

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



EFFECTO ANTICANCERÍGENO *in vitro* DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO  
ARNi-WT1/CURCUMINA Y SU COMBINACIÓN CON FÁRMACOS  
ANTINEOPLÁSICOS EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE PULMÓN

POR


MARA VALERIA RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

2026

EFFECTO ANTICANCERÍGENO *in vitro* DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO  
ARNi-WT1/CURCUMINA Y SU COMBINACIÓN CON FÁRMACOS  
ANTINEOPLÁSICOS EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE PULMÓN

**Comité de tesis**



**Dr. Pablo Zapata Benavides**

Presidente



**Dra. Diana Ginette Zárate Triviño**

Secretaria



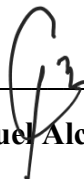
**Dra. Diana Reséndez Pérez**

Vocal 1



**Dra. Ana Carolina Martínez Torres**

Vocal 2



**Dr. Juan Manuel Alcocer González**

Vocal 3



**Dr. Katiushka Arévalo Niño**

Subdirectora de posgrado

EFFECTO ANTICANCERÍGENO *in vitro* DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO  
ARNi-WT1/CURCUMINA Y SU COMBINACIÓN CON FÁRMACOS  
ANTINEOPLÁSICOS EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE PULMÓN


**Dirección de tesis**



---

**Dr. Pablo Zapata Benavides**

Director interno



---

**Dr. Oscar Alberto Alvarez Quezada**

Director externo

## LUGAR DE TRABAJO



El presente estudio se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León con el financiamiento de la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación bajo la Convocatoria de Investigación Científica de Frontera 2023-2025 (Clave CF2023-1-912).

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer profundamente a la SECIHTI por brindarme el apoyo económico durante los dos años de maestría y su apoyo a la ciencia y a los investigadores.

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, Jefa del Laboratorio de Inmunología y Virología donde se realizó este proyecto de investigación.

Gracias Dr. Pablo Zapata, responsable de la unidad de Biología Molecular del Cáncer, por el apoyo, enseñanza, retroalimentación y bromas durante mi estancia en el laboratorio.

Gracias Dr. Oscar Alvarez por tu disponibilidad para aclarar dudas, por los comentarios para hacer un trabajo mejor, por enseñarme a hacer gran parte de este proyecto y por ser un gran amigo y colega.

A mis padres, Mayra y Mario Rodríguez, quienes siempre han estado al pendiente de mí y de mis hermanos, Mayín y David. Gracias por brindarme su apoyo en todo momento y por su amor incondicional. Por ustedes soy lo que soy ahora. Los quiero mucho.

A mi familia, en especial a mi tía Betty, por siempre recibirme en tu casa, por madrugar y llevarme a la universidad a las 5:30 a.m., por desvelarte y recogerme el día que terminé un examen a las 12 a.m., por estar al pendiente de mí y por ayudarme a aligerar el trayecto de la casa a la universidad y viceversa.

Agradezco a mis sinodales, Dra. Diana Zárate, Dra. Diana Reséndez, Dra. Ana Carolina Martínez y al Dr. Juan Manuel Alcocer por abrirme las puertas de sus unidades de laboratorio y facilitar el camino para concluir esta investigación.

Agradezco infinitamente al Dr. Alberto Valadez por sus consejos y por su apoyo en la obtención de los reactivos y equipos con los que no contaba para poder continuar con mi proyecto, así como la motivación y las pláticas sobre atletismo. Al Dr. Sergio Galindo, quien me permitió utilizar su Zetasizer cuando más lo necesitaba. A la Dra. María Guadalupe Rojas por apoyarme en la liofilización de las nanopartículas

en cualquier momento cuando eran tiempos difíciles. A la Dra. Katiushka, subdirectora de posgrado, por permitirme utilizar su equipo de laboratorio cuando ya no tenía ninguna otra opción.

También un agradecimiento especial a la Dirección de Deportes de la UANL y a los coaches de velocidad Edgar Treviño y Violeta Ávila del Equipo de Atletismo de la UANL por estar al pendiente de mi educación y mi desempeño como atleta, por el apoyo económico y por todos los servicios y obsequios que me brindaron durante mis estudios en la maestría.

A mis compañeros de laboratorio y de la generación de la maestría, Vianey, Adriana y Pablo, con los que pasé grandes aventuras y siempre buscamos todos juntos la manera de solucionar los obstáculos y seguir adelante. Gracias por todas las risas y desahogos que pasamos por estos dos años.

A Emilio, quien ha sido un gran apoyo, me ha motivado a sacar lo mejor de mí, me ha enseñado a ver el lado positivo de todas las cosas e incluso me ha ayudado en los experimentos de laboratorio, en escuchar mi presentación de tesis y en hacerme preguntas. Cada momento difícil que se me presentó, tú estuviste ahí para ayudarme. Te quiero muchísimo.

A mi gran amiga de atletismo Jocelyn, quien convertía el cansancio de todos los días en algo divertido y quien estuvo en mi seminario escuchando mi proyecto aunque no estuviera relacionada con el tema, fue un momento muy especial para mí.

A Wendy y Mónica Rueda con quienes pasé horas y horas en el laboratorio realizando muchos Western blot y extracciones de plásmido hasta obtener un resultado y sacar adelante nuestras tesis. De igual forma, gracias Mónica Silva por tu iniciativa y continuar con los experimentos de citotoxicidad.

A mis compañeros de laboratorio, Juan Manuel, Leo, Ramsés, Jesús, Fernanda, Luisa, Rubén, Pao e Isaí, con quienes pasé buenos momentos en el laboratorio, me aconsejaron sobre experimentos y ayudaron en la retroalimentación de mi trabajo. A los chicos de servicio social, Enrique y Enrique que, a pesar de convivir poco tiempo, me ayudaron a terminar con mis últimos experimentos.

A Mony de posgrado quien me resolvió todas mis dudas sobre los trámites de maestría y me defendía de J.M.

A mis compañeros de generación de maestría, Jess, Daniel, Ana, Devany, David y Lenin, con quienes compartí prácticas, presentaciones y tareas por este tiempo.

A mis dos amigas, Prins y Mariana, quienes fueron mis amigas desde licenciatura y con quienes continué la maestría y nos llevamos muchas experiencias juntas durante este proceso.

A mi perrita Blacky, quien fue mi acompañante todos los días y noches de escritura y quien se alegraba de verme cada que llegaba a casa después de un largo día de laboratorio.

Aunque sé que no lo sabrá, pero agradezco a mi laptop Lenovo que soportó tantas horas de trabajo, funcionando día y noche, con fallas intermitentes, pero a pesar de eso, siempre recuperó todos los documentos y me permitió terminar la tesis.

Y agradezco a todos los que de alguna forma me brindaron apoyo moral y consejos para la realización de esta tesis.

¡GRACIAS A TODOS!

## DEDICATORIA

*A todos aquellos que luchan esta batalla,  
quienes demostraron que las estrellas brillan más  
cuando la noche es muy oscura...*

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	xiv
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2 ANTECEDENTES</b> .....	3
<b>2.1 Cáncer</b> .....	3
<b>2.2 Cáncer de pulmón</b> .....	3
<b>2.3 WT1</b> .....	4
<b>2.4 ARNi-WT1</b> .....	6
<b>2.5 Tratamientos actuales contra el cáncer de pulmón</b> .....	6
<b>2.6 Curcumina</b> .....	7
<b>2.6.1 Curcumina en carcinogénesis</b> .....	8
<b>2.7 Nanotecnología</b> .....	9
<b>2.7.1 Nanopartículas de quitosano</b> .....	9
<b>3 HIPÓTESIS</b> .....	12
<b>4 OBJETIVO GENERAL</b> .....	13
<b>5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	13
<b>6 JUSTIFICACIÓN</b> .....	14
<b>7 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	15
<b>7.2 Preparación del tratamiento con curcumina</b> .....	15
<b>7.3 Concentraciones de gemcitabina</b> .....	15
<b>7.4 Transformación de bacterias calciocompetentes</b> .....	15
<b>7.5 Extracción de plásmido</b> .....	16
<b>7.6 Digestión con enzimas de restricción</b> .....	16
<b>7.7 Nanopartículas de quitosano con ARNi-WT1/curcumina</b> .....	16
<b>7.8 Ensayo de viabilidad celular</b> .....	17
<b>7.9 Ensayo de hemólisis</b> .....	18
<b>7.10 Extracción de ARN</b> .....	19
<b>7.10.1 Generación de ADNc</b> .....	20
<b>7.10.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</b> .....	20
<b>7.10.3 Electroforesis</b> .....	21
<b>7.11 Apoptosis con Anexina V y 7-AAD</b> .....	21
<b>7.12 Ensayo de fragmentación</b> .....	22
<b>7.13 Microscopia de fluorescencia con DAPI y PI</b> .....	22

7.14	Ensayo de migración de herida por rasguño .....	23
7.15	Análisis estadístico .....	23
8	<b>RESULTADOS</b> .....	24
8.1	Caracterización del plásmido pGSH1-GFP WT1 .....	24
8.2	Caracterización de la formulación de nanopartículas de quitosano .....	26
8.3	Determinación de la concentración media inhibitoria de la formulación de nanopartículas .....	28
8.4	Ensayo de hemólisis .....	31
8.5	Índice de combinación entre NPQ-ARNi/cur y gemcitabina .....	32
8.6	Expresión de WT1.....	33
8.7	Análisis del porcentaje de unión de Anexina V y 7-AAD .....	34
8.8	Ensayo de fragmentación .....	35
8.9	Análisis de apoptosis/necrosis con microscopia de fluorescencia .....	36
8.10	Ensayo de migración de herida por rasguño .....	38
9	<b>DISCUSIÓN</b> .....	40
10	<b>CONCLUSIONES</b> .....	45
11	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	46
12	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	47

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Isoformas de la estructura de WT1 .....	5
<b>Figura 2.</b> Mapa del plásmido de expresión pGSH1-GFP .....	24
<b>Figura 3.</b> Caracterización del plásmido 5-6 contra WT1 .....	25
<b>Figura 4.</b> Morfología de células B16F10 con el plásmido 5-6 o encapsulado junto con curcumina .....	26
<b>Figura 5.</b> Características métricas de los complejos nanoencapsulados con quitosano..	27
<b>Figura 6.</b> Eficiencia de encapsulación del plásmido .....	28
<b>Figura 7.</b> Porcentajes de viabilidad en las células A549 y Calu-3 .....	29
<b>Figura 8.</b> Porcentajes de viabilidad en las células A549 y Calu-3 tratadas con la combinación de compuestos activos .....	31
<b>Figura 9.</b> Porcentaje de hemólisis de NPQ/ARNi-WT1/cur .....	32
<b>Figura 10.</b> Expresión a nivel transcripcional de WT1 .....	34
<b>Figura 11.</b> Efecto del tratamiento combinado sobre la inducción de apoptosis.....	35
<b>Figura 12.</b> Ensayo de fragmentación de ADN. ....	36
<b>Figura 13.</b> Marcaje con DAPI y PI bajo microscopia de fluorescencia. ....	37
<b>Figura 14.</b> Migración de células A549 con los distintos tratamientos .....	39

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Principios activos empleados en células A549 para determinar la concentración media inhibitoria. ....	17
<b>Tabla 2.</b> Combinación de tratamientos sin y con gemcitabina aplicados en las líneas celulares de cáncer pulmonar. ....	18
<b>Tabla 3.</b> Secuencias de cebadores. ....	20
<b>Tabla 4.</b> Condiciones de amplificación. ....	21
<b>Tabla 5.</b> Determinación de tamaño, potencial Z y polidispersión de nanopartículas de quitosano y cargadas con los principios activos. ....	26
<b>Tabla 6.</b> Índice de combinación entre NPQ/ARNi-WT1/cur y gemcitabina en A549....	33

## ABREVIATURAS

WT1: Wilm's Tumor 1

CPCNP: cáncer pulmonar de células no pequeñas

CPCP: cáncer pulmonar de células pequeñas

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNp: ADN plasmídico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNi: ARN de interferencia

LB: Luria Bertani

s: segundo

min: minuto

h: hora

mg/mL: miligramo sobre mililitro

$\mu$ g/mL:

ng: nanogramo

nm: nanómetro

$\mu$ L: microlitro

mL: mililitro

$\mu$ M: micromolar

mM: milimolar

rpm: revoluciones por minuto

xg: fuerza G

mV: milivoltios

U: Unidad

CMSP: células mononucleares de sangre periférica

PEI: polietilenimina

PBS: phosphate-buffered saline

TPP: tripolifosfato de sodio

NPQ: nanopartículas de quitosano

NPQ/ARNi-WT1/cur: Nanopartículas de quitosano con plásmido con ARNi-WT1 y curcumina

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

DMSO: dimetilsulfóxido

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

PI: yoduro de propidio

## RESUMEN

WT1 es un gen sobreexpresado y reconocido como promotor de tumores. Estudios muestran que el silenciamiento de WT1 mediante ARNi induce una disminución de la proliferación tumoral, sin embargo, reportan la prevalencia de metástasis a un ritmo más lento. Por ende, una coadministración con quimioterapia ejerce un efecto sinérgico, sin embargo, la quimioterapia se asocia con daño renal y hepático. En este contexto, la curcumina se convierte en una molécula clave, puesto que posee la capacidad de reducir la toxicidad inducida por los quimioterapéuticos, además de quimiosensibilizar a las células cancerosas y disminuir la expresión de WT1.

El presente estudio fue diseñado para evaluar el efecto anticancerígeno de nanopartículas de curcumina y ARNi contra WT1 recubiertas de quitosano administradas en células A549 en combinación con gemcitabina. Se determinaron las características de estas, así como el efecto anticancerígeno a través de un ensayo con MTT; PCR para evaluar la disminución de WT1; citometría de flujo, fragmentación celular y microscopia de fluorescencia para el análisis de muerte celular y un ensayo de herida por rasguño para medir el porcentaje de migración. El cotratamiento mostró un efecto sinérgico y brindó un efecto citotóxico a una relación 1:1 de NPQ/ARNi-WT1/cur y gemcitabina. Además, el tratamiento nanoencapsulado como monoterapia y como cotratamiento ejerció una disminución de la expresión de WT1 e inhibió la migración celular de la línea A549. Asimismo, las NPQ/ARNi-WT1/cur indujeron fragmentación del ADN y mostraron un posible mecanismo combinado de muerte celular.

Por tanto, las NPQ/ARNi-WT1/cur administradas simultáneamente con gemcitabina tienen un efecto antitumoral y sinérgico contra las células A549 de cáncer pulmonar.

## ABSTRACT

WT1 is an overexpressed gene recognized as a tumor promoter. Studies show that WT1 silencing via RNAi induces a decrease in tumor proliferation; however, the persistence of metastasis at a slower rate has been reported. Therefore, co-administration with chemotherapy exerts a synergistic effect, although, the chemotherapy is typically associated with kidney and liver damage. In this context, curcumin emerges as a key molecule, as it possesses the ability to reduce chemotherapy-induced toxicity, further to chemosensitizing cancer cells and decreasing WT1 expression.

The present study was designed to evaluate the antitumoral effect of chitosan-coated curcumin and WT1-silencing RNAi nanoparticles administered to A549 cells in combination with gemcitabine. The nanoparticles were characterized, and their antitumoral effect was determined via MTT assay, PCR was used to evaluate the downregulation WT1, flow cytometry, DNA fragmentation and fluorescence microscopy were employed for cell death analysis; and scratch wound assay was performed to measure the migration rate. The co-treatment exhibited a synergistic effect and exerted cytotoxicity at a 1:1 ratio of NPQ/ARNi-WT1/cur and gemcitabine. Furthermore, the nanoencapsulated treatment, both as monotherapy and co-treatment decreased WT1 expression and inhibited the cell migration of the A549 cells. Likewise, the NPQ/ARNi-WT1/cur induced DNA fragmentation and suggested a possible combined cell death mechanism.

Consequently, NPQ/ARNi-WT1/cur administered simultaneously with gemcitabine have a synergistic antitumor effect against A549 lung cancer cells.

# 1 INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón es la segunda neoplasia más frecuente a nivel mundial, la cual representa el 12.4% de cánceres en el año 2022 (Global Cancer Observatory, 2024). Se clasifica en función de los subtipos celulares, dividiéndose en cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), el cual representa el 85%, siendo el más común con un crecimiento lento; y el cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP), abarcando un 15%, pero a menudo con un crecimiento acelerado (Panunzio y Sartori., 2020; World Health Organization, 2023).

La inhalación prolongada a un carcinógeno o factores ambientales y genéticos aumenta el riesgo de padecer la enfermedad. Esto conduce a aberraciones en las vías de señalización implicadas en el cáncer de pulmón, en donde ocurre una supresión de genes proapoptóticos y una activación de genes prosupervivencia. Entre estos últimos se encuentra el gen del tumor de Wilms (WT1), un factor promotor de tumores que se encuentra sobreexpresado en neoplasias pulmonares (Choudhary *et al.*, 2023; Siddiqui *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2023). WT1 es considerado un blanco terapéutico contra el cáncer de pulmón, donde la terapia génica tiene un papel considerable en el tratamiento de este tipo de tumor. El uso de terapias alternativas como la quimioterapia puede potenciar el efecto antitumoral al combinarse con un ARN interferente pequeño contra WT1. Sin embargo, la administración de agentes quimioterapéuticos puede causar daños renales o hepático (De Francisco *et al.*, 2019). Por ello, se ha optado por experimentar con compuestos activos de origen vegetal, siendo uno de ellos la curcumina. Los efectos de la curcumina son altamente dependientes de la dosis, el contexto celular, el estado metabólico de la célula e incluso el sexo de la persona, lo que sugiere la posibilidad de respuestas no lineales que deben considerarse en estrategias combinatorias. (Maher *et al.*, 2021; Mishra *et al.*, 2023; Schiborr *et al.*, 2014). La desventaja de la curcumina es su insolubilidad y pobre absorción en células. Por ello, se han implementado vehículos a base de nanomateriales para transportar la curcumina y mejorar la biodisponibilidad y la eficacia terapéutica.

