

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EFECTO DE LA CURCUMINA EN COMBINACIÓN CON CISPLATINO EN
LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER *IN VITRO*

POR

EVELYN NALLELY MUÑOZ GUZMÁN

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

JUNIO, 2017

EFFECTO DE LA CURCUMINA EN COMBINACIÓN CON CISPLATINO EN
LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER *IN VITRO*

COMISIÓN DE TESIS

Dra. Laura María Trejo Ávila
Director

Dr. Edgar Mendoza Gamboa
Secretario

Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales
Vocal 1

Dr. Pablo Zapata Benavides
Vocal 2

Dra. Diana Reséndez Pérez
Vocal 3

EFFECTO DE LA CURCUMINA EN COMBINACIÓN CON CISPLATINO EN
LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER *IN VITRO*

DIRECCIÓN DE TESIS

Dra. Laura María Trejo Ávila
Director

Dr. Pablo Zapata Benavides
Co-Director

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, gracias a Dios por permitirme concluir una meta más en mi vida, a mis padres Humberto Muñiz y María Guzmán por invertir y creer en mí día a día junto con mis hermanos Jorge y Miriam que siempre están al pendiente y me ayudan en lo posible.

A toda mi familia en general, tíos, primos y abuelos, los cuales algunos ya no están aquí conmigo, pero los llevo en mi corazón, por siempre ayudarme y motivarme a ser mejor cada día, a no darme por vencida y poner un granito a que esto pudiera llevarse a cabo.

Al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por proveer el apoyo financiero y la infraestructura requeridos para la realización de este proyecto.

Con una gran admiración al Dr. Pablo Zapata y a la Dra. Laura Trejo les agradezco por darme la oportunidad de llegar más lejos y concluir una maestría, por ayudarme a cumplir un sueño más y espero un día poder ser una gran investigadora como ellos.

Sin duda al laboratorio de Inmunología y Virología de la FCB, a mis maestros y compañeros, les agradezco todos los aprendizajes que me dejaron, por ser una gran familia científica, especialmente al L5, en donde encontré grandes amigos y colegas Kary, Ashanti, Ramiro, Felipe, Mariela, Fernanda, Daniela, Liz, Edgar, Santiago, Karlita y Beto del L7, que fueron un apoyo incondicional para que esto también pudiera concluirse, sin duda no tengo palabras para agradecerles cada consejo y momento vivido a su lado.

Y a todas las personas que me han acompañado a lo largo de mi camino, a esos grandes amigos que siempre están al pendiente, especialmente a Oscar que me ha alentado este último año a cumplir todas mis metas y las que nos faltan.

A CONACYT por el financiamiento otorgado. Gracias!!

DEDICATORIA

A la familia.

“Uno pertenece a donde se le acepta, se le escucha, se le ama y se le demuestra, porque el vínculo que te une a una verdadera familia no es de sangre, si no de respeto y alegría por la vida del otro”

ÍNDICE

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	v
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
Cáncer	2
Tratamientos	5
Quimioterapia	6
Otros tratamientos.....	8
Curcumina.....	9
Mecanismos de Curcumina.....	11
JUSTIFICACIÓN	14
OBJETIVO GENERAL.....	16
OBJETIVOS PARTICULARES.....	16
MATERIAL Y MÉTODOS	17
Estrategia general.....	20
Cultivo de células.....	17
Preparación de curcumina.....	17
Ensayo de proliferación celular (MTT)	17
Ensayo clonogénico	18
Análisis de Viabilidad Celular por Citometría de Flujo.....	19

Análisis estadístico.....	19
RESULTADOS	21
Análisis de la viabilidad celular de diversas líneas celulares expuestas a curcumina.....	21
Análisis de la formación de colonias de las diversas líneas celulares expuestas a curcumina.....	23
Análisis de la viabilidad celular de diversas líneas celulares expuestas a cisplatino.	27
Análisis de la viabilidad celular de diversas líneas celulares expuestas a curcumina y cisplatino.	28
Análisis de viabilidd celular.....	30
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	35
BIBLIOGRAFÍA.....	36
RESUMEN BIOGRÁFICO	40

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. DL50 de las líneas celulares Mcf7, HeLa y B16F10 expuestas a curcumina a las 24, 48 y 72 horas	23
Tabla 2. Resultados de los ensayos clonogénicos de la línea celular B16F10 expuesta a concentraciones de curcumina de 15 y 10 μM	24
Tabla 3. Resultados de los ensayos clonogénicos de la línea celular Mcf7 expuesta a expuesta a concentraciones de curcumina de 15 y 20 μM	25
Tabla 4. DL50 de las líneas celulares Mcf7, HeLa y B16F10 expuestas a cisplatino a las 24 horas.....	26
Tabla 5. DL50 de las líneas celulares Mcf7, HeLa y B16F10 expuestas a cisplatino a las 24 horas	28

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Principales curcuminoides del extracto de <i>Curcuma longa</i> L.....	9
Figura 2. Actividades anti-cáncer de curcumina	13
Figura 3. Análisis de viabilidad celular de la línea celular B16F10 a diversas concentraciones de 20 a 100 μ M de curcumina	22
Figura 4. Análisis de viabilidad celular de la línea celular MCF7 a diversas concentraciones de 20 a 100 μ M de curcumina.....	22
Figura 5. Análisis de viabilidad celular de la línea celular HeLa a diversas concentraciones de 20 a 100 μ M de curcumina.	23
Figura 6. Ensayos clonogénicos de la línea celular B16F10 expuesta a 10 y 5 μ M de curcumina	24
Figura 7. Ensayos clonogénicos de la línea celular Mcf7 expuesta a 15 y 20 μ M de curcumina	25
Figura 8. Ensayos clonogénicos de la línea celular HeLa expuesta a 15 y 10 μ M de curcumina	26
Figura 9. Resultados de los ensayos clonogénicos de las líneas celulares B16F10 y Mcf7 ..	27
Figura 10. Análisis de viabilidad celular de las líneas celulares MCF7, HeLa y B16F10 a concentraciones de 4 a 14 ng/ μ L de cisplatino	28
Figura 11. Análisis de viabilidad celular de la línea celular B16F10 utilizando la DL25, DL50 y DL75 de curcumina y Cisplatino	29
Figura 12. Análisis de viabilidad celular de la línea celular MCF7 utilizando la DL25, DL50 y DL75 de curcumina y Cisplatino	29
Figura 13. Análisis de viabilidad celular de la línea celular HeLa utilizando la DL25, DL50 y DL75 de curcumina y Cisplatino	30
Figura 14. Viabilidad celular mediante citometria de flujo. Se cultivaron células HeLa, MCF7 y B16F10 con curcumina, cisplatino y combinadas	31

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

°C : Grados centrigados

µg : Microgramos

µL : Microlitos

µM: Micromolar

ADN: Ácido desoxirribonucleico

B16F10: Línea celular de melanoma murino

CAM: Medicinas alternativas y complementarias

CO₂: Dióxido de carbono

DL50: Dosis letal media

et al: “y otros”

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos

g: gramos

h o hr: Horas

HELA: Línea celular de cáncer cervicouterino humano

MCF7: Línea celular de cáncer de mama humano

Kb: Kilopares de bases

Kg: Kilogramos

m o min: minutos

mL: Mililitros

mM: Milimolar

ng: nanograos

nmol: Nanomoles

PBS: Phosphate buffered saline

RNAm: Acido ribonucleico mensajero

SDS: Dodecilsulfato sódico

V: Volts

RESUMEN

El cáncer es la principal causa de muerte a escala mundial en donde los índices de mortalidad van en aumento, esto es debido en gran parte a su diagnóstico en etapas avanzadas, así como el desarrollo de metástasis previas al diagnóstico, por lo que es importante buscar nuevas alternativas que mejoren la tasa de supervivencia de los pacientes, proponiéndose el uso de curcumina (diferuloylmethane) como un gran candidato. La curcumina es un polifenol derivado de la planta *Curcuma longa* Linn conocida comúnmente como cúrcuma y tiene un variedad de propiedades terapéuticas incluyendo anti-oxidante, actividad antiséptica entre otras y además recientemente se ha encontrado que posee actividades anti-cancerosas a través de su efecto sobre una variedad de vías biológicas involucradas en la mutagénesis, expresión de oncogenes, regulación del ciclo celular, apoptosis, la tumorigénesis y metástasis. Por lo que se desea determinar el efecto de la curcumina en combinación con cisplatino en líneas celulares de cáncer *in vitro* mediante ensayos de MTT y citometría de flujo. En este proyecto se reporta tener un efecto anti-tumoral y anti-proliferativo en la línea celular de ratón B16F10 y en las líneas celulares humanas Mcf7 y HeLa, además de poseer un efecto aditivo al combinarse con el quimioterapéutico cisplatino siendo un fármaco compuesto de platino que actúa como un agente alquilante impidiendo que las células cancerosas crezcan y haciendo que mueran Siendo considerada en el desarrollo de quimioterapias adyuvantes como una nueva alternativa para disminuir los efectos secundarios y la toxicidad sin comprometer la eficacia terapéutica, y aumentar así los protocolos de tratamiento disponibles en la actualidad.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las enfermedades más comunes y una de las causas más altas de fallecimiento de los seres humanos, y se sabe que puede ser iniciado por agentes externos o factores genéticos heredados, sin importar el sexo, la edad o clase social.

El cáncer se define como el crecimiento y proliferación incontrolada de las células malignas neoplásicas, dichas células presentan una morfología alterada.

Entre las formas de tratar a los pacientes con cáncer se encuentran las cirugías, las radioterapias, las quimioterapias, terapia génica y la medicina alternativa en donde esta última se caracteriza por el uso de plantas medicinales o acupuntura. En investigaciones recientes, se ha conjugado la farmacología moderna con la herbolaria tradicional, se espera encontrar nuevos compuestos que contribuyan en el hallazgo de nuevos medicamentos contra el cáncer.

La integración de la medicina alternativa y complementaria (CAM) ha llevado a los investigadores al estudio de nuevos compuestos extraídos de diversas hierbas en contra del cáncer, en donde a menudo en investigaciones *in vitro* e *in vivo* en animales se ha mostrado tener una actividad citotóxica en contra de las células cancerígenas y tener efectos apoptóticos y anti-proliferativos sin afectar a las células normales.

Actualmente se han usado distintos extractos de hierbas como la planta *Curcuma longa* Linn destacando entre los componentes de la raíz la curcumina, (vendida ya comercialmente), tener una actividad antitumoral, anti-proliferativa, anti-inflamatoria, radioprotectora entre muchas otras características (Verma et al., 1998; Mehta et al., 1997; Navis et al., 1999; Menon et al., 1995; Lv et al., 2014).

A pesar de que se ha estudiado su actividad aún se desconoce cuáles son los mecanismos por los que la curcumina propicia el tener estos efectos en el cáncer, y debido a la falta de conocimiento es de gran importancia dilucidar estos mecanismos y las vías de señalización de la curcumina en el cáncer.

