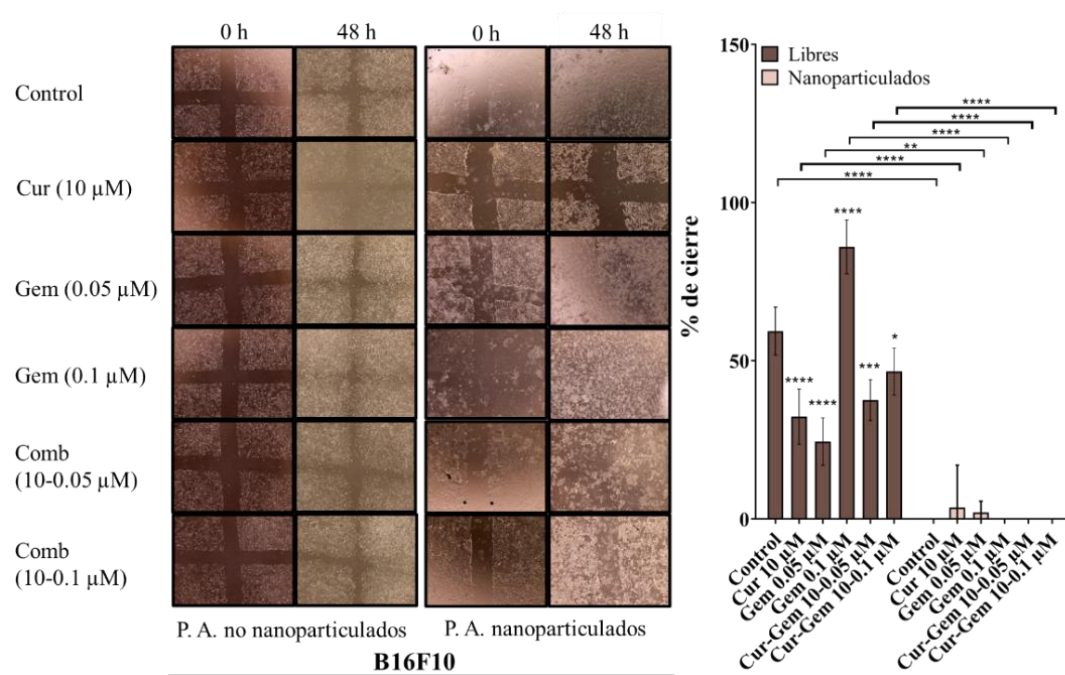


**Figura 11.** Ensayo de cierre de herida presentado en monocapas de células B16F10 tratadas con curcumina (10  $\mu\text{M}$ ), gemcitabina (0.05 y 0.1  $\mu\text{M}$ ) y sus combinaciones, en su forma sin nanoparticular y nanoparticulada, con incubaciones a 48 h. Las micrografías fueron tomadas en un aumento de 10 X. La grafica se muestra con las medias y desviaciones estándar de los tratamientos, el ANOVA de 2 vías y las comparaciones múltiples de Dunnett y Sidak se presentan con una significancia de  $p = 0.05$ .

Las células A549 no tratadas presentaron un porcentaje de cierre de herida del  $38.11 \pm 7.02\%$  a las 48 h, menor que el presentado en B16F10. Por otro lado, solo el tratamiento con curcumina a 10  $\mu\text{M}$  redujo la movilidad celular, obteniendo un valor de  $28.33 \pm 5.77\%$ . Las células tratadas con Np-Q mostraron una disminución en la tasa de migración, con un porcentaje de cierre de herida de  $29.65 \pm 11.80\%$ , inferior al de las células no tratadas. Los tratamientos con Np-Cur a 10  $\mu\text{M}$  y Np-Gem a 0.1  $\mu\text{M}$  indujeron una

disminución en el porcentaje de cierre de herida, alcanzando valores de  $5.04 \pm 4.78\%$  y  $15.05 \pm 9.14\%$ , respectivamente (Figura 12).

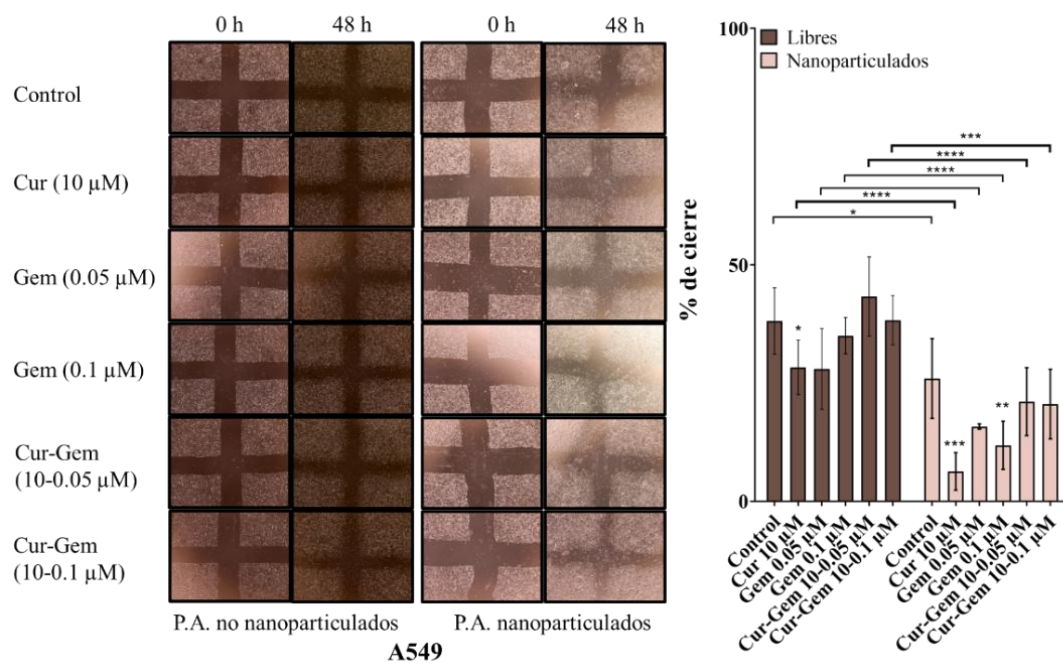


**Figura 12.** Ensayo de cierre de herida presentado en monocapas de células A549 tratadas con curcumina (10 µM), gemcitabina (0.05 y 0.1 µM) y sus combinaciones, en su forma sin nanoparticular y nanoparticulada, con incubaciones a 48 h. Las micrografías fueron tomadas en un aumento de 10 X. La grafica se muestra con las medias y desviaciones estándar de los tratamientos, el ANOVA de 2 vías y las comparaciones múltiples de Dunnett y Sidak se presentan con una significancia de  $p = 0.05$ .

El ensayo de invasión se realizó para determinar el potencial que presentaban las células para degradar una matriz de colágeno y movilizarse a través de ella. Este ensayo mostró que las células B16F10 presentan una tasa de invasión de  $46.66 \pm 10.70$  células por campo. También se observó que la gemcitabina a 0.1 µM y la combinación de curcumina-gemcitabina a 10-0.05 µM son capaces de inducir un incremento significativo en la tasa de invasión, alcanzando valores de  $339.25 \pm 47.96$  y  $132.25 \pm 47.71$  células por campo, respectivamente. Por otro lado, solo la combinación de curcumina-gemcitabina a 10-0.1 µM logró reducir la tasa de invasión a  $8.16 \pm 6.04$  células por campo. Las células tratadas con Np-Q mostraron un incremento en la tasa de invasión en comparación con las células no tratadas, alcanzando un valor de  $303.63 \pm 50.68$  células por campo. Las drogas

nanoparticuladas y sus combinaciones demostraron un efecto inhibitor sobre la tasa de invasión, mostrando valores menores en comparación con las células tratadas con Np-Q. Sin embargo, solo las Np-Gem (0.05 y 10  $\mu$ M) y la combinación nanoparticulada de curcumina-gemcitabina a 10-0.1  $\mu$ M presentaron tasas de invasión menores que las células no tratadas (Figura 13).

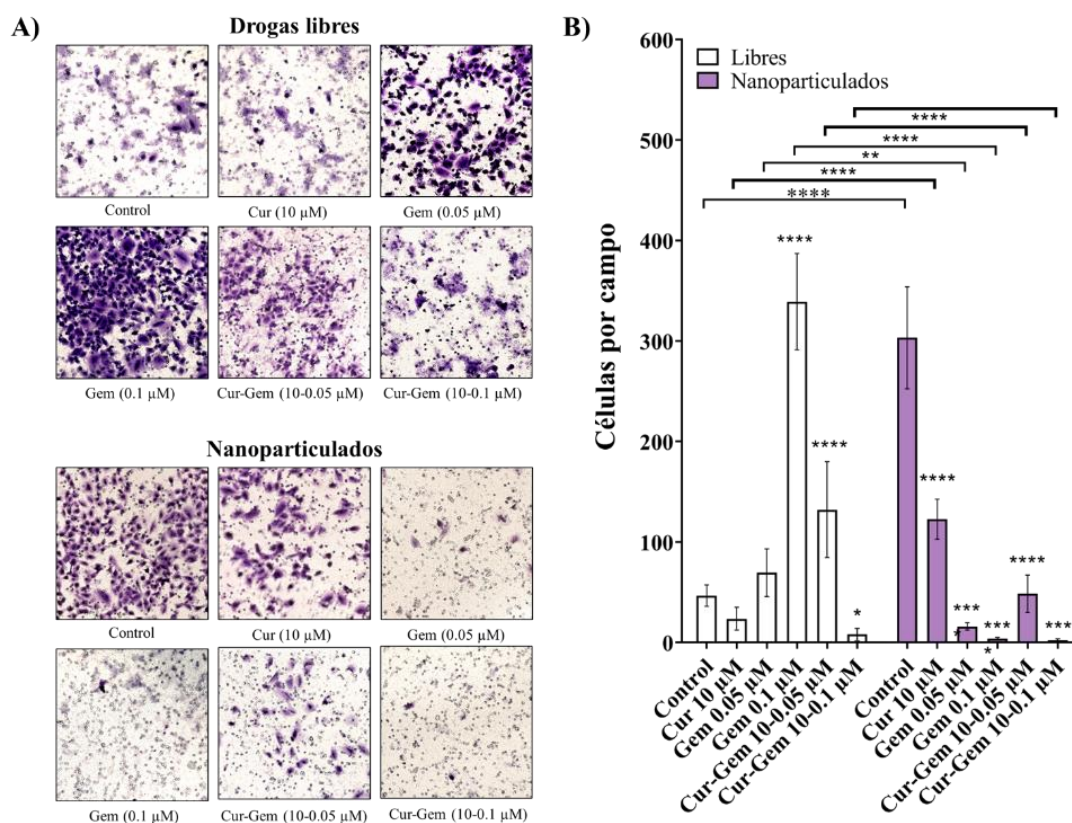


**Figura 13.** Evaluación del efecto del pretratamiento por 48 h con Curcumina (10  $\mu$ M), Gemcitabina (0.05 y 0.1  $\mu$ M) y sus combinaciones, en su forma sin nanoparticular y nanoparticulada, sobre la invasión de células B16F10. El proceso de invasión se realizó durante 6 h. A) Micrografías del ensayo de invasión de células B16F10. B) Análisis estadístico del ensayo de invasión. La grafica se muestra con las medias y desviaciones estándar de los tratamientos, el ANOVA de 2 vías y las comparaciones múltiples de Dunnett y Sidak se presentan con una significancia de  $p = 0.05$ .

Por otro lado, las células A549 presentaron una tasa de invasión de  $26.16 \pm 7.02$  células por campo. Los tratamientos con curcumina, gemcitabina y sus combinaciones redujeron la tasa de invasión, presentando valores de células por campo menores que los del control ( $p = 0.05$ ). Los tratamientos con curcumina a 10  $\mu$ M, gemcitabina a 0.1  $\mu$ M y sus

combinaciones fueron los que mostraron una inhibición más pronunciada sobre la tasa de invasión. Las células tratadas con Np-Q no mostraron variaciones significativas en la tasa de invasión respecto a las células no tratadas, con una tasa de invasión de  $31.66 \pm 4.17$  células por campo. Sin embargo, se identificó que las células tratadas con curcumina a  $10 \mu\text{M}$  y con la combinación curcumina-gemcitabina a  $10\text{-}0.5 \mu\text{M}$  indujeron una reducción en la tasa de invasión. La curcumina fue el tratamiento que presentó la mayor disminución en la tasa de invasión, con un valor de  $2.5 \pm 1.04$  células por campo (Figura 14).

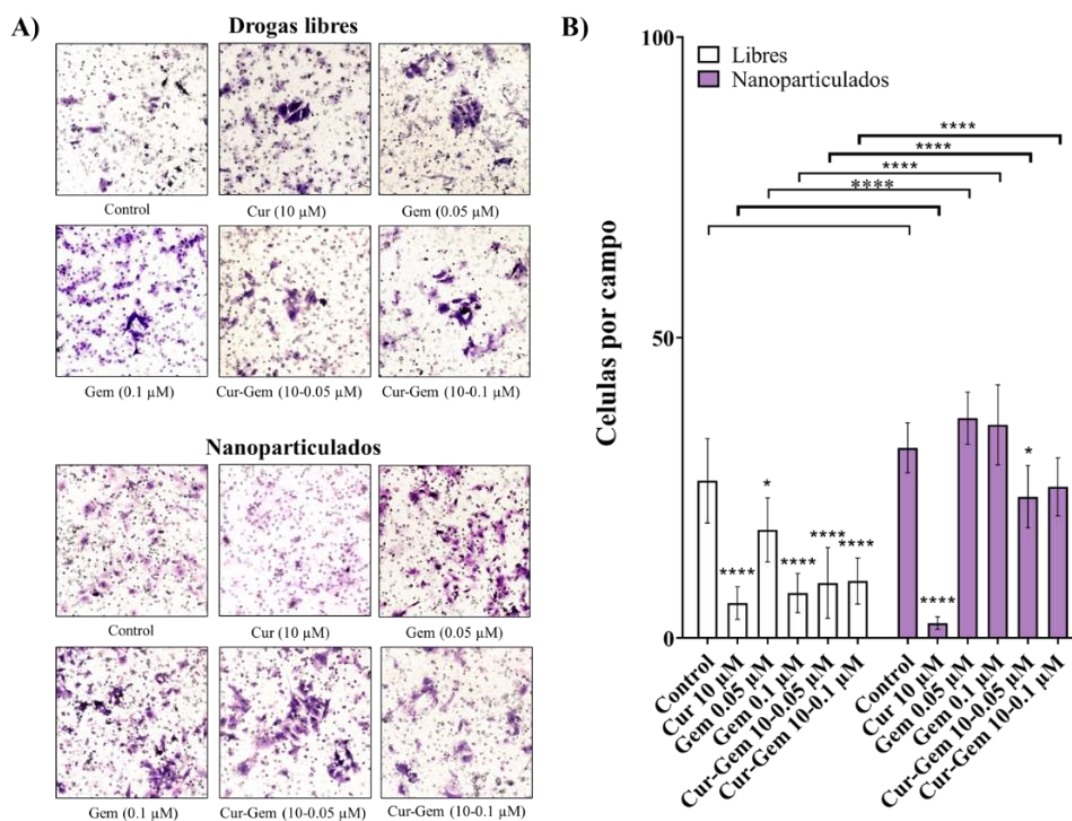


**Figura 14.** Evaluación del efecto del pretratamiento por 48 h con Curcumina ( $10 \mu\text{M}$ ), Gemcitabina ( $0.05$  y  $0.1 \mu\text{M}$ ) y sus combinaciones, en su forma sin nanoparticular y nanoparticulada, sobre la invasión de células A549. El proceso de invasión se realizó durante 6 h. A) Micrografías del ensayo de invasión de células A549. B) Análisis estadístico del ensayo de invasión. La grafica se muestra con las medias y desviaciones estandar de los tratamientos, el ANOVA de 2 vías y las comparaciones múltiples de Dunnett y Sidak se presentan con una significancia de  $p = 0.05$ .

El ensayo de implantación permitió determinar la viabilidad de las células para iniciar un nuevo nicho tumoral, luego de ser expuestas a los tratamientos. Las células B16F10

mostraron una capacidad de implantación de  $42 \pm 2$  UFC por pozo. La mayoría de los tratamientos con drogas no nanoparticuladas disminuyeron la capacidad de implantación, siendo las combinaciones de curcumina-gemcitabina las que presentaron las tasas más bajas, con valores entre 2.66 y 4.33 UFC por pozo. Por otro lado, el tratamiento con gemcitabina a una concentración de  $0.1 \mu\text{M}$  produjo un incremento en la tasa de implantación, alcanzando  $65.33 \pm 11.93$  UFC por pozo. En el caso de las células tratadas con Np-Q, se observó una disminución en la tasa de implantación respecto a las células no tratadas, con un valor promedio de  $8.33 \pm 1.52$  UFC por pozo. Además, se identificó que las células tratadas con Np-Cur a  $10 \mu\text{M}$ , así como sus combinaciones con Np-Gem a  $0.05$  y  $0.1 \mu\text{M}$ , impidieron por completo la implantación celular. Por otro lado, ambas concentraciones de Np-Gem ( $0.05$  y  $0.1 \mu\text{M}$ ) incrementaron la tasa de implantación a  $39.66 \pm 2.30$  y  $36.66 \pm 8.08$  UFC por pozo, respectivamente (Figura 15).

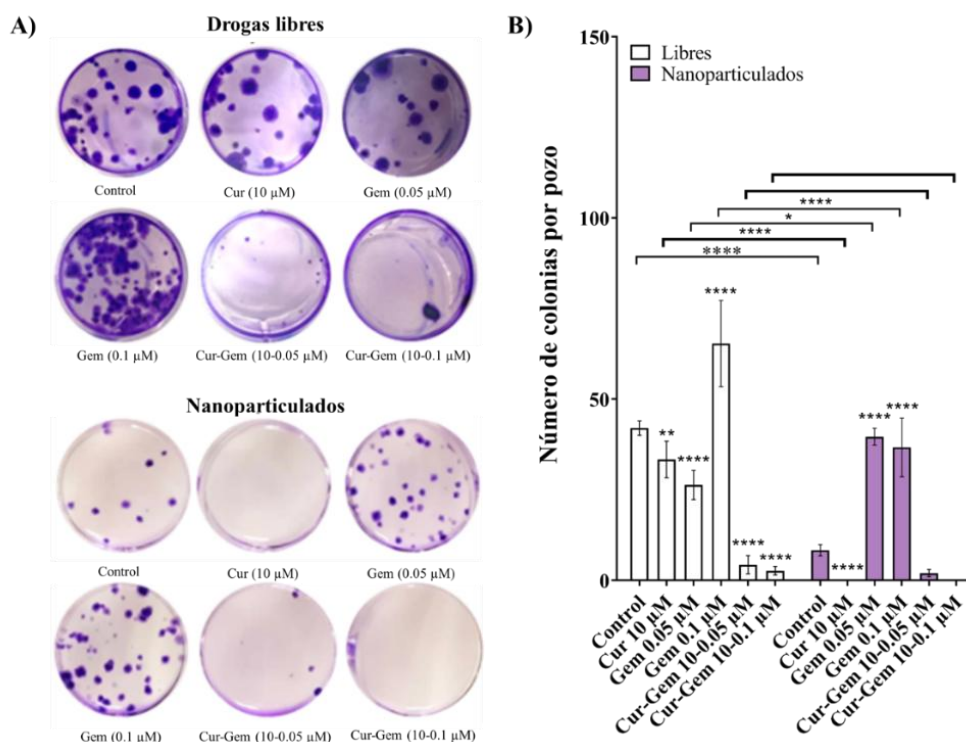


**Figura 15.** Evaluación del efecto del pretratamiento por 48 h con de Curcumina ( $10 \mu\text{M}$ ), Gemcitabina ( $0.05$  y  $0.1 \mu\text{M}$ ) y sus combinaciones, en su forma sin nanoparticular y nanoparticulada, sobre la invasión de células B16F10. El proceso de implantación fue monitoreado por 7 días. A) Micrografías del ensayo de invasión de células B16F10. B) Análisis estadístico del ensayo de invasión. La grafica se muestra con las

medias y desviaciones estándar de los tratamientos, el ANOVA de 2 vías y las comparaciones múltiples de Dunnett y Sidak se presentan con una significancia de  $p = 0.05$ .