Dado esto, en este trabajo se evalúa la nanoencapsulación de ARNi-WT1 con curcumina y la combinación con gemcitabina para determinar el efecto citotóxico con la correlación con la expresión de WT1, así como analizar la muerte celular y la migración de la línea celular A549.

## **2 ANTECEDENTES**

### **2.1 Cáncer**

El cáncer es denominado como el conjunto de enfermedades originadas debido a un crecimiento descontrolado de células anormales con la capacidad de invadir órganos y afectar su funcionamiento, siendo esta la mayor causa de muerte por cáncer (Organización Mundial de la Salud, 2019).

En el continente americano, se registró una incidencia de 3.7 millones de casos y 1.3 millones de decesos en el año 2020, representando el 21% y 14.3% de la población mundial, respectivamente (Global Cancer Observatory, 2020).

Se estima que para el año 2040, el diagnóstico de cáncer aumente en un 57% si continúa con la misma tendencia y no se cuenta con las medidas de prevención y control (Organización Panamericana de la Salud, 2023).

### **2.2 Cáncer de pulmón**

Este tipo de neoplasia es la primera más frecuente a nivel mundial, representando un 12.4% en el año 2022 (Global Cancer Observatory, 2024). Durante el año 2020, en México, el cáncer de pulmón tuvo una incidencia y mortalidad del 0.4% para ambos casos.

Este se puede clasificar en función de los subtipos celulares, dividiéndose en cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), el cual es el más común con un crecimiento lento; y el cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP), siendo menos frecuente, pero a menudo con un crecimiento acelerado (Panunzio y Sartori., 2020; World Health Organization, 2023).

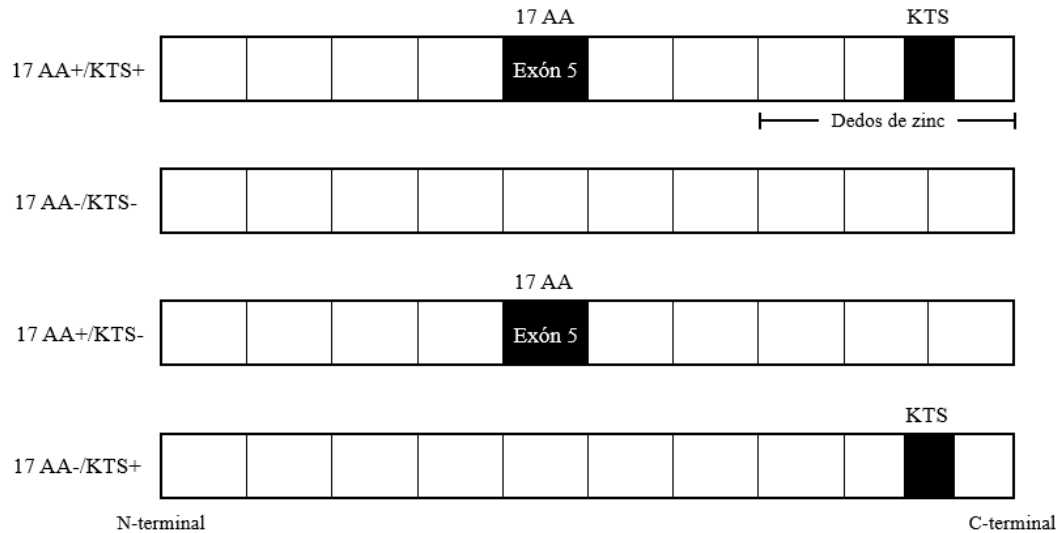
La fisiopatología de este tipo de cáncer es compleja. La inhalación prolongada a un carcinógeno o factores ambientales y genéticos aumenta el riesgo de padecer la enfermedad. Esto conduce a aberraciones en las vías de señalización implicadas en el cáncer de pulmón, en donde las más comunes son los receptores de tirosina quinasas, quienes dan lugar a la supresión de genes proapoptóticos y la activación de oncogenes prosupervivencia, siendo uno de ellos el gen tumoral 1 de Wilms, el cual se encuentra implicado en la interacción con la vía de señalización PI3K/AKT o en la modulación transcripcional de dianas involucradas en la apoptosis, quimiorresistencia, proliferación

e invasión, lo que conlleva a la progresión del ciclo celular y la supervivencia de las células anormales (Choudhary *et al.*, 2023; Siddiqui *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2023).

### 2.3 WT1

El gen WT1 es un factor de transcripción involucrado en el desarrollo embrionario, y del aparato genitourinario, en la proliferación celular y en la apoptosis. Se encuentra localizado en el cromosoma 11p13, con una longitud de ARNm de 3.5 Kb, el cual está conformado por 10 exones. Este puede generar distintas isoformas de diferentes pesos moleculares debido a que presenta tres inicios variables de la traducción, siendo de 36-38 kDa, 52-54 kDa y 62-64 kDa (Hernández *et al.*, 2004).

El procesamiento del ARNm genera cuatro isoformas proteicas mediante dos eventos de empalme alternativo. El primero ocurre en el exón 5 con la inserción de 17 aminoácidos, mientras que en el segundo se adiciona el triplete KTS (lisina, treonina y serina) que se encuentran en el carboxilo terminal entre los exones 9 y 10, los cuales codifican un dominio de dedos de zinc junto con los exones 7 y 8 (Rampal y Figueroa, 2016). Dada la presencia de estos últimos aminoácidos, existe una mayor afinidad de unión de la proteína hacia el ARN, reduciendo así su capacidad de unión al ADN. Por el contrario, las isoformas que carecen de esta inserción presentan una unión preferente a regiones con alta densidad de guanina y citosina en el ADN (Muñoz *et al.*, 2003; Steege *et al.*, 2008) (**Fig. 1**).



**Figura 1.** Isoformas de la estructura de WT1 generadas por la presencia o ausencia de 17 aminoácidos en el empalme alternativo en el exón 5 y/o la inserción o delección de KTS en los dedos de zinc entre el exón 9 y 10.

Diversas investigaciones han identificado a WT1 en distintas neoplasias, incluido el cáncer de pulmón, por tanto, ha sido catalogado como un factor promotor de tumores. Se ha observado que, en pacientes con CPCNP, este oncogén se encuentra sobreexpresado y está estrechamente vinculado con la progresión y capacidad metastásica del cáncer (Li *et al.*, 2023; Xu *et al.*, 2013). Asimismo, la expresión de WT1 se ha utilizado como un indicador del estadio clínico y del pronóstico de vida, puesto que esta se ha visto asociada con el promotor de *CDHI*, promoviendo así la invasión de las células cancerosas (Wu *et al.*, 2013).

En cambio, se ha reportado que al inhibir WT1 implica una caída de la proliferación celular y activación de los mecanismos de muerte celular programada. Además, en modelos de cáncer de pulmón, el silenciamiento génico a través de un ARN de interferencia (ARNi) induce un bloqueo del ciclo celular en la fase G1 y estimula la expresión de genes proapoptóticos (Wang *et al.*, 2013). Este fenómeno se manifiesta a través de marcadores moleculares clave, como la escisión de la caspasa-3 y la activación de la poli-ADP-ribosa polimerasa, así como la fragmentación del ADN y la aparición de cuerpos apoptóticos observado en modelos *in vitro* con metástasis pulmonar B16F10 (Zamora *et al.*, 2007).

Dado esto, WT1 es considerado como un blanco terapéutico donde se ha considerado a la terapia génica como un recurso contra el cáncer de pulmón.

#### **2.4 ARNi-WT1**

El potencial del ARNi fue descubierto por Fire *et al.*, (1998) cuando evaluaron la expresión de proteínas en *Caenorhabditis elegans* y observaron el silenciamiento de los genes diana. Actualmente, el uso del ARNi está en su auge debido a su capacidad de administrarse como terapia anticancerígena personalizada. En estudios previos, se puso en evidencia el efecto obtenido del uso de un ARNi-WT1 con polietileneimina (PEI) administrado por vía aerosol en un modelo *in vivo* de cáncer metastásico pulmonar B16F10, en donde se observó la reducción del número y tamaños de los focos tumorales, del mismo modo que el número y el tamaño de los vasos sanguíneos tumorales (Zamora *et al.*, 2009).

Por otro lado, la aplicación de ARNi en un sistema liposomal DOPC demostró una pérdida de viabilidad, progresión, migración e invasión en el mismo modelo tumoral. Sin embargo, los ratones continuaron con la metástasis a un ritmo más lento, por lo que se sugiere el uso de terapias alternativas para mejorar el efecto (Ramos *et al.*, 2023).

Dicho esto, el empleo de quimioterapia con un ARNi-WT1 induce un efecto sinérgico al disminuir la expresión de WT1 y potenciar el mecanismo de acción de los fármacos como tratamiento en el cáncer metastásico pulmonar en un modelo *in vitro* e *in vivo* (Zapata *et al.*, 2019).

#### **2.5 Tratamientos actuales contra el cáncer de pulmón**

Los tratamientos actuales se dividen según la fase en la que se encuentra desarrollado el cáncer. El tratamiento primario para los pacientes en etapa 1 y 2 es la cirugía o la radioterapia, pero no la combinación de estas. Para los pacientes en etapa 3 se recomienda radioterapia, quimioterapia y quimioradioterapia; mientras que para la etapa 4 las opciones incluyen radioterapia externa paliativa, quimioterapia dirigida e inmunoterapia. Con frecuencia, se recomienda la combinación de estos tratamientos con quimioterapia o la

posterior administración de esta para prevenir una recurrencia del tumor (Lemjabbar-Alaoui *et al.*, 2015).

Entre las quimioterapias disponibles se encuentran las de primera línea y la combinación de esta con terapia dirigida. La primera consiste en una coadministración de drogas citotóxicas a base de platino (cisplatino o carboplatino) combinada con taxanos (paclitaxel, docetaxel o vinorelbina), antimetabolitos (gemcitabina o pemetrexed), o alcaloides de vinca (vinblastina). Para el segundo caso se basa en la adición del anticuerpo bevacizumab de unión a VEGF con la quimioterapia de primera línea (Lemjabbar-Alaoui *et al.*, 2015).

No obstante, los efectos adversos de la quimioterapia abarcan fatiga, úlceras bucales, alopecia y debilitan el sistema inmunitario, por lo que el paciente es más susceptible a infecciones (National Health Service, 2022). Además, los agentes quimioterapéuticos se metabolizan y excretan por el hígado y riñón, donde algunos de los administrados para la terapia pulmonar pueden causar daños renales o hepático (De Francisco *et al.*, 2019; Amjad *et al.*, 2023).

Dado esto, se ha optado por experimentar con compuestos activos de origen vegetal, puesto que se ha observado efectos antiproliferativos, tal como el caso de la curcumina, asimismo que esta tiene el potencial de inducir un efecto nefroprotector y hepatoprotector (Maher *et al.*, 2021; Mishra *et al.*, 2023; Ramírez y Velasque, 2019).

## **2.6 Curcumina**

La curcumina es el componente bioactivo extraído del rizoma de *C. longa*, una especie proveniente de la familia Zingiberaceae. En un contexto químico, es conocido como 1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona con masa molecular de 368.39 g/mol y su fórmula molecular es  $C_{21}H_{20}O_6$  (Karthikeyan *et al.*, 2020; Sharifi-Rad *et al.*, 2020). Debido a su amplio perfil farmacológico, es ampliamente utilizada por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y su rol protector en el sistema nervioso, hepático, cardiovascular y antitumoral (Sarifi-Rad *et al.*, 2020).

### 2.6.1 Curcumina en carcinogénesis

Diversas investigaciones han esclarecido el potencial antitumoral de la curcumina, en donde se le atribuye una acción dual. En primer lugar, inhibe la transcripción génica, el avance del ciclo celular, la metástasis y la angiogénesis. En segundo lugar, esto permite la promoción de la apoptosis, la inducción de cambios epigenéticos y activación de genes supresores de tumores (Zoi *et al.*, 2021).

Este principio activo destaca por su capacidad para interactuar con las especies reactivas de oxígeno, bloqueando la progresión tumoral y posterior metástasis. Asimismo, interviene en la regulación de la vía de señalización de supervivencia de PI3K/AKT y AKT/mTOR, logrando inhibir su vía de transducción en modelos de cáncer de próstata PC-3 (Kasi *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2008; Zoi *et al.*, 2021).

Uno de los principales ejes terapéuticos de la curcumina consiste en la inhibición de la angiogénesis. Este compuesto bloquea factores proangiogénicos como el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). En el caso de este último, la expresión disminuida se debe a la regulación negativa de NF- $\kappa$ B y el factor de crecimiento AP-1, atenuando la expresión de IL-8 (Sharifi-Rad *et al.*, 2020).

Adicionalmente, se ha comprobado su eficacia en la disminución de la viabilidad celular en leucemia linfoblástica aguda pre-B. A través del aumento de caspasa-3 y la inhibición de Bcl-2, la curcumina promueve la apoptosis y la escisión de PARP-1, una proteína especializada en la reparación del ADN y suele estar altamente expresada en tejidos malignos (Mishra *et al.*, 2016).

Se ha demostrado que la curcumina ejerce un efecto supresor sobre WT1 en pacientes con leucemia, logrando esta inhibición en el 50% de los casos de este estudio (Anuchapreeda *et al.*, 2006).

Por otro lado, este compuesto actúa como un agente quimiosensibilizador en el cáncer, puesto que tiene la capacidad de potenciar eventos como la apoptosis y la autofagia, así como la reducción de la proliferación y detención del ciclo celular (Ashrafizadeh *et al.*, 2020). Particularmente en el CPCNP, la combinación de curcumina y cisplatino en las

células A549 radiosensibilizadas demostró un decremento de la viabilidad, así como un bloqueo de la capacidad migratoria e invasiva (Cai *et al.*, 2019). Aunado a esto, el tratamiento con este fitoquímico no induce resistencia o efectos adversos (Smagurauskaite *et al.*, 2020).

No obstante, dada su insolubilidad y pobre absorción celular, se ha estudiado el uso de vehículos de transporte nanométricos para optimizar su biodisponibilidad y eficacia terapéutica en menores dosis.

## **2.7 Nanotecnología**

El uso de nanomateriales como sistemas de liberación controlada ha revolucionado en la terapia oncológica. Dentro de esta categoría destacan diversas arquitecturas y materiales como los liposomas, los nanotubos de carbono, micelas, nanopartículas metálicas, magnéticas y poliméricas (García y Loera, 2021). Sin embargo, estas últimas han sobresalido por sus resultados favorecedores en la biocompatibilidad y eficacia en la administración de fármacos.

En particular, las nanopartículas poliméricas de quitosano se han sido de gran interés por sus propiedades fisicoquímicas, convirtiéndose en un transporte ideal para compuestos terapéuticos.

### **2.7.1 Nanopartículas de quitosano**

El quitosano es un biopolímero derivado de la desacetilación parcial de la quitina, un compuesto presente en exoesqueletos de crustáceos e insectos, así como en la pared celular de algunas especies de hongos y algas. Estructuralmente se encuentra compuesto por unidades de N-acetilglucosamina ligadas con enlaces ( $\beta$ -1,4) y se obtiene al eliminar al menos el 50% de los grupos acetilo de la quitina (Aranaz *et al.*, 2021; Lárez, 2006; Sharifi-Rad *et al.*, 2021).

El comportamiento químico del quitosano es particular, puesto que es insoluble en agua a pH neutro debido al porcentaje de acetilaciones y peso molecular alto, lo cual lo convierte en un compuesto soluble en medios ácidos (como el acético, cítrico o fórmico) en virtud de la protonación de los grupos amina libres, puesto que estos se desprotonan a un pH mayor a 6 (Aranaz *et al.*, 2021; Hembram *et al.*, 2016; Sharifi-Rad *et al.*, 2021).

Por otro lado, una de sus principales características es su biodegradabilidad por la acción de diversas enzimas como quitinasas, lisozimas, celulasas, hemicelulasas, proteasas y quitosanasas. Además, su alta biocompatibilidad lo hace idóneo para sistemas de liberación de fármacos (Raafat y Sahl, 2009).

A su vez, destaca por su capacidad antimicrobiana al inhibir el crecimiento de bacterias, hongos filamentosos y levaduras (Aranaz *et al.*, 2021; Raafat y Sahl, 2009).

Sumado a esto, posee actividad antioxidante dada por los grupos hidroxilo y amino que interaccionan con los electrones y átomos de H de los radicales libres (Aranaz *et al.*, 2021).

El potencial del quitosano para formar nanopartículas lo ha convertido en un diseño eficiente para el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos oncológicos. Dada su carga superficial positiva, estas nanopartículas interactúan eficazmente con las membranas mucosas y la microvasculatura tumoral, facilitando así la entrega del agente terapéutico. (Mohammed *et al.*, 2017; Sharifi-Rad *et al.*, 2021).

Uno de los protocolos de síntesis más comunes es la gelificación iónica, donde se adiciona un agente reticulante, siendo adquirido principalmente el tripolifosfato de sodio (TPP). El mecanismo se basa en la atracción electrostática entre el quitosano catiónico y el polianión TPP, en donde ocurre una protonación de los grupos amina del polímero cuando se encuentra en un medio acuoso ácido a un pH <6 que, bajo agitación constante a temperatura ambiente, forma una red entrecruzada cuando está en contacto con el TPP (Hembram *et al.*, 2016; Mohammed *et al.*, 2017).

No obstante, la administración intravenosa de nanoencapsulados exige diámetros de partícula comprendidos entre 100 nm y 2 µm. En este sentido, las nanopartículas de quitosano resultan idóneas, puesto que se han reportado tamaños que oscilan entre los 41 y 600 nm (Khanmohammadi *et al.*, 2015; Caro *et al.*, 2019).

Asimismo, se ha evidenciado que la encapsulación de curcumina en estos sistemas supera la biodisponibilidad del fitoquímico libre, además de optimizar su capacidad protectora (Ebrahimi *et al.*, 2023).