ANTECEDENTES

Cáncer

El cáncer es una de las principales enfermedades que limitan la vida humana, se puede llegar a tratar con cirugía, radiación, quimioterapia, hormonas e Inmunoterapia. Según estimaciones de la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC por sus siglas en inglés), hubo 12.7 millones de nuevos casos de cánceres en 2008 en todo el mundo. En el 2012 se le atribuyen 8,2 millones de defunciones ocurridas en todo el mundo (WHO, 2014). Para el 2030, se espera que en el mundo existan cerca de 21.4 millones casos nuevos de cáncer y 13.2 millones de muertes por enfermedades simplemente debido al crecimiento y envejecimiento de la población, así como la reducción de la mortalidad infantil y muertes por enfermedades infecciosas en los países en desarrollo (Sbeity y Younes, 2015).

Su causa se debe a factores tanto externos (tabaco, organismos infecciosos, alimentación deficiente, sustancias químicas y radiación) como internos (mutaciones heredadas, hormonas, problemas inmunitarios y mutaciones debidas al metabolismo). El cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se habla de tumores malignos o neoplasias malignas. Una característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis. Las metástasis es la principal causa de muerte por cáncer (WHO, 2014).

Hay más de 100 tipos de cáncer. Los tipos de cáncer reciben, en general, el nombre de los órganos o tejidos en donde se forman los cánceres. Por ejemplo, como en pulmón, colon, senos, piel, huesos o tejido nervioso; entre los diversos síntomas que desencadena están los escalofríos, la fatiga, la fiebre y pérdida de peso, entre muchos otros. (American Cancer Society 2014).

Clasificación

Según el Instituto Nacional del Cáncer (INH), el cáncer se clasifica en diversas categorías que empiezan en tipos específicos de células:

Carcinoma: son los tipos más comunes de cáncer, se forman en las células epiteliales, las cuales son las células que cubren las superficies internas y externas del cuerpo. Los carcinomas que empiezan en diferentes tipos de células epiteliales tienen nombres específicos:

a) El adenocarcinoma es un cáncer que se forma en las células epiteliales que producen fluidos o mucosidad. Los tejidos con este tipo de células epiteliales se llaman algunas veces tejidos glandulares. Algunos cánceres que pertenecen a esta clasificación son de seno, de colon y de próstata.

b) El carcinoma de células basales es un cáncer que empieza en la capa más baja o basal (en la base) de la epidermis, la cual es la capa exterior de la piel de una persona.

c) El carcinoma de células escamosas las células epiteliales están por debajo de la superficie exterior de la piel. Las células escamosas revisten también muchos otros órganos, como el estómago, los intestinos, los pulmones, la vejiga y los riñones. Los carcinomas de células escamosas algunas veces se llaman carcinomas epidermoides.

d) El carcinoma de células de transición es un cáncer que se forma en un tipo de tejido epitelial llamado epitelio de transición o urotelio. Este tejido, está formado de muchas capas de células epiteliales que pueden hacerse más grandes o más pequeñas y se encuentra en el revestimiento de la vejiga, de los uréteres y en parte de los riñones (pelvis renal), y en algunos otros órganos.

Sarcomas: son cánceres que se forman en el hueso y en los tejidos blandos, incluso en músculos, tejido adiposo (graso), vasos sanguíneos, vasos linfáticos y en tejido fibroso (como tendones y ligamentos).

a) El osteosarcoma es el cáncer de hueso más común. Los tipos más comunes de sarcoma de tejido blando son el leiomiomasarcoma, el sarcoma de Kaposi, el histiocitoma fibroso maligno, el liposarcoma y el dermatofibrosarcoma protuberante.

Leucemia: Son los cánceres que empiezan en los tejidos que forman la sangre en la médula ósea. Estos cánceres no forman tumores sólidos. En vez de eso, un gran número de glóbulos blancos anormales (células leucémicas y blastocitos leucémicos) se acumulan en la sangre y en la médula ósea y desplazan a los glóbulos normales de la sangre. La concentración baja de células normales de la sangre puede hacer que el cuerpo lleve con dificultad oxígeno a los tejidos, que no controle las hemorragias o que no combata las infecciones.

Hay cuatro tipos comunes de leucemia, los cuales se agrupan de acuerdo a la rapidez con la que empeora la enfermedad (aguda o crónica) y del tipo de glóbulo en donde empieza el cáncer (linfoblástico o mieloide).

a) Linfoma es un cáncer que empieza en los linfocitos (células T o células B), estos son glóbulos blancos que combaten las enfermedades y que forman parte del sistema inmunitario. En el linfoma, los linfocitos anormales se acumulan en los ganglios linfáticos y en los vasos linfáticos, así como en otros órganos del cuerpo.

Hay dos tipos principales de linfomas:

- Linfoma de Hodgkin: Las personas que tienen esta enfermedad tienen linfocitos anormales que se llaman células de Reed-Sternberg. Estas células se forman, en general, de células B.

- Linfoma no Hodgkin: Este es un grupo grande de cánceres que empiezan en los linfocitos. Los cánceres pueden crecer con rapidez o con lentitud y se pueden formar de células B o de células T.

b) Mieloma múltiple o mieloma de células plasmáticas es cáncer que empieza en las células plasmáticas, otro tipo de células inmunitarias. Las células plasmáticas anormales, llamadas células de mieloma, se acumulan en la médula ósea y forman tumores en los huesos de todo el cuerpo como la enfermedad de Kahler.

c) Melanoma es cáncer que empieza en las células que se convierten en melanocitos, los cuales son células especializadas en producir melanina (el pigmento que da el color a la piel). La mayoría de los melanomas se forman en la piel, pero pueden formarse también en otros tejidos pigmentados, como en los ojos.

Tratamientos

Existen diversos tratamientos para los pacientes que padecen de cáncer, los que comúnmente se emplean son cirugía (extracción del cáncer en una operación), quimioterapia (uso de medicamentos para destruir las células cancerosas), radioterapia (uso de rayos X en dosis altas u otros rayos de alta energía para destruir las células cancerosas) y terapia biológica (uso del sistema inmunológico del cuerpo para combatir el cáncer).

La mayoría de los tratamientos del cáncer pueden causar efectos secundarios, es decir, problemas que ocurren cuando el tratamiento afecta tejidos u órganos sanos, estos efectos varían de una persona a otra, aun entre personas que reciben el mismo tratamiento algunas pueden tener pocos efectos secundarios mientras que otras tienen más. El tipo de tratamiento que se puede recibir depende de la cantidad o la frecuencia del tratamiento, la edad y otros padecimientos de salud además de determinar también los efectos secundarios que pudiera tener como va desde anemia, caída del pelo (alopecia), cambios en la piel y en las uñas, diarrea, dolor, falta de apetito. Fatiga, náuseas y vómitos, problemas para dormir y sangrado y moretones (trombocitopenia), entre muchos otros.

El método más empleado para aquellos tumores pequeños y localizados en un lugar concreto es la cirugía. Para que sea completamente eficaz se precisa extirpar parte

del tejido que rodea el tumor para asegurar así que todas las células cancerosas han sido extirpadas. Si el cáncer se ha extendido a otras zonas, a través de la sangre o de la linfa, habrá que realizar otros tratamientos, bien sean añadidos a la cirugía o únicos y distintos a ella (Hellman and Vokes, 1996).

La radioterapia en cambio, utiliza rayos de alta energía como rayos X, rayos gamma y las partículas cargadas, utilizándolos para eliminar las células cancerosas al dañar su ADN, teniendo como consecuencia el daño a las células normales, llevando al paciente de sufrir efectos secundarios.

La radiación puede ser entregada por una máquina fuera del cuerpo (radioterapia de haz externo), o puede provenir de un material radiactivo colocado en el cuerpo cerca de las células cancerosas o se inyecta en el torrente sanguíneo (radioterapia interna, también llamada braquiterapia). La radioterapia sistémica usa sustancias radiactivas, como el yodo radiactivo, que viajan en la sangre para eliminar las células cancerosas. Un paciente puede recibir terapia de radiación, antes, durante, o después de la cirugía, dependiendo del tipo de cáncer a tratar.

Algunos pacientes reciben radioterapia sola, y algunos reciben radioterapia en combinación con cirugía, quimioterapia o ambos. La radioterapia también puede administrarse con intención paliativa, los cuales no tienen la intención de curar, si no, solo aliviar los síntomas y reducir el sufrimiento causado por el cáncer (National Cancer Institute, 2010).

Quimioterapia

La quimioterapia consiste en el uso de medicamentos para destruir las células cancerosas, es un tratamiento sistémico debido a que los medicamentos se introducen al torrente sanguíneo, viajan a través del cuerpo destruyendo las células cancerosas. Los medicamentos quimioterapéuticos pueden administrarse de diferentes formas: a través de un comprimido por vía oral; mediante un suero o inyección intravenosa; por inyección intramuscular o mediante una inyección a través de una punción en la médula ósea.

La quimioterapia se puede emplear para reducir el tamaño de un tumor antes de la cirugía o de la radioterapia y es llamada terapia neoadyuvante o puede utilizarse después de la cirugía o la radioterapia para ayudar a destruir las células cancerosas remanentes y se le conoce como terapia adyuvante (Sbeity y Younes, 2015).

Algunos de estos quimioterapéuticos utilizados son la 5-fluorouracilo (5-FU), Temozolomida, Paclitaxel (Taxol), Gemcitabina, Trametiniv, Oxaliplatino (Eloxatin), Cisplatino, entre otros y se administran principalmente dependiendo del tipo de cáncer, lo avanzado que esté, si alguna vez ya se estuvo expuesto a quimioterapia, o algunos otros problemas de salud, como diabetes o enfermedades cardíacas.

Uno de los ejemplos de estos quimioterapéuticos muy utilizado es el cisplatino el cual es administrado vía intravenosa.

Cisplatino

El cisplatino (cis-diaminodicloroplatino II) es un quimioterapéutico inorgánico basado en platino el cuál se aplica como tratamiento a diversos tumores, esta droga se une al DNA, consecuentemente induce apoptosis e inhibe el crecimiento celular. Se ha visto que su actividad intercalante de DNA no es específica, causando que tenga efectos tóxicos como efectos gastrointestinales (Náuseas y vomito), supresión de la médula ósea, ototoxicidad, neurotoxicidad, hepatotoxicidad, etc., motivo por el cual se administra en dosis limitadas (Razaee et al., 2017)

En los últimos años, se están empleando combinaciones de quimioterapéuticos porque se ha comprobado que su acción conjunta es más eficaz para destruir el cáncer, se suelen combinar medicamentos anticancerígenos con modos de acción distintos y capacidad para producir efectos diferentes, estas combinaciones pretenden ser más eficaces sobre las células cancerosas y menos dañinas para las células normales (American Society, 2014).