Las células A549 presentaron una tasa de implantación de  $55 \pm 3.6$  UFC por pozo. La gemcitabina a  $0.05 \mu\text{M}$  fue el único tratamiento que logró reducir la tasa de implantación en comparación con el control; el resto de los tratamientos no presentó diferencias significativas. Las células tratadas con Np-Q mostraron una tasa de implantación de  $39.66 \pm 7.76$  UFC por pozo, un valor menor que el de las células no expuestas a tratamiento. De las drogas nanoparticuladas, solamente la curcumina a  $10 \mu\text{M}$  y la gemcitabina a  $0.05 \mu\text{M}$  lograron una disminución en la tasa de implantación en comparación con el control, con valores de  $19.33 \pm 5.77$  y  $10.66 \pm 3.51$  UFC, respectivamente (Figura 16).

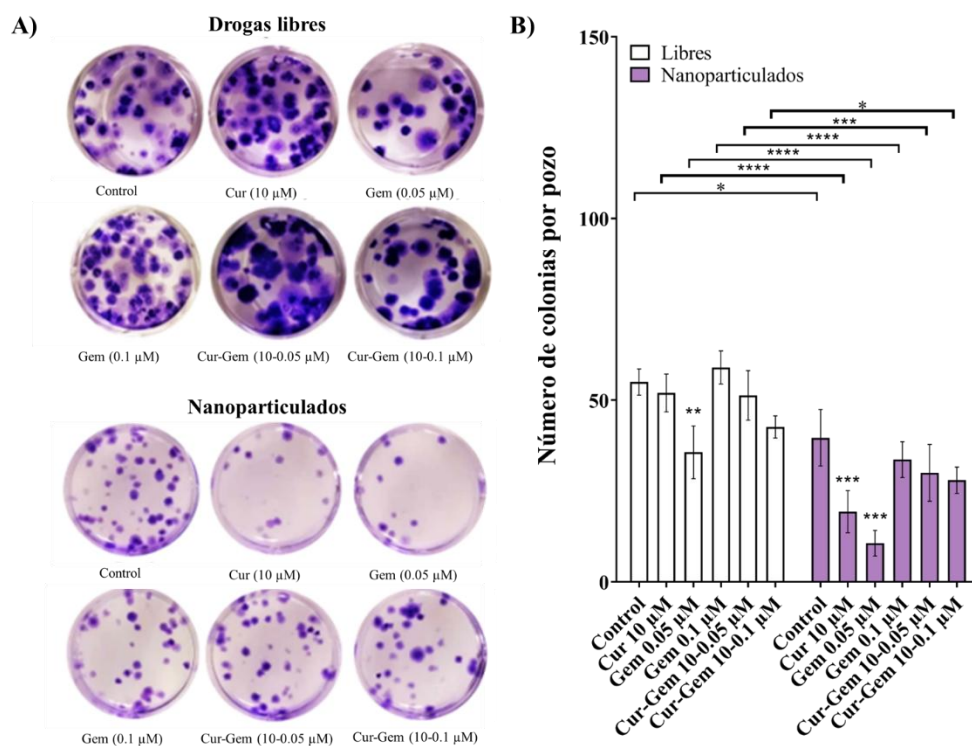


**Figura 16.** Evaluación del efecto del pretratamiento por 48 h con Curcumina ( $10 \mu\text{M}$ ), Gemcitabina ( $0.05$  y  $0.1 \mu\text{M}$ ) y sus combinaciones, en su forma sin nanoparticular y nanoparticulada, sobre la invasión de células B16F10. El proceso de implantación fue monitoreado por 7 días. A) Micrografías del ensayo de invasión de células B16F10. B) Análisis estadístico del ensayo de invasión. La grafica se muestra con las medias y desviaciones estándar de los tratamientos, el ANOVA de 2 vías y las comparaciones múltiples de Dunnett y Sidak se presentan con una significancia de  $p = 0.05$ .

## 8 DISCUSIÓN

La curcumina tiende a formar agregados en solución, lo que afecta sus propiedades ópticas de absorción y fluorescencia, siendo el solvente utilizado en su disolución el principal influyente (Patra & Barakat, 2011). Este efecto se ha visto en otras cumarinas con estructura similar a la curcumina, como el difenilhexatrieno, que también presenta este comportamiento (Gracetto et al., 2011; Makwana et al., 2011). Debido a su naturaleza predominantemente hidrofóbica, se espera que se disuelva mejor en solventes menos polares, por lo que se utilizaron metanol y DMSO como solventes, con índices de polaridad que oscilan entre 5.1 y 7.2 (Kleiman et al., 2016). Ambos solventes permitieron mantener la curcumina en suspensión, pero el metanol presenta efectos tóxicos menores sobre células eucariotas; mientras que el DMSO, incluso a bajas concentraciones, afecta la expresión génica, la diferenciación celular e induce alteraciones epigenéticas (Tunçer et al., 2018; Verheijen et al., 2019). Además, el DMSO dificulta la solubilidad del quitosano procesado con ácido acético (Sashiwa et al., 2000). Por estas razones, se seleccionó metanol como solvente para mantener la suspensión de curcumina durante la síntesis de las nanopartículas.

Las partículas se produjeron mediante gelificación iónica, y se determinó la interacción del grupo amino del quitosano con el fosfato del TPP. Esto se evidenció por un desplazamiento de la banda correspondiente al grupo amino del quitosano de la región de 1585–1590  $\text{cm}^{-1}$  a la región de 1645–1655  $\text{cm}^{-1}$ , junto con un aumento en la intensidad de dicha señal (M. A. Khan et al., 2016). Los grupos amino presentes en las nanopartículas de quitosano generan una carga superficial positiva, la cual influye en su absorción debido a una mejor interacción con la carga negativa de la membrana plasmática, atribuida a los fosfolípidos (Magalhaes & Glogauer, 2009; Nogueira et al., 2013). Las nanopartículas con valores de carga superficial entre 2 y 40 mV se adhieren mejor que aquellas con cargas más bajas (C. He et al., 2010; Yue et al., 2011). Además, se ha observado que las células fagocíticas tienden a internalizar partículas con carga negativa, mientras que las células no fagocíticas internalizan más rápidamente las partículas con carga positiva (Boyles et al., 2015; W. L. Chen et al., 2017; Hu et al., 2012). Por tanto, los valores de potencial Z

entre 10 y 20 mV aseguran que Np-Q, Np-C y Np-G puedan ser asimiladas rápidamente por células epiteliales pulmonares no fagocíticas y evitar su eliminación por parte de células del sistema inmune fagocítico.

El tamaño óptimo de las nanopartículas utilizadas en terapias celulares se encuentra entre 20 y 50 nm, ya que este tamaño favorece su absorción por células no fagocíticas (Chithrani et al., 2010; W. Jiang et al., 2008). Sin embargo, este tamaño limita la cantidad de fármaco que puede ser incorporado. Por ello, se han estudiado nanopartículas entre 50 y 150 nm, ya que pueden ingresar a las células por endocitosis mediada por caveolinas o clatrininas (Tahara et al., 2009; Tammam et al., 2015). Las partículas de tamaño micrométrico son más susceptibles a la fagocitosis (Champion et al., 2008; Tahara et al., 2009). Las nanopartículas generadas en este estudio presentaron tamaños entre 180 y 200 nm, similares a los reportados para nanopartículas de quitosano obtenidas mediante gelificación iónica. Este intervalo también ha sido asociado con internalización por endocitosis mediada por clatrininas, mientras que simultáneamente evita la fagocitosis por células inmunes (Francia et al., 2020; Guan et al., 2023). Además, se ha observado que las nanopartículas menores a 200 nm presentan estabilidad coloidal y liberación sostenida del fármaco, un efecto documentado en nanopartículas de quitosano cargadas con doxorrubicina o curcumina (Hasan et al., 2019; Nair et al., 2019). La diferencia en el tamaño de partícula al encapsular compuestos con polaridades distintas puede explicarse por factores como la hidrofobicidad, la viscosidad de la solución precursora y las condiciones de agitación durante la síntesis (Subedi et al., 2016; Vaezifar et al., 2013). La morfología de estas nanopartículas fue ovoide, lo cual ha sido previamente reportado para nanopartículas de quitosano utilizadas en la encapsulación de curcumina y gemcitabina (Elhabak et al., 2022; Jesus et al., 2020; Khanmohammadi et al., 2015; Shen et al., 2022; Valencia et al., 2021), coincidiendo también con las observaciones de nanopartículas producidas por gelificación iónica y centrifugación posterior, donde las formas elípticas u ovaladas son comunes como resultado del proceso de granulación (Büyük et al., 2020; Sari et al., 2018). Se ha demostrado que las nanopartículas esféricas u ovaladas se internalizan de manera más eficiente por células no fagocíticas mediante mecanismos endocíticos, en comparación con partículas alargadas o de forma irregular, que son

preferentemente captadas por células fagocíticas (L. Zhang, Su, et al., 2019; L. Zhang, Wang, et al., 2019). Con base en los resultados y la evidencia previa, las nanopartículas obtenidas en este estudio tienen el potencial de ser endocitadas por células A549 y B16F10.

Para comprender los efectos de los compuestos encapsulados, primero se evaluó su potencial en forma libre. Los solventes utilizados para diluir la curcumina influyen en su efecto citotóxico (Beltzig et al., 2021; Ilieva et al., 2021; F. Liu et al., 2017), debido a la estabilidad que presenta en ciertos solventes orgánicos (Mondal et al., 2016). Por lo tanto, el efecto citotóxico varía dependiendo de si se utiliza metanol o DMSO. La viabilidad de las células sanas no se vio afectada por la curcumina o la gemcitabina libres en las concentraciones utilizadas. Resultados similares han sido reportados previamente en células musculares lisas vasculares murinas, fibroblastos, células endoteliales y PBMCs, donde se ha demostrado que la curcumina no es tóxica hasta concentraciones de 40  $\mu\text{M}$  (Do et al., 2022; C. Zhang et al., 2010; Zhong et al., 2014). Sin embargo, varios estudios han identificado que la curcumina posee propiedades citotóxicas que afectan a células A549 y B16F10 (Alvizo-Báez et al., 2022; Pillai et al., 2004; Shimada et al., 2018), siendo las células B16F10 más sensibles, mostrando una viabilidad por debajo del 50% con concentraciones tan bajas como 5  $\mu\text{M}$  (Alvizo-Báez et al., 2022). Estos hallazgos son consistentes con los resultados obtenidos en este estudio. En contraste, las células A549 fueron más sensibles a la gemcitabina, con una  $\text{CI}_{50}$  de aproximadamente 1.12  $\mu\text{M}$ , resultado similar al reportado en otros estudios (Santucci et al., 2024). No obstante, nuestros resultados difieren de lo reportado por algunos autores, donde la  $\text{CI}_{50}$  de gemcitabina en células A549 supera los 90  $\mu\text{M}$ . Esta discrepancia podría deberse a la presencia de células que han desarrollado mecanismos de resistencia (Fu et al., 2023; S. Jiang et al., 2020; Wu et al., 2016).

En cuanto a la eficacia citotóxica demostrada en esta investigación, los resultados obtenidos son consistentes con estudios previos en los que compuestos naturales, como extractos marinos y otros fitofármacos encapsulados (Dewi et al., 2022; Sindhoor et al., 2022), han mostrado una mayor actividad antiproliferativa en líneas celulares A549 y

B16F10. Un ejemplo de ello es el uso de nanopartículas lipídicas cargadas con curcumina o alcaloides marinos, que han inducido apoptosis significativa en células A549, activando mecanismos relacionados con el estrés oxidativo y la activación de caspasas (Kononenko et al., 2024; Yao et al., 2015). De manera similar, nanopartículas de quitosano cargadas con doxorubicina o paclitaxel también han demostrado alta eficacia en la toxicidad presentada en células pulmonares y de melanoma murino, lo que refuerza la utilidad del sistema de liberación utilizado en este estudio (A. S. Moghaddam et al., 2020; Yoncheva et al., 2019). Estas comparaciones ayudan a contextualizar la efectividad de las nanopartículas formuladas, destacando que tanto el sistema de encapsulación como las propiedades fisicoquímicas de los principios activos influyen en la respuesta biológica observada. La nanoparticulación de principios activos mejora la internalización celular, incrementando el efecto terapéutico al reducir las concentraciones necesarias del fármaco (L. Jia, 2005; Minaei et al., 2016; Rosière et al., 2018; Sakhi et al., 2022). Este mismo efecto se observó en el presente estudio, donde la  $CI_{50}$  de la curcumina se redujo un 34.68% en células A549, y la  $CI_{50}$  de la gemcitabina se redujo entre un 69.83% y un 91.26% en células A549 y B16F10 al estar encapsuladas en nanopartículas de quitosano. En contraste, el efecto citotóxico de Np-Cur sobre células B16F10 disminuyó un 30.63%. El aumento en la viabilidad celular observado con bajas dosis de NP-Gem podría explicarse por una respuesta hormética, fenómeno reportado con varios agentes quimioterapéuticos, en el cual concentraciones elevadas inducen toxicidad, mientras que dosis bajas estimulan la proliferación celular (Calabrese, 2005; Y. Chen et al., 2022b). Específicamente, se ha reportado que la gemcitabina estimula la proliferación en células de cáncer de pulmón y páncreas cuando se utiliza a bajas concentraciones (Sugisawa et al., 2019; Yoshimasu et al., 2015). Sin embargo, el efecto hormético de la quimioterapia varía dependiendo del tipo celular, el microambiente tumoral, la concentración del fármaco y el tiempo de exposición (Aoishi et al., 2019; Bocci et al., 2002; Calabrese, 2005).

Las interacciones farmacológicas entre la curcumina y la gemcitabina mostraron una fuerte dependencia tanto del tipo celular como de la concentración. En general, las concentraciones más bajas de curcumina favorecieron una mejor cooperación

farmacológica, mientras que concentraciones más altas tendieron a interferir con la eficacia de la gemcitabina, probablemente debido a sus propiedades antioxidantes (Ashrafizadeh et al., 2020). Este comportamiento sugiere un efecto hormético que varía según la línea celular (Aoishi et al., 2019; Jodynis-liebert & Kujawska, 2020; N. S. A. Moghaddam et al., 2019). Por otro lado, la nanoencapsulación alteró drásticamente estas interacciones, reduciendo el potencial de sinergia en ambos modelos celulares. Esto podría atribuirse a cambios en la biodisponibilidad o en el perfil de liberación intracelular de los compuestos (Y. Liu et al., 2024). Estos hallazgos subrayan la importancia de considerar no solo la dosis y el tipo celular, sino también la formulación farmacéutica al evaluar combinaciones terapéuticas en cáncer.

Las concentraciones utilizadas en el ensayo con AO/PI (0.2  $\mu$ M de gemcitabina y 20  $\mu$ M de curcumina) se encuentran dentro del rango en el que el ensayo MTT comienza a mostrar una disminución significativa en la viabilidad celular. Sin embargo, mientras que el MTT indica una reducción parcial en la actividad mitocondrial, el análisis con AO/PI revela un porcentaje mucho mayor de células con daño estructural irreversible. Esto sugiere que algunos de los efectos citotóxicos detectados por AO/PI podrían ser subestimados por el MTT debido a la persistencia de actividad metabólica en células que están en proceso de muerte (Ghasemi et al., 2021; Kari et al., 2022). Las discrepancias entre AO/PI y MTT son esperables y reflejan los diferentes aspectos de la viabilidad celular que cada técnica evalúa. Mientras el MTT es útil para estimar el metabolismo celular, AO/PI proporciona una visión más directa de la integridad celular (Hoogstraten et al., 2022; Khalef et al., 2024). La implementación combinada de ambas técnicas, como en este estudio, permite una evaluación más integral de los efectos citotóxicos de los tratamientos.

El uso de fármacos encapsulados en nanopartículas permite inducir la muerte celular a concentraciones más bajas en comparación con los fármacos libres, condición bajo la cual los eventos necróticos tienden a ser menos frecuentes (Mirakabadi et al., 2012; Tsuda et al., 2020). Aunque se ha documentado ampliamente que la curcumina induce apoptosis en células tumorales (Kocyigit & Guler, 2017; Yazdani et al., 2021), los patrones de tinción observados en este estudio —basados en Anexina V-FITC/PI y Naranja de

acridina/Bromuro de etidio (AO/EB)— sugieren un escenario más complejo en los mecanismos de muerte celular. En el ensayo de Anexina V/PI, las células B16F10 tratadas con fármacos encapsulados mostraron una mayor proporción de células doblemente positivas (Anexina V y PI), lo que indica etapas avanzadas de muerte celular con pérdida de integridad de membrana. En contraste, las células A549 presentaron un mayor porcentaje de células positivas solo para Anexina V en todos los tratamientos, lo que puede corresponder a etapas tempranas de muerte celular regulada, como apoptosis o necroptosis. Dado que las células Anexina V-positivas/PI-negativas aún conservan integridad de membrana y cierta actividad metabólica, podrían representar estados intermedios o incluso reversibles (Costigan et al., 2023; Kari et al., 2022). En respaldo de estos hallazgos, la tinción AO/EB mostró patrones consistentes, con células viables que emitían fluorescencia verde y células no viables con fluorescencia roja debido a la captación de bromuro de etidio (Kari et al., 2022). En las células B16F10, el tratamiento con nanopartículas resultó en un aumento notable de la fluorescencia roja y fragmentación nuclear, consistente con daño irreversible de membrana y desintegración nuclear avanzada (Atale et al., 2014). Por el contrario, las células A549 mostraron una mayor proporción de fluorescencia amarilla o anaranjada, lo que sugiere un daño progresivo con compromiso parcial de membrana (Plemel et al., 2017). Estos resultados coinciden con la idea de que las células B16F10 progresan más rápidamente hacia la ruptura completa de membrana, mientras que las células A549 experimentan una forma de muerte más lenta o modulada.