En atención a la agresividad del cáncer pulmonar, se propone la coadministración de ARNi-WT1 y curcumina nanoencapsulados con quitosano y administrados en simultáneo

con la quimioterapia convencional. Este enfoque integral busca mitigar la quimiorresistencia y la proliferación tumoral mediante la inhibición de WT1, además de ofrecer un efecto protector contra la toxicidad renal ocasionada por los quimioterapéuticos.

### **3 HIPÓTESIS**

La combinación de curcumina y ARNi-WT1 en una formulación de nanopartículas de quitosano induce un efecto sinérgico antitumoral al administrarse simultáneamente con gemcitabina en un modelo *in vitro* de cáncer de pulmón.

## **4 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto antitumoral de la combinación de curcumina y ARNi-WT1 en una formulación de nanopartículas de quitosano al administrarse con gemcitabina en un modelo *in vitro* de cáncer de pulmón.

## **5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Caracterizar las propiedades físicas de la formulación de nanopartículas de quitosano.
2. Determinar el efecto citotóxico de las NPQ/ARNi-WT1/curcumina en la línea celular A549.
3. Medir la expresión de WT1 en las células de cáncer de pulmón tratadas con y sin la formulación de nanopartículas.
4. Analizar la muerte celular inducida por la combinación de nanopartículas NPQ/ARNi-WT1/curcumina con gemcitabina en la línea celular de cáncer de pulmón.
5. Evaluar el efecto antineoplásico de los nanocomplejos en combinación con gemcitabina en la migración de las células cancerosas de pulmón.

## 6 JUSTIFICACIÓN

El cáncer de pulmón es la segunda neoplasia más frecuente a nivel mundial y la primera causa de muerte en América Latina por cáncer. Es sabido que aberraciones en las vías de señalización en el cáncer de pulmón conducen a una activación de oncogenes prosupervivencia, en la que destaca WT1, un gen sobreexpresado promotor de tumores. El silenciamiento de WT1 mediante ARNi induce una disminución de la proliferación tumoral; sin embargo, estudios muestran la prevalencia de metástasis. Por lo tanto, una coadministración con quimioterapia ejerce un efecto sinérgico, en donde la molécula clave para llegar a un resultado favorable es la curcumina, puesto que tiene la capacidad de reducir el daño conferido con los quimioterapéuticos, además de quimiosensibilizar a las células y participar en la reducción de la expresión de WT1. De esta manera se pretende mejorar la calidad de vida de los pacientes al disminuir la dosis quimioterapéutica. Es por eso que en este proyecto se evaluó el efecto citotóxico, apoptótico y la migración celular de la administración de la combinación de gemcitabina con NPQ/ARNi-WT1/curcumina nanoencapsulados con quitosano.

## **7 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1 Cultivo celular**

Las líneas celulares A549 y Calu-3 se obtuvieron del banco de células de la Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud del Tecnológico de Monterrey y del Laboratorio de Inmunología y Virología, respectivamente. Se cultivaron con medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibiótico al 1%, incubadas a 37°C con humedad relativa del 50% y una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

### **7.2 Preparación del tratamiento con curcumina**

La curcumina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) se disolvió en metanol para preparar un stock con una concentración de 1 mg/mL. Se mantuvo en refrigeración en un área oscura hasta su uso.

### **7.3 Concentraciones de gemcitabina**

Para las concentraciones de gemcitabina (Glenmark) se partió de una concentración de 256 µg/mL para realizar una curva dosis/respuesta (que va desde 1 a 256 µg/mL).

### **7.4 Transformación de bacterias calciocompetentes**

Se utilizó la cepa bacteriana de *Escherichia coli* DH5α vírgenes. Se activaron 50 µL de bacterias en 5 mL de caldo Luria Bertani (DIBICO, Cuautitlan Izcalli, Ciudad de México, México) y se incubaron a 37°C a 200 rpm toda la noche. Cumplido el tiempo, se tomaron 50 µL de la suspensión y se volvieron a sembrar las bacterias en un nuevo tubo con 5 mL de caldo LB hasta que las bacterias llegaran a la fase estacionaria. Posterior a esto, se tomó 1.5 mL del caldo bacteriano y se centrifugó en frío a 2,000 rpm por 10 min. Luego se retiró el sobrenadante y se agregó 400 µL de CaCl<sub>2</sub> [50 mM] por 1 min en hielo. Después, se desechó el sobrenadante y se agregó 20 µL de CaCl<sub>2</sub> y 100 ng del plásmido (se realizó una transformación con el plásmido obtenido de la construcción de la Dra. Diana Zamora, 2007) y se incubó en frío durante 1 hora para después realizar rápidamente

un choque térmico a 42°C por 1 min y de inmediato pasar nuevamente el tubo a 4°C. Por último, se adicionó 200 µL de caldo LB y se incubó a 37°C por 1 h.

### **7.5 Extracción de plásmido**

Se realizó una extracción de plásmido a pequeña escala con el kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, Lituania) para la extracción del plásmido de ARNi-WT1 para observar las tres conformaciones de este y su digestión con enzimas de restricción. Posteriormente, el plásmido de ARNi-WT1 se extrajo con el kit PureLink HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit (Invitrogen, Vilnius, Lituania) siguiendo las instrucciones del proveedor para ambos kits.

### **7.6 Digestión con enzimas de restricción**

En un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL se preparó una mezcla con un volumen final de 10 µL donde se agregó H<sub>2</sub>O, buffer 1X, 1 µg de ADN y 1U de enzima HindIII siguiendo este mismo orden y se dejó en incubación a 37°C durante 1 h. Posteriormente, el producto digerido y sin digerir se cargó en un gel de agarosa a 0.8% a 80 mV durante 40 min para visualizar la linealización del plásmido.

### **7.7 Nanopartículas de quitosano con ARNi-WT1/curcumina**

Las nanopartículas con ARNi-WT1/curcumina (NPQ/ARNi-WT1/cur), se prepararon siguiendo la metodología de Alvarez (2025), donde se hidrató quitosano durante un día con ácido acético al 0.1 M a una concentración final de 1 mg/mL. Posteriormente, se ajustó el pH del quitosano a 5 para luego centrifugar a 2,500 rpm por 5 min para remover los residuos. Luego, se agregaron 20 mL de quitosano a un vaso de precipitados y se añadió curcumina [1 mg/mL]. La mezcla se mantuvo a 900 rpm mientras se adicionó como agente reticulante el tripolifosfato de sodio (TPP) [2mg/ml] mezclado con la solución de ARNi-WT1 [10 µg/mL] a una relación de 1 gota cada 5 s., hasta completar un volumen de 4 mL. La suspensión obtenida se centrifugó a 3,000 rpm durante 15 min para obtener el sobrenadante con las nanopartículas.

Se realizaron evaluaciones de tamaño, carga e índice de polidispersión en el equipo Malvern Zetasizer Nano-ZS90 con un láser ‘rojo’ 4 mW 632.8 nm con un ángulo de detección de dispersión de 90°. El dispersante seleccionado fue el agua, cuyos valores de índice de refracción y viscosidad son de 1.330 y 0.8872, respectivamente. Con relación al quitosano, su índice de refracción es de 1.33 y la absorción de 0.001. Los resultados fueron arrojados por el Zetasizer Software, en donde se realizaron 3 mediciones de 11 corridas cada una.

Para medir el tamaño de partícula, se determinó mediante dispersión dinámica de luz. Se agregó la muestra diluida con agua bidestilada a una relación de 1:10, completando un volumen final de 1 mL para posteriormente colocarla en una celda de poliestireno. La carga superficial se evaluó a partir de un volumen de 1 mL de la muestra contenida en una celda capilar plegada DTS1070.

### 7.8 Ensayo de viabilidad celular

Se cultivaron 6,000 células en una placa de 96 pocillos durante 24 h. Los experimentos se realizaron por triplicado. Se formaron 8 grupos de tratamiento los cuales se representan en la **Tabla 1** y **2**.

Se aplicó como blanco nanopartículas de quitosano (NPQ), además de un control sin tratamiento.

**Tabla 1.** Principios activos empleados en células A549 a las 24, 48 y/o 72 h para determinar la concentración media inhibitoria.

Tratamientos	Dosis
Control	0
ARNi-WT1	0, 500, 800, 1000, 1200 ng ADN
Gemcitabina	0, 1, 2, 4, 8, 16, 128 y 256 µg/mL
NPQ/ARNi-WT1/cur	0, 200 ng ADN + 5 µM cur, 400 ng ADN + 10 µM cur, 800 ng ADN + 20 µM cur
NPQ	Misma cantidad equivalente al grupo de nanopartículas con curcumina y plásmido.

**Tabla 2.** Combinación de tratamientos sin y con gemcitabina aplicados en las líneas celulares de cáncer pulmonar a las 24, 48 y 72 h y a las 24 h, respectivamente.

<b>Concentración de NPQ/ARNi-WT1/cur</b>		
Plásmido ng	Curcumina $\mu$ M	
0	0	
200	5	
400	10	
800	20	
<b>Concentración de NPQ/ARNi-WT1/cur + gemcitabina</b>		
Plásmido ng	Curcumina $\mu$ M	Gemcitabina $\mu$ g/mL
0	0	30
300	7.5	22.5
600	15	15
900	22.5	7.5
1200	30	0

La prueba de viabilidad se realizó con el método de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Invitrogen, Eugene, OR, USA). Después de haber completado 20 h. de incubación, se aplicaron 20  $\mu$ L de MTT [5 mg/mL] y se incubaron por 4 h a 37°C. Luego, se agregó 100  $\mu$ L de DMSO durante 2-4 min y se agitó cuidadosamente. Las muestras se leyeron en un lector de placas a una longitud de onda de 570 nm. Los datos obtenidos se analizaron con la siguiente fórmula:

$$Viabilidad = \left( \frac{D.O. \text{ células tratadas}}{D.O. \text{ sin tratar}} \right) 100$$

Donde D.O. representa la densidad óptica.

### **7.9 Ensayo de hemólisis**

Se tomó sangre venosa de un paciente sano en un tubo con EDTA para posteriormente diluir 2 mL de sangre en 4 mL de solución salina estéril al 0.9% en un tubo cónico. Se centrifugó a 1,500 xg por 10 min y posteriormente se realizaron 3 lavados más

bajo las mismas condiciones. Luego, se tomaron los eritrocitos y se diluyeron en 2 mL de solución salina. Para cada muestra se tomaron 40  $\mu$ L de la solución y se agregó 960  $\mu$ L de solución salina en un tubo nuevo de microcentrífuga. Se les aplicó la dosis correspondiente y se incubaron en agitación por 2 h a 37°C a 100 rpm. Para el control negativo y positivo se tomaron 30  $\mu$ L de la suspensión de eritrocitos y se diluyeron con 970  $\mu$ L de solución salina (control negativo) o agua destilada (control positivo) y se continuó con el mismo proceso de incubación.

Por último, se centrifugaron las muestras 10,000 xg por 5 min y se transfirió 100  $\mu$ L del sobrenadante a una placa de 96 pocillos.

Se leyó la absorbancia a 540 nm y los datos obtenidos se procesaron con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Hemólisis} = \left( \frac{\text{Abs grupo experimental} - \text{Abs grupo negativo}}{\text{Abs control positivo} - \text{Abs control negativo}} \right) 100$$

#### **7.10 Extracción de ARN**

Para cada línea celular, se cultivaron 350,000 células en placas de 6 pozos durante 24 h con NPQ/ARNi-WT1/cur, gemcitabina, en combinación y los controles. A cada muestra se le agregaron 500  $\mu$ L de TRIzol (Molecular Research Center, Inc., Montgomery Rd Cincinnati, OH, EUA) para una lisis celular y se homogenizó durante 5 min a temperatura ambiente. Luego se adicionó 200  $\mu$ L de cloroformo (ICN Biomedicals Inc., South Chillicothe Road Aurora, OH, EUA), se agitó vigorosamente, se dejó reposar durante 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 xg por 15 min. Posteriormente, la fase acuosa donde contiene el ARN, se transfirió a un tubo de microcentrífuga para luego mezclar con 500  $\mu$ L de isopropanol (ICN Biomedicals Inc, South Chillicothe Road Aurora, OH, EUA) y dejar incubar a temperatura ambiente durante 10 min para después centrifugar a 12,000 xg por 8 min. El pellet obtenido se lavó con etanol al 75% (Alcoholera de Zapopan, Zapopan, Jalisco, México) y se centrifugó a 7,500 xg por 5 min. Finalmente, el pellet de ARN se dejó secar por 5 min, se re-suspendió con 50  $\mu$ L de agua inyectable (Laboratorios Pisa, Guadalajara, Jalisco, México) y se incubó a 55°C por 10 min.

La concentración de ARN se midió en un nanómetro (NanoDrop Spectrophotometer ND-1000) con una longitud de onda de 260 nm. Se consideró una muestra pura si su índice de pureza  $A_{260}/A_{280}$  es de  $\sim 2.0$ .

### 7.10.1 Generación de ADNc

Se utilizó el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania). Para cada muestra se tomó 600 ng de ARN y a cada una se le agregó una solución de un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ , la cual contenía 4  $\mu\text{L}$  de 5X Reaction Buffer, 2  $\mu\text{L}$  de 10 mM dNTP Mix, 1  $\mu\text{L}$  de Random Hexamer Primer, 1  $\mu\text{L}$  de RevertAid RT (200 U/  $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de Oligo dT<sub>18</sub> primer, 1  $\mu\text{L}$  de RiboLock RNAsa Inhibitor, H<sub>2</sub>O y la muestra correspondiente. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler) bajo las condiciones siguientes: 60 min a 42°C y 5 min a 70°C a lo largo de 1 ciclo.

### 7.10.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la amplificación de cada gen se etiquetaron tubos de microcentrífuga correspondientes a cada muestra. A cada tubo se le agregó 10  $\mu\text{L}$  de Buffer 5X, 4  $\mu\text{L}$  de MgCL<sub>2</sub> 25 mM, 0.05  $\mu\text{L}$  de dNTP 10 mM, 0.5  $\mu\text{L}$  de Taq 5 U/  $\mu\text{L}$  y 1  $\mu\text{L}$  de Primer Forward 10 mM, 1  $\mu\text{L}$  de Primer Reverse 10 mM (secuencia mostrada en la **Tabla 3**), H<sub>2</sub>O (Promega, Madison, WI, USA) y 1,500 ng de muestra, para un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ . Las condiciones de amplificación se muestran en la **Tabla 4**.

**Tabla 3.** Secuencias de cebadores.

Gen	Cebador	Tamaño
<b>WT1</b>	Forward 71: 5' CACATGAGAGAAACGCCCTTCATGTG	166
	Reverse 72: 5' TTTGAGCTGGTCTGAACGAGAAA	
<b>G3PDH</b>	Forward: 5' ACCACAGTCCATGCCATCAC	452
	Reverse: 5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA	

**Tabla 4.** Condiciones de amplificación.

<b>Gen</b>	<b>Desnaturalización</b>	<b>Hibridación</b>	<b>Elongación</b>	<b>Ciclos</b>
<b>WT1</b>	94°C - 40 s.	64°C - 30 s.	72°C - 30 s.	35
<b>G3PDH</b>	94°C – 40 s	60.5°C – 30 s	72°C – 30 s	35

### **7.10.3 Electroforesis**

Los amplicones de los genes se visualizaron en un gel de agarosa al 1.2%, el cual contenía 20 mL de Buffer SB al 1X y 0.24 gramos de agarosa (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Se disolvió 0.8 µL de bromuro de etidio en la solución de agarosa y se dejó solidificar a temperatura ambiente.

El gel se colocó en la cámara. Se cargaron las muestras con buffer de carga en una relación 3:1 y 2 µL del marcador de peso molecular. Las condiciones de corrimiento fueron de 100 mV durante 25 min. Posteriormente, el gel se visualizó en un equipo con luz UV (Spectroline BI-O-Vision™).

### **7.11 Apoptosis con Anexina V y 7-AAD**

Las líneas celulares se cultivaron en placas de 6 pozos a una densidad de 270,000 células/mL y se les aplicó los tratamientos al día siguiente. Posterior a 24 h., se tomó el sobrenadante de cada muestra y se centrifugó a 2,000 rpm por 10 min. Luego, se levantó la monocapa de células con 500 µL de tripsina, se neutralizaron con 500 mL de DMEM y se siguió el mismo proceso de centrifugación. Cada muestra celular se resuspendió con 100 µL de binding buffer 1X.

Se preparó un stock que contenía 5 µL de anexina V (BD Biosciences), 5 µL 7-AAD (BD Biosciences) por muestra y se le agregó a cada pellet. Se mezcló gentilmente cada tubo y se incubaron durante 15 min en oscuridad a temperatura ambiente y finalmente se añadió 400 µL de binding buffer 1X.

Las muestras se procesaron en un citómetro BD FACSCanto™ II en un lapso de 1 h.

### **7.12 Ensayo de fragmentación**

Para cada tratamiento y control, se utilizó un frasco de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> y se aplicaron las NPQ/ARNi-WT1/cur y los controles cuando alcanzaron el 90% de confluencia. Se incubaron durante 24 h a 37°C y posteriormente se recolectó en un tubo de microcentrífuga el medio de cultivo. Se centrifugó a 5,000 rpm por 5 min y se eliminó el sobrenadante. Se agregaron 500 µL de tampón de lisis al pellet celular. En los frascos de cultivo se adicionó 500 µL de tampón de lisis y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Una vez pasados los 10 min, se recolectaron las células lisadas y se agregaron al tubo de microcentrífuga en donde se encontraban las células resuspendidas en el medio de cultivo. Luego, para la desnaturalización de las proteínas, se incubó el tubo a 65°C por 5 min y se enfrió a temperatura ambiente por 5 min. Después, se agregó 700 µL de cloroformo-alcohol isoamílico, se mezcló suavemente y rápidamente se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min. Se tomó la fase acuosa y se pasó a un nuevo tubo. Posteriormente, en el tubo nuevo se agregó un volumen igual de isopropanol frío, se mezcló suavemente por inversión y se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min. Luego, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet de ADN al aire por 10 min. Pasado este tiempo, el pellet se disolvió en 50 µL de agua destilada y se cuantificó la concentración y pureza del ADN en un espectrofotómetro, donde se considera puro si la relación  $A_{260}/A_{280}$  es de 1.8 a 2.0 y si la relación  $A_{260}/A_{230}$  es de 2.0 a 2.2.