Por lo tanto, la administración de quimioterapia implica una reducción de células cancerosas y la toxicidad tisular, que es una función del tamaño de la población celular normal destruida y los límites de dosis de fármaco. Por esta razón, estamos interesados en optimizar la quimioterapia contra el cáncer.

Otros tratamientos

En la actualidad existen terapias dirigidas contra el cáncer los cuales son fármacos u otras sustancias que bloquean el crecimiento y la diseminación del cáncer al interferir en blancos moleculares que participan en el crecimiento, el avance y la diseminación del cáncer.

Las terapias dirigidas son, en la actualidad, en donde se centra la mayor creación de fármacos contra el cáncer, usa información de los genes y proteínas de una persona para prevenir, diagnosticar y tratar enfermedades.

Muchas terapias dirigidas contra el cáncer han sido aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para tratar tipos específicos de cáncer. Otras se investigan en estudios clínicos (estudios de investigación con personas) y muchas más están en estudio preclínico (estudios de investigación con animales) (NIH, 1997).

Los tratamientos anteriormente descritos desarrollan una serie de efectos secundarios en los pacientes destacando pérdida del cabello, náuseas, mareos, diarrea, entre muchos otros, es por eso que en la búsqueda de nuevas alternativas, muchos pacientes recurre a Medicinas alternativas y complementarias (CAM) siendo un término utilizado para los productos y las prácticas médicas que no forman parte de los cuidados estándar como lo sería la acupuntura, la quiropráctica y la medicina herbaria. De acuerdo con los practicantes de CAM, sus beneficios pueden sonar promisorios, sin embargo, los investigadores no conocen la seguridad de muchos tratamientos con CAM ni saben si funcionan bien. Se están realizando estudios para determinar la seguridad y la utilidad de muchas prácticas de CAM (NIH, 1997).

Analizando los tratamientos anteriores, y buscando una alternativa para no provocar daño a las células normales y tener un efecto anti-tumoral, entre la medicina herbaria se ha visto la utilización de un compuesto proveniente de la raíz de la planta *Curcuma longa L.*, a la cual se le atribuyen varios beneficios entre los que destaca su actividad anti-tumoral.

Curcumina

Curcuma longa L. de la familia de las Zingiberáceas, es una planta de origen asiático cuyo rizoma, de color naranja vivo bajo una fina película marrón clara, es usado comúnmente como una especie en la cultura asiática, donde está como una planta mágica dadas sus características organolépticas y sus indudables propiedades terapéuticas y protectoras, sobre todo a nivel hepático y cutáneo (Mesa *et al.*, 2000).

El rizoma de cúrcuma ha sido objeto de muchas investigaciones en la India, se ha intentado encontrar sus principios activos con el fin de optimizar su actividad y de explicar su mecanismo de acción; se han preparado numerosos extractos, etanólicos, metanólicos y con distintos solventes para analizar sus actividades biológicas (Ammon and Wahl, 1991; Ammon *et al.*, 1993; Srimal, 1997). Entre los componentes del extracto están: carbohidratos (4.7-8.2%), aceites esenciales (2.44.0%), ácidos grasos (1.7-3.3%), curcuminoides (curcumina, demetoxicurcumina y bisdemetoxicurcumina) (figura 1), cuyo contenido aproximado es de un 2%, aunque puede rondar entre 2.5-5.0% del peso seco, y otros polipéptidos como la turmerina (0.1 % del extracto seco) (Srinivas *et al.*, 1992).

La curcumina (diferuloilmetano) es la sustancia causante del color amarillo característico de los rizomas de esta planta, y es uno de los ingredientes activos responsable de su actividad biológica. La síntesis de este compuesto es conocida y su estructura fue determinada en 1910 (Mesa *et al.*, 2000) (Figura 1).

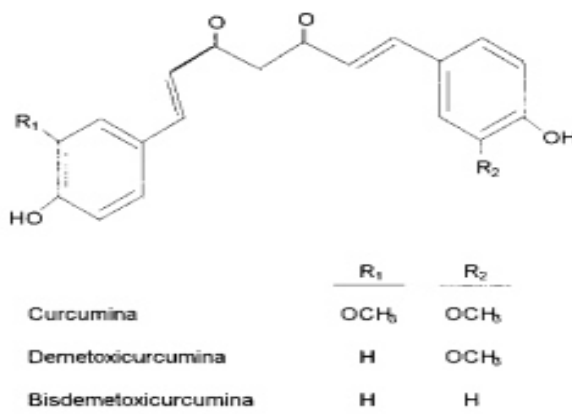


Figura 1. Principales curcuminoides del extracto de *Curcuma longa* L.

La principal línea de investigación de la cúrcuma en los últimos años, ha sido conocer su actividad antiproliferativa y antitumoral. Se ha comprobado el efecto preventivo y curativo de la cúrcuma, la curcumina y sus extractos acuosos frente al cáncer y la formación de tumores. Los agentes estudiados han sido administrados oralmente, por inyección o probados en sistemas in vitro, y su actividad ha sido demostrada usando varios modelos y midiendo algunos marcadores enzimáticos.

Anto *et al.*, (1996) comprobó la citotoxicidad y la actividad antitumoral de cinco curcuminoides sintéticos en cultivos de células L929, observaron que todos eran citotóxicos y que se producía un 50% de inhibición de los tumores utilizando una concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$, efecto similar al obtenido con la curcumina purificada. Otros autores han comprobado que la cúrcuma previene el cáncer de mama inducido en ratones y ratas por virus o por productos químicos (Bhide *et al.*, 1994). Mehta *et al.*, (1997), demostraron un efecto antiproliferativo de la curcumina en cultivos de células de tumor de mama y sugirieron que esta sustancia podía ser un potencial agente anticancerígeno, mientras que Verma *et al.*, (1998) han comprobado que la combinación de curcumina con isoflavonoides tiene un efecto preventivo y terapéutico en el cáncer de mama y de pulmón inducido por agentes estrogénicos, como algunos pesticidas químicos, y que este efecto es mayor que el que produce la curcumina por sí sola.

También se ha estudiado el efecto citoprotector y quimioprotector de la curcumina (Huang *et al.*, 1995; Rao *et al.*, 1995; Commandeur and Vermeulen, 1996; Pereira *et al.*, 1996; Samaha *et al.*, 1997). Samaha *et al.*, (1997) y Khar *et al.*, (1999) propusieron un mecanismo apoptótico como explicación de la actividad antitumoral de la curcumina sobre las células tumorales AK-5, y han comprobado que esta sustancia es capaz de inhibir el crecimiento del tumor mediante la inducción de la apoptosis de estas células, mientras que Menon *et al.* (1995) demostraron que la administración oral de curcumina (200 nmol/kg) inhibe las metástasis intestinales y aumenta la vida de los ratones con tumores inducidos por células de melanoma B16F10.

Un aspecto interesante de la actividad de la curcumina es su efecto radioprotector sobre las células normales y efectos radiosensibilizadores en las células cancerosas. Este mecanismo no se entiende por completo, se ha sugerido que la capacidad de la curcumina para reducir el estrés oxidativo e inhibir la transcripción de genes está relacionado con respuestas de estrés oxidativo e inflamatorias la cual puede proporcionar protección contra los efectos nocivos de la radiación, mientras que la actividad radiosensibilizadora podría ser debido la regulación positiva de genes responsables de la muerte celular (Plummer *et al.*, 1999; Jagetia, 2007; Murakami *et al.* 2008; Binion *et al.*, 2008; Kunwar *et al.* 2009; Cekmen *et al.*, 2009).

Por lo que después de ver el efecto de la curcumina en varias líneas celulares se ha propuesto combinarlo con otros agentes quimioterapéuticos, entre ellos esta Navis *et al.* (1999) que estudiaron la terapia combinada de la curcumina con el cisplatino, un agente anticanceroso ampliamente usado en la curación del fibrosarcoma, y comprobaron que cuando se administran conjuntamente ambas sustancias se consigue una recuperación casi total de los marcadores enzimáticos en homogenados de hígado y riñón de ratas.

Sin embargo, el mecanismo por el que la curcumina induce la apoptosis celular todavía no está totalmente claro, es por eso que en proceso para conocer estos mecanismos Lv *et al.*, (2014) mostró que la curcumina indujo apoptosis en células de cáncer de mama humano MCF-7 y MDA-231 siendo provocada por la regulación a la baja de Bcl-2 y la sobre regulación de Bax.

Mecanismos de Curcumina

Los mecanismos implicados en la inhibición de tumorigenesis por curcumina son diversos y parecen implicar una combinación de anti-inflamatorios, anti-oxidantes, inmunomodulación, proapoptotico y anti-angiogenicas propiedades a través de efectos peitrópicos sobre genes y vías de señalización celular en múltiples niveles (Park *et al.*, 2002; Maheshwari *et al.*, 2006; Strimpakos and Sharma, 2008; Hatcher *et al.*, 2008 and Goel *et al.*, 2008).

La sobreexpresión de COX-2 se ha visto implicada en la carcinogénesis de muchos tumores, viéndose en estudios que curcumina inhibe la transcripción de la proteína de COX-2 y esto probablemente desencadena la actividad anti-inflamatoria (Plummer *et al.*, 1999). Un estudio *in vitro* en células de cáncer cervical de humano se ha visto que la baja regulación de COX-2 induce la óxido nítrico sintetasa (iNOS) y ciclina D, causando esta combinación de actividad anti-inflamatoria y anti-oxidante la inhibición del factor de crecimiento endotelial vascular mediando la angiogénesis en células endoteliales microvasculares de intestino humano (Plummer *et al.*, 1999; Strimpakos and Sharma, 2008; Murakami *et al.*, 2008).

En estudios de células de carcinoma epiteliales de mama humano, células de cáncer de próstata y células de linfoma B *in vitro*, se encontró que la curcumina induce apoptosis incrementando la expresión de p53 en la fase G2 del ciclo celular y por liberación de citocromo c de la mitocondria (Aggarwal, 2008).

El efecto anti-tumor de la curcumina se ha atribuido en parte a la supresión de la proliferación celular, reducción de la carga tumoral y la inducción de la apoptosis en varios modelos de cáncer, tanto *in vitro* como *in vivo*. Se ha visto que inhibe múltiples niveles dentro de la red transcripcional para restringir la proliferación celular, además es capaz de inducir la apoptosis dependiente de p53 en varios tipos de cáncer de colon, mama, vejiga, pulmón, ovario, etc. (Anand *et al.*, 2008). La curcumina promueve la escisión mediada por caspasa-3 de β -Catenina y disminuye β -Catenina/Tcf-Lef capacidad de transactivación para c-Myc y ciclina D1 (Shi *et al.*; 2006) también activa la caspasa-7 y la caspasa-9 e induce la escisión de la polimerasa poliadenosina-5'-difosforibosa a través de la baja regulación de NF- κ B en células de mieloma múltiple (Jaiswal *et al.*, 2002; Sung *et al.*, 2009). Además, la curcumina inhibe la activación de EGFR, la actividad de Src e inhibe la actividad de algunos receptores nucleares (Maheshwari *et al.*, 2006; Binion *et al.*, 2008; Kunwar *et al.*, 2009); demuestra efectos inhibitorios sobre la COX-2 y ciclina D1, mediadas a través de NF- κ B, y restringe el crecimiento de células tumorales (Villegas *et al.*, 2008; Cen *et al.*, 2009) (Figura 2).