Estas diferencias pueden atribuirse a características intrínsecas de las líneas celulares. Las células B16F10 son más sensibles al estrés oxidativo, lo que podría acelerar la desestabilización de la membrana (Becker & Indra, 2023). En cambio, se ha reportado que las células A549 presentan niveles más altos de enzimas antioxidantes y proteínas antiapoptóticas (Aqil et al., 2014), lo que podría retrasar la progresión de la muerte celular. Además, la combinación de curcumina y gemcitabina redujo la proporción de células positivas solo para Anexina V y aumentó la proporción de células doblemente positivas o solo PI-positivas en ambos ensayos, particularmente en A549. Esto podría indicar una transición hacia formas de muerte más abruptas o menos reguladas. Dado que la gemcitabina genera especies reactivas de oxígeno (ROS) y la curcumina modula la

respuesta antioxidante, incluyendo la activación de Nrf2 (Ashrafizadeh et al., 2020; Zhao et al., 2019), su combinación podría resultar en interacciones antagónicas o activar respuestas alternativas como la autofagia (N. S. A. Moghaddam et al., 2019; Moustapha et al., 2015). En conjunto, el uso combinado de Annexina V/PI y AO/EB revela que la muerte celular inducida por los agentes encapsulados no sigue una única vía, sino que varía en dinámica temporal y progresión estructural dependiendo del tipo celular. Estos hallazgos resaltan el valor del uso de ensayos complementarios y la adopción de interpretaciones matizadas basadas en múltiples líneas de evidencia. Desde una perspectiva traslacional, comprender estas dinámicas podría contribuir a un mejor diseño farmacéutico y respaldar el desarrollo racional de estrategias anticancerígenas sinérgicas y personalizadas.

Se ha descrito que WT1 y Par-4 participan en procesos clave como apoptosis, proliferación y metástasis en diversos tipos de cáncer. En condiciones típicas de muerte celular inducida, WT1 tiende a reprimirse, mientras que Par-4 se sobreexpresa, favoreciendo la activación de vías apoptóticas como Fas/FasL e inhibiendo mecanismos de supervivencia celular como NF- $\kappa$ B (Azmi et al., 2008; Daniel et al., 2018; El-Guendy & Rangnekar, 2003; Takahara et al., 2011; J. B. Wang et al., 2009). No obstante, en este estudio se observaron patrones divergentes respecto a lo reportado. Por ejemplo, la combinación libre de curcumina-gemcitabina (10–0.1  $\mu$ M), así como los tratamientos con Np-Cur (10  $\mu$ M) y Np-Cur-Np-Gem (10–0.1  $\mu$ M), indujeron una sobreexpresión de WT1 en células B16F10 y A549. De manera paralela, se identificó una supresión de Par-4 en A549 tratadas con curcumina libre (10  $\mu$ M).

Estas observaciones podrían explicarse por dos mecanismos no excluyentes. Por un lado, WT1 puede comportarse como oncogén, promoviendo proliferación, evasión de apoptosis, transición epitelio-mesenquimal (EMT) y angiogénesis, como se ha descrito en melanoma, pulmón, mama y páncreas (Burwell et al., 2007; B. Q. Li et al., 2019; K. Wagner et al., 2002; K. J. Wagner et al., 2001). Por otro, la supresión de Par-4 podría representar una respuesta adaptativa que permite a las células sobrevivir frente al daño

subletal inducido por la curcumina, especialmente cuando se administra a concentraciones no citotóxicas.

En conjunto, los efectos observados sobre migración, invasión e implantación celular parecen estar mediados, al menos en parte, por cambios en la expresión de genes asociados a la progresión tumoral. Particularmente, los tratamientos que indujeron un comportamiento pro-metastásico, como las combinaciones libres de curcumina y gemcitabina a bajas concentraciones, coincidieron con la sobreexpresión de WT1 y/o la supresión de Par-4, lo cual sugiere un vínculo funcional entre el perfil fenotípico y la modulación de estos genes. Este hallazgo respalda la hipótesis de que ciertos tratamientos pueden activar vías de escape celular que favorecen la diseminación metastásica, especialmente cuando no alcanzan umbrales citotóxicos efectivos. Así, la correlación entre los cambios moleculares y los efectos funcionales observados destaca la importancia de considerar cuidadosamente la dosis y la formulación en el diseño de estrategias terapéuticas más eficaces y seguras.

La Np-Q demostró inhibición tanto de la movilidad como de los mecanismos de implantación en células B16F10 y A549. Estudios recientes han mostrado que el quitosano nanoparticulado puede reducir la expresión de genes como *CXCR4*, *SDF-1* y metaloproteinasas de matriz, todos ellos asociados con la migración de células tumorales, la angiogénesis y la metástasis (Potdar & Shetti, 2016). Además, se ha demostrado que el uso de quitosano como sistema de liberación en nanopartículas mejora significativamente los efectos antimetastásicos de compuestos activos (Dana et al., 2022). De forma consistente, la curcumina, tanto libre como en su forma nanoparticulada (Np-Cur), demostró la capacidad de reducir o normalizar los parámetros metastásicos en células B16F10 y A549. Este efecto concuerda con estudios previos *in vitro* e *in vivo* en cánceres de próstata, mama y pulmón, en los que se ha demostrado que la curcumina inhibe la migración, implantación e invasión al modular citocinas proinflamatorias, microARNs y factores de transcripción involucrados en la proliferación, supervivencia, invasión y angiogénesis celular (H. Chen et al., 2008; Gao et al., 2012; Killian et al., 2012; M. Li et al., 2023; Tang & Cao, 2022; S. Zhou et al., 2017).

Uno de los hallazgos más intrigantes de este estudio fue el efecto pro-metastásico de 0.1  $\mu\text{M}$  de gemcitabina libre en células B16F10. Nuestros resultados mostraron que esta concentración incrementó significativamente la migración, invasión e implantación de dichas células. Estos hallazgos concuerdan con estudios previos en líneas celulares de cáncer de mama y páncreas, en los que dosis bajas de gemcitabina rescataron a las células del estrés citotóxico y promovieron su supervivencia. Por ejemplo, en células MCF-7, la gemcitabina contrarrestó los efectos de la protopina (Garcia-Gil et al., 2021), mientras que en células MDA-MB-231, dosis bajas de gemcitabina indujeron autofagia como mecanismo de resistencia (M. Chen et al., 2014). En cáncer pancreático, se ha reportado que promueve la transición epitelio-mesénquima (EMT), lo cual incrementa el potencial metastásico (H. Li et al., 2019; Sugisawa et al., 2019). Respuestas similares se han observado con otros quimioterapéuticos. Por ejemplo, la exposición continua a dosis bajas de doxorubicina indujo quimiorresistencia y plasticidad celular en células MDA-MB-231 (Salinas-Jazmín et al., 2024), mientras que dosis subletales transformaron células MCF-7 en fenotipos migratorios e invasivos (Mohammed et al., 2021). Asimismo, se ha demostrado que el cisplatino —solo o en combinación con gemcitabina— induce efectos similares en células MCF-7, T-47D y de adenocarcinoma pulmonar (Y. Chen et al., 2022a; R. Zhang et al., 2022).

Este comportamiento paradójico se alinea con la naturaleza bifásica y hormética de la gemcitabina y fármacos similares, en los que concentraciones bajas estimulan mecanismos de supervivencia y metástasis, mientras que concentraciones altas son citotóxicas (Y. Chen et al., 2022a; H. Li et al., 2019; Sugisawa et al., 2019). Nuestro estudio demuestra que la gemcitabina nanoparticulada a 0.5 y 1  $\mu\text{M}$  induce proliferación celular, mientras que a 0.1  $\mu\text{M}$  e su forma libre promueve un comportamiento metastásico, reforzando este efecto bifásico.

De manera interesante, la combinación de curcumina y gemcitabina en concentraciones de 10–0.5  $\mu\text{M}$  en su forma libre incrementó significativamente la tasa de implantación de células B16F10. Se hipotetiza que esto está relacionado con las propiedades antioxidantes de la curcumina, que podrían contrarrestar el estrés oxidativo que normalmente impide

que las células tumorales circulantes sobrevivan en el torrente sanguíneo. Estudios previos han demostrado que antioxidantes como la N-acetilcisteína y la vitamina E pueden reducir las especies reactivas de oxígeno (ROS), inhibir el daño al ADN y, en consecuencia, promover la progresión tumoral y la metástasis en modelos de melanoma y cáncer de pulmón (Le Gal et al., 2015; Piskounova et al., 2015). Esto podría explicar por qué la combinación de curcumina libre y gemcitabina promueve la implantación celular —en B16F10— al aliviar el estrés oxidativo, la curcumina podría apoyar inadvertidamente mecanismos de supervivencia en células migrantes.

Sin embargo, cuando se utilizó Np-Gem a 0.1  $\mu\text{M}$ , los parámetros metastásicos se suprimieron o normalizaron en ambas líneas celulares. Esto sugiere que la nanoparticulación puede atenuar las respuestas horméticas inducidas por la gemcitabina libre, posiblemente debido a una liberación controlada, mejor captación intracelular o farmacodinámica alterada (Zakeri-Milani et al., 2017). En células B16F10, la mayoría de los tratamientos —particularmente aquellos que involucraron formulaciones nanoparticuladas— redujeron la migración, invasión e implantación celular. No obstante, en este estudio también se ha demostrado que esta concentración de Np-Gem puede contribuir al incremento en la proliferación, lo que sugiere que el fármaco puede inducir distintos mecanismos dependiendo del contexto celular y la formulación utilizada. De forma destacada, la combinación de curcumina y gemcitabina libres a 10–0.05  $\mu\text{M}$  incrementó inesperadamente la invasión, posiblemente a través de la activación de vías celulares de rescate, lo que conduce a la selección de células con un fenotipo más invasivo y orientado a la supervivencia. Esto se respalda en evidencia que indica que los quimioterapéuticos pueden inducir respuestas adaptativas y promover resistencia celular. Por ejemplo, se ha demostrado que la curcumina desestabiliza las mitocondrias e induce apoptosis, pero también activa la autofagia, promoviendo la degradación de orgánulos dañados y mejorando la supervivencia celular bajo estrés (Moustapha et al., 2015; Rainey et al., 2015). Mientras tanto, la gemcitabina puede activar la vía de señalización *CXCL12/CXCR-4-Akt/ERK*, contribuyendo a la quimiorresistencia y al potencial metastásico (Arora et al., 2013; S. Singh et al., 2010).

En contraste, las células A549 no mostraron un comportamiento metastásico incrementado con ningún tratamiento. Todas las combinaciones probadas redujeron o mantuvieron los parámetros metastásicos basales, lo que sugiere que los efectos horméticos observados son altamente dependientes del tipo celular. Esto es consistente con estudios previos que muestran que el trasfondo genético, la activación de vías de señalización y los mecanismos de respuesta al estrés influyen en la sensibilidad y adaptación a los fármacos (Amrutkar et al., 2020; Aoishi et al., 2019; Garcia-Gil et al., 2021; Inoue et al., 1998). Esta diferencia de comportamiento entre las dos líneas celulares subraya la importancia de considerar el contexto biológico específico al diseñar tratamientos combinados para terapia contra el cáncer. Los resultados obtenidos en la presente investigación también destacan la necesidad de analizar más a fondo los efectos de concentraciones bajas de quimioterapéuticos, ya que sus efectos pueden ser paradójicos y potencialmente promover resistencia y metástasis en ciertos casos. Estos hallazgos tienen importantes implicaciones clínicas, sugiriendo que un enfoque más cuidadoso y personalizado en la administración de estos fármacos podría mejorar los resultados terapéuticos.

## 9 CONCLUSIONES

En este estudio se evaluó el efecto de la nanoencapsulación de curcumina y gemcitabina sobre la viabilidad, muerte celular y comportamiento metastásico de las líneas celulares A549 y B16F10. La caracterización fisicoquímica de las nanopartículas reveló que el uso de metanol como solvente favorece la estabilidad de la curcumina durante la síntesis, y que la formulación con quitosano produce sistemas estables, homogéneos y de tamaño nanométrico adecuado para aplicaciones biomédicas. Las nanopartículas presentaron morfología ovoide, carga superficial positiva y distribución de tamaño uniforme tras la liofilización. Los resultados demostraron que la nanoencapsulación modificó significativamente la eficacia citotóxica de ambos fármacos. Mientras que la curcumina nanoparticulada mostró menor citotoxicidad en B16F10 en comparación con su forma libre, en A549 su efecto fue superior. Por su parte, la gemcitabina encapsulada mostró una notable disminución en los valores de  $CI_{50}$  en ambas líneas celulares, lo que indica una mayor eficacia. Además, se observó una mayor inducción de apoptosis con las formulaciones nanoencapsuladas en comparación con los fármacos libres.

En cuanto al potencial metastásico, se evidenció que gemcitabina en concentraciones subletales puede promover la migración e invasión en B16F10, un efecto que fue contrarrestado por la curcumina en combinación libre y, de forma más efectiva, cuando ambos compuestos fueron nanoparticulados. En A549, las formulaciones nanoencapsuladas mantuvieron o disminuyeron los parámetros metastásicos. Estos hallazgos respaldan la naturaleza bifásica y hormética de la gemcitabina, así como la dualidad dependiente del contexto de los efectos antioxidantes de la curcumina.

En conjunto, los datos sugieren que la formulación en nanopartículas no solo mejora la eficacia terapéutica de la curcumina y la gemcitabina, sino que también puede prevenir efectos pro-metastásicos asociados a dosis subletales. Sin embargo, las interacciones farmacológicas observadas son altamente dependientes del tipo celular, la concentración utilizada y la forma de administración, lo que resalta la necesidad de un diseño racional y personalizado en terapias combinadas basadas en nanotecnología para optimizar los resultados en oncología.

## 10 PERSPECTIVAS

Probar otros agentes criopreservante y determinar si se disminuye el potencial citotóxico de las nanopartículas no cargadas con los principios activos.

Evaluar el efecto de las nanopartículas no cargadas en un modelo murino y establecer si se presenta un efecto citopático o de respuesta inmunológica.

Observar si el encapsulamiento conjunto de curcumina y gemcitabina en las condiciones probadas en este trabajo pueden modificar las características fisicoquímicas de las nanopartículas.

Medir el porcentaje de absorción que presentan las nanopartículas en un modelo de cultivo ALI.

Evaluar los efectos citotóxicos y metastásicos en las células en un intervalo de concentraciones mayor, tanto de drogas libres como nanoparticuladas, con fines de conocer mejor la conducta bifásica de la curcumina y la gemcitabina.

Evaluar la expresión de marcadores de estrés oxidativo relacionados en los mecanismos de muerte celular de curcumina y gemcitabina, así como en sus combinaciones, para poder determinar los posibles mecanismos antagónicos presentados en su coadministración.

Determinar el efecto de las formulaciones en marcadores moleculares relacionados con la transición epitelio mesenquimal.

## 11 BIBLIOGRAFÍA

- Adhikari, H. S., & Yadav, P. N. (2018). Anticancer Activity of Chitosan, Chitosan Derivatives, and Their Mechanism of Action. *International Journal of Biomaterials*, 2018, 1–29. <https://doi.org/10.1155/2018/2952085>
- Aggarwal, B. B., & Harikumar, K. B. (2009). Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(1), 40–59. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.06.010>
- Ahuja, G., & Pathak, K. (2009). Porous Carriers for Controlled/Modulated Drug Delivery. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71(6), 599–607.
- Alagga, A. A., Pellegrini, M. V., & Gupta, V. (2025). Drug Absorption. In *StatPearls*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7569663>
- Alfarouk, K. O., Stock, C.-M., Taylor, S., Walsh, M., Muddathir, A. K., Verduzco, D., Bashir, A. H. H., Mohammed, O. Y., Elhassan, G. O., Harguindey, S., Reshkin, S. J., Ibrahim, M. E., & Rauch, C. (2015). Resistance to cancer chemotherapy: failure in drug response from ADME to P-gp. *Cancer Cell International*, 15(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s12935-015-0221-1>
- Alqahtani, M. S., Kazi, M., Alsenaidy, M. A., & Ahmad, M. Z. (2021). Advances in Oral Drug Delivery. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.618411>
- Alvizo-Báez, C. A., Peña-Torres, A. A., Terrazas-Armendáriz, L. D., Luna-Cruz, I. E., Uscanga-Palomeque, A. C., Sampayo-Reyes, A., Tamez-Guerra, R. S., Rodríguez-Padilla, C., & Alcocer-González, J. M. (2022). Synergic effect between TRAIL gene and curcumin in magnetic chitosan nanoparticles on cancer cells apoptosis enhanced by laser photoactivation. *Journal of Nanoparticle Research*, 24(8). <https://doi.org/10.1007/s11051-022-05544-x>
- Amrutkar, M., Vethe, N. T., Verbeke, C. S., Aasrum, M., Ve, A., Petra, S., & Gladhaug, I. P. (2020). *Differential Gemcitabine Sensitivity in Primary Human Pancreatic Cancer Cells and Paired Stellate Cells Is Driven by Heterogenous Drug Uptake and Processing*. 1–18.
- Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Newman, R. A., & Aggarwal, B. B. (2007). Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. *Molecular Pharmaceutics*, 4(6), 807–818. <https://doi.org/10.1021/mp700113r>
- Anoosha, P., Sakthivel, R., & Michael Gromiha, M. (2016). Exploring preferred amino acid mutations in cancer genes: Applications to identify potential drug targets.

- Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1862(2), 155–165. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.11.006>
- Anuchapreeda, S., Thanarattanakorn, P., Sittipreechacharn, S., Tima, S., Chanarat, P., & Limtrakul, P. (2006). Inhibitory effect of curcumin onMDR1 gene expression in patient leukemic cells. *Archives of Pharmacal Research*, 29(10), 866–873. <https://doi.org/10.1007/BF02973907>
- Aoishi, Y., Yoshimasu, T., Oura, S., Kawago, M., Hirai, Y., Miyasaka, M., Ohashi, T., & Nishimura, Y. (2019). Quantitative Evaluation of Hormesis in Breast Cancer Using Histoculture Drug Response Assay. *Dose-Response*, 17(4), 155932581989618. <https://doi.org/10.1177/1559325819896183>
- Aqil, M., Elseth, K. M., Vesper, B. J., Deliu, Z., Aydogan, B., Xue, J., & Radosevich, J. A. (2014). Part I—mechanism of adaptation: high nitric oxide adapted A549 cells show enhanced DNA damage response and activation of antiapoptotic pathways. *Tumor Biology*, 35(3), 2403–2415. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-1318-6>
- Arora, S., Bhardwaj, A., Singh, S., Srivastava, S. K., Mcclellan, S., Nirodi, C. S., Piazza, G. A., Grizzle, W. E., Owen, L. B., & Singh, A. P. (2013). An Undesired Effect of Chemotherapy: Gemcitabine promotes pancreatic cancer cell invasiveness through reactive oxygen species-dependent, nuclear factor  $\kappa$ B- and hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ -mediated up-regulation of CXCR4. *Journal of Biological Chemistry*, 288(29), 21197–21207. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.484576>
- Asha, K. N., & Srivastava, N. (2025). Analysis of blood flow features in the curved artery in the presence of differently shaped hybrid nanoparticles. *Partial Differential Equations in Applied Mathematics*, 13, 101117. <https://doi.org/10.1016/j.padiff.2025.101117>
- Ashouri, A., & Samadi, S. (2019). Preparation of 2,5-diamino-1,3,4-thiadiazole derivatives using MgO nanoparticles as heterogeneous basic catalysts. *Monatshefte Fur Chemie*, 150(7), 1297–1304. <https://doi.org/10.1007/s00706-019-02431-5>
- Ashrafizadeh, M., Ahmadi, Z., Mohammadinejad, R., Farkhondeh, T., & Samarghandian, S. (2020). Curcumin Activates the Nrf2 Pathway and Induces Cellular Protection Against Oxidative Injury. *Current Molecular Medicine*, 20(2), 116–133. <https://doi.org/10.2174/1566524019666191016150757>
- Asif, H. M., Zafar, F., Ahmad, K., Iqbal, A., Shaheen, G., Ansari, K. A., Rana, S., Zahid, R., & Ghaffar, S. (2023). Synthesis, characterization and evaluation of anti-arthritis and anti-inflammatory potential of curcumin loaded chitosan nanoparticles. *Scientific Reports*, 13(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-37152-7>
- Astinfeshan, M., Rasmi, Y., Kheradmand, F., Karimipour, M., Rahbarghazi, R., Aramwit, P., Nasirzadeh, M., Daeihassani, B., Shirpoor, A., Gholinejad, Z., & Saboory, E. (2019). Curcumin inhibits angiogenesis in endothelial cells using downregulation of

- the PI3K/Akt signaling pathway. *Food Bioscience*, 29, 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.04.005>
- Atale, N., Gupta, S., Yadav, U. C. S., & Rani, V. (2014). Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques. *Journal of Microscopy*, 255(1), 7–19. <https://doi.org/10.1111/jmi.12133>
- Aydemir, D., Öztürk, K., Arslan, F. B., Çalis, S., & Ulusu, N. N. (2024). Gemcitabine-loaded chitosan nanoparticles enhanced apoptotic and ferroptotic response of gemcitabine treatment alone in the pancreatic cancer cells in vitro. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 397(11), 9051–9066. <https://doi.org/10.1007/s00210-024-03193-6>
- Azmi, A. S., Ahmad, A., Banerjee, S., Rangnekar, V. M., Mohammad, R. M., & Sarkar, F. H. (2008). Chemoprevention of Pancreatic Cancer: Characterization of Par-4 and its Modulation by 3,3' Diindolylmethane (DIM). *Pharm. Res.*, 25(9), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9581-8>. Chemoprevention
- Bachmeier, B. E., Nerlich, A. G., Lichtinghagen, R., & Sommerhoff, C. P. (2001). Matrix metalloproteinases (MMPs) in breast cancer cell lines of different tumorigenicity. *Anticancer Research*, 21(6A), 3821–3828. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11911253>
- Beasley, D. E., Koltz, A. M., Lambert, J. E., Fierer, N., & Dunn, R. R. (2015). The evolution of stomach acidity and its relevance to the human microbiome. *PLoS ONE*, 10(7), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134116>
- Becker, A. L., & Indra, A. K. (2023). Oxidative Stress in Melanoma: Beneficial Antioxidant and Pro-Oxidant Therapeutic Strategies. *Cancers*, 15(11), 3038. <https://doi.org/10.3390/cancers15113038>
- Behl, A., Sarwalia, P., Kumar, S., Behera, C., Mintoo, M. J., Datta, T. K., Gupta, P. N., & Chhillar, A. K. (2022). Codelivery of Gemcitabine and MUC1 Inhibitor Using PEG-PCL Nanoparticles for Breast Cancer Therapy. *Molecular Pharmaceutics*, 19(7), 2429–2440. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.2c00175>
- Bellmunt, J., Guillem, V., Paz-Ares, L., González-Larriba, J. L., Carles, J., Albanell, J., Tabernero, J. M., Cortés-Funes, H., & Baselga, J. (2000). Gemcitabine/paclitaxel-based three-drug regimens in advanced urothelial cancer. *European Journal of Cancer*, 36, 17–25. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(00\)00081-2](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(00)00081-2)
- Beltzig, L., Frumkina, A., Schwarzenbach, C., & Kaina, B. (2021). Cytotoxic, genotoxic and senolytic potential of native and micellar curcumin. *Nutrients*, 13(7). <https://doi.org/10.3390/nu13072385>
- Bertram-Ralph, E., & Amare, M. (2023). Factors affecting drug absorption and distribution. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 24(4), 221–227.

<https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2022.12.023>

- Beumer, J. H., Eiseman, J. L., Parise, R. A., Joseph, E., Covey, J. M., & Egorin, M. J. (2008). Modulation of Gemcitabine (2',2'-Difluoro-2'-Deoxycytidine) Pharmacokinetics, Metabolism, and Bioavailability in Mice by 3,4,5,6-Tetrahydrouridine. *Clinical Cancer Research*, 14(11), 3529–3535. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4885>
- Bjånes, T. K., Jordheim, L. P., Schjøtt, J., Kamceva, T., Cros-Perrial, E., Langer, A., de Garibay, G. R., Kotopoulis, S., McCormack, E., & Riedel, B. (2020). Intracellular cytidine deaminase regulates gemcitabine metabolism in pancreatic cancer cell lines. *Drug Metabolism and Disposition*, 48(3), 153–158. <https://doi.org/10.1124/dmd.119.089334>
- Blackstein, M., Vogel, C. L., Ambinder, R., Cowan, J., Iglesias, J., & Melemed, A. (2002). Gemcitabine as First-Line Therapy in Patients with Metastatic Breast Cancer: A Phase II Trial. *Oncology*, 62(1), 2–8. <https://doi.org/10.1159/000048240>
- Bocci, G., Nicolaou, K. C., & Kerbel, R. S. (2002). Protracted low-dose effects on human endothelial cell proliferation and survival in vitro reveal a selective antiangiogenic window for various chemotherapeutic drugs. *Cancer Research*, 62(23), 6938–6943.
- Bordonaro, M., & Lazarova, D. (2024). Hypothesis: Cancer Hormesis and Its Potential for Cancer Therapeutics. *Life*, 14(3). <https://doi.org/10.3390/life14030401>
- Boyles, M. S. P., Kristl, T., Andosch, A., Zimmermann, M., Tran, N., Casals, E., Himly, M., Puentes, V., Huber, C. G., Lütz-Meindl, U., & Duschl, A. (2015). Chitosan functionalisation of gold nanoparticles encourages particle uptake and induces cytotoxicity and pro-inflammatory conditions in phagocytic cells, as well as enhancing particle interactions with serum components. *Journal of Nanobiotechnology*, 13(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12951-015-0146-9>
- Brett, A., Pandey, S., & Fraizer, G. (2013). The Wilms' tumor gene (WT1) regulates E-cadherin expression and migration of prostate cancer cells. *Molecular Cancer*, 12(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-3>
- Brodowicz, T., Krzakowski, M., Zwitter, M., Tzekova, V., Ramlau, R., Ghilezan, N., Ciuleanu, T., Cucevic, B., Gyurkovits, K., Ulsperger, E., Jassem, J., Grgic, M., Saip, P., Szilasi, M., Wiltschke, C., Wagnerova, M., Oskina, N., Soldatenkova, V., Zielinski, C., & Wenczl, M. (2006). Cisplatin and gemcitabine first-line chemotherapy followed by maintenance gemcitabine or best supportive care in advanced non-small cell lung cancer: A phase III trial. *Lung Cancer*, 52(2), 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2006.01.006>
- Burwell, E. A., McCarty, G. P., Simpson, L. A., Thompson, K. A., & Loeb, D. M. (2007). Isoforms of Wilms' tumor suppressor gene (WT1) have distinct effects on mammary epithelial cells. *Oncogene*, 26(23), 3423–3430.

<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210127>

- Büyük, N. İ., Arayıcı, P. P., Derman, S., Mustafaeva, Z., & Yücel, S. (2020). An Optimization Study for Chitosan Nanoparticles : Synthesis and Characterization. *Celal Bayar University Journal of Science*, 16(2), 119–127. <https://doi.org/10.18466/cbayarfbe.658921>
- Calabrese, E. J. (2001). Nitric Oxide: Biphasic Dose Responses. *Critical Reviews in Toxicology*, 31(4–5), 489–501. <https://doi.org/10.1080/20014091111776>
- Calabrese, E. J. (2005). Cancer Biology and Hormesis: Human Tumor Cell Lines Commonly Display Hormetic (Biphasic) Dose Responses. *Critical Reviews in Toxicology*, 35(6), 463–582. <https://doi.org/10.1080/10408440591034502>
- Calibasi-Kocal, G., Pakdemirli, A., Bayrak, S., Ozupek, N. M., Sever, T., Basbinar, Y., Ellidokuz, H., & Yigitbasi, T. (2019). Curcumin effects on cell proliferation, angiogenesis and metastasis in colorectal cancer. *Journal of B.U.ON.*, 24(4), 1482–1487.
- Cao, J., Ye, B., Lin, L., Tian, L., Yang, H., Wang, C., Huang, W., & Huang, Z. (2017). Curcumin Alleviates oxLDL Induced MMP-9 and EMMPRIN Expression through the Inhibition of NF- $\kappa$ B and MAPK Pathways in Macrophages. *Frontiers in Pharmacology*, 8(FEB), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00062>
- Casado, A., Gimeno, A., Aguilar-Guisado, M., García, M., Rodríguez, J. F., Rivas, P. A., Bueno, C., Lepe, J. A., Cisneros, J. M., & Molina, J. (2023). Safety of early oral ambulatory treatment of adult patients with bloodstream infections discharged from the emergency department. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 67(11). <https://doi.org/10.1128/aac.00780-23>
- Champion, J. A., Walker, A., & Mitragotri, S. (2008). Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres. *Pharmaceutical Research*, 25(8), 1815–1821. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9562-y>
- Chen, H., Lee, J., Huang, J., Wang, C., Chen, W., Su, S., Huang, C., Ho, C., Chen, J. J. W., Tsai, M., Yu, S., & Yang, P. (2008). *Curcumin Inhibits Lung Cancer Cell Invasion and Metastasis through the Tumor Suppressor HLJI*. 1(18), 7428–7438. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6734>
- Chen, M., He, M., Song, Y., & Chen, L. (2014). The cytoprotective role of gemcitabine-induced autophagy associated with apoptosis inhibition in triple-negative MDA-MB-231 breast cancer cells. *Internationa Journal of Molecular Medicine*, 34, 276–282. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1772>
- Chen, N. X., Su, X.-L., Feng, Y., Liu, Q., Tan, L., Yuan, H., Chen, Y., Zhao, J., Zhao, Y.-Q., Dusenge, M. A., Hu, J., Ye, Q., Ou-Yang, Z.-Y., Zhong, M.-M., Zhang, Q., Guo, Y., Feng, Y.-Z., & Peng, Y.-B. (2023). Chitosan nanoparticles for sustained release

- of metformin and its derived synthetic biopolymer for bone regeneration. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1169496>
- Chen, W. L., Li, F., Tang, Y., Yang, S. Di, Li, J. Z., Yuan, Z. Q., Liu, Y., Zhou, X. F., Liu, C., & Zhang, X. N. (2017). Stepwise pH-responsive nanoparticles for enhanced cellular uptake and on-demand intracellular release of doxorubicin. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 4241–4256. <https://doi.org/10.2147/IJN.S129748>
- Chen, Y., Liu, H., Zheng, Q., Li, H., You, H., Feng, Y., & Feng, W. (2022a). Promotion of tumor progression induced by continuous low-dose administration of antineoplastic agent gemcitabine or gemcitabine combined with cisplatin. *Life Sciences*, 306(May), 120826. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120826>
- Chen, Y., Liu, H., Zheng, Q., Li, H., You, H., Feng, Y., & Feng, W. (2022b). Promotion of tumor progression induced by continuous low-dose administration of antineoplastic agent gemcitabine or gemcitabine combined with cisplatin. *Life Sciences*, 306(July), 120826. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120826>
- Chithrani, D. B., Jelveh, S., Jalali, F., Van Prooijen, M., Allen, C., Bristow, R. G., Hill, R. P., & Jaffray, D. A. (2010). Gold nanoparticles as radiation sensitizers in cancer therapy. *Radiation Research*, 173(6), 719–728. <https://doi.org/10.1667/RR1984.1>
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156–159. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90021-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2)
- Chou, T.-C., & Martin, N. (2004). CompuSyn User ' s Guide. In *ComboSyn, Inc.* (pp. 1–65).
- Cockfield, J. A., & Schafer, Z. T. (2019). Antioxidant defenses: A context-specific vulnerability of cancer cells. *Cancers*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/cancers11081208>
- Costigan, A., Hollville, E., & Martin, S. J. (2023). Discriminating Between Apoptosis, Necrosis, Necroptosis, and Ferroptosis by Microscopy and Flow Cytometry. *Current Protocols*, 3(12). <https://doi.org/10.1002/cpz1.951>
- Crombag, M.-R. B. S., de Vries Schultink, A. H. M., Schellens, J. H. M., Beijnen, J. H., & Huitema, A. D. R. (2014). Incidence of Hematologic Toxicity in Older Adults Treated with Gemcitabine or a Gemcitabine-Containing Regimen in Routine Clinical Practice: A Multicenter Retrospective Cohort Study. *Drugs & Aging*, 31(10), 737–747. <https://doi.org/10.1007/s40266-014-0207-z>
- D'Costa, Z., Jones, K., Azad, A., van Stiphout, R., Lim, S. Y., Gomes, A. L., Kinchesh, P., Smart, S. C., Gillies McKenna, W., Buffa, F. M., Sansom, O. J., Muschel, R. J., O'Neill, E., & Fokas, E. (2017). Gemcitabine-Induced TIMP1 Attenuates Therapy

- Response and Promotes Tumor Growth and Liver Metastasis in Pancreatic Cancer. *Cancer Research*, 77(21), 5952–5962. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2833>
- Dahal, H., Roy, S., Dey, J., & Dasgupta, S. B. (2025). Assessing Interactions with DNA, Gene Transfection Potential, and Cytotoxicity of Amide-Bonded Cationic Gemini Surfactants: The Role of Chain Length. *ChemistrySelect*, 10(16). <https://doi.org/10.1002/slct.202502049>
- Dana, P., Pimpha, N., Chaipuang, A., Thumrongsiri, N., Tanyapanyachon, P., Taweechaipaisankul, A., Chonniyom, W., Watcharadulyarat, N., Sathornsumetee, S., & Saengkrit, N. (2022). Inhibiting Metastasis and Improving Chemosensitivity via Chitosan-Coated Selenium Nanoparticles for Brain Cancer Therapy. *Nanomaterials*, 12(15), 2606. <https://doi.org/10.3390/nano12152606>
- Daniel, S., Rotem, R., Koren, G., Lunenfeld, E., & Levy, A. (2018). Vaginal antimycotics and the risk for spontaneous abortions. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 218(6), 601.e1-601.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2018.02.013>
- Dede, D. S., Kilicaslan, A., Akinci, M. B., Demirci, U., Tahtaci, G., & Yalcin, B. (2013). The predictive value of hENT 1 molecule for gemcitabine treatment in bladder cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 31(15\_suppl), e15540–e15540. [https://doi.org/10.1200/jco.2013.31.15\\_suppl.e15540](https://doi.org/10.1200/jco.2013.31.15_suppl.e15540)
- Del Prado-Audelo, M. L., Caballero-Florán, I. H., Meza-Toledo, J. A., Mendoza-Muñoz, N., González-Torres, M., Florán, B., Cortés, H., & Leyva-Gómez, G. (2019). Formulations of curcumin nanoparticles for brain diseases. *Biomolecules*, 9(2), 1–28. <https://doi.org/10.3390/biom9020056>
- des Rieux, A., Fievez, V., Garinot, M., Schneider, Y.-J., & Préat, V. (2006). Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *Journal of Controlled Release*, 116(1), 1–27. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.08.013>
- Dewi, M. K., Chaerunisaa, A. Y., Muhaimin, M., & Joni, I. M. (2022). Improved Activity of Herbal Medicines through Nanotechnology. *Nanomaterials*, 12(22), 4073. <https://doi.org/10.3390/nano12224073>
- Diomede, F., Fonticoli, L., Guarnieri, S., Della Rocca, Y., Rajan, T. S., Fontana, A., Trubiani, O., Marconi, G. D., & Pizzicannella, J. (2021). The Effect of Liposomal Curcumin as an Anti-Inflammatory Strategy on Lipopolysaccharide e from Porphyromonas gingivalis Treated Endothelial Committed Neural Crest Derived Stem Cells: Morphological and Molecular Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7534. <https://doi.org/10.3390/ijms22147534>
- Disilvestro, R. A., Joseph, E., Zhao, S., & Bomser, J. (2012). Diverse effects of a low dose supplement of lipidated curcumin in healthy middle aged people. *Nutrition Journal*,

11(1), 2–9. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-11-79>

- Do, X. H., Hoang, M. H. T., Vu, A. T., Nguyen, L. T., Bui, D. T. T., Dinh, D. T., Nguyen, X. H., Than, U. T. T., Mai, H. T., To, T. T., Nguyen, T. N. H., & Hoang, N. T. M. (2022). Differential Cytotoxicity of Curcumin-Loaded Micelles on Human Tumor and Stromal Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20). <https://doi.org/10.3390/ijms232012362>
- Dong, Z., Feng, Q., Zhang, H., Liu, Q., & Gong, J. (2021). Curcumin enhances drug sensitivity of gemcitabine-resistant lung cancer cells and inhibits metastasis. *Pharmazie*, 76(11), 538–543. <https://doi.org/10.1691/ph.2021.0927>
- dos Santos, A. M., Liszbinski, R. B., Carvalho, S. G., Junior, A. G. T., Chorilli, M., de Jesus, M. B., & Gremião, M. P. D. (2025). 5-Fluorouracil-loaded chitosan nanoparticles conjugated with methotrexate for targeted therapy of colorectal cancer. *International Journal of Biological Macromolecules*, 287, 138342. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.138342>
- Drozdzik, M., Czekawy, I., Oswald, S., & Drozdzik, A. (2020). Intestinal drug transporters in pathological states: an overview. *Pharmacological Reports*, 72(5), 1173–1194. <https://doi.org/10.1007/s43440-020-00139-6>
- Dudeja, V., Mujumdar, N., Phillips, P., Chugh, R., Borja-Cacho, D., Dawra, R. K., Vickers, S. M., & Saluja, A. K. (2009). Heat shock protein 70 inhibits apoptosis in cancer cells through simultaneous and independent mechanisms. *Gastroenterology*, 136(5), 1772–1782. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.01.070>
- El-Guendy, N., & Rangnekar, V. M. (2003). Apoptosis by Par-4 in cancer and neurodegenerative diseases. *Experimental Cell Research*, 283(1), 51–66. [https://doi.org/10.1016/S0014-4827\(02\)00016-2](https://doi.org/10.1016/S0014-4827(02)00016-2)
- Elhabak, M., Ibrahim, S., & Ibrahim, R. R. (2022). Intra-vaginal gemcitabine-hybrid nanoparticles for effective cervical cancer treatment. *OpenNano*, 8(September), 100090. <https://doi.org/10.1016/j.onano.2022.100090>
- Endo, H., Inoue, I., Masunaka, K., Tanaka, M., & Yano, M. (2020). Curcumin induces apoptosis in lung cancer cells by 14-3-3 protein-mediated activation of Bad. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 84(12), 2440–2447. <https://doi.org/10.1080/09168451.2020.1808443>
- Epelbaum, R., Schaffer, M., Vize, B., Badmaev, V., & Bar-Sela, G. (2010). Curcumin and gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *Nutrition and Cancer*, 62(8), 1137–1141. <https://doi.org/10.1080/01635581.2010.513802>
- Esfahani, K., Boodaghians, L., Kasymjanova, G., Agulnik, J. S., Pepe, C., Sark, L., Small, D. I., Tomas, R. J., & Cohen, V. (2019). A phase I open prospective cohort trial of curcumin plus tyrosine kinase inhibitors for EGFR-mutant advanced non-small cell