Las muestras se cargaron a una relación 3:1 con buffer de carga en un gel de agarosa al 1.5% con 0.8 µL de bromuro de etidio y se corrieron a 80 mV durante 45 min. El gel se visualizó en un transiluminador con luz UV.

### **7.13 Microscopia de fluorescencia con DAPI y PI**

En una placa de 6 pozos, se colocó un cubreobjetos estéril y se cultivaron 350,000 células durante 24 h. Después, se aplicaron las NPQ/ARNi-WT1/cur y como controles se aplicó DMSO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y un pozo sin tratamiento. Se incubaron durante 24 h y posteriormente se retiraron los cubreobjetos y se dejaron secar (en este caso no se lavaron las células ni se permeabilizaron y fijaron debido a que esto provocaría una muerte en ellas y habría marcado un falso positivo). Luego, se agregó en el cubreobjetos yoduro de

propidio (partiendo de un stock de 1 mg/mL y se diluyó 1:1000 con H<sub>2</sub>O) gota a gota y posteriormente se aplicó el colorante DAPI (diluido 1:1000). Se incubó por 5 min a 37°C en oscuridad y después se visualizaron en un microscopio invertido de fluorescencia.

#### **7.14 Ensayo de migración de herida por rasguño**

Se cultivaron 400,000 células en una placa de 6 pozos durante 24 h. Cuando las células alcanzaron el 90% de confluencia, se trazó una línea vertical con la punta de una pipeta, se reemplazó el medio de cultivo por DMEM sin suero y se administró el tratamiento a cada pozo. Después se visualizó el área marginal y la distancia relativa del rasguño bajo un microscopio invertido (Olympus IX51). Se tomaron fotos a las 6, 12, 24 h y 48 h., se calculó el área y distancia del área lesionada a través del programa ImageJ con el macros Wound healing size tool y se comparó con la imagen cuando se administró el tratamiento a las 0 h.

La fórmula utilizada para calcular el cierre de herida fue la siguiente:

$$\% \text{ Cierre de herida} = \left( \frac{\text{Area inicial} - \text{Area final}}{\text{Area inicial}} \right) 100$$

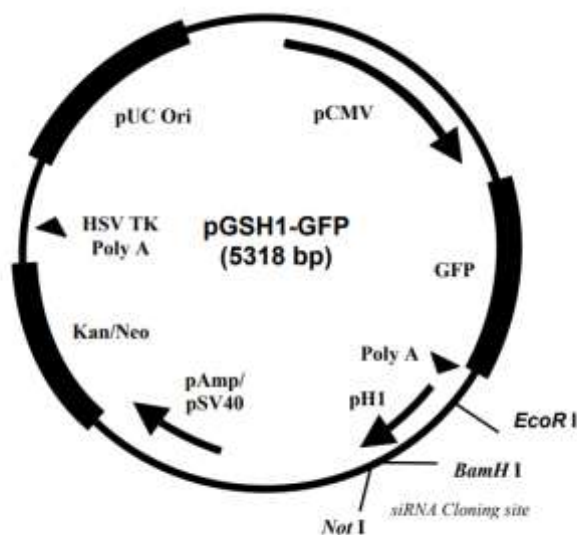
#### **7.15 Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó con Microsoft Excel y GraphPad Prism (versión 9.0.0). Para las pruebas de viabilidad se realizó un análisis de varianza ANOVA bidireccional seguido de una prueba *post-hoc* de comparaciones múltiples de Dunnett donde todas las muestras se compararon contra el control. En el caso de la prueba de viabilidad de la combinación de tratamientos se realizó una prueba de normalidad y posteriormente un ANOVA unidireccional con comparaciones múltiples de Dunnett. El ensayo de hemólisis se sometió a un ANOVA unidireccional seguido de una prueba T de Tukey para comparar las muestras entre sí. Todas las muestras fueron normales. Se consideraron que valores  $p < 0.05$  mostraban diferencias estadísticamente significativas.

## 8 RESULTADOS

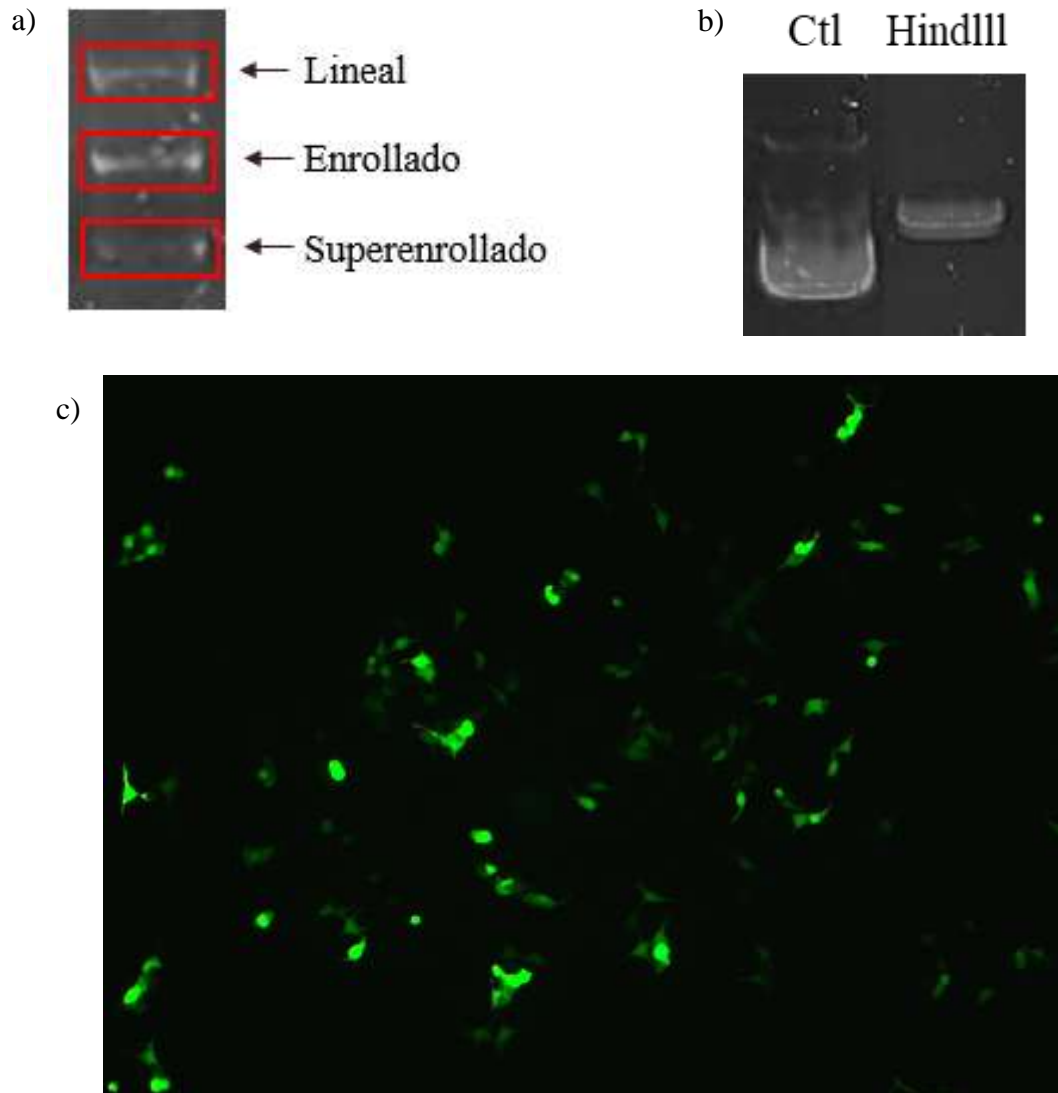
### 8.1 Caracterización del plásmido pGSH1-GFP WT1

La construcción del plásmido fue diseñada y aprobada anteriormente por la Dra. Diana Zamora (2005) denominado plásmido 5-6. La secuencia de ARNi contra WT1 fue ligada al plásmido de expresión pGSH1-GFP (**Fig. 2**) y se transformaron bacterias calcio competentes DH5 $\alpha$ .



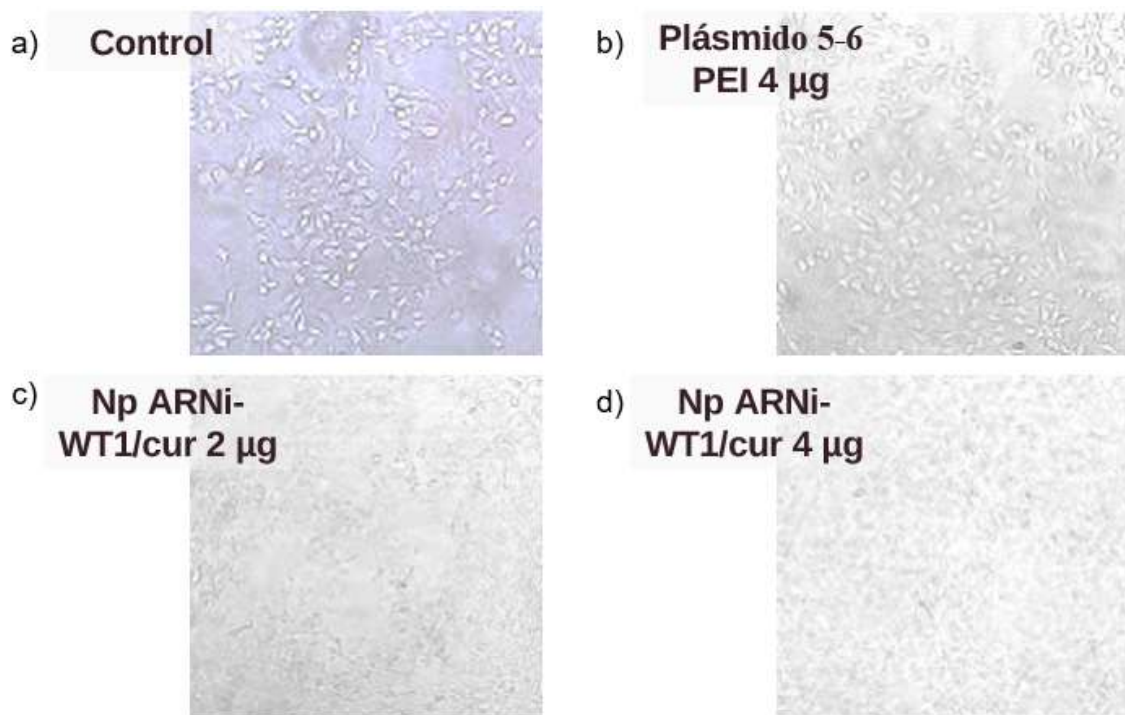
**Figura 2.** Mapa del plásmido de expresión pGSH1-GFP.

Se realizó una extracción del plásmido a pequeña escala (**Fig 3a**) y posterior digestión del plásmido 5-6 con la enzima de restricción HindIII. (**Fig. 3b**). Luego, se transfectó con polietilenimina (PEI) en células B16F10 y se visualizó bajo un microscopio de fluorescencia para determinar la presencia de la proteína verde fluorescente (GFP) contenida en el constructo (**Fig. 3c**).



**Figura 3.** a) Conformaciones del plásmido 5-6 extraído a través de un miniprep. b) Digestión del plásmido con la enzima de restricción HindIII. Se observa el plásmido linealizado al digerir en la horquilla pequeña de la secuencia ubicada en el sitio de clonación. c) Expresión de la proteína GFP en células B16F10 transfectadas con el plásmido y PEI como vehículo de transfección.

Asimismo, se realizó un comparativo con la línea celular B16F10 en donde se empleó el plásmido 5-6 desnudo y el plásmido contenido en nanopartículas de quitosano con curcumina para observar la morfología de las células. Se puede apreciar que en ambos grupos donde se aplicaron las nanopartículas se muestra una pérdida de la morfología en comparación con el grupo con el plásmido 5-6/PEI y el control (**Fig. 4**).



**Figura 4.** Morfología de células B16F10 con el plásmido 5-6 o encapsulado junto con curcumina. a) Células sin transfectar. b) Células transfectadas con 4 µg del plásmido 5-6 usando PEI. c y d) Células transfectadas NPQ/ARNi-WT1/cur donde se aplicaron 2 y 4 µg, respectivamente.

## 8.2 Caracterización de la formulación de nanopartículas de quitosano

Se realizaron dos tipos de nanopartículas de quitosano: cargadas con curcumina y con el plásmido 5-6 (ARNi-WT1) y solas (NPQ). Las características de tamaño, potencial Z y polidispersión se ven representadas en la **Tabla 5** y **Figura 5**.

**Tabla 5.** Determinación de tamaño, potencial Z y polidispersión de nanopartículas de quitosano y cargadas con los principios activos.

Nanopartícula	Tamaño (nm)	Potencial Z (mV)	Polidispersión
Quitosano	160.2 ± 3.80	16.5 ± 5.45	0.367 ± 0.059
ARNi-WT1/curcumina	209.3 ± 9.44	15.8 ± 7.03	0.372 ± 0.019

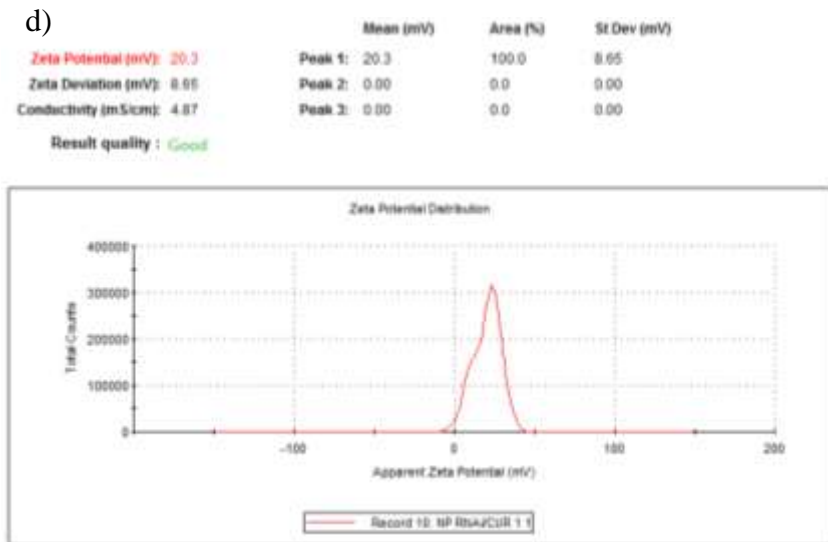
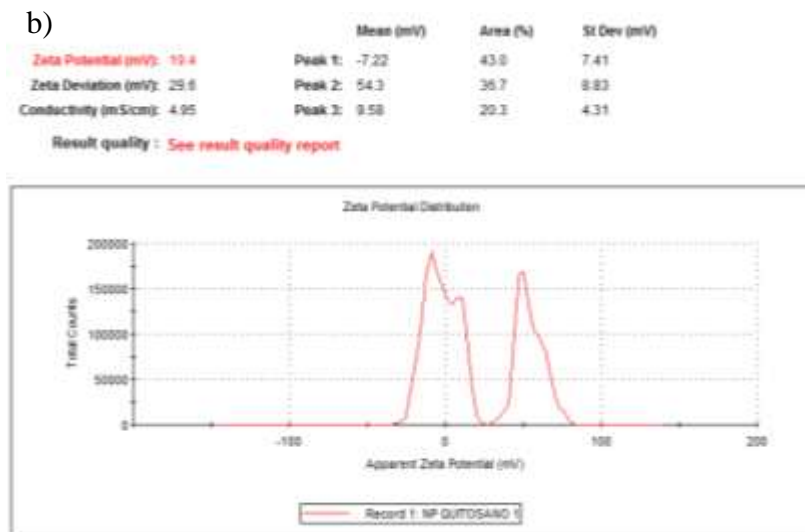
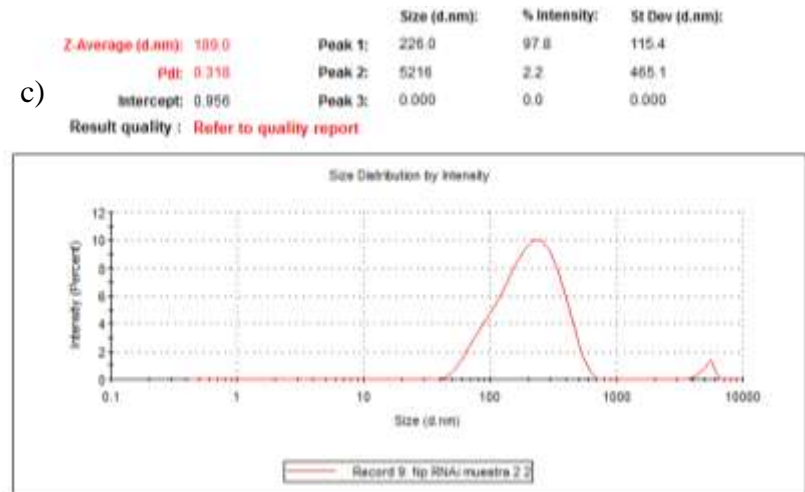
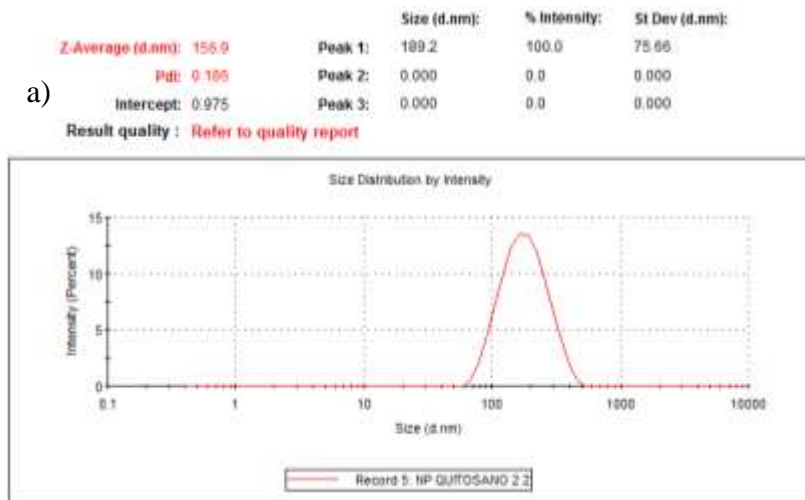
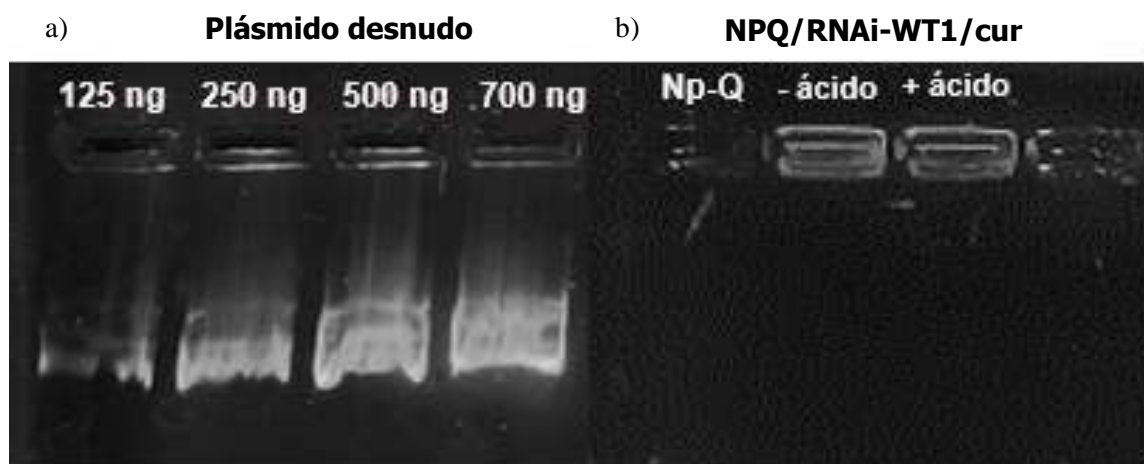


Figura 5. Características métricas de los complejos nanoencapsulados con quitosano. NPQ a) y b). NPQ/ARNi-WT1/cur c) y d).