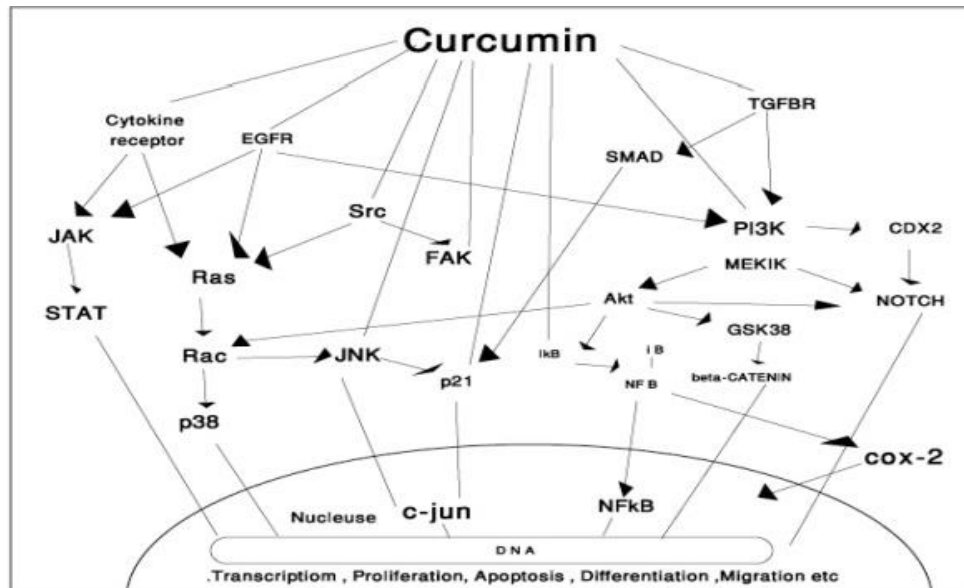


Figura 2. Actividades anti-cáncer de curcumina.

Se ha observado además que la curcumina suprime la expresión de Wt1 un gen implicado en la oncogénesis (Semsri *et al.*, 2011; Shen-meng *et al.*, 2012) por lo que se propone estudiar su expresión al combinarla con agentes quimioterapéuticos.

JUSTIFICACIÓN

La Organización Mundial de la Salud estima que en el 2030 habrá 13.1 millones de muertes por cáncer en todo el mundo; se le atribuyen 7.6 millones de muertes (alrededor del 13% del total de defunciones) en 2008, siendo esta enfermedad la principal causa de muerte en el mundo (WHO, 2014). En México, según la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC), el cáncer es la tercera causa de muerte y estima que cada año se detectan 128 mil casos nuevos. Los tipos más frecuentes de cáncer son diferentes entre hombres y mujeres, en hombres es cáncer de pulmón, estómago, hígado, esófago, colorrectal y próstata; mientras que en mujeres, cáncer de mama, pulmón, estómago, colorrectal y cérvico-uterino.

Las opciones actuales de tratamiento se basan en quimioterapias, cirugías, radioterapias y combinaciones de éstas, sin embargo, ninguna de estas terapias ha llevado a la sobrevivencia de los pacientes sin que presenten una elevada toxicidad debido a las elevadas dosis de fármacos empleados para controlar el progreso de la enfermedad.

Es por eso que en la búsqueda de nuevas alternativas, se ha optado por hacer un estudio en el uso de compuestos de extractos como lo es la curcumina, la cual se ha visto tener un efecto antitumoral y anti-proliferativo, por lo que sería una buena opción combinar su efecto con otros agentes quimioterapéuticos como lo es cisplatino, observando su toxicidad y el efecto en células cancerosas.

HIPÓTESIS

La curcumina quimiosensibiliza a las células cancerígenas a la muerte inducida por cisplatino.

OBJETIVO DEL TRABAJO

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la curcumina en combinación con cisplatino en líneas celulares de cáncer *in vitro*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar el efecto de curcumina en la proliferación de las líneas celulares de cáncer B16F10, HeLa y MCF7.
2. Determinar el efecto de la curcumina en la quimiosensibilización en las líneas celulares de cáncer tratadas con cisplatino.
3. Determinar el efecto de la curcumina en el ciclo celular y muerte en las líneas celulares de cáncer.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo de células

Se cultivaron las líneas celulares B16F10 (melanoma murino), HELA (cáncer cervicouterino humano) y MCF7 (cáncer de mama humano) en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM-F12) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de antibiótico-antimicótico, las células fueron incubadas a 37 °C en una atmósfera a 95% de O₂ y 5% de CO₂.

Preparación de curcumina

Se compró curcumina Sigma-Aldrich C1386 con un peso molecular de 368.38. Disolviéndose en DMSO > 11 mg/mL, posteriormente se filtró, utilizando filtros de 0.22µm para evitar alguna contaminación y después se pasó a combinar con medio DMEM preparado con 10% SFB y 1% Anti-anti.

Ensayo de proliferación celular (MTT)

El efecto en la viabilidad y proliferación celular de las líneas celulares HELA, MCF7 y B16F10 tratadas con Curcumina se evaluaron a las 24, 48 y 72 horas empleando el método de ensayo MTT [Bromuro de 3-(4, 5- dimetil tiazol- 2- ilo)- 2, 5- difenil tetrazolio] introducido por Mossman y adaptado en el laboratorio a una concentración final de 5 µg/ml PBS 1X (Buffer de fosfatos-salina).

Las células con 80% de confluencia fueron tripsinizadas, contadas en la cámara de Neubauer y transferidas a placas de microtitulación de 96 pozos con fondo plano, con una cantidad de 3,000 células por pozo. A las 24 horas se les agregó el tratamiento a concentraciones de 0, 20, 40, 60, 80, y 100 µM. Se incubaron en un periodo promedio de 24, 48 o 72 horas. A las 24, 48 o 72 horas del tratamiento se agregó 20 µL de MTT a cada pozo sin haber retirado el medio. Se incubó a 37°C por 1 hora y se leyó la absorbancia a 570nm en el lector Synergy 2 de BioTek. Se calcularon los porcentajes de

supervivencia relativas a las células control no tratadas. Se obtuvieron gráficas de las concentraciones contra el porcentaje de supervivencia y así calcular las concentraciones letales al 50%. La valoración de las concentraciones de Curcumina se realizará empleando tres pozos con cada concentración evaluada.

Utilizando la misma metodología anteriormente descrita se obtuvo la DL50 de las líneas celulares expuestas a 24 horas de tratamiento con cisplatino a concentraciones de 0, 4, 6, 8, 10, 12, 14 ng/ μ L, posteriormente se realizaron combinaciones con la DL25, DL50 y DL75 de cisplatino y curcumina.

Ensayo clonogénico

En una placa de 6 pozos se sembraran 250 células en 3 pozos como control y 500 células en los otros 3 pozos para someterlas a tratamiento, se dejaron incubar a condiciones previamente descritas por 24 horas, pasado el tiempo se retiró el medio y se adiciono el tratamiento solo donde se habían incubado 500 células a concentraciones de 10 y 15 μ M de curcumina para obtener un volumen final de 2 mL se incubó por 24h y posteriormente se retiró el medio con tratamiento, se agregaron 3 mL de medio nuevo y se dejó incubando por 8 días a 37°C en una atmosfera de humedad al 50% y CO₂ al 5%, revisando el crecimiento de las células cada 48h. Concluyendo los 8 días se retiró el medio y se fijaron las células con 1 mL de Metanol: Ácido acético (3:1) y se dejaron incubando a -20°C durante 20min, después se retirará el metanol: ácido acético y se lavó la placa con 1 mL de PBS 1X, después de retirar el PBS se adiciono 1mL del colorante cristal violeta y se incubó a temperatura ambiente por 10 min, pasado el tiempo se retiró el colorante y se realizaron 3 lavados con PBS 1X para quitar el exceso colorante, a continuación se contó cada colonia, considerando una colonia a un grupo de más de 50 células, el experimento se realizó para cada una de las líneas celulares anteriormente descritas.

Se utilizaron las siguientes fórmulas para tener datos cuantitativos:

$$\text{Eficiencia de Plaqueo} = \frac{\text{\#de colonias contadas en el control}}{\text{\# de células sembradas}} \times 100\%$$

$$\text{Fracción de sobrevivencia} = \frac{\text{\#de colonias formadas después del tratamiento}}{\text{\# de células sembradas} \times \text{EP}}$$

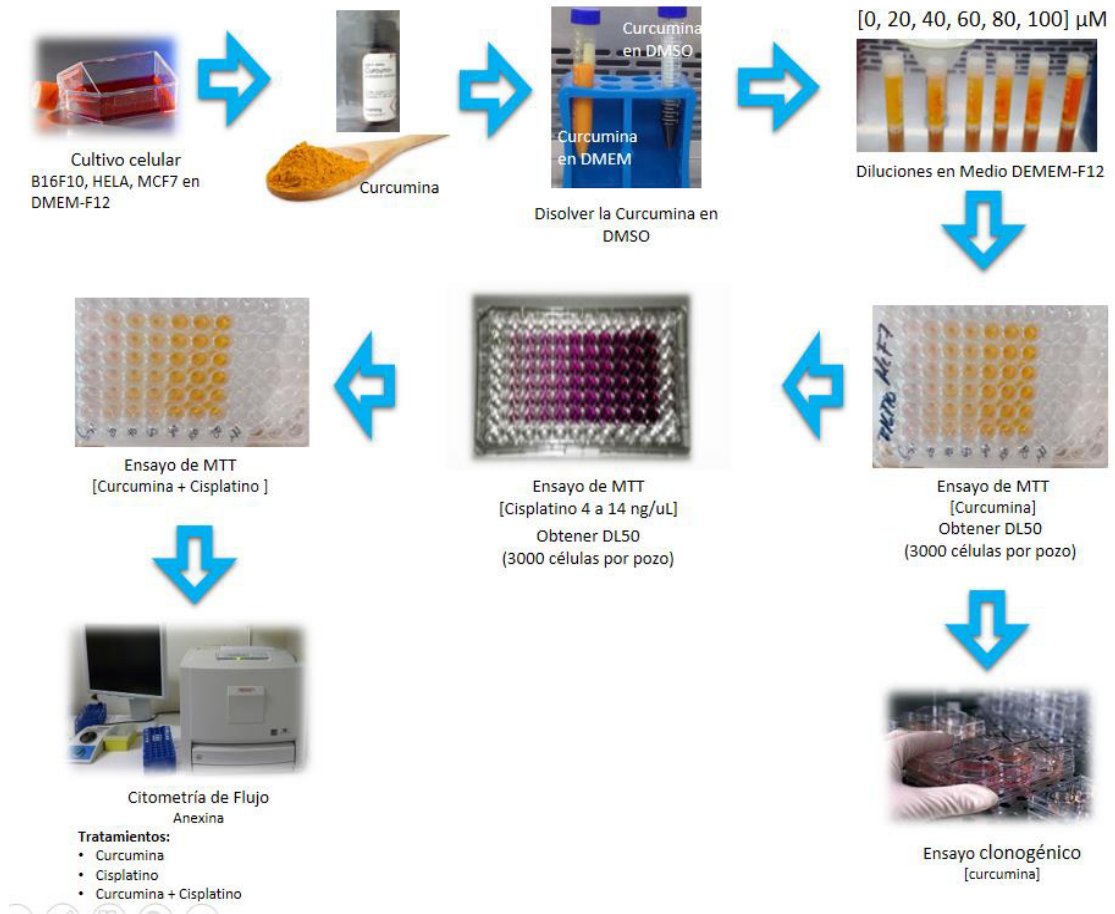
Análisis de Viabilidad Celular por Citometría de Flujo