- lung cancer. *J. Clin. Oncol.*, 37, 1–7.
- Fang, T., Yao, Y., Tian, G., Chen, D., Wu, A., He, J., Zheng, P., Mao, X., Yu, J., Luo, Y., Luo, J., Huang, Z., Yan, H., & Yu, B. (2021). Chitosan oligosaccharide attenuates endoplasmic reticulum stress-associated intestinal apoptosis via the Akt/mTOR pathway. *Food & Function*, 12(18), 8647–8658. <https://doi.org/10.1039/D1FO01234G>
- Finlay, C. A., Hinds, P. W., & Levine, A. J. (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell*, 57(7), 1083–1093. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90045-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90045-7)
- Francia, V., Montizaan, D., & Salvati, A. (2020). Interactions at the cell membrane and pathways of internalization of nano-sized materials for nanomedicine. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 11, 338–353. <https://doi.org/10.3762/bjnano.11.25>
- Fu, T., Ma, X., Du, S. L., Ke, Z. Y., Wang, X. C., Yin, H. H., Wang, W. X., Liu, Y. J., & Liang, A. L. (2023). p21 promotes gemcitabine tolerance in A549 cells by inhibiting DNA damage and altering the cell cycle. *Oncology Letters*, 26(5), 1–8. <https://doi.org/10.3892/ol.2023.14059>
- Gabold, B., Adams, F., Brameyer, S., Jung, K., Ried, C. L., Merdan, T., & Merkel, O. M. (2023). Transferrin-modified chitosan nanoparticles for targeted nose-to-brain delivery of proteins. *Drug Delivery and Translational Research*, 13(3), 822–838. <https://doi.org/10.1007/s13346-022-01245-z>
- Gagliardi, M., Chiarugi, S., De Cesari, C., Di Gregorio, G., Diodati, A., Baroncelli, L., Cecchini, M., & Tonazzini, I. (2023). Crosslinked Chitosan Nanoparticles with Muco-Adhesive Potential for Intranasal Delivery Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7), 6590. <https://doi.org/10.3390/ijms24076590>
- Gao, S., Yang, J., Chen, C., Chen, J., Ye, L., Wang, L., Wu, J., Xing, C., & Yu, K. (2012). Pure curcumin decreases the expression of WT1 by upregulation of miR-15a and miR-16-1 in leukemic cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 31(1), 27. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-31-27>
- Gaohua, L., Miao, X., & Dou, L. (2021). Crosstalk of physiological pH and chemical pKa under the umbrella of physiologically based pharmacokinetic modeling of drug absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 17(9), 1103–1124. <https://doi.org/10.1080/17425255.2021.1951223>
- Garcia-Gil, M., Turri, B., Gabriele, M., Pucci, L., Agnarelli, A., Lai, M., Freer, G., Pistello, M., Vignali, R., Batistoni, R., & Marracci, S. (2021). Protopine/gemcitabine combination induces cytotoxic or cytoprotective effects in cell type-specific and dose-dependent manner on human cancer and normal cells. *Pharmaceuticals*, 14(2), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ph14020090>

- García-Manteiga, J., Molina-Arcas, M., Casado, F. J., Mazo, A., & Pastor-Anglada, M. (2003). Nucleoside transporter profiles in human pancreatic cancer cells: role of hCNT1 in 2',2'-difluorodeoxycytidine- induced cytotoxicity. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 9(13), 5000–5008. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14581375>
- Gelperina, S., Kisich, K., Iseman, M. D., & Heifets, L. (2005). The Potential Advantages of Nanoparticle Drug Delivery Systems in Chemotherapy of Tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 172(12), 1487–1490. <https://doi.org/10.1164/rccm.200504-613PP>
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12827. <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>
- Ghazal, H., Waqar, A., Yaseen, F., Shahid, M., Sultana, M., Tariq, M., Bashir, M. K., Tahseen, H., Raza, T., & Ahmad, F. (2024). Role of nanoparticles in enhancing chemotherapy efficacy for cancer treatment. *Next Materials*, 2(January), 100128. <https://doi.org/10.1016/j.nxmte.2024.100128>
- Gialeli, C., Theocharis, A. D., & Karamanos, N. K. (2011). Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS Journal*, 278(1), 16–27. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07919.x>
- Glassman, P. M., & Muzykantov, V. R. (2019). Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Drug Delivery Systems. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 370(3), 570–580. <https://doi.org/10.1124/jpet.119.257113>
- Gohil, S. V., Padmanabhan, A., Kan, H.-M., Khanal, M., & Nair, L. S. (2021). Degradation-Dependent Protein Release from Enzyme Sensitive Injectable Glycol Chitosan Hydrogel. *Tissue Engineering Part A*, 27(13–14), 867–880. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2020.0124>
- Gomes, T. L. N., Zenha, R. S. S., Antunes, A. H., Faria, F. R., Rezende, K. R., De Souza, E. L., & Mota, J. F. (2021). Evaluation of the Impact of Different Doses of Curcuma longa L. on Antioxidant Capacity: A Randomized, Double-Blind, Crossover Pilot Trial. *BioMed Research International*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/3532864>
- Gomez-Lazaro, M., Fernandez-Gomez, F. J., & Jordán, J. (2004). p53: Twenty five years understanding the mechanism of genome protection. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 60(4), 287–307. <https://doi.org/10.1007/BF03167075>
- Gracetto, A. C., Tessaro, A. L., De Souza, V. R., Caetano, W., Pontes, R. M., Batistela, V. R., De Oliveira, H. P. M., & Hioka, N. (2011). Self-Aggregation processes of 1,6-Diphenyl-1,3,5-Hexatriene in water/ethanol mixtures with high water percentages.

*Applied Spectroscopy*, 65(6), 604–610. <https://doi.org/10.1366/10-06161>

- Grafeneder, J., Derhaschnig, U., Eskandary, F., Buchtele, N., Sus, N., Frank, J., Jilma, B., & Schoergenhofer, C. (2022). Micellar Curcumin: Pharmacokinetics and Effects on Inflammation Markers and PCSK-9 Concentrations in Healthy Subjects in a Double-Blind, Randomized, Active-Controlled, Crossover Trial. *Molecular Nutrition & Food Research*, 66(22). <https://doi.org/10.1002/mnfr.202200139>
- Greenhill, C. (2011). Gemcitabine confirmed as the first-line therapy for pancreatic cancer. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 8(1), 3–3. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.200>
- Guan, K., Liu, K., Jiang, Y., Bian, J., Gao, Y., Dong, E., & Li, Z. (2023). Nanoparticles Internalization through HIP-55-Dependent Clathrin Endocytosis Pathway. *Nano Letters*, 23(24), 11477–11484. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.3c03074>
- Guo, M., Xu, W., Yamamoto, Y., & Suzuki, T. (2021). Curcumin increases heat shock protein 70 expression via different signaling pathways in intestinal epithelial cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 707(April), 108938. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108938>
- Guo, Y., & Shen, L. (2017). Overexpression of NRF2 is correlated with prognoses of patients with malignancies: A meta-analysis. *Thoracic Cancer*, 8(6), 558–564. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.12462>
- Haggag, Y. A., Osman, M. A., El-Gizawy, S. A., Goda, A. E., Shamloula, M. M., Faheem, A. M., & McCarron, P. A. (2018). Polymeric nano-encapsulation of 5-fluorouracil enhances anti-cancer activity and ameliorates side effects in solid Ehrlich Carcinoma-bearing mice. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 105(April), 215–224. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.124>
- Hamed, S. S., Straubinger, R. M., & Jusko, W. J. (2013). Pharmacodynamic modeling of cell cycle and apoptotic effects of gemcitabine on pancreatic adenocarcinoma cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 72(3), 553–563. <https://doi.org/10.1007/s00280-013-2226-6>
- Han, Y., Song, C., Zhang, T., Zhou, Q., Zhang, X., Wang, J., Xu, B., Zhang, X., Liu, X., & Ying, X. (2020). Wilms' tumor 1 (WT1) promotes ovarian cancer progression by regulating E-cadherin and ERK1/2 signaling. *Cell Cycle*, 19(20), 2662–2675. <https://doi.org/10.1080/15384101.2020.1817666>
- Hasan, M., Elkhoury, K., Kahn, C. J. F., Arab-Tehrany, E., & Linder, M. (2019). Preparation, Characterization, and Release Kinetics of Chitosan-Coated Nanoliposomes Encapsulating Curcumin in Simulated Environments. *Molecules*, 24(10), 2023. <https://doi.org/10.3390/molecules24102023>
- Hawk, M. A., McCallister, C., & Schafer, Z. T. (2016). Antioxidant activity during tumor

- progression: A necessity for the survival of cancer cells? *Cancers*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/cancers8100092>
- Hayashi, H., Kurata, T., & Nakagawa, K. (2011). Gemcitabine: Efficacy in the treatment of advanced stage nonsquamous non-small cell lung cancer. *Clinical Medicine Insights: Oncology*, 5, 177–184. <https://doi.org/10.4137/CMO.S6252>
- He, C., Hu, Y., Yin, L., Tang, C., & Yin, C. (2010). Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*, 31(13), 3657–3666. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.065>
- He, Y. C., He, L., Khoshaba, R., Lu, F. G., Cai, C., Zhou, F. L., Liao, D. F., & Cao, D. (2019). Curcumin nicotinate selectively induces cancer cell apoptosis and cycle arrest through a P53-mediated mechanism. *Molecules*, 24(22). <https://doi.org/10.3390/molecules24224179>
- Hoehle, S. I., Pfeiffer, E., Sólyom, A. M., & Metzler, M. (2006). Metabolism of Curcuminoids in Tissue Slices and Subcellular Fractions from Rat Liver. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3), 756–764. <https://doi.org/10.1021/jf058146a>
- Hoogstraten, C. A., Smeitink, J. A. M., Russel, F. G. M., & Schirris, T. J. J. (2022). Dissecting Drug-Induced Cytotoxicity and Metabolic Dysfunction in Conditionally Immortalized Human Proximal Tubule Cells. *Frontiers in Toxicology*, 4. <https://doi.org/10.3389/ftox.2022.842396>
- Hosono, S., Gross, I., English, M. A., Hajra, K. M., Fearon, E. R., & Licht, J. D. (2000). E-cadherin Is a WT1 Target Gene. *Journal of Biological Chemistry*, 275(15), 10943–10953. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.15.10943>
- Hou, Y., Hu, J., Park, H., & Lee, M. (2012). Chitosan-based nanoparticles as a sustained protein release carrier for tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 100A(4), 939–947. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34031>
- Hryciuk, B., Szymanowski, B., Romanowska, A., Salt, E., Wasąg, B., Grala, B., Jassem, J., & Duchnowska, R. (2017). Severe acute toxicity following gemcitabine administration: A report of four cases with cytidine deaminase polymorphisms evaluation. *Oncology Letters*. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7473>
- Hu, C. S., Chiang, C. H., Hong, P. Da, & Yeh, M. K. (2012). Influence of charge on FITC-BSA-loaded chondroitin sulfate-chitosan nanoparticles upon cell uptake in human Caco-2 cell monolayers. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 4861–4872. <https://doi.org/10.2147/IJN.S34770>
- Huang, B., Pi, L., Chen, C., Yuan, F., Zhou, Q., Teng, J., & Jiang, T. (2012). WT1 and Pax2 re-expression is required for epithelial-mesenchymal transition in 5/6

- nephrectomized rats and cultured kidney tubular epithelial cells. *Cells Tissues Organs*, 195(4), 296–312. <https://doi.org/10.1159/000327530>
- Huang, X., Jiao, Y., & Zhou, C. (2021). Impacts of chitosan oligosaccharide (COS) on angiogenic activities. *Microvascular Research*, 134, 104114. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2020.104114>
- Hui, Y. F., & Reitz, J. (1997). Gemcitabine: A cytidine analogue active against solid tumors. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 54(2), 162–170. <https://doi.org/10.1093/ajhp/54.2.162>
- Iengar, P. (2012). An analysis of substitution, deletion and insertion mutations in cancer genes. *Nucleic Acids Research*, 40(14), 6401–6413. <https://doi.org/10.1093/nar/gks290>
- Ilieva, Y., Dimitrova, L., Zaharieva, M. M., Kaleva, M., Alov, P., Tsakovska, I., Pencheva, T., Tibi, I. P. El, Najdenski, H., & Pajeva, I. (2021). Cytotoxicity and microbicidal activity of commonly used organic solvents: A comparative study and application to a standardized extract from vaccinium macrocarpon. *Toxics*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/toxics9050092>
- Inoue, K., Tamaki, H., Ogawa, H., Oka, Y., Soma, T., Tatekawa, T., Oji, Y., Tsuboi, A., Kim, E. H., Kawakami, M., Akiyama, T., Kishimoto, T., & Sugiyama, H. (1998). Wilms' Tumor Gene (WT1) Competes With Differentiation-Inducing Signal in Hematopoietic Progenitor Cells. *Blood*, 91(8), 2969–2976. [https://doi.org/10.1182/blood.V91.8.2969.2969\\_2969\\_2976](https://doi.org/10.1182/blood.V91.8.2969.2969_2969_2976)
- Jesus, S., Marques, A. P., Duarte, A., Soares, E., Costa, J. P., Colaço, M., Schmutz, M., Som, C., Borchard, G., Wick, P., & Borges, O. (2020). Chitosan Nanoparticles: Shedding Light on Immunotoxicity and Hemocompatibility. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(February). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00100>
- Jia, L. (2005). Nanoparticle Formulation Increases Oral Bioavailability of Poorly Soluble Drugs: Approaches, Experimental Evidences and Theory. *Current Nanoscience*, 1(3), 237–243. <https://doi.org/10.2174/157341305774642939>
- Jia, Y., & Xie, J. (2015). Promising molecular mechanisms responsible for gemcitabine resistance in cancer. *Genes & Diseases*, 2(4), 299–306. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2015.07.003>
- Jiang, S., Wang, R., Zhang, X., Wu, F., Li, S., & Yuan, Y. (2020). Combination treatment of gemcitabine and sorafenib exerts a synergistic inhibitory effect on non-small cell lung cancer in vitro and in vivo via the epithelial-to-mesenchymal transition process. *Oncology Letters*, 20(1), 346–356. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11536>
- Jiang, W., Kim, B. Y. S., Rutka, J. T., & Chan, W. C. W. (2008). Nanoparticle-mediated

- cellular response is size-dependent. *Nature Nanotechnology*, 3(3), 145–150. <https://doi.org/10.1038/nnano.2008.30>
- Jin, X., Zhang, S. B., Li, S. M., Liang, K., & Jia, Z. Y. (2016). Influence of chitosan nanoparticles as the absorption enhancers on salvianolic acid B in vitro and in vivo evaluation. *Pharmacognosy Magazine*, 12(45), 57–63. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.176047>
- Jodynys-liebert, J., & Kujawska, M. (2020). Biphasic dose-response induced by phytochemicals: Experimental evidence. *Journal of Clinical Medicine*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/jcm9030718>
- Kadam, P. V., Bhingare, C. L., Nikam, R. Y., & Pawar, S. A. (2013). Development and validation of UV Spectrophotometric method for the estimation of Curcumin in cream formulation. *Pharmaceutical Methods*, 4(2), 43–45. <https://doi.org/10.1016/j.phme.2013.08.002>
- Kakwere, H., Ingham, E. S., Tumbale, S. K., & Ferrara, K. W. (2020). Gemcitabine-retinoid prodrug loaded nanoparticles display in vitro antitumor efficacy towards drug-resilient human PANC-1 pancreatic cancer cells. *Materials Science and Engineering: C*, 117, 111251. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111251>
- Kari, S., Subramanian, K., Altomonte, I. A., Murugesan, A., Yli-Harja, O., & Kandhavelu, M. (2022). Programmed cell death detection methods: a systematic review and a categorical comparison. *Apoptosis*, 27(7–8), 482–508. <https://doi.org/10.1007/s10495-022-01735-y>
- Katuri, V., Gerber, S., Qiu, X., McCarty, G., Goldstein, S. D., Hammers, H., Montgomery, E., Chen, A. R., & Loeb, D. M. (2014). WT1 regulates angiogenesis in Ewing Sarcoma. *Oncotarget*, 5(9), 2436–2449. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1610>
- Kevadiya, B. D., Zhang, L., & Davé, R. N. (2018). Sustained Release of Poorly Water-Soluble Drug from Hydrophilic Polymeric Film Sandwiched Between Hydrophobic Layers. *AAPS PharmSciTech*, 19(6), 2572–2584. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-1089-x>
- Khalef, L., Lydia, R., Filicia, K., & Moussa, B. (2024). Cell viability and cytotoxicity assays: Biochemical elements and cellular compartments. *Cell Biochemistry and Function*, 42(3). <https://doi.org/10.1002/cbf.4007>
- Khalid, Q., Ahmad, M., Minhas, M. U., & Rashid, H. (2018). Development and evaluation of eudragit based microparticles of dexibuprofen for site specific drug release. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 31(4), 1385–1392. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30033424>
- Khan, J., Rudrapal, M., Bhat, E. A., Ali, A., Alaidarous, M., Alshehri, B., Banwas, S., Ismail, R., & Egbuna, C. (2021). Perspective Insights to Bio-Nanomaterials for the

- Treatment of Neurological Disorders. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.724158>
- Khan, M. A., Zafaryab, M., Mehdi, S. H., Ahmad, I., & Rizvi, M. M. A. (2016). Characterization and anti-proliferative activity of curcumin loaded chitosan nanoparticles in cervical cancer. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93(November), 242–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.08.050>
- Khanmohammadi, M., Elmizadeh, H., & Ghasemi, K. (2015). Investigation of size and morphology of chitosan nanoparticles used in drug delivery system employing chemometric technique. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 14(3), 665–675.
- Killian, P. H., Kronski, E., Katharina, M., Barbieri, O., Astigiano, S., Sommerhoff, C. P., Pfeffer, U., Nerlich, G., & Bachmeier, B. E. (2012). *Curcumin inhibits prostate cancer metastasis in vivo by targeting the inflammatory cytokines CXCL1 and -2*. 33(12), 2507–2519. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs312>
- Kim, D. G., Jeong, Y. Il, Choi, C., Roh, S. H., Kang, S. K., Jang, M. K., & Nah, J. W. (2006). Retinol-encapsulated low molecular water-soluble chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 319(1–2), 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.03.040>
- Kitamura, H., & Motohashi, H. (2018). NRF2 addiction in cancer cells. *Cancer Science*, 109(4), 900–911. <https://doi.org/10.1111/cas.13537>
- Kleiman, M., Ryu, K. A., & Esser-Kahn, A. P. (2016). Determination of Factors Influencing the Wet Etching of Polydimethylsiloxane Using Tetra-n-butylammonium Fluoride. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 217(2), 284–291. <https://doi.org/10.1002/macp.201500225>
- Kocyigit, A., & Guler, E. M. (2017). Curcumin induce DNA damage and apoptosis through generation of reactive oxygen species and reducing mitochondrial membrane potential in melanoma cancer cells. *Cellular and Molecular Biology*, 63(11), 97–105. <https://doi.org/10.14715/CMB/2017.63.11.17>
- Kong, C.-S., Kim, J.-A., Ahn, B., Byun, H.-G., & Kim, S.-K. (2010). Carboxymethylations of chitosan and chitin inhibit MMP expression and ROS scavenging in human fibrosarcoma cells. *Process Biochemistry*, 45(2), 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.09.004>
- Kononenko, V., Joukhan, A., Bele, T., Križaj, I., Kralj, S., Turk, T., & Drobne, D. (2024). Gelatin nanoparticles loaded with 3-alkylpyridinium salt APS7, an analog of marine toxin, are a promising support in human lung cancer therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 177, 117007. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.117007>