Posteriormente, se analizó la eficiencia de unión y liberación del ADN plasmídico al quitosano mediante un ensayo de retardo en gel de electroforesis, donde las nanopartículas fueron incubadas con agua y con ácido acético pH 3 (**Fig. 6b**), este último para liberar el ADN del quitosano. Se observó que el ADN se unió al quitosano, pero que el plásmido no se liberó de las nanopartículas al aplicar ácido.



**Figura 6.** a) Curva de distintas concentraciones del plásmido desnudo. b) Encapsulación del plásmido ARNi-WT1. Carril 1: nanopartículas de quitosano diluidas en ácido acético; carril 2: NPQ/ARNi-WT1/cur diluidas en agua; carril 3: NPQ/ARNi-WT1/cur diluidas en ácido acético. Gel de agarosa al 0.8%.

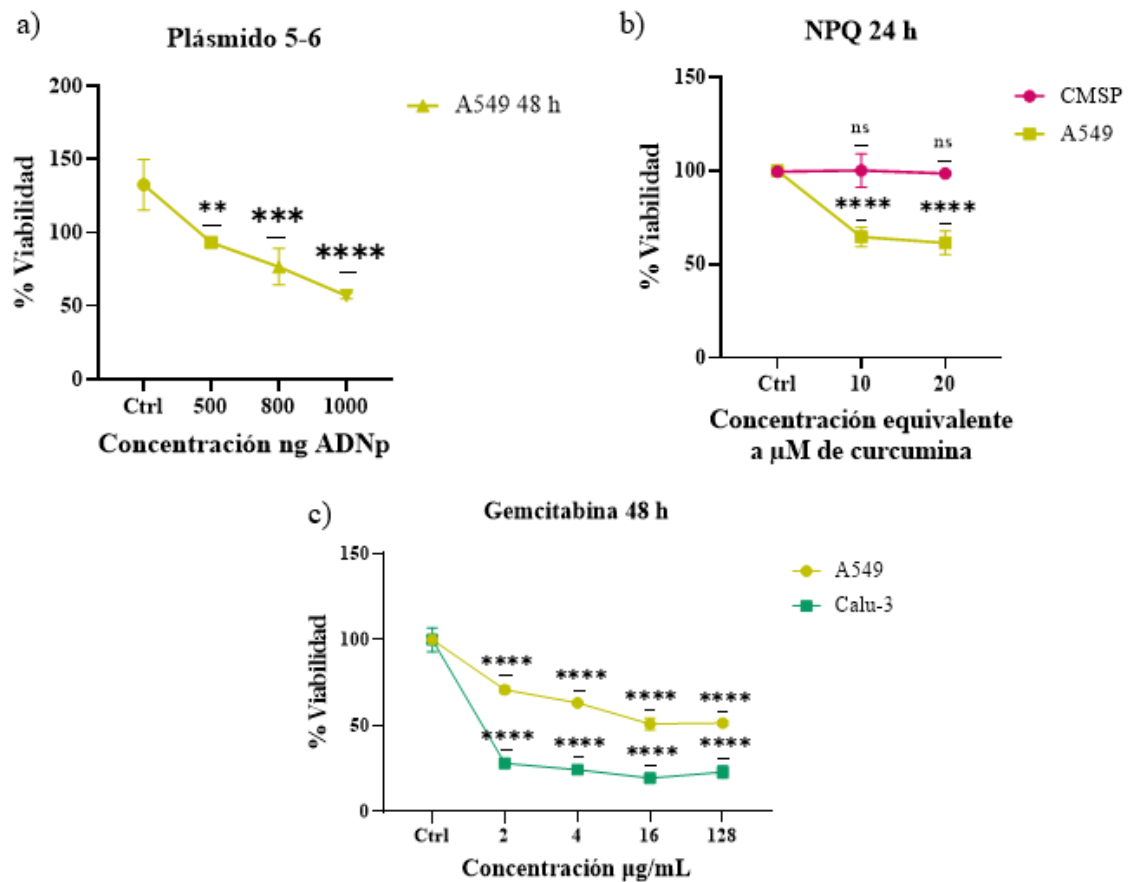
Con respecto al porcentaje de eficiencia de encapsulación (%EE) del ADN en la nanopartícula, se registró un porcentaje del 93.57% EE.

### 8.3 Determinación de la concentración media inhibitoria de la formulación de nanopartículas

Se organizaron seis grupos de tratamiento para evaluar cada compuesto por separado (**Tabla 1**) y en conjunto (**Tabla 2**).

Las dosis de gemcitabina se aplicaron durante 48 h y se determinó la concentración media inhibitoria ( $IC_{50}$ ), siendo esta de 16  $\mu\text{g/mL}$  de gemcitabina para las células A549. En vista de que las células mostraron una dosis alta media inhibitoria, se probó la línea celular Calu-3 para determinar el efecto de la gemcitabina en esta línea, donde la dosis

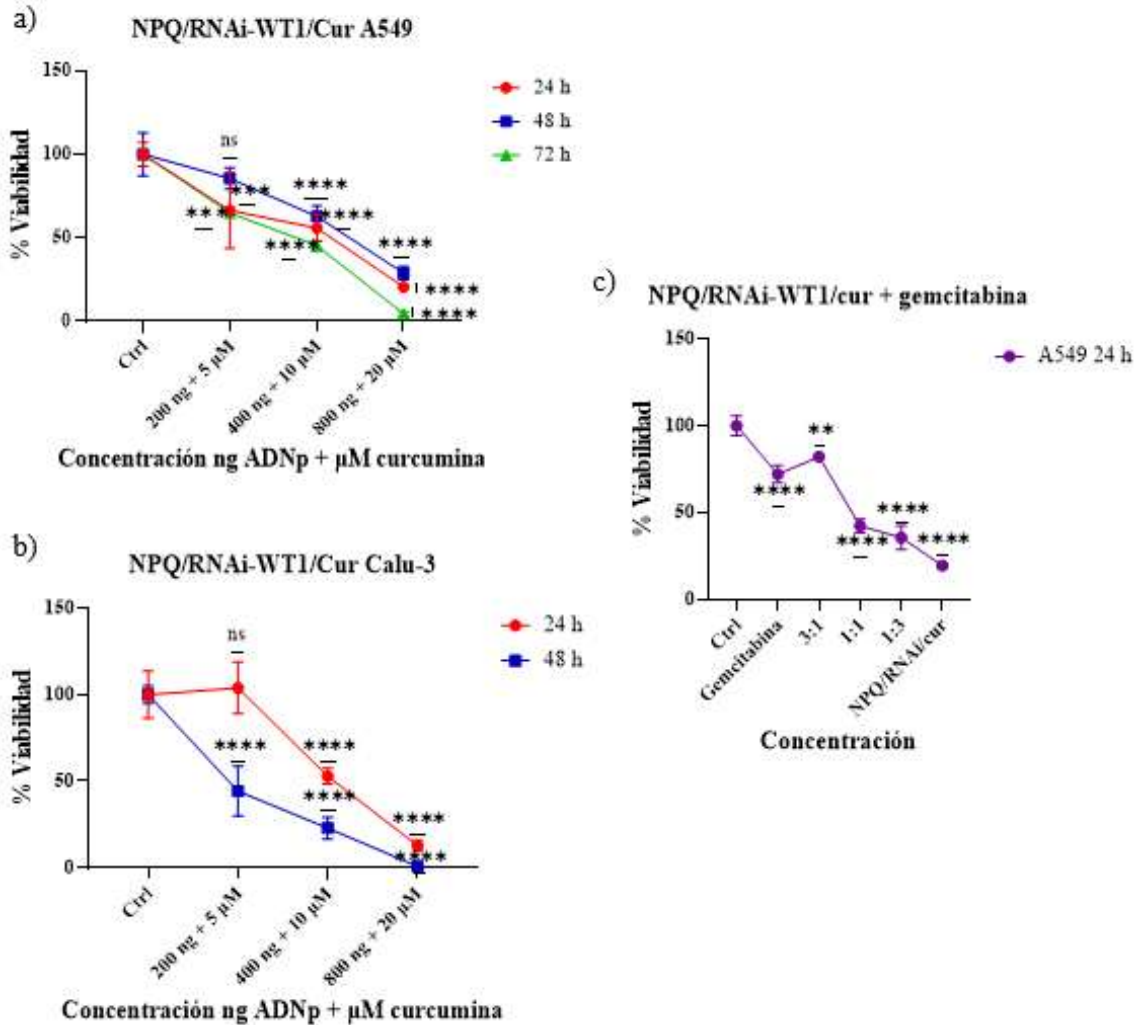
menor probada de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  indicó un porcentaje de viabilidad de 28.24% (**Fig.7c**) Lo cual demuestra que la línea celular A549 es más resistente a este fármaco. Para el tratamiento del plásmido 5-6 transfectado con PEI en células A549 se registró una  $\text{IC}_{50}$  de 1.086  $\mu\text{g}$  a las 48 h. (**Fig. 7a**) (debido a que el plásmido manifiesta su mayor expresión a este tiempo). Por otro lado, se evaluó la citotoxicidad de las NPQ en las células A549 y células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Se data una citotoxicidad dependiente de la concentración en las células cancerosas, mientras que en las CMSP no hubo un efecto citotóxico significativo (**Fig. 7b**).



**Figura 7.** Porcentajes de viabilidad de las células A549 y Calu-3. a) Células A549 tratadas con el plásmido 5-6 desnudo transfectadas con PEI. b) CMSP tratadas con NPQ a las 24 h y A549 con el mismo tratamiento a las 24 y 72 h. c) Células A549 y Calu-3 tratadas con gemcitabina. \*\* $P < 0.05$  \*\*\* $P < 0.005$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , ns: no significativo.

Por otro lado, las NPQ/ARNi-WT1/cur de la **Tabla 1** mostraron en las células A549 una  $IC_{50}$  de 468.87 ng de ADNp y 11.72  $\mu$ M de curcumina a las 24 h, mientras que a las 48 h fue de 624.11 ng de ADNp y 15.6  $\mu$ M de curcumina y a las 72 h fue de 254.95 ng de ADN y 6.37  $\mu$ M de curcumina, lo cual indica que el tratamiento es dosis y tiempo dependiente (**Fig. 8a**). De igual forma, se emplearon células Calu-3 para comparar la citotoxicidad de los nanocomplejos, mostrando una  $IC_{50}$  de 413.97 ng de ADNp y 10.34  $\mu$ M de curcumina a las 24 h; en cambio, a las 48 h, la  $IC_{50}$  obtenida fue de 181.6 ng de ADNp y 4.54  $\mu$ M de curcumina (**Fig. 8b**).

Partiendo de los datos obtenidos, se optó para tomar como punto medio de referencia la  $IC_{50}$  de las NPQ/ARNi-WT1/cur y gemcitabina a las 48 h en A549, siendo esta de 624.11 ng de ADNp, 15.6  $\mu$ M de curcumina y 15  $\mu$ g/mL de gemcitabina. Se aplicaron las dosis expuestas en la **Tabla 2**. Al combinar las Np ARNi-WT1/cur con gemcitabina se data que a una relación 1:1 se ve un efecto citotóxico del 57.63%, donde se aplicaron 600 ng de ADNp + 15  $\mu$ M de curcumina y 15  $\mu$ g/mL de gemcitabina a las 24 h., siguiendo una tendencia en donde conforme va subiendo la concentración de Np ARNi-WT1/cur, va disminuyendo el porcentaje de viabilidad de las células. Esto nos indica una  $IC_{50}$  de 577.31 ng de ADNp + 14.42  $\mu$ M de curcumina y 15.41  $\mu$ g/mL de gemcitabina en las células A549 a las 24 h (**Fig. 8c**), lo cual señala una dosis similar de Np ARNi-WT1/cur y gemcitabina administrada de forma individual a este mismo tiempo.

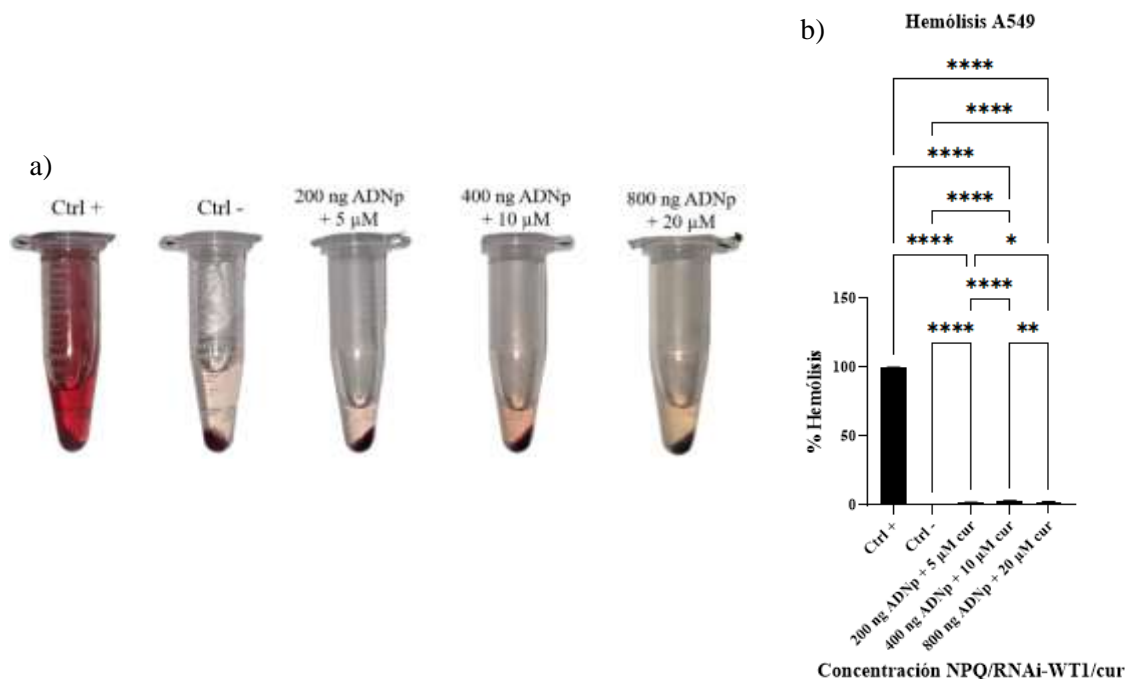


**Figura 8.** Porcentajes de viabilidad de las células A549 y Calu-3 tratadas con la combinación de compuestos activos. a) y b) Células A549 y Calu-3 tratadas con NPQ/ARNi-WT1/cur, respectivamente. c) Células A549 tratadas con la combinación de NPQ/ARNi-WT1/cur + gemcitabina. \*\* $P < 0.05$  \*\*\* $P < 0.005$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , ns: no significativo.

#### 8.4 Ensayo de hemólisis

Para asegurar que el formulado de NPQ/ARNi-WT1/cur no indujera lisis de los eritrocitos, se evaluó el efecto hemolítico mediante medición espectrofotométrica de la liberación de hemoglobina tras la exposición de las distintas dosis probadas en los ensayos de viabilidad. Se utilizó como control positivo agua destilada, mientras que el control negativo fue solución salina 0.9% (**Fig. 9a**). Las concentraciones empleadas muestran una

actividad hemolítica inferior al 4%, siendo de 1.7% para una concentración de 200 ng ADNp + 5  $\mu$ M curcumina, 3.18% para 400 ng ADNp + 10  $\mu$ M curcumina y de 2.35% para 800 ng ADNp + 20  $\mu$ M curcumina (**Fig 9b**).