Se utilizó citometría de flujo para dilucidar la muerte celular, para ello se sembraron 10,000 células por pozo en placas de 6 pozos, dejando que las células se adhirieran por 24h a 37°C, pasado dicho periodo las placas se expusieron a los tratamientos con curcumina y cisplatino durante 24 horas. Pasando el tiempo se recuperaron los sobrenadantes en tubos eppendorf, posteriormente se agregó 500µL de tripsina dejándola por 5 min y se neutralizará con 1 ml de medio DMEM, tomando todo en el tubo eppendorf, seguido de un lavado extra con PBS1X. Una vez que se recuperaren todas las células, se centrifugarán a 1600 rpm por 10 min, se desechará el sobrenadante con ayuda de la micropipeta, al pellet se le agregará Yoduro de propidio (0.5 µg/mL) en 100 µL de Buffer de unión (HEPES 10mM pH 7.4, NaCl 140mM, Ca₂Cl 2.5mM, filtrado y almacenado a 4°C) por muestra, posteriormente se incubará en oscuridad a 4°C durante 20 min, por último se leerá en el citometro de flujo (Accuri C6 BD) y se analizará con el software proporcionado por la misma compañía Becton Dickinson. Cabe mencionar que los experimentos se realizaron por triplicado para cada una de las líneas celulares anteriormente descritas.

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante ANOVA y prueba t-student, con ayuda del programa SPSS Statistics ver. 18.0 y Prism Graphpad.

Estrategia general



RESULTADOS

Análisis de la viabilidad celular de diversas líneas celulares expuestas a curcumina.

Para determinar la DL50 de las líneas celulares HeLa, Mcf7 y B16F10 se expusieron a curcumina en un rango dinámico de concentraciones de 20 a 100 μM . Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos en medio DMEM F12 con una cantidad inicial de 3000 células por pozo, siendo aplicado el tratamiento a las 24, 48 y 72 horas, llevándose a cabo el ensayo de MTT por triplicado.

En las Figuras 3,4 y 5 se observa el porcentaje de la viabilidad en función a la concentración expresada en μM junto con su desviación estándar, los resultados obtenidos de la DL50 a diferentes tiempos de cada una de las líneas celulares se muestran en la tabla 1, observando que la línea celular más resistente a la curcumina es Mcf7 con una DL50 de 40 μM y la más sensible HeLa con una DL50 de 18 μM a las 24 horas. A las 48 horas se obtuvo como resultado que HeLa obtuvo una DL50 a 10 μM mientras que B16F10 y Mcf7 a 18 y 17 μM respectivamente, mientras que a las 72 horas la DL50 de HeLa presentó la concentración más alta siendo de 30 μM , de 18 μM en B16F10 y Mcf7 de 20 μM .

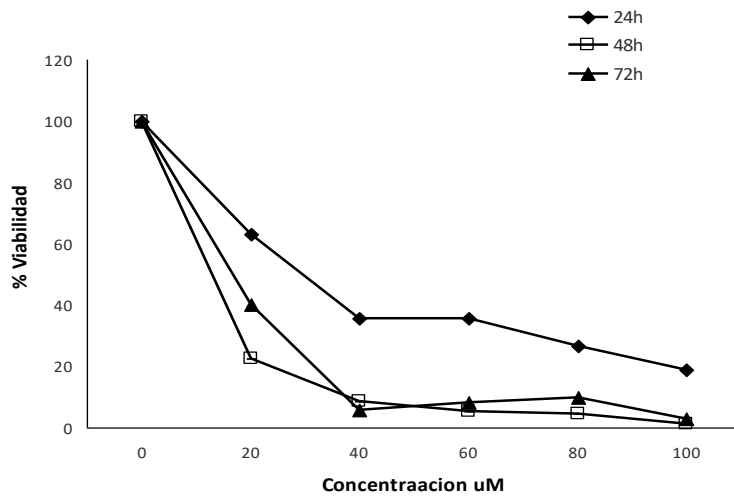


Figura 3. Análisis de viabilidad celular de la línea celular B16F10 a diversas concentraciones de 20 a 100 μ M de curcumina. Todos los ensayos se evaluaron a las 24, 48 y 72 horas y cada uno se realizó por triplicando presentando su desviación estándar.

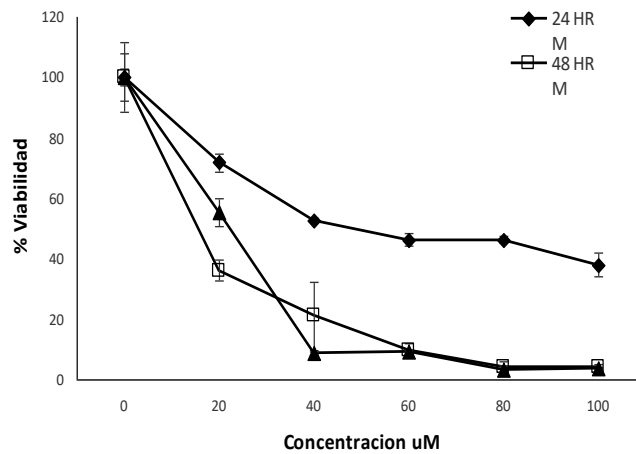


Figura 4. Análisis de viabilidad celular de la línea celular MCF7 a diversas concentraciones de 20 a 100 μ M de curcumina. Todos los ensayos se evaluaron a las 24, 48 y 72 horas y cada uno se realizó por triplicando presentando su desviación estándar.

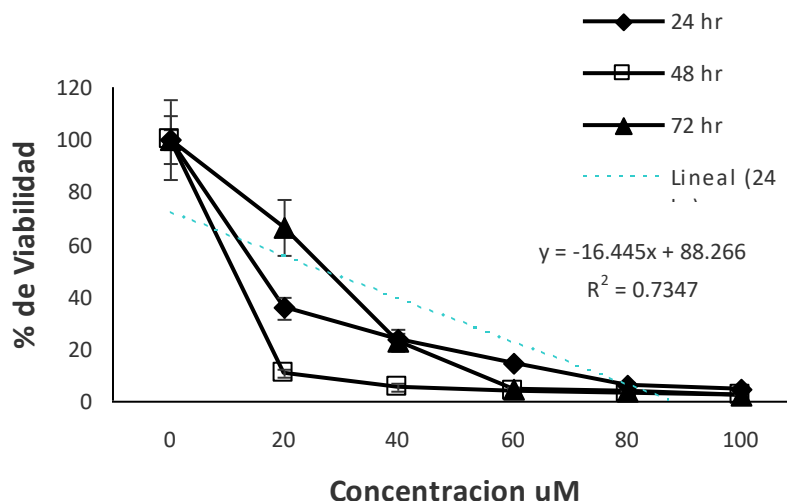


Figura 5. Análisis de viabilidad celular de la línea celular HeLa a diversas concentraciones de 20 a 100 μM de curcumina. Todos los ensayos se evaluaron a las 24, 48 y 72 horas y cada uno se realizó por triplicando presentando su desviación estándar.

Tabla 1. DL50 de las líneas celulares Mcf7, HeLa y B16F10 expuestas a curcumina a las 24, 48 y 72 horas.

Línea Celular/ Tiempo	24 horas	48 horas	72 horas
B16F10	30 μM	18 μM	18 μM
Mcf7	40 μM	17 μM	20 μM
HeLa	18 μM	10 μM	30 μM

Análisis de la formación de colonias de las diversas líneas celulares expuestas a curcumina.

Un ensayo clonogénico consiste en la sobrevivencia basada en la habilidad de una célula de formar una colonia, considerándose como colonia aquella que está formada de al menos 50 células hijas. Se seleccionó este método debido a que se puede determinar la muerte celular reproductiva después de haber expuesto a las células a algún tratamiento y además se puede utilizar para determinar la eficacia de los agentes citotóxicos como lo es la curcumina, la cual se observó que al exponer la línea celular

B16F10 se expuso a concentraciones de 10 y 5 μM la fracción de supervivencia fue del 50% y 60% respectivamente, y su eficiencia de plaqueo del 46.8% y 45.5%. Los resultados obtenidos de la línea celular B16F10 se muestran en la Figura 3, Tabla 2 y Figura 6.

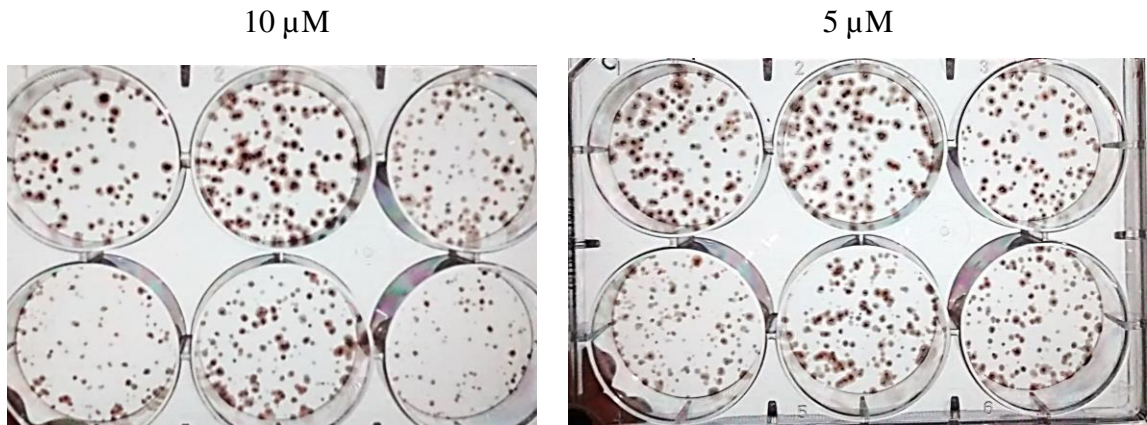


Figura 6. Ensayos clonogénicos de la línea celular B16F10 expuesta a 10 y 5 μM de curcumina. EL pozo 1,2 y 3 muestra el control, y el pozo 4, 5 y 6 fueron expuestos a curcumina.