- Kontomanolis, E. N., Koutras, A., Syllaïos, A., Schizas, D., Mastoraki, A., Garmpis, N., Diakosavvas, M., Angelou, K., Tsarsaris, G., Pagkalos, A., Ntounis, T., & Fasoulakis, Z. (2020). Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. *Anticancer Research*, 40(11), 6009–6015. <https://doi.org/10.21873/anticancer.14622>
- Koselke, E. A., Marini, B. L., Kraft, S. L., Wallker, S. C., Allore, D. D., & Mackler, E. R. (2015). Implementation of and Satisfaction with an Outpatient Oral Anticancer Therapy Program. *J Hematol Oncol Pharm.*, 5(3), 62–68.
- Ku, M. S. (2008). Use of the Biopharmaceutical Classification System in Early Drug Development. *The AAPS Journal*, 10(1), 208–212. <https://doi.org/10.1208/s12248-008-9020-0>
- Kumavat, S. D., Chaudhari, Y., Borole, P., Mishra, P., Shenhgani, K., & Duvvuri, P. (2013). Degradation studies of curcumin. *International Journal of Pharmacy Review & Research*, 3(2), 50–55.
- Kurien, B. T., & Scofield, R. H. (2009). Increasing aqueous solubility of curcumin for improving bioavailability. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(7), 334–335. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.04.005>
- Laaraibi, A., Moughaoui, F., Damiri, F., Ouakit, A., Charhouf, I., Hamdouch, S., Jaafari, A., Abourriche, A., Knouzi, N., Bennamara, A., & Berrada, M. (2018). Chitosan-Clay Based (CS-NaBNT) Biodegradable Nanocomposite Films for Potential Utility in Food and Environment. In *Chitin-Chitosan - Myriad Functionalities in Science and Technology*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76498>
- Laessig, D., Vehling-Kaiser, U., Fasching, P., Melchert, F., Koelbl, H., Stauch, M., Maubach, P., Scharl, A., Stemmler, J., & Heinemann, V. (2006). Gemcitabine plus carboplatin for patients with pretreated, metastatic breast cancer: A phase II trial. *Journal of Clinical Oncology*, 24(18\_suppl), 10635–10635. [https://doi.org/10.1200/jco.2006.24.18\\_suppl.10635](https://doi.org/10.1200/jco.2006.24.18_suppl.10635)
- Le Gal, K., Ibrahim, M. X., Wiel, C., Sayin, V. I., Akula, M. K., Karlsson, C., Dalin, M. G., Akyürek, L. M., Lindahl, P., Nilsson, J., & Bergo, M. O. (2015). Antioxidants can increase melanoma metastasis in mice. *Science Translational Medicine*, 7(308). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad3740>
- Lee, Y.-J., Park, K.-S., & Lee, S.-H. (2021). Curcumin Targets Both Apoptosis and Necroptosis in Acidity-Tolerant Prostate Carcinoma Cells. *BioMed Research International*, 2021, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2021/8859181>
- Li, B. Q., Liang, Z. Y., Seery, S., Liu, Q. F., You, L., Zhang, T. P., Guo, J. C., & Zhao, Y. P. (2019). WT1 associated protein promotes metastasis and chemo-resistance to gemcitabine by stabilizing Fak mRNA in pancreatic cancer. *Cancer Letters*, 451(February), 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.02.043>

- Li, H., Zhang, Z., Gao, C., Wu, S., Duan, Q., Wu, H., & Wang, C. (2019). Combination chemotherapy of valproic acid ( VPA ) and gemcitabine regulates STAT3 / Bmi1 pathway to differentially potentiate the motility of pancreatic cancer cells. *Cell & Bioscience*, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0312-0>
- Li, M., Guo, T., Lin, J., Huang, X., Ke, Q., Wu, Y., Fang, C., & Hu, C. (2023). Corrigendum to “ Curcumin inhibits the invasion and metastasis of triple negative breast cancer via Hedgehog / Gli1 signaling pathway .” *Journal of Ethnopharmacology*, 312(April), 116524. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.116524>
- Li, P., Wang, X., Cai, X., Chen, L., Li, R., & Du, C. (2024). The solvation process and thermodynamic parameters analysis of gemcitabine form a in pure and mixed solvents. *Journal of Molecular Liquids*, 403, 124659. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2024.124659>
- Lin, Q., Zhu, F., Shiye, A., Liu, R., Wang, X., Ye, Z., Ding, Y., Sun, X., & Ma, Y. (2024). Antimicrobial Effects of Thonningianin a (TA)-Loaded Chitosan Nanoparticles Encapsulated by a PF-127 hydrogel in Diabetic Wound Healing. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 19, 12835–12850. <https://doi.org/10.2147/IJN.S488115>
- Liu, F., Gao, S., Yang, Y., Zhao, X., Fan, Y., Ma, W., Yang, D., Yang, A., & Yu, Y. (2017). Curcumin induced autophagy anticancer effects on human lung adenocarcinoma cell line A549. *Oncology Letters*, 14(3), 2775–2782. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6565>
- Liu, P., Ying, Q., Liu, H., Yu, S. Q., Bu, L. P., Shao, L., & Li, X. Y. (2020). Curcumin enhances anti-cancer efficacy of either gemcitabine or docetaxel on pancreatic cancer cells. *Oncology Reports*, 44(4), 1393–1402. <https://doi.org/10.3892/or.2020.7713>
- Liu, Y., Liang, Y., Yuhong, J., Xin, P., Han, J. L., Du, Y., Yu, X., Zhu, R., Zhang, M., Chen, W., & Ma, Y. (2024). Advances in Nanotechnology for Enhancing the Solubility and Bioavailability of Poorly Soluble Drugs. *Drug Design, Development and Therapy*, Volume 18, 1469–1495. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S447496>
- Liu, Y., Zuo, T., Zhu, X., Ahuja, N., & Fu, T. (2017). Differential expression of hENT1 and hENT2 in colon cancer cell lines. *Genetics and Molecular Research*, 16(1). <https://doi.org/10.4238/gmr16019549>
- Mackenzie, G. G., Queisser, N., Wolfson, M. L., Fraga, C. G., Adamo, A. M., & Oteiza, P. I. (2008). Curcumin induces cell-arrest and apoptosis in association with the inhibition of constitutively active NF-κB and STAT3 pathways in Hodgkin's lymphoma cells. *International Journal of Cancer*, 123(1), 56–65. <https://doi.org/10.1002/ijc.23477>
- Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., & Hori, K. (2000). Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal*

- of Controlled Release*, 65(1–2), 271–284. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(99\)00248-5](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(99)00248-5)
- Magalhaes, M. A. O., & Glogauer, M. (2009). Pivotal Advance: Phospholipids determine net membrane surface charge resulting in differential localization of active Rac1 and Rac2. *Journal of Leukocyte Biology*, 87(4), 545–555. <https://doi.org/10.1189/jlb.0609390>
- Mai, Y., Dou, L., Yao, Z., Madla, C. M., Gavins, F. K. H., Taherali, F., Yin, H., Orlu, M., Murdan, S., & Basit, A. W. (2021). Quantification of P-Glycoprotein in the Gastrointestinal Tract of Humans and Rodents: Methodology, Gut Region, Sex, and Species Matter. *Molecular Pharmaceutics*, 18(5), 1895–1904. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00574>
- Makwana, P. K., Jethva, P. N., & Roy, I. (2011). Coumarin 6 and 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) as fluorescent probes to monitor protein aggregation. *Analyst*, 136(10), 2161–2167. <https://doi.org/10.1039/c0an00829j>
- Maleki, R., Khedri, M., Rezvantlab, S., & Beheshtizadeh, N. (2024). Investigation of pH-dependent Paclitaxel delivery mechanism employing Chitosan-Eudragit bioresponsive nanocarriers: a molecular dynamics simulation. *Journal of Biological Engineering*, 18(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s13036-024-00445-0>
- Manson, M. M. (2005). Inhibition of survival signalling by dietary polyphenols and indole-3-carbinol. *European Journal of Cancer*, 41(13), 1842–1853. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.05.008>
- Marcet-Palacios, M., Ulanova, M., Duta, F., Puttagunta, L., Munoz, S., Gibbings, D., Radomski, M., Cameron, L., Mayers, I., & Befus, A. D. (2007). Metalloproteinase-9 through a Nitric Oxide-Mediated Pathway. *The Journal of Immunology*, 21.
- Mattson, M. P. (2008). Hormesis defined. *Ageing Research Reviews*, 7(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2007.08.007>
- McCormick, D. A. (2004). Membrane Potential and Action Potential. In *From Molecules to Networks* (pp. 115–140). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012148660-0/50006-8>
- Mercurio, H. L. G. and A. M. (2013). VEGF targets the tumour cell Hira. *NIH Public Access*, 13(12), 871–882. <https://doi.org/10.1038/nrc3627>. VEGF
- Meza-Junco, J., Montaña-Loza, A., & Aguayo-González, A. (2006). Bases Moleculares Del Cancer. *Rev Invest Clin*, 58(1), 56–70.
- Milobedeska, J., Kostanecki, V., & Lampe, V. (1910). Structure of curcumin. *Chemischen Gessellschaft*, 43, 2163–2170.

- Minaei, A., Sabzichi, M., Ramezani, F., Hamishehkar, H., & Samadi, N. (2016). Co-delivery with nano-quercetin enhances doxorubicin-mediated cytotoxicity against MCF-7 cells. *Molecular Biology Reports*, 43(2), 99–105. <https://doi.org/10.1007/s11033-016-3942-x>
- Mini, E., Nobili, S., Caciagli, B., Landini, I., & Mazzei, T. (2006). Cellular pharmacology of gemcitabine. *Annals of Oncology*, 17(SUPPL. 5), v7–v12. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdj941>
- Mirakabadi, A. Z., Sarzaem, A., Moradhaseli, S., Sayad, A., & Negahdary, M. (2012). Necrotic effect versus apoptotic nature of Camptothecin in human cervical cancer cells. *Iranian Journal of Cancer Prevention*, 5(3), 109–116.
- Moghaddam, A. S., Khonakdar, H. A., Sarikhani, E., Jafari, S. H., Javadi, A., Shamsi, M., Amirkhani, M. A., & Ahadian, S. (2020). Fabrication of Carboxymethyl Chitosan Nanoparticles to Deliver Paclitaxel for Melanoma Treatment. *ChemNanoMat*, 6(9), 1373–1385. <https://doi.org/10.1002/cnma.202000229>
- Moghaddam, N. S. A., Oskouie, M. N., Butler, A. E., Petit, P. X., Barreto, G. E., & Sahebkar, A. (2019). Hormetic effects of curcumin: What is the evidence? *Journal of Cellular Physiology*, 234(7), 10060–10071. <https://doi.org/10.1002/jcp.27880>
- Mondal, S., Ghosh, S., & Moulik, S. P. (2016). Stability of curcumin in different solvent and solution media: UV–visible and steady-state fluorescence spectral study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 158, 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.03.004>
- Moreno, D., de Ilarduya, C. T., Bandrés, E., Buñuales, M., Azcona, M., García-Foncillas, J., & Garrido, M. J. (2008). Characterization of cisplatin cytotoxicity delivered from PLGA-systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68(3), 503–512. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.08.006>
- Moreno, D., Zalba, S., Navarro, I., Tros de Ilarduya, C., & Garrido, M. J. (2010). Pharmacodynamics of cisplatin-loaded PLGA nanoparticles administered to tumor-bearing mice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 74(2), 265–274. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2009.10.005>
- Moustapha, A., Pérétout, P., Rainey, N., Sureau, F., Geze, M., Petit, J.-M., Dewailly, E., Slomianny, C., & Petit, P. (2015). Curcumin induces crosstalk between autophagy and apoptosis mediated by calcium release from the endoplasmic reticulum, lysosomal destabilization and mitochondrial events. *Cell Death Discovery*, 1(1), 15017. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2015.17>
- Mukherjee, S., Mazumdar, M., Chakraborty, S., Manna, A., Saha, S., Khan, P., Bhattacharjee, P., Guha, D., Adhikary, A., Mukherjee, S., & Das, T. (2014). Curcumin inhibits breast cancer stem cell migration by amplifying the E-cadherin/ $\beta$ -catenin negative feedback loop. *Stem Cell Research & Therapy*, 5(5), 116.

<https://doi.org/10.1186/scrt506>

- Myat, Y. Y., Sahatsapan, N., Rojanarata, T., Ngawhirunpat, T., Opanasopit, P., Pornpitchanarong, C., & Patrojanasophon, P. (2024). Antibody-decorated chitosan-iodoacetamide-coated nanocarriers for the potential delivery of doxorubicin to breast cancer cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 258, 128797. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128797>
- Nair, R. S., Morris, A., Billa, N., & Leong, C.-O. (2019). An Evaluation of Curcumin-Encapsulated Chitosan Nanoparticles for Transdermal Delivery. *AAPS PharmSciTech*, 20(2), 69. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-1279-6>
- Namima, D., Fujihara, S., Iwama, H., Fujita, K., Matsui, T., Nakahara, M., Okamura, M., Hirata, M., Kono, T., Fujita, N., Yamana, H., Kato, K., Kamada, H., Morishita, A., Kobara, H., Tsutsui, K., & Masaki, T. (2020). The Effect of Gemcitabine on Cell Cycle Arrest and microRNA Signatures in Pancreatic Cancer Cells. *In Vivo*, 34(6), 3195–3203. <https://doi.org/10.21873/invivo.12155>
- Nogueira, D. R., Tavano, L., Mitjans, M., Pérez, L., Infante, M. R., & Vinardell, M. P. (2013). In vitro antitumor activity of methotrexate via pH-sensitive chitosan nanoparticles. *Biomaterials*, 34(11), 2758–2772. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.01.005>
- Oguri, T., Achiwa, H., Ozasa, H., Nakao, M., Uemura, T., Ohta, C., Takakuwa, O., Miyazaki, M., Maeno, K., Sato, S., & Ueda, R. (2009). Correlation of hENT1 expression with response and survival in non-small cell lung cancer patients treated with gemcitabine-containing chemotherapy. *J. Clin. Oncol*, 27, 8482–8490. [https://doi.org/https://doi.org/10.1200/jco.2009.27.15\\_suppl.e2203](https://doi.org/https://doi.org/10.1200/jco.2009.27.15_suppl.e2203)
- Ojeda-Hernández, D. D., Canales-Aguirre, A. A., Matias-Guiu, J., Gomez-Pinedo, U., & Mateos-Díaz, J. C. (2020). Potential of Chitosan and Its Derivatives for Biomedical Applications in the Central Nervous System. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00389>
- Ozakar, E., Cetin, M., Ates, O., & Hacimuftuoglu, A. (2019). Nifedipine-loaded polymeric nanoparticles: Preparation and in vitro characterization. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32(2), 547–554. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31081765>
- Pandya, A. D., Øverbye, A., Sahariah, P., Gaware, V. S., Høgset, H., Masson, M., Høgset, A., Mælandsmo, G. M., Skotland, T., Sandvig, K., & Iversen, T. G. (2020). Drug-Loaded Photosensitizer-Chitosan Nanoparticles for Combinatorial Chemo- And Photodynamic-Therapy of Cancer. *Biomacromolecules*, 21(4), 1489–1498. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00061>
- Papachristos, A., Patel, J., Vasileiou, M., & Patrinos, G. P. (2023). Dose Optimization in Oncology Drug Development: The Emerging Role of Pharmacogenomics,

- Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics. *Cancers*, 15(12), 3233. <https://doi.org/10.3390/cancers15123233>
- Parenti, R., Cardile, V., Graziano, A. C. E., Parenti, C., Venuti, A., Bertuccio, M. P., Furno, D. Lo, & Magro, G. (2014). Wilms' Tumor Gene 1 (WT1) Silencing Inhibits Proliferation of Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor sNF96.2 Cell Line. *PLoS ONE*, 9(12), e114333. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114333>
- Patra, D., & Barakat, C. (2011). Synchronous fluorescence spectroscopic study of solvatochromic curcumin dye. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 79(5), 1034–1041. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.04.016>
- Paul, A. (2019). Drug Absorption and Bioavailability. In *Introduction to Basics of Pharmacology and Toxicology* (pp. 81–88). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-32-9779-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-981-32-9779-1_5)
- Pilipenko, I., Korzhikov-Vlakh, V., Sharoyko, V., Zhang, N., Schäfer-Korting, M., Rühl, E., Zoschke, C., & Tennikova, T. (2019). pH-Sensitive Chitosan–Heparin Nanoparticles for Effective Delivery of Genetic Drugs into Epithelial Cells. *Pharmaceutics*, 11(7), 317. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11070317>
- Pillai, G. R., Srivastava, A. S., Hassanein, T. I., Chauhan, D. P., & Carrier, E. (2004). Induction of apoptosis in human lung cancer cells by curcumin. *Cancer Letters*, 208(2), 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.01.008>
- Piskounova, E., Agathocleous, M., Murphy, M. M., Hu, Z., Huddlestun, S. E., Zhao, Z., Leitch, A. M., Johnson, T. M., DeBerardinis, R. J., & Morrison, S. J. (2015). Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells. *Nature*, 527(7577), 186–191. <https://doi.org/10.1038/nature15726>
- Plemel, J. R., Caprariello, A. V., Keough, M. B., Henry, T. J., Tsutsui, S., Chu, T. H., Schenk, G. J., Klaver, R., Yong, V. W., & Stys, P. K. (2017). Unique spectral signatures of the nucleic acid dye acridine orange can distinguish cell death by apoptosis and necroptosis. *Journal of Cell Biology*, 216(4), 1163–1181. <https://doi.org/10.1083/jcb.201602028>
- Potdar, P. D., & Shetti, A. U. (2016). Evaluation of anti-metastatic effect of chitosan nanoparticles on esophageal cancer-associated fibroblasts. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*, 2(7), 259. <https://doi.org/10.20517/2394-4722.2016.25>
- Principe, D. R., Narbutis, M., Kumar, S., Park, A., Viswakarma, N., Dorman, M. J., Kamath, S. D., Grippo, P. J., Fishel, M. L., Hwang, R. F., Thummuri, D., Underwood, P. W., Munshi, H. G., Trevino, J. G., & Rana, A. (2020). Long-Term Gemcitabine Treatment Reshapes the Pancreatic Tumor Microenvironment and Sensitizes Murine Carcinoma to Combination Immunotherapy. *Cancer Research*, 80(15), 3101–3115. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-2959>