**Figura 9.** Porcentaje de hemólisis de NPQ/ARNi-WT1/cur. a) Eritrocitos tratados con NPQ/ARNi-WT1/cur. b) Porcentaje de hemólisis inducido por el tratamiento. Control positivo: agua destilada, control negativo: solución salina 0.9%. Absorbancia 540 nm. \*P < 0.05, \*\*P < 0.005, \*\*\*\*P < 0.0001.

### 8.5 Índice de combinación entre NPQ-ARNi/cur y gemcitabina

Los valores del índice de combinación indican si una interacción entre fármacos tiene un efecto antagonístico (>1), aditivo (0.9-1.1) o sinérgico (<1). Se evaluó el efecto de la interacción de distintas concentraciones de gemcitabina y NPQ/ARNi-WT1/cur a una relación 3:1, 1:1 y 1:3, respectivamente, en el software de CompuSyn. Se aprecia que únicamente la dosis 3:1 -donde predomina una concentración superior de gemcitabina- indica una respuesta antagonística, mientras que una relación 1:1 y 1:3 entre gemcitabina y NPQ/ARNi-WT1/cur muestra un efecto sinérgico, es decir, el efecto inhibitorio de los fármacos es mayor al aplicarse juntos que por separado (**Tabla 6**).

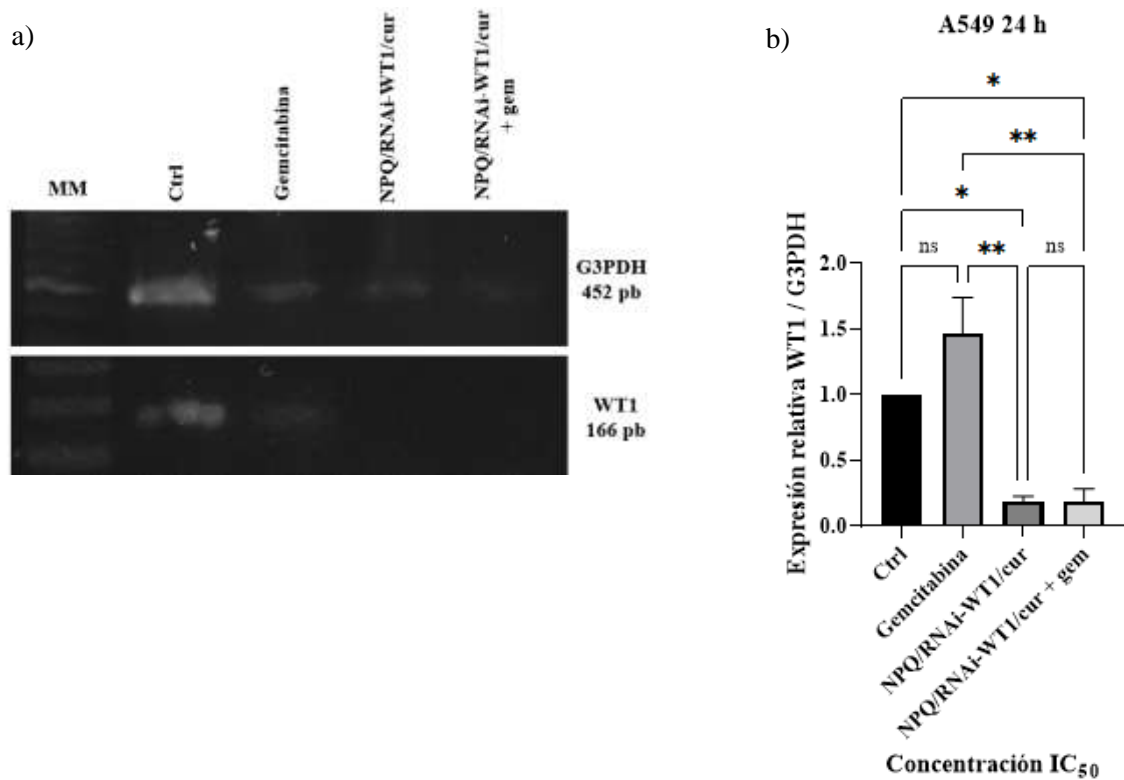
**Tabla 6.** Índice de combinación entre NPQ/ARNi-WT1/cur y gemcitabina en A549 a las 24 h.

Dosis	Valor CI	Interpretación
Gem + Np 3:1 (22.5 µg/mL de gemcitabina + 300 ng de ADNp y 7.5 µM de curcumina)	3.19	Antagonismo
Gem + Np 1:1 (15 µg/mL de gemcitabina + 600 ng de ADNp y 15 µM de curcumina)	0.05	Sinergismo
Gem + Np 1:3 (7.5 µg/mL de gemcitabina + 900 ng de ADNp y 22.5 µM de curcumina)	0.05	Sinergismo

Al observar los resultados anteriormente presentados, para los siguientes experimentos se decidió aplicar la dosis menor de gemcitabina y NPQ/ARNi-WT1/cur con la cual se obtuviera un efecto citotóxico mayor al 50% y un efecto sinérgico, siendo esta la relación 1:1. Se aplicó esta misma dosis con las drogas en conjunto y por separado.

### 8.6 Expresión de WT1

El ARN total fue aislado de las células A549 tratadas con las dosis previamente descritas de gemcitabina, NPQ/ARNi-WT1/cur, NPQ/ARNi-WT1/cur + gemcitabina y un control sin tratamiento. Se evaluó la expresión a nivel transcripcional de WT1 y G3PDH a través de una PCR punto final (**Fig. 10a**) y se analizó la expresión relativa WT1/G3PDH mediante la densidad de las bandas generadas. Los resultados muestran una inhibición del 81.56 y 81.26% de la expresión de WT1 en los grupos tratados con NPQ/ARNi-WT1/cur y NPQ/ARNi-WT1/cur + gemcitabina, respectivamente. En cambio, el tratamiento con gemcitabina mostró un aumento del 46.45% de la expresión de WT1 en comparación con el control (**Fig.10b**)

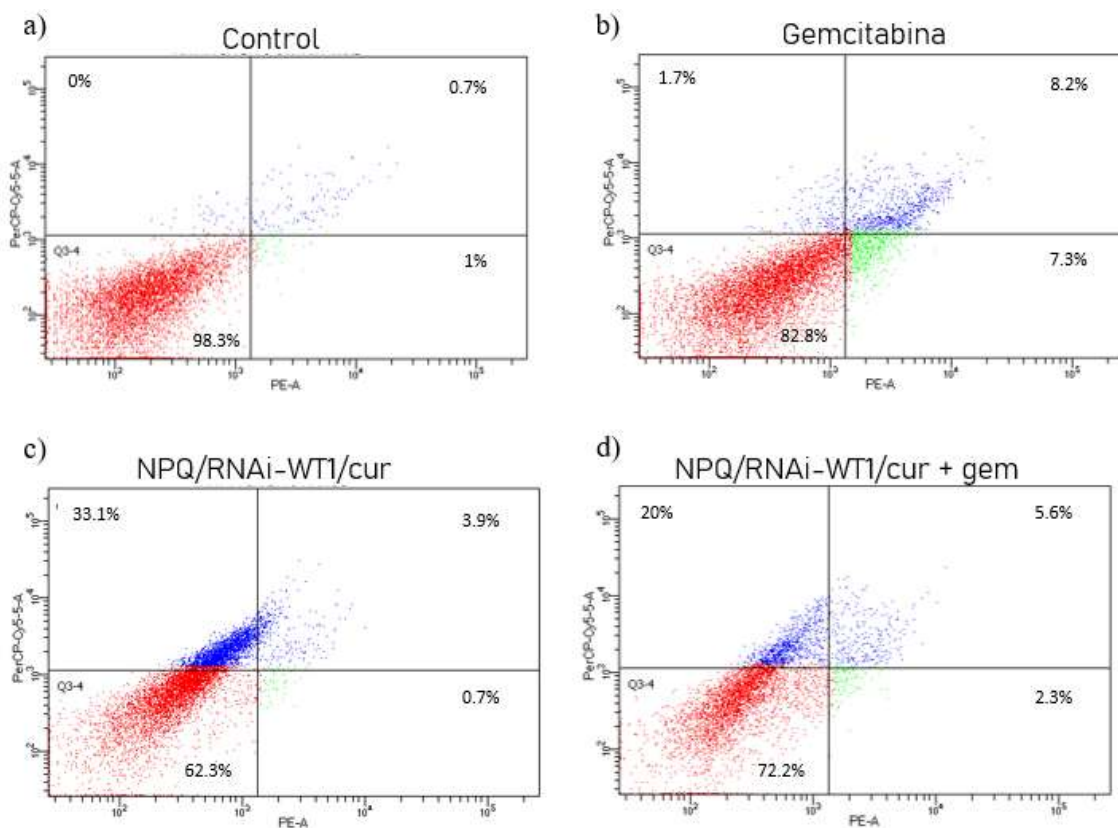


**Figura 10.** Expresión a nivel transcripcional de WT1. a) Visualización de bandas de G3PDH y WT1 con los tratamientos de la IC<sub>50</sub> de gemcitabina, NPQ/ARNi-WT1/cur y NPQ/ARNi-WT1/cur + gem. b) Expresión relativa de WT1/G3PDH. \*P<0.05, \*\*P<0.005, ns: no significativo.

### 8.7 Análisis del porcentaje de unión de Anexina V y 7-AAD

Para evaluar el efecto del tratamiento combinado sobre la inducción de apoptosis, se realizó un ensayo de citometría de flujo utilizando Anexina V y 7-AAD. Las células con positividad para Anexina V se considera apoptosis temprana, mientras que las células con positividad para 7-AAD se clasifican como necrosis y, las poblaciones celulares con positividad para ambos fluorocromos se identifican como apoptosis tardía. Las células A549 tratadas con gemcitabina mostraron un mayor porcentaje de positividad para 7-AAD y Anexina V en conjunto que únicamente para Anexina V, siendo estos porcentajes del 8.2 y 7.3%, respectivamente, mientras que el 1.7% de la población fue positiva para 7-AAD (**Fig. 11b**). Por otro lado, las células tratadas con NPQ/ARNi-WT1/cur y la combinación de estas con el quimioterapéutico mostraron resultados similares, puesto que ambos grupos presentaron positividad para 7-AAD y un bajo porcentaje para la unión de ambos fluorocromos. El grupo tratado solamente con NPQ/ARNi-WT1/cur presentó un

porcentaje de 33.1% para positividad a 7-AAD, 0.7% para positividad a Anexina V y 3.9% para ambos fluorocromos (**Fig. 11c**). En cuanto al grupo tratado con la combinación de ambos fármacos, se resalta una positividad menor a 7-AAD en comparación con el monofármaco nanoencapsulado, puesto que presenta un 20% para 7-AAD, un 2.3% para Anexina V y un 5.6% para el doble marcaje (**Fig. 11d**).

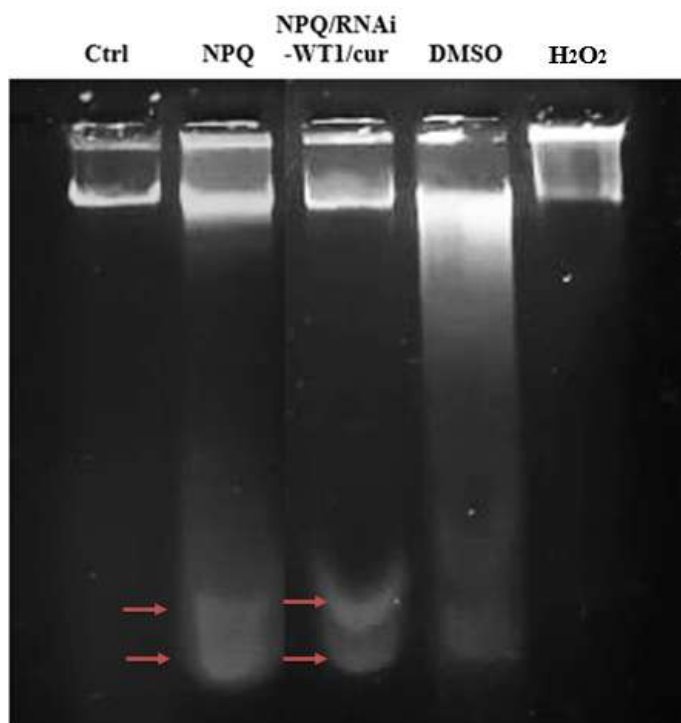


**Figura 11.** Efecto del tratamiento combinado sobre la inducción de apoptosis.

### 8.8 Ensayo de fragmentación

Dado los resultados anteriores, se procedió a realizar un ensayo de fragmentación confirmatorio, donde se puede visualizar la fragmentación de ADN característico de la apoptosis celular. Se trataron las células A549 con NPQ y NPQ/ARNi-WT1/cur para descartar la posibilidad de una necrosis o una apoptosis. Los controles fueron tratados con DMEM 10% SFB + 1% antibiótico, DMSO para causar necrosis celular y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para

apoptosis. Los resultados señalan fragmentación del ADN cuando se aplican los dos tipos de nanopartículas, por tanto, esto es indicativo de una apoptosis (**Fig. 12**).

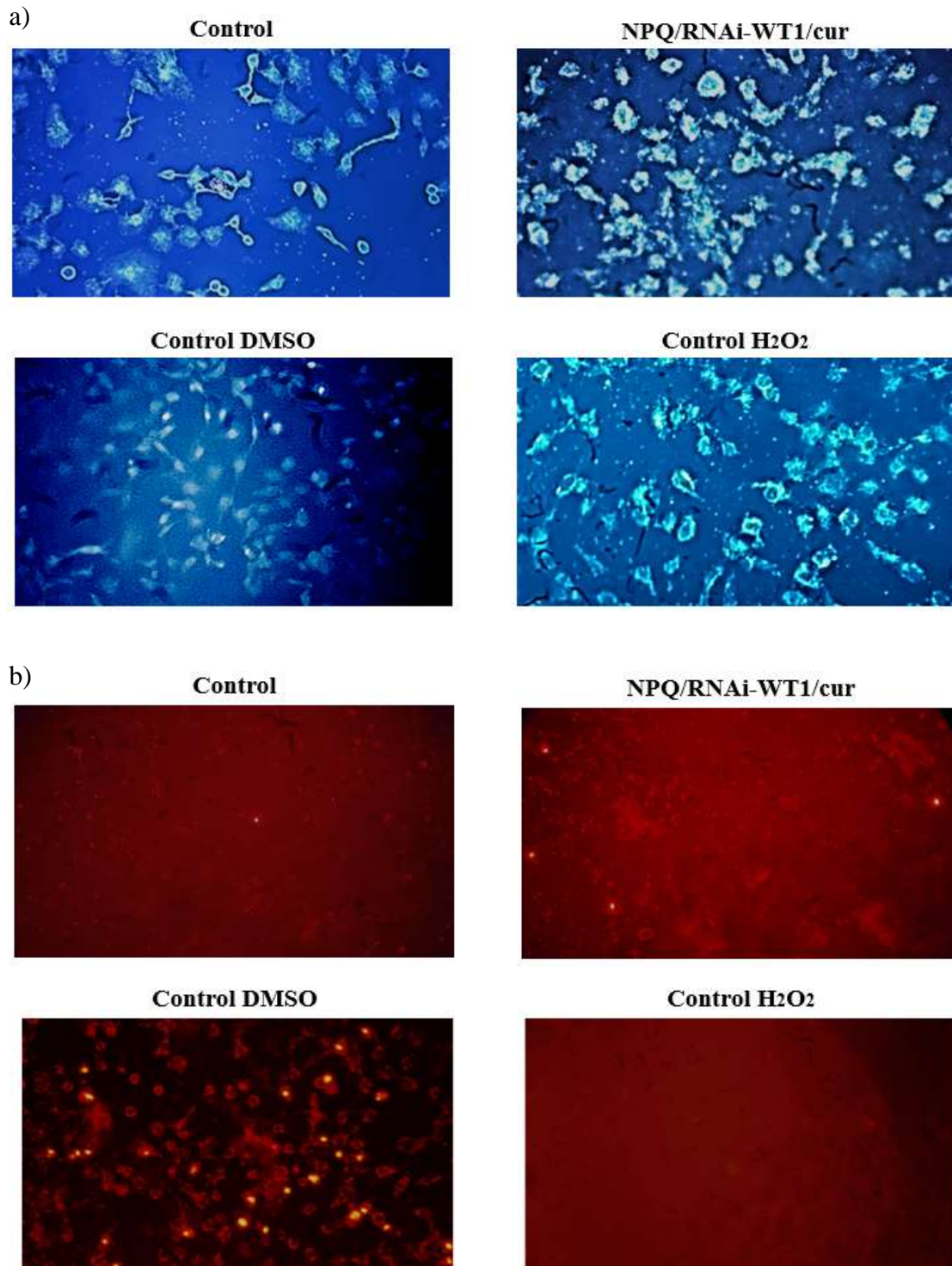


**Figura 12.** Ensayo de fragmentación de ADN. El ADN de las células A549 se encuentra fragmentado cuando es tratado con NPQ y NPQ/ARNi-WT1/cur.

### 8.9 Análisis de apoptosis/necrosis con microscopia de fluorescencia

Para confirmar que el ADN de las células A549 tratadas con las NPQ/ARNi-WT1/cur no fuera expuesto y exhibiera una necrosis, se realizó un ensayo con microscopia de fluorescencia donde se utilizó DAPI para marcar los núcleos de las células y PI para marcar el ADN donde hubo una ruptura de la membrana nuclear (**Fig. 13**). Las células tratadas con las nanopartículas y las tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (control para apoptosis) y marcadas con DAPI muestran la presencia de núcleos, sin embargo, estos no se encuentran bien definidos y se aprecia la presencia de vacuolas alrededor de las células en comparación al control con medio de cultivo. Por otro lado, el marcaje con PI muestra una mayor tinción en las células tratadas con DMSO (control para necrosis), mientras que las células tratadas con las nanopartículas y los controles no es apreciable el marcaje con PI, por lo que estos

resultados sugieren que las NPQ/ARNi-WT1/cur no exponen una ruptura de la membrana nuclear.