Tabla 2. Resultados de los ensayos clonogénicos de la línea celular B16F10 expuesta a concentraciones de curcumina de 15 y 10 μM . EP = Eficiencia de Plaqueo %S= Porcentaje de Supervivencia

La formación de colonias en la línea celular Mcf7 se expuso a concentraciones de curcumina a 20 y 15 μM obteniendo una fracción de supervivencia del 25% y 36%. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4, Tabla 3 y Figura 7.

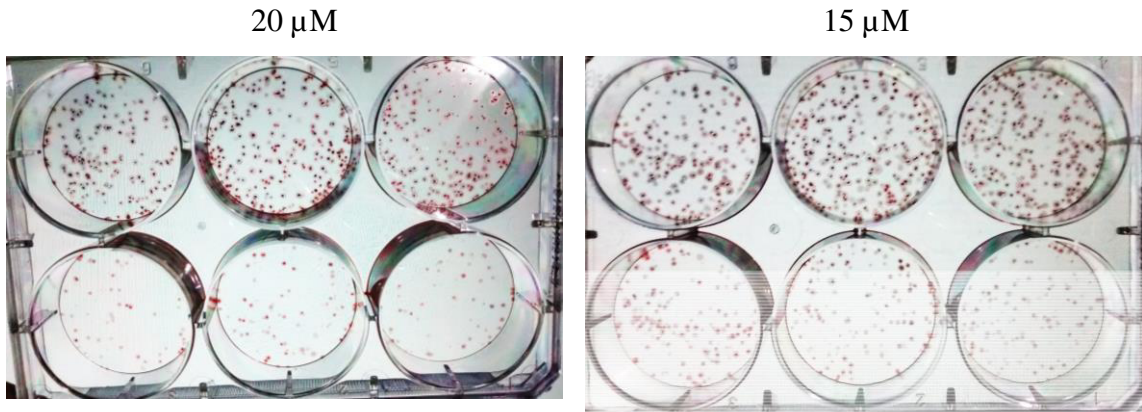


Figura 7. Ensayos clonogénicos de la línea celular Mcf7 expuesta a 15 y 20 μM de curcumina. EL pozo 1,2 y 3 muestra el control, y el pozo 4, 5 y 6 fueron expuestos a curcumina.

Tabla 3. Resultados de los ensayos clonogénicos de la línea celular Mcf7 expuesta a expuesta a concentraciones de curcumina de 15 y 20 μM . EP = Eficiencia de Plaqueo %S= Porcentaje de Supervivencia

Línea celular	Mcf7							
	ctrl (#colonias)	20uM (#colonias)	EP	%S	ctrl (#colonias)	15uM (#colonias)	EP	%S
	155	95	62	30.65	162	140	64.8	43.21
	182	95	72.8	26.10	191	123	76.4	32.20
	190	71	76	18.68	207	135	82.8	32.61
Promedio			70.27	25.14			74.67	36.01
Desviación estandar			7.34	6.04			9.12	6.24

La formación de colonias en la línea celular HeLa se expuso a concentraciones de curcumina a 15 y 10 μM obteniendo una fracción de sobrevivencia del 0% en ambas concentraciones. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5, Tabla 4 y Figura 8.

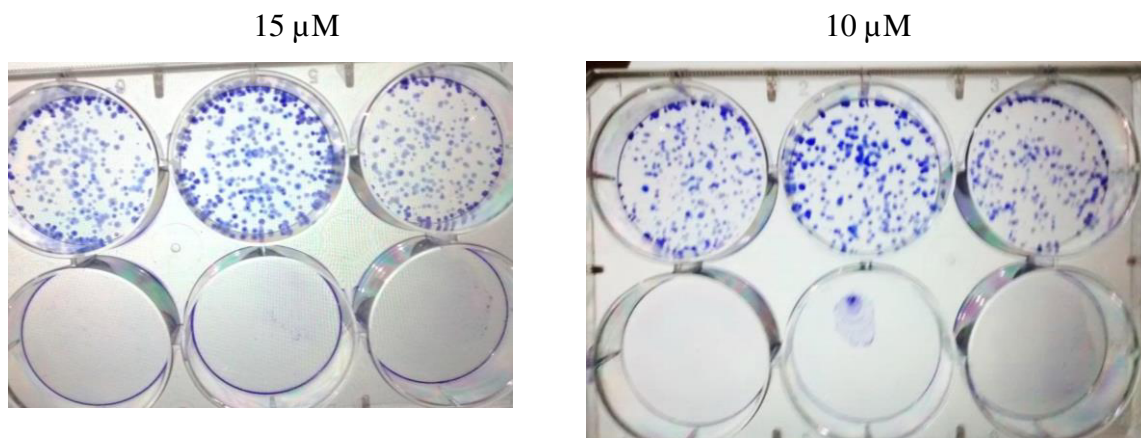


Figura 8. Ensayos clonogénicos de la línea celular HeLa expuesta a 15 y 10 μM de curcumina. EL pozo 1,2 y 3 muestra el control, y el pozo 4, 5 y 6 fueron expuestos a curcumina.

Tabla 4. Resultados de los ensayos clonogénicos de la línea celular HeLa expuesta a expuesta a concentraciones de curcumina de 15 y 20 μM . EP = Eficiencia de Plaqueo %S= Porcentaje de Sobrevivencia

Línea celular	HELA							
	Control (#colonias)	15uM (#colonias)	EP	%S	Control (#colonias)	10uM (#colonias)	EP	%S
	133	0	53.2	0	187	0	74.8	0
	174	0	69.6	0	211	0	84.4	0
	179	0	71.6	0	216	0	86.4	0
Promedio			64.80	0.00			81.87	0.00
Desviación estándar			10.10	0.00			6.20	0.00

El conjunto de resultados de formación de colonias en las 3 líneas celulares expuestas a diferentes concentraciones de curcumina se representan gráficamente en la Figura 9.

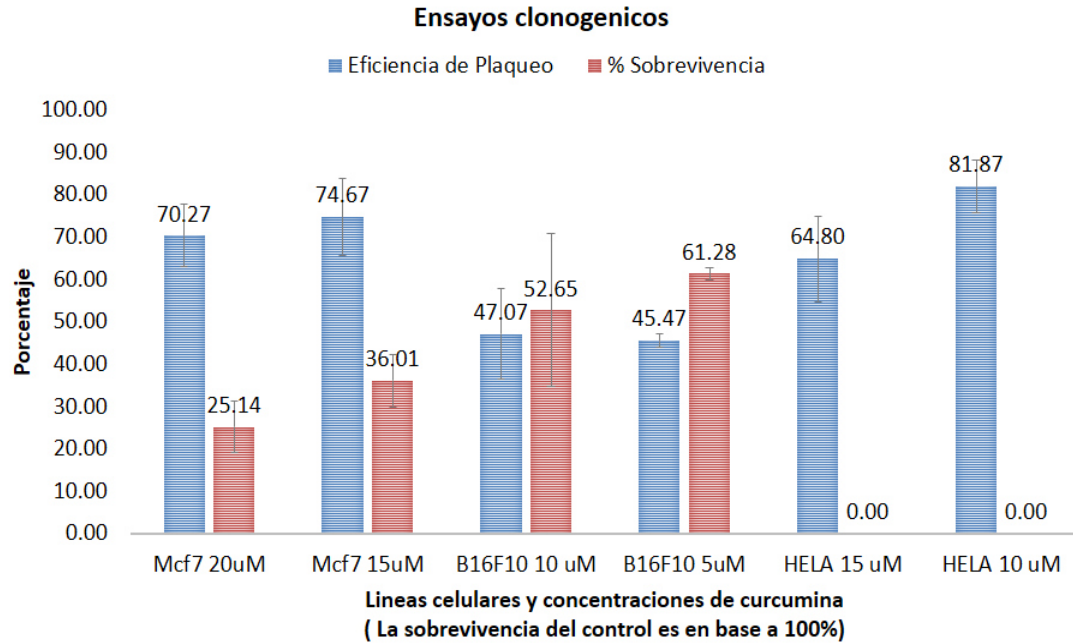


Figura 9. Resultados de los ensayos clonogénicos de las líneas celulares B16F10 y Mcf7 los cuales se realizaron por triplicando, presentando su desviación estándar.

Análisis de la viabilidad celular de diversas líneas celulares expuestas a cisplatino.

Para determinar la DL50 de las líneas celulares HeLa, Mcf7 y B16F10 se expusieron a cisplatino en un rango dinámico de concentraciones de 4 a 14 ng/μL, las células fueron sembradas en placas de 96 pozos en medio DMEM F12 con una cantidad inicial de 3000 células por pozo, siendo aplicado el tratamiento a las 24 horas, llevándose a cabo el ensayo de MTT por triplicado, teniendo como resultado que la línea celular B16F10 tiene una DL50 de 9 ng/μL mientras que HeLa y Mcf7 de 5 ng/μL. Los resultados obtenidos se pueden ver en la Figura 10 y en la Tabla 5.

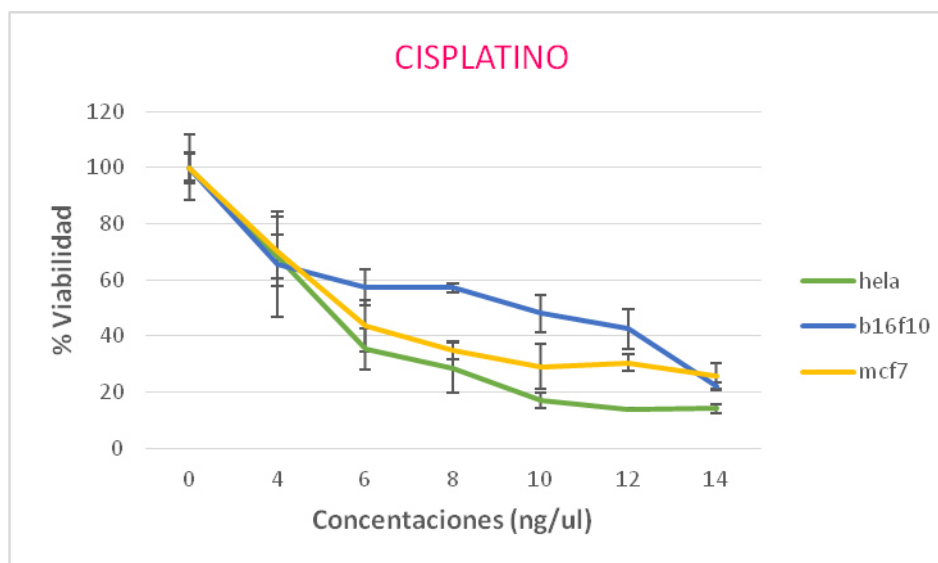


Figura 10. Análisis de viabilidad celular de las líneas celulares MCF7, HeLa y B16F10 a concentraciones de 4 a 14 ng/μL de cisplatino. Todos los ensayos se evaluaron a las 24 horas y cada uno se realizó por triplicado presentando su desviación estándar.