- Priyadarsini, K. I. (2014). The chemistry of curcumin: From extraction to therapeutic agent. *Molecules*, 19(12), 20091–20112. <https://doi.org/10.3390/molecules191220091>
- Qi, L.-F., Xu, Z.-R., Li, Y., Jiang, X., & Han, X.-Y. (2005). In vitro effects of chitosan nanoparticles on proliferation of human gastric carcinoma cell line MGC803 cells. *World Journal of Gastroenterology*, 11(33), 5136–5141. <https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i33.5136>
- Qin, S., Su, Q., Li, X., Shao, M., Zhang, Y., Yu, F., Ni, Y., & Zhong, J. (2023). Curcumin suppresses cell proliferation and reduces cholesterol absorption in Caco-2 cells by activating the TRPA1 channel. *Lipids in Health and Disease*, 22(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12944-022-01750-7>
- Quinlan, E. (2024). Journal of Biochemistry and Pharmacology Factors Influencing Drug Effectiveness: A Comprehensive Analysis of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Biochem Pharmacol*, 13, 374. <https://doi.org/10.35248/2167-0501.24.13.374>
- Rainey, N., Motte, L., Aggarwal, B. B., & Petit, P. X. (2015). *Curcumin hormesis mediates a cross-talk between autophagy and cell death*. 6(12), e2003-3. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.343>
- Ramalho, M. J., Serra, É., Lima, J., Loureiro, J. A., & Pereira, M. C. (2024). Chitosan-PLGA mucoadhesive nanoparticles for gemcitabine repurposing for glioblastoma therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 200, 114326. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2024.114326>
- Ravindranath, V., & Chandrasekhara, N. (1980). Absorption and tissue distribution of curcumin in rats. *Toxicology*, 16(3), 259–265. [https://doi.org/10.1016/0300-483X\(80\)90122-5](https://doi.org/10.1016/0300-483X(80)90122-5)
- Ravindranath, V., & Chandrasekhara, N. (1981). In vitro studies on the intestinal absorption of curcumin in rats. *Toxicology*, 20(2–3), 251–257. [https://doi.org/10.1016/0300-483X\(81\)90056-1](https://doi.org/10.1016/0300-483X(81)90056-1)
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603–632. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
- Ríos-Hernández, M. A., & Hernández-Menéndez, M. (2001). Los genes supresores de tumores y el cáncer. *Rev. Cuba. Oncol.*, 17(1), 65–71.
- Rosière, R., Van Woensel, M., Gelbcke, M., Mathieu, V., Hecq, J., Mathivet, T., Vermeersch, M., Van Antwerpen, P., Amighi, K., & Wauthoz, N. (2018). New Folate-Grafted Chitosan Derivative to Improve Delivery of Paclitaxel-Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Lung Tumor Therapy by Inhalation. *Molecular*

- Sakhi, M., Khan, A., Iqbal, Z., Khan, I., Raza, A., Ullah, A., Nasir, F., & Khan, S. A. (2022). Design and Characterization of Paclitaxel-Loaded Polymeric Nanoparticles Decorated With Trastuzumab for the Effective Treatment of Breast Cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 13(March), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.855294>
- Salinas-Jazmín, N., Medina-Mondragon, M. A., Jiménez-López, J., Guerrero-Rodríguez, S. L., Cuautle-Rodríguez, P., & Velasco-Velázquez, M. A. (2024). Continuous exposure to doxorubicin induces stem cell - like characteristics and plasticity in MDA - MB - 231 breast cancer cells identified with the SORE6 reporter. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 94(4), 571–583. <https://doi.org/10.1007/s00280-024-04701-4>
- Sandhya, Kumar, S., Kumar, D., & Dilbaghi, N. (2017). Preparation, characterization, and bio-efficacy evaluation of controlled release carbendazim-loaded polymeric nanoparticles. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(1), 926–937. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7774-y>
- Santini, D., Vincenzi, B., Fratto, M. E., Perrone, G., Lai, R., Catalano, V., Cass, C., Ruffini, P. A., Spoto, C., Mureto, P., Rizzo, S., Muda, A. O., Mackey, J. R., Russo, A., Tonini, G., & Graziano, F. (2010). Prognostic role of human equilibrative transporter 1 (hENT1) in patients with resected gastric cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 223(2), 384–388. <https://doi.org/10.1002/jcp.22045>
- Santucci, K. L., Snyder, K. K., Van Buskirk, R. G., Baust, J. G., & Baust, J. M. (2024). Investigation of Lung Cancer Cell Response to Cryoablation and Adjunctive Gemcitabine-Based Cryo-Chemotherapy Using the A549 Cell Line. *Biomedicines*, 12(6), 1239. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12061239>
- Sari, D. P., Utami, T. S., Arbianti, R., & Hermansyah, H. (2018). The effect of centrifugation speed and Chitosan-Sodium Tripolyphosphate ratio toward the nanoencapsulation of Sambiloto (*Andrographis paniculata*) for the formulation of Hepatitis B drug. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 105, 012112. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/105/1/012112>
- Sarma, S. K., Dutta, U., Das, B. K., Bharali, A., Laloo, D., Kalita, J. M., & Sahu, B. P. (2024). Evaluation of Lakadong turmeric derived curcumin nanogel against resistant biofilms: In-silico, antibacterial and antibiofilm analysis. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2024.170144>
- Sashiwa, H., Shigemasa, Y., & Roy, R. (2000). Disolution of Chitosan in Dimethyl Sulfoxide by Salt Formation. *Chemistry Letters*, 596–597.
- Sathiyaseelan, A., Saravanakumar, K., Manivasagan, P., Jeong, M. S., Jang, E.-S., & Wang, M.-H. (2022). Folic acid conjugated chitosan encapsulated palladium

- nanoclusters for NIR triggered photothermal breast cancer treatment. *Carbohydrate Polymers*, 280, 119021. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.119021>
- Schoppmeyer, K., Kronberg, J., Tannapfel, A., Mössner, J., Wittekind, C., & Caca, K. (2005). Predictive value of heparanase expression in the palliative therapy of pancreatic cancer. *Pancreatology*, 5(6), 570–575. <https://doi.org/10.1159/000087499>
- Selgas, R., del Peso, G., Bajo, M. A., Cirugeda, A., Sánchez-Tomero, J. A., & Alvarez, V. (2001). [Vascular endothelial growth factor. Its role in peritoneal physiopathology]. *Nefrologia: Publicacion Oficial de La Sociedad Espanola Nefrologia*, 21(5), 423–425. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11795005>
- Sever, R., & Brugge, J. S. (2015). Signal Transduction in Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(4), a006098–a006098. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006098>
- Shakibaei, M., John, T., Schulze-Tanzil, G., Lehmann, I., & Mobasheri, A. (2007). Suppression of NF- $\kappa$ B activation by curcumin leads to inhibition of expression of cyclo-oxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human articular chondrocytes: Implications for the treatment of osteoarthritis. *Biochemical Pharmacology*, 73(9), 1434–1445. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.01.005>
- Shao, X., Wei, X., Song, X., Hao, L., Cai, X., Zhang, Z., Peng, Q., & Lin, Y. (2015). Independent effect of polymeric nanoparticle zeta potential/surface charge, on their cytotoxicity and affinity to cells. *Cell Proliferation*, 48(4), 465–474. <https://doi.org/10.1111/cpr.12192>
- Sharifian Gh., M. (2021). Recent Experimental Developments in Studying Passive Membrane Transport of Drug Molecules. *Molecular Pharmaceutics*, 18(6), 2122–2141. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00009>
- Shen, W., Yan, M., Wu, S., Ge, X., Liu, X., Du, Y., Zheng, Y., Wu, L., Zhang, Y., & Yueyang, M. (2022). Chitosan nanoparticles embedded with curcumin and its application in pork antioxidant edible coating. *Int. J. Biol. Macromol*, 204, 410–418.
- Shimada, K., Ushijima, K., Suzuki, C., Horiguchi, M., Ando, H., Akita, T., Shimamura, M., Fujii, J., Yamashita, C., & Fujimura, A. (2018). Pulmonary administration of curcumin inhibits B16F10 melanoma lung metastasis and invasion in mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 82(2), 265–273. <https://doi.org/10.1007/s00280-018-3616-6>
- Siegel, R. L., Giaquinto, A. N., & Jemal, A. (2024). Cancer statistics, 2024. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(1), 12–49. <https://doi.org/10.3322/caac.21820>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2022). Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 72(1), 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21708>

- Sindhoor, S. M., Naveen, N. R., Rao, G., Gopan, G., Chopra, H., Park, M. N., Alshahrani, M. M., Jose, J., Emran, T. B., & Kim, B. (2022). A spotlight on alkaloid nanoformulations for the treatment of lung cancer. *Frontiers in Oncology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.994155>
- Singh, R., Shakya, A. K., Naik, R., & Shalan, N. (2015). Stability-indicating HPLC determination of gemcitabine in pharmaceutical formulations. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/862592>
- Singh, S., Srivastava, S. K., Bhardwaj, A., Owen, L. B., & Singh, A. P. (2010). CXCL12 – CXCR4 signalling axis confers gemcitabine resistance to pancreatic cancer cells : a novel target for therapy. *British Journal of Cancer*, 103(11), 1671–1679. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605968>
- Snehalatha, M., Venugopal, K., & Saha, R. N. (2008). Etoposide-Loaded PLGA and PCL Nanoparticles I: Preparation and Effect of Formulation Variables. *Drug Delivery*, 15(5), 267–275. <https://doi.org/10.1080/10717540802174662>
- Stoll, R., Lee, B. M., Debler, E. W., Laity, J. H., Wilson, I. A., Dyson, H. J., & Wright, P. E. (2007). Structure of the Wilms Tumor Suppressor Protein Zinc Finger Domain Bound to DNA. *Journal of Molecular Biology*, 372(5), 1227–1245. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.07.017>
- Suarez-Arnedo, A., Torres Figueroa, F., Clavijo, C., Arbeláez, P., Cruz, J. C., & Muñoz-Camargo, C. (2020). An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. *PLOS ONE*, 15(7), e0232565. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232565>
- Subedi, G., Shrestha, A. K., & Shakya, S. (2016). Study of Effect of Different Factors in Formulation of Micro and Nanospheres with Solvent Evaporation Technique. *Open Pharmaceutical Sciences Journal*, 3(1), 182–195. <https://doi.org/10.2174/1874844901603010182>
- Subramanian, B., Agarwal, T., Ghorai, S. K., Mandal, P., Chattopadhyay, S., Basak, P., Maiti, T. K., & Guha, S. K. (2019). Biocompatible polyvinyl alcohol and RISUG ® blend polymeric films with spermicidal potential. *Biomedical Materials*, 14(3), 035017. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/ab04e1>
- Sudhakar, S., Chandran, S. V., Selvamurugan, N., & Nazeer, R. A. (2020). Biodistribution and pharmacokinetics of thiolated chitosan nanoparticles for oral delivery of insulin in vivo. *International Journal of Biological Macromolecules*, 150, 281–288. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.079>
- Sugisawa, N., Miyake, K., Higuchi, T., Oshiro, H., Zhang, Z., Park, J. H., Kawaguchi, K., Chawla, S. P., Bouvet, M., Singh, S. R., Unno, M., & Hoffman, R. M. (2019). Induction of Metastasis by Low-dose Gemcitabine in a Pancreatic Cancer Orthotopic Mouse Model: An Opposite Effect of Chemotherapy. *Anticancer Research*, 39(10),

5339–5344. <https://doi.org/10.21873/anticancerres.13726>

- Sultan, M. H., Moni, S. S., Madkhali, O. A., Bakkari, M. A., Alshahrani, S., Alqahtani, S. S., Alhakamy, N. A., Mohan, S., Ghazwani, M., Bukhary, H. A., Almoshari, Y., Salawi, A., & Alshamrani, M. (2022). Characterization of cisplatin-loaded chitosan nanoparticles and rituximab-linked surfaces as target-specific injectable nano-formulations for combating cancer. *Scientific Reports*, 12(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04427-w>
- Swarnakar, S., Ganguly, K., Kundu, P., Banerjee, A., Maity, P., & Sharma, A. V. (2005). Curcumin Regulates Expression and Activity of Matrix Metalloproteinases 9 and 2 during Prevention and Healing of Indomethacin-induced Gastric Ulcer. *Journal of Biological Chemistry*, 280(10), 9409–9415. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413398200>
- Tahara, K., Sakai, T., Yamamoto, H., Takeuchi, H., Hirashima, N., & Kawashima, Y. (2009). Improved cellular uptake of chitosan-modified PLGA nanospheres by A549 cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 382(1–2), 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.07.023>
- Takahara, A., Koido, S., Ito, M., Nagasaki, E., Sagawa, Y., Iwamoto, T., Komita, H., Ochi, T., Fujiwara, H., Yasukawa, M., Mineno, J., Shiku, H., Nishida, S., Sugiyama, H., Tajiri, H., & Homma, S. (2011). Gemcitabine enhances Wilms' tumor gene WT1 expression and sensitizes human pancreatic cancer cells with WT1-specific T-cell-mediated antitumor immune response. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 60(9), 1289–1297. <https://doi.org/10.1007/s00262-011-1033-3>
- Tammam, S. N., Azzazy, H. M. E., Breiting, H. G., & Lamprecht, A. (2015). Chitosan Nanoparticles for Nuclear Targeting: The Effect of Nanoparticle Size and Nuclear Localization Sequence Density. *Molecular Pharmaceutics*, 12(12), 4277–4289. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00478>
- Tang, Y., & Cao, Y. (2022). Curcumin Inhibits the Growth and Metastasis of Melanoma via miR-222-3p / SOX10 / Notch Axis. 2022, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2022/3129781>
- Tangthong, T., Piroonpan, T., Thipe, V. C., Khoobchandani, M., Katti, K., Katti, K. V., & Pasanphan, W. (2021). Bombesin Peptide Conjugated Water-Soluble Chitosan Gallate—A New Nanopharmaceutical Architecture for the Rapid One-Pot Synthesis of Prostate Tumor Targeted Gold Nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine, Volume 16*, 6957–6981. <https://doi.org/10.2147/IJN.S327045>
- Thompson, B. R., Shi, J., Zhu, H.-J., & Smith, D. E. (2020). Pharmacokinetics of gemcitabine and its amino acid ester prodrug following intravenous and oral administrations in mice. *Biochemical Pharmacology*, 180, 114127. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114127>

- Thongpon, P., Intuyod, K., Chomwong, S., Pongking, T., Klungsaeng, S., Muisuk, K., Charoenram, N., Sitthirach, C., Thanan, R., Pinlaor, P., & Pinlaor, S. (2024). Curcumin synergistically enhances the efficacy of gemcitabine against gemcitabine-resistant cholangiocarcinoma via the targeting LAT2/glutamine pathway. *Scientific Reports*, 14(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-66945-7>
- Tonato, M., Mosconi, A. M., & Martin, C. (1995). Safety profile of gemcitabine. *Anti-Cancer Drugs*, 6(Supplement 6), 27–32. <https://doi.org/10.1097/00001813-199512006-00005>
- Tønnesen, H. H., & Karlsen, J. (1985). Studies on curcumin and curcuminoids. *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung*, 180(5), 402–404. <https://doi.org/10.1007/BF01027775>
- Topete, A., Tang, J., Ding, X., Filipe, H. P., Saraiva, J. A., Serro, A. P., Lin, Q., & Saramago, B. (2020). Dual drug delivery from hydrophobic and hydrophilic intraocular lenses: in-vitro and in-vivo studies. *Journal of Controlled Release*, 326, 245–255. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.07.020>
- Toschi, L., & Cappuzzo, F. (2009). Gemcitabine for the treatment of advanced nonsmall cell lung cancer. *OncoTargets and Therapy*, 2, 209–217. <https://doi.org/10.2147/ott.s4645>
- Toschi, L., Finocchiaro, G., Bartolini, S., Gioia, V., & Cappuzzo, F. (2005). Role of gemcitabine in cancer therapy. *Future Oncology*, 1(1), 7–17. <https://doi.org/10.1517/14796694.1.1.7>
- Tscheka, C., Hittinger, M., Lehr, C.-M., Schneider-Daum, N., & Schneider, M. (2015). Macrophage uptake of cylindrical microparticles investigated with correlative microscopy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 95, 151–155. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.03.010>
- Tsigos, I., Martinou, A., Kafetzopoulos, D., & Bouriotis, V. (2000). Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 18(7), 305–312. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)01462-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)01462-1)
- Tsuda, Y., Tsoi, K., Parry, M. C., Stevenson, J. D., Fujiwara, T., Sumathi, V., & Jeys, L. M. (2020). Impact of chemotherapy-induced necrosis on event-free and overall survival after preoperative MAP chemotherapy in patients with primary high-grade localized osteosarcoma. *Bone and Joint Journal*, 102(6), 795–803. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.102B6.BJJ-2019-1307.R1>
- Tunçer, S., Gurbanov, R., Sheraj, I., Solel, E., Esenturk, O., & Banerjee, S. (2018). Low dose dimethyl sulfoxide driven gross molecular changes have the potential to interfere with various cellular processes. *Scientific Reports*, 8(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33234-z>

- Vaezifar, S., Razavi, S., Golozar, M. A., Karbasi, S., Morshed, M., & Kamali, M. (2013). Effects of Some Parameters on Particle Size Distribution of Chitosan Nanoparticles Prepared by Ionic Gelation Method. *Journal of Cluster Science*, 24(3), 891–903. <https://doi.org/10.1007/s10876-013-0583-2>
- Valencia, M. S., Silva Júnior, M. F. da, Xavier-Júnior, F. H., Veras, B. de O., Albuquerque, P. B. S. de, Borba, E. F. de O., Silva, T. G. da, Xavier, V. L., Souza, M. P. de, & Carneiro-da-Cunha, M. das G. (2021). Characterization of curcumin-loaded lecithin-chitosan bioactive nanoparticles. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2, 100119. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100119>
- Vaughan, H. J., Zamboni, C. G., Radant, N. P., Bhardwaj, P., Revai Lechtich, E., Hassan, L. F., Shah, K., & Green, J. J. (2021). Poly(beta-amino ester) nanoparticles enable tumor-specific TRAIL secretion and a bystander effect to treat liver cancer. *Molecular Therapy Oncolytics*, 21(June), 377–388. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2021.04.004>
- Veltkamp, S. A., Jansen, R. S., Callies, S., Pluim, D., Visseren-Grul, C. M., Rosing, H., Kloeker-Rhoades, S., Andre, V. A. M., Beijnen, J. H., Slapak, C. A., & Schellens, J. H. M. (2008). Oral Administration of Gemcitabine in Patients with Refractory Tumors: A Clinical and Pharmacologic Study. *Clinical Cancer Research*, 14(11), 3477–3486. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4521>
- Verheijen, M., Lienhard, M., Schrooders, Y., Clayton, O., Nudischer, R., Boerno, S., Timmermann, B., Selevsek, N., Schlapbach, R., Gmuender, H., Gotta, S., Geraedts, J., Herwig, R., Kleinjans, J., & Caiment, F. (2019). DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40660-0>
- Verma, P., Thakur, A. S., Deshmukh, K., Jha, A. K., & Verma, S. (2010). Routes of Drug Administration. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*, 1(1), 54–59. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99796-6.00006-0>
- Vicente-Dueñas, C., Romero-Camarero, I., Cobaleda, C., & Sánchez-García, I. (2013). Function of oncogenes in cancer development: A changing paradigm. *EMBO Journal*, 32(11), 1502–1513. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.97>
- Vieira-de-Melo, I. S., Feintosa-dos-Santos, A., & Bezerra-Bueno, N. (2018). Curcumin or combined curcuminoids are effective in lowering the fasting blood glucose concentrations of individuals with dysglycemia: Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Pharmacological Research*, 128, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.09.010>
- Vinarov, Z., Abdallah, M., Agundez, J. A. G., Allegaert, K., Basit, A. W., Braeckmans, M., Ceulemans, J., Corsetti, M., Griffin, B. T., Grimm, M., Keszthelyi, D., Koziolok,