**Figura 13.** Marcaje con DAPI y PI bajo microscopia de fluorescencia. a) Núcleos celulares marcados con DAPI. b) ADN expuesto marcado con PI.

### **8.10 Ensayo de migración de herida por rasguño**

Debido a que las principales causas de muerte por cáncer pulmonar son por la capacidad de migración, invasión y posterior metástasis de las células cancerosas, se determinó el porcentaje de migración de las células al aplicarles gemcitabina, NPQ/ARNi-WT1/cur y su combinación y se capturaron fotografías a las 0, 6, 12, 24 y 48 h (**Fig. 14a y b**). Como referencia, el grupo control mostró un porcentaje de cierre de herida del 0, 0, 11.93, 17.63 y 27.69%, respectivamente. De forma similar, pero en mayor medida, el grupo tratado con gemcitabina exhibió un porcentaje de migración del 0, 11.23, 23.93, 26.67 y 30.3% conforme pasa el tiempo. Además, a las 24 h se puede observar que comenzó un desprendimiento de las células, mientras que a las 48 h se visualiza una menor densidad celular en los cuadrantes, así como también un mayor porcentaje de cierre. Por otro lado, tanto al grupo con NPQ/ARNi-WT1/cur como la combinación de estas últimas con gemcitabina, presentaron un porcentaje de cierre negativo. Se logra percibir que los bordes de la herida se mantienen rectos en los distintos tiempos; además al combinar las NPQ/ARNi-WT1 /cur con gemcitabina, hay una pérdida de densidad celular, pero esta es menor que el grupo tratado únicamente con el fármaco. Por tanto, el tratamiento con las nanopartículas solas y en combinación con gemcitabina inhibió la capacidad migratoria de las células A549.



## 9 DISCUSIÓN

Entre el esquema actual del tratamiento de cáncer de pulmón se encuentran las drogas a base de platino en combinación con diversas terapias como la gemcitabina. No obstante, dicho tratamiento ejerce un efecto sistémico, por consiguiente, genera múltiples afectaciones destacándose entre ellas el daño hepático y renal (Lemjabbar-Alaoui *et al.*, 2015; De Francisco *et al.*, 2019; Amjad *et al.*, 2023).

En los últimos años se ha dilucidado que la curcumina contiene propiedades antitumorales, además de ofrecer un efecto hepatoprotector y nefoprotector (Ramírez y Velasque, 2019). Aunado a esto, se ha descubierto que este compuesto activo derivado de la cúrcuma es capaz de disminuir la sobreexpresión del oncogén WT1 en leucemias de pacientes (Anuchapreeda *et al.*, 2006). Además, recientemente en nuestro equipo de trabajo se probó que una construcción de un ARNi contra WT1 en combinación con curcumina disminuyó la viabilidad de células cancerosas B16F10 de melanoma murino (Zacarías, 2016). Por tanto, esta asociación tiene el potencial de quimiosensibilizar a las células cancerosas.

Dado que la curcumina tiene una pobre biodisponibilidad, se optó por diseñar una nanopartícula a base de quitosano para mejorar la farmacocinética y la farmacodinamia de este fitoquímico en conjugación con el ARNi-WT1. En virtud de la naturaleza catiónica del quitosano y la carga electrostática negativa del ADN y el TPP, permitió la asociación de este complejo, formando nanopartículas de  $209.3 \pm 9.44$  nm. Además, el potencial Z de las nanopartículas de quitosano nos indicó una disminución de  $16.5 \pm 5.45$  mV a  $15.8 \pm 7.03$  mV cuando se les agregó el ARNi-WT1, lo cual, dicho efecto confirma la unión, puesto que Katas (2006) y Ghafoor (2015) mencionan que la presencia de los grupos fosfato del ADN neutralizan a los grupos  $\text{NH}_3$  del quitosano, por tanto, existe una disminución de las cargas catiónicas del polímero. Asimismo, en el ensayo de retardo en gel de agarosa no se observó una liberación del plásmido aun cuando se dejó en ácido a pH 3 para simular el efecto esponja de protones, ni en solución salina. Dicho suceso coincide con lo obtenido por Csaba y colaboradores (2009), donde afirman que de igual manera el ADN no se liberó seguido de la incubación en buffer acetato a pH 4 y pH 7.4 ni en agua MiliQ. Ellos mencionan que esto indica que el ADN plasmídico está

fuertemente ligado a las nanopartículas de quitosano/TPP sin importar su peso molecular. No obstante, los autores lograron liberar el ADN de las nanopartículas al incubarlas con buffer de acetato en simultáneo con quitosanasas.

A su vez, la carga superficial positiva de las nanopartículas permite su hemocompatibilidad, esto debido a que se ha reportado que valores muy altos (+50 mV) provocan hemólisis y trombosis. Por su contraparte, un potencial Z negativo (-40 mV) conduce a la activación de macrófagos y su posterior fagocitosis, además de una repulsión de cargas con la membrana celular. Por ello, un valor medio entre +15 a -30 mV, además de un tamaño de partícula que va desde los 150 a 300 nm permite una biocompatibilidad exitosa con el organismo y una absorción por células no fagocíticas (Sonin *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2024), lo cual coincide con las características obtenidas de las NPQ y las NPQ/ARNi-WT1/cur, puesto que el tamaño y potencial Z se encuentra dentro del rango predicho, además de que se demostró que el porcentaje de hemólisis es menor al 4%, siendo considerado un valor del 5% como una muestra hemolítica, mientras que un valor entre 2-5% indica una hemólisis ligera y abajo del 2% es no hemolítica, según lo que señala la Norma ASTM F 176-17. Aunado a esto, el quitosano posee otras propiedades beneficiosas, puesto que, además de proteger los ácidos nucleicos y mejorar la biocompatibilidad de la curcumina, también otorga baja inmunogenicidad, escape del endosoma, mucoadhesividad y es biodegradable (Silva *et al.*, 2024). En cuanto a la mucoadhesividad, esto es debido a que los grupos amino con carga positiva interactúan con las glicoproteínas mucinas de carga negativa que se encuentran en las secreciones mucosas de los pulmones (Silva *et al.*, 2024), por tanto, las NPQ/ARNi-WT1/cur pueden ser un tratamiento dirigido para el cáncer pulmonar.

Por otro lado, existe evidencia que las nanopartículas con quitosano poseen una citotoxicidad selectiva, puesto que se ha registrado una mayor toxicidad en células cancerosas que en células sanas (Zoe *et al.*, 2023). Dicho esto, al evaluar el efecto citotóxico de NPQ en CMSP y en células A549 a las 24 h. se observó una mayor viabilidad en células sanas que en células cancerosas, siendo el quitosano un acarreador prometedor para terapias dirigidas. Además, el recubrimiento con quitosano en las nanopartículas proporciona una mejor absorción de los compuestos activos. Esto fue visto en nanoesferas de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) modificados con quitosano en células A549,

en donde la captación celular de partículas de un tamaño de 200 nm fue a través de la endocitosis mediada por clatrina (Tahara *et al.*, 2009).

En cuanto a las nanopartículas de quitosano con curcumina, se han reportado tamaños de partícula entre 170-200 nm, con una liberación de curcumina sostenida durante 180 h., lo cual mejora su captación celular y efecto citotóxico en las células cancerígenas de pulmón. Dichos resultados mostraron un contraste entre la administración de curcumina libre y encapsulada en la línea celular de cáncer de pulmón H1299, siendo esta última la de mejor eficacia, obteniéndose un 57% de citotoxicidad a 25  $\mu\text{M}$  durante 72 h (Vijayakurup *et al.* 2019). No obstante, con las NPQ/ARNi-WT1/cur se obtuvo un 50% de citotoxicidad con una dosis de 6.37  $\mu\text{M}$  de curcumina a las 72 h en la línea A549. Aunque es sabido que la línea A549 es más sensible que la línea H1299 y más resistente que la línea Calu-3, aun así, se alcanzó una dosis citotóxica casi 4 veces menor que la obtenida por Vijayakurup, esto podría ser debido al efecto inhibitor del shRNA contra WT1. Sin embargo, se observa que el comportamiento de liberación de los compuestos activos en las células A549 a las 48 h no se visualiza una disminución de la viabilidad menor que a las 24 h. Este comportamiento de liberación bifásica es característico de nanopartículas poliméricas. Hasanzade *et al.* (2025) mencionan que la liberación inicial de ráfagas puede ser a causa de una rápida desorción de curcumina que se encuentra en los bordes exteriores de la nanopartícula, mientras que la posterior liberación sostenida corresponde a una difusión del fármaco que se queda entre las redes del quitosano hidratado. A pesar de ello, esta conducta de aumento de la viabilidad también puede atribuirse a un fenómeno de adaptación celular característico de células cancerosas.

En cuanto a la dosis citotóxica, al administrar las NPQ/ARNi-WT1/cur de forma individual en las células A549 durante 24 h, se observó una  $\text{IC}_{50}$  de 468.87 ng de ADNp y 11.72  $\mu\text{M}$  de curcumina, siendo una dosis menor de curcumina encapsulada que la administrada por Alvarez (2025) en la misma línea celular, la cual el autor data que esta fue de 14.6852  $\mu\text{M}$ . Esto probablemente se deba a que las NPQ/ARNi-WT1/cur contienen un ARNi contra WT1, por lo cual se pretende que, al combinarse estos dos componentes en una nanopartícula de quitosano, se potencie el efecto que al aplicarlos por separado. Por otro lado, la  $\text{IC}_{50}$  de la gemcitabina a las 48 h fue de 16  $\mu\text{g/mL}$  y, al combinar los

principios activos, fue destacable que a una relación 1:1 de las nanopartículas y la gemcitabina (600 ng de ADNp + 15  $\mu$ M de curcumina y 15  $\mu$ g/mL de gemcitabina) hubo una disminución de la viabilidad por debajo del 50%, lo cual representa un toxicidad ligeramente mayor que al aplicar las nanopartículas de forma individual, pero hubo un considerable sinergismo al combinar las NPQ/ARNi-WT1/cur con gemcitabina a una relación 1:3 y 1:1, puesto que se vio favorecido el efecto del antimetabolito con una menor dosis. Dado esto, se observó una acentuada disminución de WT1 al aplicar las NPQ/ARNi-WT1/cur solas y en combinación con gemcitabina, obteniendo un decremento del 81.56 y 81.26%, respectivamente. En contraste, el tratamiento con gemcitabina no mostró el mismo efecto favorable, puesto que se registró un aumento del 46.45% de la expresión de WT1. Esto es debido a que se ha reportado que la administración de gemcitabina potencia la expresión del ARNm de WT1 a causa de la activación de NF $\kappa$ B (Takahara *et al.*, 2011). No obstante, esto mismo no ocurrió cuando se aplicaron las NPQ/ARNi-WT1/cur en simultáneo, dando lugar a una menor expresión de WT1. Dong (2021) menciona que, al combinar curcumina y gemcitabina promueve la inhibición de células A549 resistentes a gemcitabina, así como un aumento de la expresión de E-cadherina y una disminución de MMP9, vimentina y N-cadherina, inhibiendo así la transición epitelio mesenquimal, lo que da lugar a la inhibición de la migración e invasión.

De acuerdo a lo anteriormente mencionado, al aplicar las NPQ/ARNi-WT1/cur solas y en combinación con gemcitabina, se observó una inhibición de la migración de las células A549. El análisis del porcentaje de cierre de herida indica que hubo una migración nula bajo el efecto de estos dos tratamientos. Por el contrario, el tratamiento con una dosis de 15  $\mu$ g/mL de gemcitabina mostró un aumento gradual de la migración celular, así como el aumento de WT1, siendo un hecho que no se equipara al cotratamiento, lo cual confirma que las NPQ/ARNi-WT1/cur quimiosensibilizan a las células cancerosas a la gemcitabina. Esto también es observable en el estudio de Liu *et al.* (2020) donde evaluaron si la curcumina quimiosensibilizaba a las células PANC-1 a la gemcitabina y si inhibía su migración. Los autores reportan que al combinar una dosis de 5  $\mu$ M de curcumina y 2  $\mu$ M de gemcitabina mostraba una mayor capacidad para inhibir la migración que al aplicar la gemcitabina como monofármaco. Además, se registró una expresión a la baja de vimentina y N-cadherina, así como un aumento de E-cadherina al utilizar una terapia

combinada. Estos datos sugieren que, a pesar de tratarse de diferentes líneas celulares, la curcumina tiene el potencial de quimiosensibilizar a las células, asimismo, las NPQ/ARNi-WT1/cur solas y en combinación con gemcitabina muestran un potente efecto en comparación con el estudio anterior puesto que, el porcentaje de migración analizado fue del 0%, es decir, las células no recubrieron la zona donde se realizó el rasguño. Por consiguiente, la disminución de WT1 se puede vincular con la inhibición de la migración.

En lo que se refiere al mecanismo de muerte celular, el cotratamiento mostró un aumento de positividad para 7-AAD, mientras que la gemcitabina como monoterapia exhibió un mayor porcentaje de la población con positividad para 7-AAD y Anexina-V, en tanto que las NPQ/ARNi-WT1/cur presentaron resultados similares que el tratamiento combinado, lo cual es contradictorio al efecto apoptótico de la curcumina que se ha reportado. Namwan y colaboradores (2025) observaron un aumento en la apoptosis temprana y tardía al aplicar un derivado de la curcumina (CU17) en células A549. Asimismo, los autores aplicaron una dosis de 0.75  $\mu$ M de CU17 en combinación con 1.3  $\mu$ M de gemcitabina y reportaron un aumento significativo en la apoptosis, siendo este del  $20.45 \pm 0.85\%$ . En cambio, Liu y colaboradores (2018) mencionan que la curcumina tiene una actividad antitumoral mediada tanto por apoptosis como por autofagia en células A549. Dado esto, el mecanismo de muerte inducido por la curcumina nanoencapsulada no sigue una única vía (Alvarez, 2025). En consecuencia, se procedió a evaluar la integridad de la membrana de las células A549 tratadas únicamente con NPQ/ARNi-WT1/cur. El estudio muestra una fragmentación del ADN en las células tratadas con las nanopartículas, dato que concuerda con el trabajo de Maiti y colaboradores (2017) donde resaltan que la curcumina encapsulada en partículas lipídicas aumentaba la fragmentación del ADN en comparación con la curcumina libre en células de glioblastoma multiforme. Del mismo modo, el estudio de Zamora (2007) indica que el plásmido 5-6, el cual contiene el ARNi-WT1 que se utilizó en este estudio, induce fragmentación del ADN, característico de la apoptosis. Por lo que respecta al ensayo de tinción con DAPI y PI, el resultado podría sugerir una apoptosis temprana, puesto que la integridad de la membrana no se encuentra comprometida, sin embargo, es necesario realizar más estudios para dilucidar el mecanismo de muerte asociado a las NPQ/ARNi-WT1/cur.

## 10 CONCLUSIONES

Las NPQ/ARNi-WT1/cur oscilan un tamaño de 200 nm y potencial Z positivo, lo que permite una endocitosis mediada por clatrin y afinidad por las membranas celulares de las células no fagocíticas.

El plásmido ARNi-WT1 posee una eficacia de encapsulación del 93.57% y una ligación fuerte al quitosano.

Las NPQ/ARNi-WT1/cur tienen un efecto dependiente de la dosis y el tiempo y una concentración citotóxica menor a las 72 h.

El complejo nanoencapsulado no induce hemólisis.

La gemcitabina en combinación con NPQ/ARNi-WT1/cur a una relación 1:1 y 1:3 ejerce un efecto sinérgico, mientras que a una relación 3:1 (gemcitabina: NPQ/ARNi-WT1/cur) posee un efecto antagónico.

Las NPQ/ARNi-WT1/cur inhiben la expresión génica de WT1, contrario a la gemcitabina, puesto que las células tratadas con el antimetabolito presentaron un aumento en el ARNm de WT1, mientras que el cotratamiento indujo una expresión a la baja de WT1.

La monoterapia con NPQ/ARNi-WT1/cur y la combinación del nanocomplejo con gemcitabina no mostró migración de las células cancerosas, lo cual se correlaciona con la disminución de WT1.

Las NPQ/ARNi-WT1/cur tienen mayor positividad para 7-AAD, sin embargo, las células tratadas presentaron fragmentación de ADN y no se visualizó el marcaje con PI.

## 11 PERSPECTIVAS

1. Evaluar la expresión de genes pro-apoptóticos y anti-apoptóticos.
2. Profundizar en el proceso de transición epitelio-mesénquima, así como analizar el estado de la expresión de E-cadherina, N-cadherina, vimentina y fibronectina.
3. Analizar el sinergismo e  $IC_{50}$  al emplear otro quimioterapéutico.
4. Determinar el mecanismo de muerte celular de las NPQ/ARNi-WT1/cur.
5. Emplear las NPQ/ARNi-WT1/cur en un modelo *in vivo* de cáncer de pulmón.