Tabla 5. DL50 de las líneas celulares Mcf7, HeLa y B16F10 expuestas a cisplatino a las 24 horas.

Línea Celular/ Tiempo	24 horas
B16F10	9 ng/μL
Mcf7	5 ng/μL
HeLa	5 ng/μL

Análisis de la viabilidad celular de diversas líneas celulares expuestas a curcumina y cisplatino.

Después de determinadas las DL50 para Cisplatino y Curcumina para las diversas líneas celulares se prosiguió a realizar una combinación. Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos en medio DMEM F12 con una cantidad inicial de 3000 células por pozo, se aplicó el tratamiento a las 24 horas, llevándose a cabo el ensayo de MTT por triplicado. En las Figuras 11, 12 y 13 se muestran las diversas líneas celulares de cáncer, tratadas con curcumina, cisplatino y curcumina combinada con cisplatino,

tomándose las concentraciones de 15, 30 y 45 μM de curcumina y para cisplatino de 5, 10 y 15 $\text{ng}/\mu\text{L}$ solo para la línea B16F10, y para Mcf7 y Hela de 2.5, 5 y 7.5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ tomándose esas concentraciones debido a que son las DL25, DL50 y DL75 para Curcumina y Cisplatino en sus respectivas líneas celulares. En las tres líneas celulares se observó que la curcumina en combinación con cisplatino presenta tener un efecto aditivo, siendo B16F10 y HeLa las dos líneas celulares con menor porcentaje de viabilidad al exponerlas a cisplatino y curcumina.

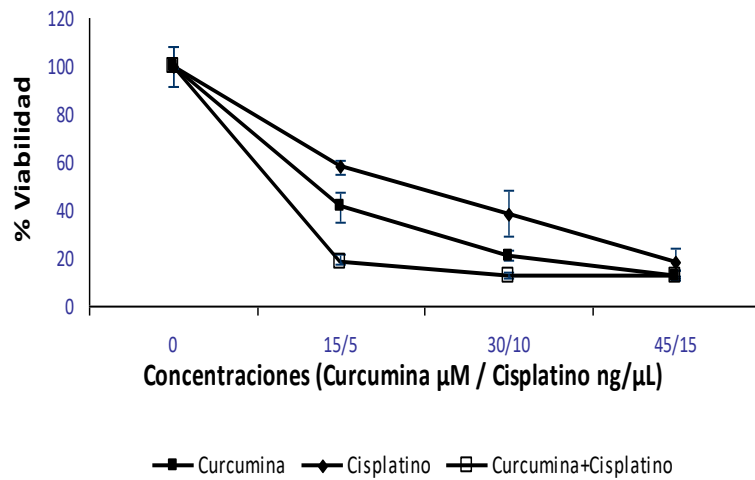


Figura 11. Análisis de viabilidad celular de la línea celular B16F10 utilizando la DL25, DL50 y DL75 de curcumina y Cisplatino. Todos los ensayos se evaluaron a las 24 horas y cada uno se realizó por triplicado presentando su desviación estándar.

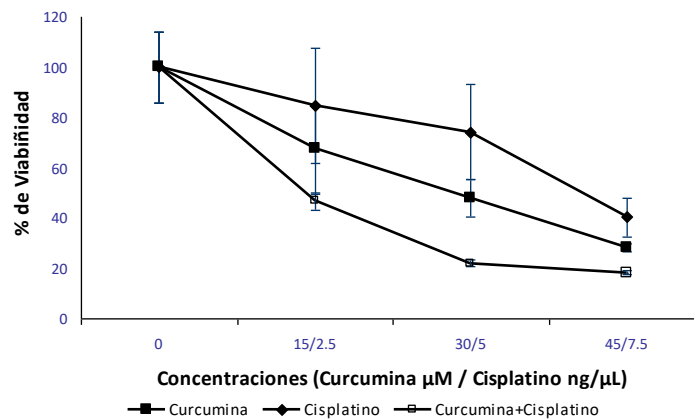


Figura 12. Análisis de viabilidad celular de la línea celular MCF7 utilizando la DL25, DL50 y DL75 de curcumina y Cisplatino. Todos los ensayos se evaluaron a las 24 horas y cada uno se realizó por triplicado presentando su desviación estándar.

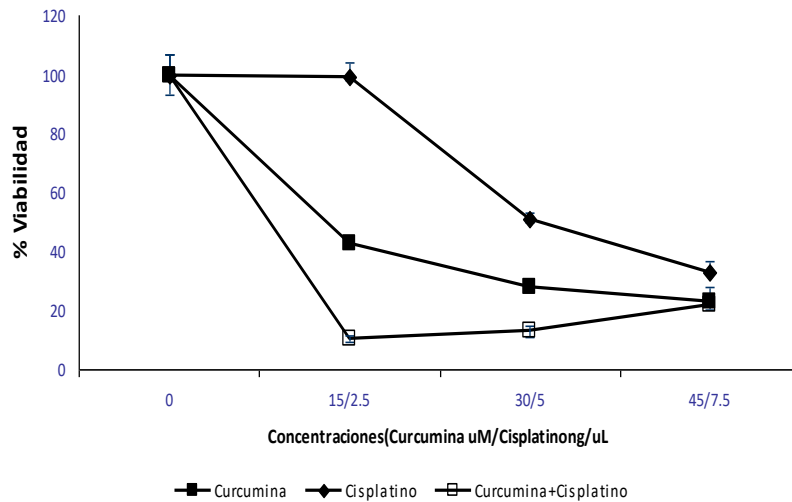


Figura 13. Análisis de viabilidad celular de la línea celular HeLa utilizando la DL25, DL50 y DL75 de curcumina y Cisplatino. Todos los ensayos se evaluaron a las 24 horas y cada uno se realizó por triplicado presentando su desviación estándar.

Análisis de viabilidad celular

Después de observar la viabilidad célula mediante MTT se prosiguió a revisar los resultados mediante citometría de flujo. Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos en medio DMEM F12 con una cantidad inicial de 10000 células por pozo, en placas de 6, aplicándose el tratamiento a las 24 horas. Las diversas líneas celulares de cáncer fueron tratadas con curcumina, cisplatino y curcumina combinada con cisplatino, tomándose las concentraciones de 15 uM de curcumina y para cisplatino de 5 ng/uL. Como control se usaron las células cultivadas con DMEM-F12 con 10% de SFB durante 24 horas. La viabilidad celular se analizó utilizando ioduro de propidio mostrando que existe una mayor muerte en células Hela y Mcf7 usando una combinación de cisplatino

con curcumina, mientras que en B16F10 se obtuvo una mayor muerte usando solo la curcumina (Figura 14).

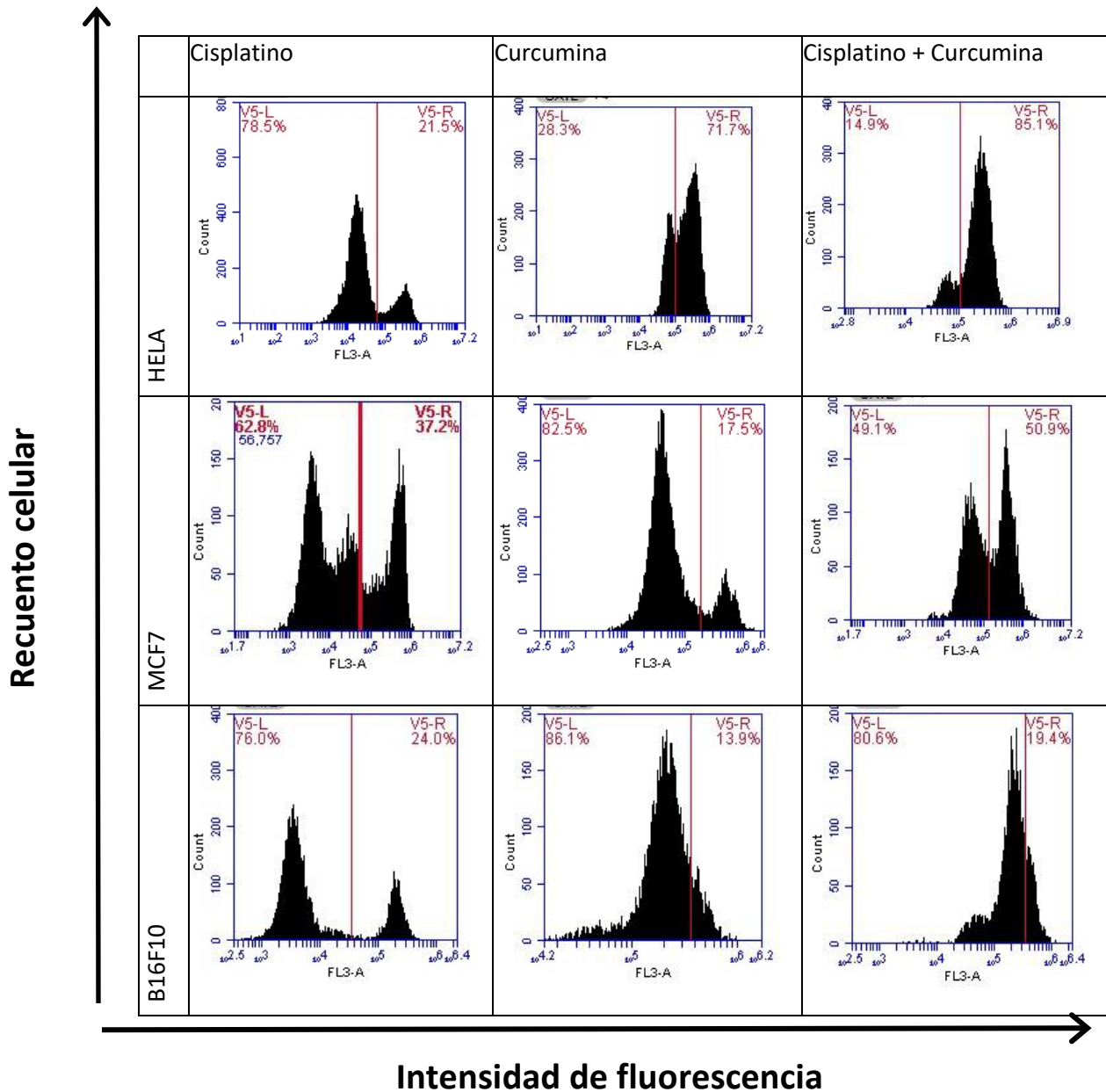


Figura 14. Viabilidad celular mediante citometría de flujo. Se cultivaron células HELA, MCF7 y B16F10 con curcumina, cisplatino y combinadas. Control: células cultivadas con DMEM-F12 con 10% de SFB durante 24 horas. La viabilidad celular se analizó utilizando ioduro de propidio.