- M., Madla, C. M., Matthys, C., McCoubrey, L. E., Mitra, A., Reppas, C., Stappaerts, J., Steenackers, N., ... Augustijns, P. (2021). Impact of gastrointestinal tract variability on oral drug absorption and pharmacokinetics: An UNGAP review. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 162, 105812. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.105812>
- Vincenzi, B., Stacchiotti, S., Collini, P., Pantano, F., Rabitti, C., Perrone, G., Iuliani, M., Baldi, A., Badalamenti, G., Sanfilippo, R., Santini, D., Muda, A. O., Gronchi, A., Casali, P., Dei Tos, A. P., & Tonini, G. (2017). Human equilibrative nucleoside transporter 1 gene expression is associated with gemcitabine efficacy in advanced leiomyosarcoma and angiosarcoma. *British Journal of Cancer*, 117(3), 340–346. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.187>
- Vishnoi, K., Viswakarma, N., Rana, A., & Rana, B. (2020). Transcription Factors in Cancer Development and Therapy. *Cancers*, 12(8), 2296. <https://doi.org/10.3390/cancers12082296>
- Vllasaliu, D. (2025). Grand challenges in oral drug delivery. *Frontiers in Drug Delivery*, 5. <https://doi.org/10.3389/fddev.2025.1571982>
- Von Hoff, D. D., Ervin, T., Arena, F. P., Chiorean, E. G., Infante, J., Moore, M., Seay, T., Tjulandin, S. A., Ma, W. W., Saleh, M. N., Harris, M., Reni, M., Dowden, S., Laheru, D., Bahary, N., Ramanathan, R. K., Tabernero, J., Hidalgo, M., Goldstein, D., ... Renschler, M. F. (2013). Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine. *New England Journal of Medicine*, 369(18), 1691–1703. <https://doi.org/10.1056/nejmoal1304369>
- Waarts, M. R., Stonestrom, A. J., Park, Y. C., & Levine, R. L. (2022). Targeting mutations in cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 132(8), 1–11. <https://doi.org/10.1172/JCI154943>
- Wagner, K. J., Patek, C. E., Miles, C., Christie, S., Brookes, A. J., & Hooper, M. L. (2001). Truncation of WT1 Results in Downregulation of Cyclin G1 and IGFBP-4 Expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 287(4), 977–982. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5693>
- Wagner, K., Wagner, N., Bondke, A., Nafz, B., Flemming, B., Theres, H., & Scholz, H. (2002). The Wilms' tumor suppressor Wt1 is expressed in the coronary vasculature after myocardial infarction. *The FASEB Journal*, 16(9), 1117–1119. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0986fje>
- Wahlström, B., & Blennow, G. (1978). A Study on the Fate of Curcumin in the Rat. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 43(2), 86–92. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1978.tb02240.x>
- Walser, T., Cui, X., Yanagawa, J., Lee, J. M., Heinrich, E., Lee, G., Sharma, S., & Dubinett, S. M. (2008). Smoking and lung cancer: The role of inflammation.

- Proceedings of the American Thoracic Society*, 5(8), 811–815. <https://doi.org/10.1513/pats.200809-100TH>
- Wang, H., Liu, X., Long, M., Huang, Y., Zhang, L., Zhang, R., Zheng, Y., Liao, X., Wang, Y., Liao, Q., Li, W., Tang, Z., Tong, Q., Wang, X., Fang, F., de la Vega, M. R., Ouyang, Q., Zhang, D. D., Yu, S., & Zheng, H. (2016). NRF2 activation by antioxidant antidiabetic agents accelerates tumor metastasis. *Science Translational Medicine*, 8(334). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad6095>
- Wang, J. B., Qi, L. L., Zheng, S. Di, & Wu, T. X. (2009). Curcumin induces apoptosis through the mitochondria-mediated apoptotic pathway in HT-29 cells. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 10(2), 93–102. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0820238>
- Ways, T. M. M., Filippov, S. K., Maji, S., Glassner, M., Cegłowski, M., Hoogenboom, R., King, S., Lau, W. M., & Khutoryanskiy, V. V. (2022). Mucus-penetrating nanoparticles based on chitosan grafted with various non-ionic polymers: Synthesis, structural characterisation and diffusion studies. *Journal of Colloid and Interface Science*, 626, 251–264. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2022.06.126>
- Wei, X., Shao, B., He, Z., Ye, T., Luo, M., Sang, Y., Liang, X., Wang, W., Luo, S., Yang, S., Zhang, S., Gong, C., Gou, M., Deng, H., Zhao, Y., Yang, H., Deng, S., Zhao, C., Yang, L., ... Zhang, Z. (2015). Cationic nanocarriers induce cell necrosis through impairment of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and cause subsequent inflammatory response. *Cell Research*, 25(2), 237–253. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.9>
- Wilson, N. R., Wiele, A. J., Surasi, D. S., Rao, P., Sircar, K., Tamboli, P., Shah, A. Y., Genovese, G., Karam, J. A., Wood, C. G., Tannir, N. M., & Msaouel, P. (2021). Efficacy and safety of gemcitabine plus doxorubicin in patients with renal medullary carcinoma. *Clinical Genitourinary Cancer*, 19(6), e401–e408. <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2021.08.007>
- Wimardhani, Y. S., Suniarti, D. F., Freisleben, H. J., Wanandi, S. I., Siregar, N. C., & Ikeda, M. A. (2014). Chitosan exerts anticancer activity through induction of apoptosis and cell cycle arrest in oral cancer cells. *Journal of Oral Science*, 56(2), 119–126. <https://doi.org/10.2334/josnusd.56.119>
- Witkin, S. S., Kanninen, T. T., & Sisti, G. (2017). The Role of Hsp70 in the Regulation of Autophagy in Gametogenesis, Pregnancy, and Parturition. *Adv Anat Embryol Cell Biol*., 222, 117–127. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-51409-3\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-51409-3_6)
- Witsch, E., Sela, M., & Yarden, Y. (2010). Roles for Growth Factors in Cancer Progression. *Physiology*, 25(2), 85–101. <https://doi.org/10.1152/physiol.00045.2009>
- Wong, T.-S., Chan, W.-S., Li, C.-H., Liu, R. W.-M., Tang, W. W.-Y., Tsao, S.-W., Tsang, R. K.-Y., Ho, W.-K., Wei, W. I., & Chan, J. Y.-W. (2010). Curcumin alters the migratory phenotype of nasopharyngeal carcinoma cells through up-regulation of E-

- cadherin. *Anticancer Research*, 30(7), 2851–2856.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20683022>
- Wu, H. M., Shao, L. J., Jiang, Z. F., & Liu, R. Y. (2016). Gemcitabine-Induced Autophagy Protects Human Lung Cancer Cells from Apoptotic Death. *Lung*, 194(6), 959–966.  
<https://doi.org/10.1007/s00408-016-9936-6>
- Xie, Z., Zhang, Y., Jin, C., & Fu, D. (2018). Gemcitabine-based chemotherapy as a viable option for treatment of advanced breast cancer patients: a meta-analysis and literature review. *Oncotarget*, 9(6), 7148–7161. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23426>
- Yallapu, M. M., Jaggi, M., & Chauhan, S. C. (2012). Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer. *Drug Discovery Today*, 17(1–2), 71–80.  
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.09.009>
- Yallapu, M. M., Maher, D. M., Sundram, V., Bell, M. C., Jaggi, M., & Chauhan, S. C. (2010). Curcumin induces chemo/radio-sensitization in ovarian cancer cells and curcumin nanoparticles inhibit ovarian cancer cell growth. *Journal of Ovarian Research*, 3(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1757-2215-3-11>
- Yallapu, M. M., Nagesh, P. K. B., Jaggi, M., & Chauhan, S. C. (2015). Therapeutic Applications of Curcumin Nanoformulations. *The AAPS Journal*, 17(6), 1341–1356.  
<https://doi.org/10.1208/s12248-015-9811-z>
- Yang, F. R., Li, S. Y., Hu, X. W., Li, X. R., & Li, H. J. (2022). Identifying the Antitumor Effects of Curcumin on Lung Adenocarcinoma Using Comprehensive Bioinformatics Analysis. *Drug Design, Development and Therapy*, 16(July), 2365–2382. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S371420>
- Yao, Qi., Lin, M., Wang, Y., Lai, Y., Hu, J., Fu, T., Wang, L., Lin, S., Chen, L., & Guo, Y. (2015). Curcumin induces the apoptosis of A549 cells via oxidative stress and MAPK signaling pathways. *International Journal of Molecular Medicine*, 36(4), 1118–1126. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2327>
- Yazdani, Z., Mehrabanjoubani, P., Rafiei, A., Biparva, P., & Kardan, M. (2021). Combined Effect of Cold Atmospheric Plasma and Curcumin in Melanoma Cancer. *BioMed Research International*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/1969863>
- Yoncheva, K., Merino, M., Shenol, A., Daskalov, N. T., Petkov, P. St., Vayssilov, G. N., & Garrido, M. J. (2019). Optimization and in-vitro/in-vivo evaluation of doxorubicin-loaded chitosan-alginate nanoparticles using a melanoma mouse model. *International Journal of Pharmaceutics*, 556, 1–8.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.11.070>
- Yoncheva, K., Tzankov, B., Yordanov, Y., Spassova, I., Kovacheva, D., Frosini, M., Valoti, M., & Tzankova, V. (2020). Encapsulation of doxorubicin in chitosan-alginate nanoparticles improves its stability and cytotoxicity in resistant lymphoma

- L5178 MDR cells. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 59, 101870. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101870>
- Yoshimasu, T., Ohashi, T., Oura, S., Kokawa, Y., Kawago, M., Hirai, Y., Miyasaka, M., Nishiguchi, H., Kawashima, S., Yata, Y., Honda, M., Fujimoto, T., & Okamura, Y. (2015). A Theoretical Model for the Hormetic Dose-response Curve for Anticancer Agents. *Anticancer Research*, 35(11), 5851–5855. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26504007>
- Yu, S., Huang, G., Qian, G., Li, Y., Wu, G., & Guo, R. (2007). Efficacy of Chemotherapeutic Agents Under Hypoxic Conditions in Pulmonary Adenocarcinoma Multidrug Resistant Cell Line. *Journal of Chemotherapy*, 19(2), 203–211. <https://doi.org/10.1179/joc.2007.19.2.203>
- Yuan, Y.-G., Peng, Q.-L., & Gurunathan, S. (2017). Silver nanoparticles enhance the apoptotic potential of gemcitabine in human ovarian cancer cells: combination therapy for effective cancer treatment. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 12, 6487–6502. <https://doi.org/10.2147/IJN.S135482>
- Yue, Z. G., Wei, W., Lv, P. P., Yue, H., Wang, L. Y., Su, Z. G., & Ma, G. H. (2011). Surface charge affects cellular uptake and intracellular trafficking of chitosan-based nanoparticles. *Biomacromolecules*, 12(7), 2440–2446. <https://doi.org/10.1021/bm101482r>
- Zakeri-Milani, P., Farkhani, S. M., Shirani, A., & Mohammadi, S. (2017). Cellular uptake and anti-tumor activity of gemcitabine conjugated with new amphiphilic cell. *EXCLI Journal*, 16, 650–662. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.17179/excli2017-249> This
- Zeng, J., Funk, J., Lee, B. R., Hsu, C. H., Messing, E. M., & Chipollini, J. (2023). Gemcitabine as first-line therapy for high-grade non-muscle invasive bladder cancer: Results from a tertiary center in the contemporary BCG-shortage era. *Translational Andrology and Urology*, 12(6), 960–966. <https://doi.org/10.21037/tau-22-772>
- Zhang, C., Li, B., Zhang, X., Hazarika, P., Aggarwal, B. B., & Duvic, M. (2010). Curcumin selectively induces apoptosis in cutaneous T-cell lymphoma cell lines and patients PBMCs: Potential role for STAT-3 and NF-B signaling. *Journal of Investigative Dermatology*, 130(8), 2110–2119. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.86>
- Zhang, C., Pan, D., Li, J., Hu, J., Bains, A., Guys, N., Zhu, H., Li, X., Luo, K., Gong, Q., & Gu, Z. (2017). Enzyme-responsive peptide dendrimer-gemcitabine conjugate as a controlled-release drug delivery vehicle with enhanced antitumor efficacy. *Acta Biomaterialia*, 55, 153–162. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.02.047>
- Zhang, L., Su, H., Wang, H., Li, Q., Li, X., Zhou, C., Xu, J., Chai, Y., Liang, X., Xiong, L., & Zhang, C. (2019). Tumor chemo-radiotherapy with rod-shaped and spherical gold nano probes: Shape and active targeting both matter. *Theranostics*, 9(7), 1893–1908. <https://doi.org/10.7150/thno.30523>

- Zhang, L., Wang, Y., Yang, D., Huang, W., Hao, P., Feng, S., Appelhans, D., Zhang, T., & Zan, X. (2019). Shape effect of nanoparticles on tumor penetration in monolayers versus spheroids. *Molecular Pharmaceutics*, 16(7), 2902–2911. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00107>
- Zhang, R., Li, S., Lan, J., Li, C., Du, X., Dong, W., & Yu, Q. (2022). CNTN-1 Upregulation Induced by Low-Dose Cisplatin Promotes Malignant Progression of Lung Adenocarcinoma Cells via Activation of Epithelial-Mesenchymal Transition. *Frontier in Genetics*, 13(May), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.891665>
- Zhang, X., Xu, G., Gadora, K., Cheng, H., Peng, J., Ma, Y., Guo, Y., Chi, C., Zhou, J., & Ding, Y. (2018). Dual-sensitive chitosan derivative micelles for site-specific drug release in the treatment of chicken coccidiosis. *RSC Advances*, 8(26), 14515–14526. <https://doi.org/10.1039/C8RA02144A>
- Zhao, H., Wu, S., Li, H., Duan, Q., Zhang, Z., Shen, Q., Wang, C., & Yin, T. (2019). ROS/KRAS/AMPK Signaling Contributes to Gemcitabine-Induced Stem-like Cell Properties in Pancreatic Cancer. *Molecular Therapy - Oncolytics*, 14, 299–312. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2019.07.005>
- Zhong, Y., Yu, W., Feng, J., Fan, Z., & Li, J. (2014). Curcumin suppresses tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced matrix metalloproteinase-2 expression and activity in rat vascular smooth muscle cells via the NF- $\kappa$ B pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 7(6), 1653–1658. <https://doi.org/10.3892/etm.2014.1647>
- Zhou, S., Zhang, S., Shen, H., Chen, W., Xu, H., Chen, X., Sun, D., Zhong, S., Zhao, J., & Tang, J. (2017). *Curcumin inhibits cancer progression through regulating expression of microRNAs*. <https://doi.org/10.1177/1010428317691680>
- Zhou, X., Ren, M., Yang, J., Pan, H., Yu, M., & Ji, F. (2021). Curcumin Improves Epithelial Barrier Integrity of Caco-2 Monolayers by Inhibiting Endoplasmic Reticulum Stress and Subsequent Apoptosis. *Gastroenterology Research and Practice*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/5570796>
- Zielinski, C. C. (2003). Gemcitabine, anthracycline, and taxane combinations for advanced breast cancer. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, 17(12 Suppl 14), 36–40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14768404>

## **12 RESUMEN BIOGRÁFICO**

M. en C. Oscar Alberto Alvarez Quezada

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

**Tesis: Efecto de curcumina-gemcitabina sobre los procesos de malignidad en cáncer y estrategias para su liberación sitio específico**

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

### **Datos personales:**

Nacido en la ciudad de Torreón Coahuila, México, el 16 de febrero de 1992. Hijo del señor Oscar Alvarez Guillermo<sup>†</sup> y la señora Norma Quezada Solís.

### **Educación:**

Egresado de la UACJ, obteniendo el grado de Licenciado en Química en el año 2015, mejor promedio de la generación. Línea de investigación en Farmacognosia.

Egresado de la UACJ, obteniendo el grado de Maestro en Ciencias con Orientación en Genómica en el año 2018, con mención honorífica. Línea de investigación en Farmacognosia.

### **Experiencia profesional:**

Químico de análisis clínicos en el Laboratorio Privado “Imagen Diagnóstica” de Ciudad Juárez, Chihuahua, 2015-2016.

Profesor por honorarios de las clases teóricas de Farmacia II, Análisis Químicos II, Micología, Biología celular, Investigación I e Investigación III y de los Laboratorios de Química Orgánica I, Química Orgánica III, Microbiología II, Farmacia II, Tecnología Farmacéutica II, Bioquímica I, Bioquímica II y Biología celular, desde el 2018 a la fecha en UACJ. Acreditado como profesor a distancia con vigencia hasta agosto del 2024.

Asesor externo de 1 tesis de maestría (Maestría en Ciencias con Orientación en Inmunobiología, UANL) y director de 5 tesis y 3 monografías de licenciatura (Programa de Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, UACJ).

Miembro activo de la Academia de Ciencias Farmacéuticas y de la Academia de Métodos de Investigación y estadística de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua.

## 13 PRODUCTOS ENTREGABLES DE ESTA INVESTIGACIÓN

### Artículos indexados

### Presentaciones de congresos

- 2022. San Nicolás de los Garza, Nuevo León. II Congreso Internacional de Futuros Investigadores en Biociencias. Alvarez-Quezada O. A., “Formas farmacéuticas de liberación sitio específicas y sus implicaciones en cáncer.”
- 2023. Ciudad Juárez, Chihuahua. 6to. Coloquio Internacional en Materiales de Interés Biotecnológico. Alvarez-Quezada O. A., Vargas-Requena C. L., Zárate-Triviño D. G., Franco-Molina M. A., Tamez-Guerra R. S., Zapata-Benavides P. y Rodríguez-Padilla M. C. “El nano encapsulamiento de curcumina y gemcitabina incrementa su efecto citotóxico e induce cambios en los mecanismos de muerte y ciclo celular.”
- 2023. Ciudad Juárez, Chihuahua. I Congreso Internacional de Ciencias Naturales y Aplicadas. Alvarez-Quezada O. A., Vargas-Requena C. L., Zárate-Triviño D. G., Rodríguez-Padilla M. C. y Zapata-Benavides P. “Efecto del encapsulamiento de curcumina-gemcitabina sobre la invasión, migración e implantación de células A549 y B16F10.”

### Tesis dirigidas, derivadas de esta investigación

- 2022. Herrera-González Michell. Evaluación del efecto anti proliferativo de la curcumina nanoparticulada, sobre un modelo de adenocarcinoma pulmonar de células no pequeñas. *Tesis de Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo*. Director. UACJ.
- 2022. Chávez-Payán Yara. Efecto citotóxico de curcumina nanoencapsulada en quitosano, sobre células de melanoma murino B16F10. *Tesis de Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo*. Director. UACJ.

- 2022. Monrreal-Ramírez Monserrat. Estudio del efecto antiproliferativo de la combinación curcumina-quimioterapia, sobre células de cáncer de mama murino 4T1. *Tesis de Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo*. Director. UACJ.
- 2023. Rodríguez-Rodríguez Mara Valeria. Efecto de la curcumina nanoencapsulada sobre la viabilidad celular y la modulación de la expresión génica de WT1 Y PAR-4 en células K562. *Tesis de Licenciatura en Biotecnología y Genómica*. Asesor externo. UANL.