## 12 BIBLIOGRAFÍA

1. Alvarez-Quezada, O.A., Arellano-Rodríguez, N.C., Rodríguez-Rodríguez, M.V., Franco-Molina, M.A., Zarate-Triviño, D.G., Zamora-Ávila, D.E., Vargas-Requena, C.L., Zapata-Benavides, P. and Rodríguez-Padilla, M.C. (2025) Encapsulation of Curcumin and Gemcitabine: Cytotoxic Effect and Mechanisms of Death in Lung Cancer. *Adv Pharmacol Pharm Sci*. 2025:8816364. doi: 10.1155/adpp/8816364. PMID: 40842623; PMCID: PMC12367379.
2. Amjad, M., Chidharla, A. and Kasi, A. [Updated 2023 Feb 27]. Cancer Chemotherapy In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564367/>
3. Anuchapreeda, S., Limtrakul, P., Thanarattanakorn, P., Sittipreechacharn, S. and Chanarat, P. (2006). Inhibitory effect of curcumin on WT1 gene expression in patient leukemic cells. *Arch Pharm Res*, 29(1), 80-87. <https://doi:10.1007/BF02977473>.
4. Anuchapreeda, S., Thanarattanakorn, P., Sittipreechacharn, S., Chanarat, P., and Limtrakul, P. (2006). Curcumin inhibits WT1 gene expression in human leukemic K562 cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27(3), 360–366. doi:10.1111/j.1745-7254.2006.00291.x
5. Aranaz, I., Alcántara, A., Civera, M., Arias, C., Elorza, B., Heras, A. and Acosta, N. (2021). Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications. *Polymers (Basel)*, 13(19), 3256. <https://doi:10.3390/polym13193256>.
6. Ashrafizadeh, M., Najafi, M., Makvandi, P., Zarrabi, A., Farkhondeh, T., and Samarghandian, S. (2020). Versatile role of curcumin and its derivatives in lung cancer therapy. *Journal of Cellular Physiology*, 235(12), 9241–9268. doi:10.1002/jcp.29819
7. Cai, Y., Sheng, Z., and Liang, S. (2019). Radiosensitization effects of curcumin plus cisplatin on non-small cell lung cancer A549 cells. *Oncology Letters*, 18(1), 529–534.

8. Caro, F., López, L., Lizardi, J., Argüelles, W., Goycoolea, F., Carvajal, E. y López, Y. (2019). Métodos de preparación de nanopartículas de quitosano: una revisión. *Biocencia*, 21(3), 13-25.
9. Choudhary, N., Bawari, S., Burcher, J.T., Sinha, D., Tewari, D. and Bishayee, A. (2023). Targeting Cell Signaling Pathways in Lung Cancer by Bioactive Phytocompounds. *Cancers*; 15(15):3980. <https://doi.org/10.3390/cancers15153980>
10. Csaba, N., Köping-Höggård, M. and Alonso, M. (2009). Ionically crosslinked chitosan/tripolyphosphate nanoparticles for oligonucleotide and plasmid DNA delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 382, 205–214.
11. De Francisco, A., Macía, M., Alonso, F., García, P., Gutiérrez, E., Quintana, L. F., Quiroga, B., y Torregrosa, I. (2019). Onco-Nefrología: cáncer, quimioterapia y riñón. *Nefrología*, 39(5), 473-481. <https://doi.org/10.1016/j.nefro.2018.10.016>
12. Dong, Z., Feng, Q., Zhang, H., Liu, Q and Gong, J. (2021). Curcumin enhances drug sensitivity of gemcitabine-resistant lung cancer cells and inhibits metastasis. *Pharmazie* 76, 538-543. <https://doi: 10.1691/ph.2021.0927>
13. Ebrahimi, H. A., Esmaeli, S., Khezri, S., & Salimi, A. (2023). Curcumin-Loaded Chitosan Nanoparticle Preparation and Its Protective Effect on Celecoxib-induced Toxicity in Rat isolated Cardiomyocytes and Mitochondria. *Drug research*, 73(3), 125–136. <https://doi.org/10.1055/a-1960-3092>
14. Fire, A. *et al.* (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811.
15. García, A. y Loera, S. (2021). Nanomateriales contra el cáncer. *Materia, ciencia y nanociencia*, 4(2), 18-31
16. Ghafoor, M., Katas, H., and Wen, T. (2015). Stability, Intracellular Delivery, and Release of siRNA from Chitosan Nanoparticles Using Different Cross-Linkers. *PLoS ONE*, 10(6), e0128963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128963>
17. GLOBOCAN (2021). Cancer today. Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr/>)
18. Hasanzade, P., Mosayebi, G., Ganji, A., Fahimirad, S. and Ghazavi, A. (2025) Curcumin-loaded chitosan nanoparticles: a promising approach to liver fibrosis

- prevention. *BMC Pharmacol Toxicol.* 26(1), 190. doi: 10.1186/s40360-025-01031-w. PMID: 41225671; PMCID: PMC12613923.
19. Hembram, K., Prabha, S., Chandra, R., Ahmed, B. and Nimesh, S. (2014). Advances in preparation and characterization of chitosan nanoparticles for therapeutics. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 44(1), 305-314. [https://doi: 10.3109/21691401.2014.948548](https://doi.org/10.3109/21691401.2014.948548).
  20. Hernández, A., Aguirre, A., Fuentes, H., Rodríguez, C., Trejo, R. y Zapata, P. (2004). WT1: sexo, vida y muerte. *Ciencia UANL*, 3(3), 342-347.ra
  21. Karthikeyan, A., Senthil, N., and Min, T. (2020). Nanocurcumin: A Promising Candidate for Therapeutic Applications. *Frontiers in Pharmacology*, 11(487), 1-24. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00487>
  22. Kasi P., Tamilselvam R., Skalicka-Wozniak K., Nabavi S., Daglia M., Bishayee A., Pazoki, H. and Nabavi, S. (2016). Molecular targets of curcumin for cancer therapy: an updated review. *Tumor Biol.* 37(10), 13017–13028. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5183-y>
  23. Katas H, Alpar HO. (2006). Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. *J Control Release.* 115, 216–225. pmid:16959358
  24. Khanmohammadi, M., Elmizadeh, H. and Ghasemi, K. (2015). Investigation of Size and Morphology of Chitosan Nanoparticles Used in Drug Delivery System Employing Chemometric Technique. *Iran J Pharm Res*, 14(3),665-675.
  25. Lárez, C., (2006). Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en Química*, 1(2), 15-21.
  26. Lemjabbar-Alaoui, H., Hassan, O. U., Yang, Y.-W., and Buchanan, P. (2015). Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1856(2), 189–210. [https://doi:10.1016/j.bbcan.2015.08.002](https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.08.002)
  27. Li, X., An, W., Pan, H. *et al.* (2023). Wilms' tumour gene 1 (WT1) enhances non-small cell lung cancer malignancy and is inhibited by microRNA-498-5p. *BMC Cancer* 23, 824. <https://doi.org/10.1186/s12885-023-11295-2>

28. Liu, F., Gao, S., Yang, Y., Zhao, X., Fan, Y., Ma, W., Yang, D., Yang, A., Yu, Y. (2018). Antitumor activity of curcumin by modulation of apoptosis and autophagy in human lung cancer A549 cells through inhibiting PI3K/Akt/mTOR pathway. *Oncol Rep.* 39(3), 1523-1531. doi: 10.3892/or.2018.6188. PMID: 29328421.
29. Maher, T., Ahmad Raus, R., Daddiouaissa, D., Ahmad, F., Adzhar, N., Latif, E., Abdulhafiz, F., and Mohammed, A. (2021). Medicinal Plants with Anti-Leukemic Effects: A Review. *Molecules*, 26(9), 2741. <https://doi.org/10.3390/molecules26092741>
30. Maiti, P., Al-Gharaibeh, A., Kolli, N., Dunbar, G.L. (2017). Solid Lipid Curcumin Particles Induce More DNA Fragmentation and Cell Death in Cultured Human Glioblastoma Cells than Does Natural Curcumin. *Oxid Med Cell Longev.* doi: 10.1155/2017/9656719. PMID: 29359011; PMCID: PMC5735327.
31. Mishra, A., Swetanshu, Singh, P., Yadav, S., Nigam, M., Seidel, V., and Rodrigues, C. (2023). Role of the Dietary Phytochemical Curcumin in Targeting Cancer Cell Signalling Pathways. *Plants*, 12(9), 1782. <http://dx.doi.org/10.3390/plants12091782>
32. Mishra, D., Singh, S. and Narayan, G. (2016). Curcumin Induces Apoptosis in Pre-B Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Lines Via PARP-1 Cleavage. *Asian Pac J Cancer Prev.*, 17(8), 3865-3869.
33. Mohammed, M., Syeda, J., Wasan, K. and Wasan, E. (2017). An Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery. *Pharmaceutics*, 9(4), 53. <https://doi:10.3390/pharmaceutics9040053>.
34. National Health Service. (2022, 1 november). Lung cancer. nhs.uk. <https://www.nhs.uk/conditions/lung-cancer/treatment/>
35. Namwan, N., Senawong, G., Phaosiri, C., Kumboonma, P., Somsakeesit, L.-o., Samankul, A., Leerat, C., & Senawong, T. (2025). Synergistic Anti-Cancer Activities of Curcumin Derivative CU17 Combined with Gemcitabine Against A549 Non-Small-Cell Lung Cancer Cells. *Pharmaceutics*, 17(2), 158. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17020158>

36. Pan American Health Organization. (2023). World Cancer Day 2023: Close the care gap. Pan American Health Organization. <https://www.paho.org/en/campaigns/world-cancer-day-2023-close-care-gap>
37. Panunzio, A., and Sartori, P. (2020). Lung Cancer and Radiological Imaging. *Current radiopharmaceuticals*, 13(3), 238–242. <https://doi.org/10.2174/1874471013666200523161849>
38. Raafat, D. and Sahl, H. (2009). Chitosan and its antimicrobial potential--a critical literature survey. *Microb Biotechnol*, 2(2), 186-201. <https://doi: 10.1111/j.1751-7915.2008.00080.x>.
39. Ramírez, I. y Velasque, O. (2019). *Eficacia de la cúrcuma en pacientes con enfermedad renal crónica para disminuir el deterioro progresivo de los riñones*. [Trabajo académico para optar el título de especialista en enfermería en nefrología]. Universidad Norbert Wiener.
40. Ramos-Gonzalez, M. R., Vazquez-Garza, E., Garcia-Rivas, G., Rodriguez-Aguayo, C., & Chavez-Reyes, A. (2023). Therapeutic Effects of WT1 Silencing via Respiratory Administration of Neutral DOPC Liposomal-siRNA in a Lung Metastasis Melanoma Murine Model. *Non-coding RNA*, 9(2), 21. <https://doi.org/10.3390/ncrna9020021>
41. Rampal, R., and Figueroa, M. (2016). Wilms tumor 1 mutations in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 101(6), 672–679. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.141796>
42. Sharifi-Rad, J., Quispe, C., Butnariu, M. *et al.* (2021). Chitosan nanoparticles as a promising tool in nanomedicine with particular emphasis on oncological treatment. *Cancer Cell Int*, 21, 318,1-21. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02025-4>
43. Sharifi-Rad, J., Rayess, Y., Rizk, A., Sadaka, C., Zgheib, R., Zam, W., Sestito, S., Rapposelli, S., Neffe-Skocińska, K., Zielińska, D., Salehi, B., Setzer, W., Dosoky, N., Taheri, Y., El Beyrouthy, M., Martorell, M., Ostrander, E., Suleria, H., Cho, W., Maroyi, A. and Martins, N. (2020). Turmeric and Its Major Compound Curcumin on Health: Bioactive Effects and Safety Profiles for Food,

- Pharmaceutical, Biotechnological and Medicinal Applications. *Frontiers in Pharmacology*, 11(1),1-23. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01021>
44. Siddiqui, F., Vaqar, S. and Siddiqui, A.H. [Updated 2023 May 8]. Lung Cancer. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482357/>
45. Silva, A. C., Costa, M. P., Zacaron, T. M., Ferreira, K. C. B., Braz, W. R., Fabri, R. L., Frézard, F. J. G., Pittella, F., and Tavares, G. D. (2024). The Role of Inhaled Chitosan-Based Nanoparticles in Lung Cancer Therapy. *Pharmaceutics*, 16(8), 969. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16080969>
46. Schiborr, C., Kocher, A., Behnam, D., Jandasek, J., Toelstede, S. and Frank, J. (2014). The oral bioavailability of curcumin from micronized powder and liquid micelles is significantly increased in healthy humans and differs between sexes. *Mol. Nutr. Food Res.* 58, 516–527.
47. Smagurauskaitė, G., Mahale, J., Brown, K., Thomas, A.L. and Howells, L.M. (2020). New Paradigms to Assess Consequences of Long-Term, Low-Dose Curcumin Exposure in Lung Cancer Cells. *Molecules*, 25, 366. <https://doi.org/10.3390/molecules25020366>
48. Sonin, D., Pochkaeva, E., Zhuravskii, S., Postnov, V., Korolev, D., Vasina, L., Kostina, D., Mukhametdinova, D., Zelinskaya, I., Skorik, Y., Naumysheva, E., Malashicheva, A., Somov, P., Istomina, M., Rubanova, N., Aleksandrov, I., Vasyutina, M., and Galagudza, M. (2020). Biological Safety and Biodistribution of Chitosan Nanoparticles. *Nanomaterials*, 10(4), 810. <https://doi.org/10.3390/nano10040810>
49. Steege, A., Föhling, M., Paliege, A., Bondke, A. Kirschner, K., Martinka, P., Kaps, C., Patzak, A., Persson, P., Thiele, B., Scholz, H., Mrowka, R. (2008). Wilms' tumor protein (—KTS) modulates renin gene transcription, *Kidney International*, (74)4, 458-466. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.194>
50. Tahara, K., Sakai, T., Yamamoto, H., Takeuchi, H., Hirashima, N., and 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:10.1016/j.ijpharm.2009.07.023>

51. 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 Immunol Immunother.*60(9):1289-97. doi: 10.1007/s00262-011-1033-3. PMID: 21607557; PMCID: PMC11029139.
52. Vijayakurup, V., Thulasidasan, A., Shankar G., Retnakumari, A., Nandan, C., Somaraj, J., Jayesh, A., Alex, V., Vinod, V., Liju, V., Sundaram, S., Vinod, G. and Anto, R. (2019). Chitosan Encapsulation Enhances the Bioavailability and Tissue Retention of Curcumin and Improves its Efficacy in Preventing B[a]P-induced Lung Carcinogenesis. *Cancer Prevention Research*, 12(4), 225-236. <https://doi:10.1158/1940-6207.CAPR-18-0437>
53. Wang, X., Gao, P., Lin, F. *et al.* (2013). Wilms' tumour suppressor gene 1 (WT1) is involved in the carcinogenesis of Lung cancer through interaction with PI3K/Akt pathway. *Cancer Cell Int* 13, 114. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-13-114>
54. World Health Organization: WHO. (2019, julio 12). Cancer. [https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1)
55. World Health Organization: WHO. (2023, 26 junio). Lung cancer. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/lung-cancer>
56. Wu, C., Zhu, W., Qian, J., He, S., Wu, C., Chen, Y., and Shu, Y. (2013). WT1 Promotes Invasion of NSCLC via Suppression of CDH1. *Journal Of Thoracic Oncology*, 8(9), 1163-1169. <https://doi.org/10.1097/jto.0b013e31829f6a5f>
57. Xu, C., Wu, C., Xia, Y., Zhong, Z., Liu, X., Xu, J., *et al.* (2013). WT1 Promotes Cell Proliferation in Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines through Up-Regulating Cyclin D1 and p-pRb In Vitro and In Vivo. *PLoS ONE* 8(8): e68837. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068837>
58. Yu, S., Shen, G., Khor, T., Kim, J. and Kong, A. (2008). Curcumin inhibits Akt/mammalian target of rapamycin signaling through protein phosphatase-

- dependent mechanism. *Mol Cancer Ther*, 7(9), 2609-2620. [https://doi: 10.1158/1535-7163.MCT-07-2400](https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-2400). PMID: 18790744;
59. Zacarías, J. (2016). *Efecto combinado antitumoral con wt1-sirna y curcumina sobre la proliferación de células de melanoma murino B16F10 in vitro*. [Trabajo académico para optar el título de Maestría en ciencias con orientación en Inmunobiología]. Universidad Autónoma de Nuevo León.
60. Zamora-Ávila, D. (2005). Efecto de la expresión del gen WT1 en la proliferación celular de cáncer de pulmón. [Tesis de maestría]. Universidad Autónoma de Nuevo León.
61. Zamora-Ávila, D., Franco-Molina, M., Trejo-Avila, L., Rodríguez-Padilla, C., Resendez-Perez, D. and Zapata-Benavides, P. (2007). RNAi silencing of the WT1 gene inhibits cell proliferation and induces apoptosis in the B16F10 murine melanoma cell line. *Melanoma Res*, 17, 341–348. PMID: 22740987. DOI: 10.3892/ol.2012.578.
62. Zamora-Ávila, D., Zapata-Benavides, P., Franco-Molina, M., Franco-Molina, M., Saavedra-Alonso, S., Trejo-Ávila, L., Resendez-Pérez, D., Méndez-Vázquez, J., Isaías-Badillo, J. and Rodríguez-Padilla, C. (2009). WT1 gene silencing by aerosol delivery of PEI–RNAi complexes inhibits B16-F10 lung metastases growth. *Cancer Gene Ther*, 16, 892–899. PMID: 19461674. DOI: 10.1038/cgt.2009.35.
63. Zapata-Benavides, P., Thompson-Armendariz, F. G., Arellano-Rodríguez, M., Franco-Molina, M. A., Mendoza-Gamboa, E., Saavedra-Alonso, S., Zacarias-Hernández, J. L., Trejo-Avila, L. M., & Rodríguez-Padilla, C. (2019). shRNA-WT1 Potentiates Anticancer Effects of Gemcitabine and Cisplatin Against B16F10 Lung Metastases In Vitro and In Vivo. *In vivo (Athens, Greece)*, 33(3), 777–785. <https://doi.org/10.21873/invivo.11539>
64. Zoe, L.H., David, S.R. and Rajabalaya, R. (2023). Chitosan nanoparticle toxicity: A comprehensive literature review of in vivo and in vitro assessments for medical applications. *Toxicol Rep*. 29(11), 83-106. doi: 10.1016/j.toxrep.2023.06.012. PMID: 38187113; PMCID: PMC10767636.

65. Zoi, V., Galani, V., Lianos, G., Voulgaris, S., Kyritsis, A. and Alexiou, G. (2021). The Role of Curcumin in Cancer Treatment. *Biomedicines*, 9(9), 1086. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9091086>