DISCUSIÓN

La curcumina (diferuloilmetano) es la sustancia causante del color amarillo característico de los rizomas de la planta *Cucuma Longa Linn*, y es uno de los ingredientes activos responsable de su actividad biológica. La principal línea de investigación de la cúrcuma en los últimos años, ha sido conocer su actividad antiproliferativa y antitumoral; y- tiene un variedad de propiedades terapéuticas incluyendo anti-oxidante, analgésico, anti-inflamatorio y actividad antiséptica y además recientemente se ha encontrado que posee actividades anti-cancerosas a través de su efecto sobre una variedad de vías biológicas involucradas en la mutagénesis, expresión de oncogenes, regulación del ciclo celular, apoptosis, la tumorogénesis y metástasis. Con la finalidad de contribuir al estudio de sus actividades anti-cancerosas en este trabajo se realizó el análisis de su efecto en diversas líneas celulares de cáncer.

Para realizar un análisis de la toxicidad de la curcumina en las diversas líneas celulares de cáncer se realizó mediante un ensayo de MTT, en la línea celular Mcf7 se ha reportado una dosis letal media de 30 μM a las 48 hr y 40 μM a las 24 hr (Kumaravel et al., 2012), siendo similar a lo obtenido en nuestros ensayos la cual fue de 40uM a las 24 horas y a las 48 hr de 17 μM , además Jia et al., 2014 reporto tener un 60% de viabilidad a las 24 horas expuesta a curcumina a 40 μM .

En la línea celular HeLa nosotros obtuvimos una DL50 de 18 μM a las 24 horas y a las 48 horas de 10 μM , Brava et al., 2005, reporta que la curcumina a 5 μM tiene un porcentaje de viabilidad del 95 a las 24 hr, obteniéndose un porcentaje muy similar en esa línea celular en nuestros experimentos, ya que la línea celular Hela a concentraciones menores de 10uM tiende a comportarse como el control o hasta elevar su viabilidad. Mu et al 2013 reporta que la línea celular hela tiene un porcentaje de inhibición de 10 % a las 24 horas llegando al 50% de inhibición al estar en una concentración de 100 μM siendo nuestros resultados no congruentes con él, pudiéndose deber a la lectura que se realiza con la curcumina ya que emite un color amarillo, que podría estar interfiriendo al momento de leer la placa en el espectrofotómetro.

En cambio Anuchapreeda et al., 2012 reporta que la curcumina en la línea celular B16F10 tiene una DL50 de 3.5 μM a las 72 horas siendo que nosotros obtuvimos una DL50 de 18 μM , siendo muy por arriba de lo reportado.

Se ha reportado en otras líneas celulares como lo es una línea celular de cáncer de vejiga GBC-SD (Tian-Yu et al., 2013) reporta tener a las 24 horas de 30 μM , a las 48 horas de 7.5 μM y a las 72 horas de 7.50 μM . Yadav 2010 reporta en células de meduloblastoma de humano obteniendo una DL50 a una concentración de 25 μM , observándose como un patrón común que las DL50 obtenidas en las diversas líneas celulares de cáncer están por debajo de los 40 μM de curcumina.

En los ensayos clonogénicos las células de medublastoma reporta una ausencia de las células al llegar a una concentración de 6.25 μM a las 24 horas (Yadav 2010) y en la línea celular de cáncer de vejiga GBC-S se ha reportado que a los 3 μM siendo la dosis más alta empleada reporta tener un número de colonias menor a 50 (Tian-tu et al. 2013). En la línea celular Mcf7 a una concentración de 40 μM de curcumina dejándose de 3 a 6 horas se observa que el número de colonias era de 80 y 60 respectivamente, habiéndose sembrado 1000 células por pozo. (Jia et al 2014). En nuestros ensayos se sembraban 500 células por pozo y a una concentración de 15 μM se obtenía un número de colonias de aproximadamente 140 en la línea B16F10, mientras que para la línea celular Mcf7 a una concentración de 20 μM se obtenía aproximadamente 95 colonias.

Bava et al., 2005 reporta que la curcumina a 5 μM en la línea celular Hela al combinarse con taxol a una concentración de 5 μM un quimioterapéutico se obtiene in efecto sinérgico, reportándose el mismo en efecto en una línea celular de cáncer de ovario humano (Yunos et al., 2011) y en la línea celular HA22T/VGH a una concentración de 20 μM de curcumina y 1.5 $\mu\text{g/mL}$ de cisplatino (Notabartolo et al., 2005). Siendo el mismo efecto que se encontró en nuestros experimentos aplicado a las 24 horas, variando en la cantidad de curcumina y cisplatino reportado en los trabajos anteriores.

CONCLUSIONES

La curcumina en la proliferación de las líneas celulares de cáncer B16F10, HeLa y MCF7 a las 24 horas presenta tener una dosis letal media de 30, 18 y 40 μM respectivamente y en la formación de colonias la línea celular B16F10 presento tener un % de sobrevivencia del 53% al exponerse a 10 μM de curcumina y la línea celular Mcf7 de 36% al exponerse a 15 μM .

La curcumina al combinarse con cisplatino presenta tener un efecto aditivo en las diversas líneas celulares de cáncer.

BIBLIOGRAFÍA

Aggarwal BB. 2008. Prostate cancer and curcumin: add spice to your life. *Cancer Biol. Ther.*, 7:1427-35.

American Cancer Society. 2014. <http://www.cancer.org/index>

Ammon H, Safayhi H, Mark T, Sabieraj J. 1993. Mechanism of antiinflammatory actions of curcumin and boswellic acids. *Journal Ethnopharmacol* 38:113-119.

Ammon H, Wahl M. 1991. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med.*, 57:1-7.

Anand P, Thomas SG, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikuma KB, Sung B, Tharakan ST, Misra K, Priyadarsini IK, Rajasekharan KN, Aggarwal BB. 2008. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and mother nature. *Biochem. Pharmacol.* 76:1590-611.

Anto R, George J, Babu K, Rajasekhara K, Kuttan R. 1996. Antitumorigenic and anticarcinogenic activity of natural and synthetic curcuminoids. *Mutat Res.* 370: 127-131.

Anuchapreeda, Fukumori, Okonogi, Ichikawa, 2012. Preparation of Lipid Nanoemulsions Incorporating Curcumin for Cancer Therapy.

Bava, S., Vineshkumar T., Puliappadamba, Deepti, A., Asha Nair, Devarajan Karunakaran, and Ruby John Anto. 2005. Sensitization of Taxol-induced Apoptosis by Curcumin Involves Down-regulation of Nuclear Factor- κ B and the Serine/Threonine Kinase Akt and Is Independent of Tubulin Polymerization*

Bhide SV, Azuine MA, Lahiri M, Telang NT. 1994. Chemoprevention of mammary tumor virus induced and chemical carcinogen induced rodent mammary tumors by natural plant products. *Breast Cancer Res Treatment*, 30:233-242

Binion DG, Otterson MF, Rafiee P. 2008. Curcumin inhibits VEGF-mediated angiogenesis in human intestinal microvascular endothelial cells through COX-2 and MAPK inhibition. *Gut* 57:1509-17.

Cekmen M, Ilbey YO, Ozbek E, Simsek A, Somay A, Ersoz C. 2009 Curcumin prevents oxidative renal damage induced by acetaminophen in rats. *Food Chem. Toxicol* 47:1480-4.

Cen L, Hutzen B, Ball S, DeAngelis S, Chen CL, Fuchs JR, Li C, Li PK, Lin J. 2009. New structural analogues of curcumin exhibit potent growth suppressive activity in human colorectal carcinoma cells. *BMC Cancer* 9:99.

Commandeur J, Vermeulen N. 1996. Cytotoxicity and cytoprotective activities of natural compound. The case of curcumin. *Xenobiotica*, 26: 667-668.

Goel A, Jhurani S, Aggarwal BB. 2008. Multi-targeted therapy by curcumin: how spicy is it? *Mol. Nutr. Food Res.* 52:1010-30.

Haber DA, Sohn RL, Buckler AJ, Pelletier J, Call KM, Housman DE. 1991. Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA.* 88:9618-9622.

Hatcher H, Planalp R, Cho J, Torti F, Torti SV. 2008. Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. *Cell Mol. Life Sci.* 65:1631-52.

Hellman S, Vokes E. 1996. Advancing current treatments for cancer. *Sci. American* 275: 84-89.

Hernández-Herrera A, Aguirre-Cavazos AM, Fuentes-Vélez H, Rodríguez-Padilla C, Trejo-Ávila L, Zapata Benavides P. 2004. WT1: Sexo, vida y muerte. *Ciencia UANL*, 7:3.

Huang M, Ma W, Lu Y, Chang R, Fisher C, Manchand P, Newmark H, Conney A. 1995. Effects of curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin and tetrahydrocurcumin on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion. *Carcinogenesis* 16:2493-2497.

Jagetia GC. 2007. Radioprotection and radiosensitization by curcumin. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 595:301-20.

Jaiswal AS, Marlow BP, Gupta N, Narayan S. 2002. Beta-catenin-mediated transactivation and cell-cell adhesion pathways are important in curcumin (diferuylmethane)-induced growth arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Oncogene* 21: 8414-27.

Jia, T., Zhang, L., Yale Duan, Y., Zhang, M., Wang, G., Zhang, J., Zhao, Z. 2014 The differential susceptibilities of MCF-7 and MDA-MB-231 cells to the cytotoxic effects of curcumin are associated with the PI3K/Akt-SKP2-Cip/Kips pathway.

Khar A, Ali A, Pardhasaradhi B, Begum Z, Anjum R. 1999. Antitumor activity of curcumin is mediated through the induction of apoptosis in AK-5 tumor cells. *FEBS Lett*, 19: 165-168.

Kumaravel M., Sankar, P., Rukkumani, R., 2012. Antiproliferative effect of an analog of curcumin bis-1,7-(2-hydroxyphenyl)-hepta-1,6-diene-3,5-dione in human breast cancer cells.

Kunwar A, Sandur SK, Krishna M, Priyadarsini KI. 2009 Curcumin mediates time and concentration dependent regulation of redox homeostasis leading to cytotoxicity in macrophage cells. *Eur. J. Pharmacol* 611:8-16.

Little M, Wells C. 1997. A clinical overview of WT1 gene mutations. *Hum Mutat.* 9:209–225.

Lv Z, Liu X, Zhao W, Dong Q, Li F, Wang H, Kong B. 2014. Curcumin induces apoptosis in breast cancer cells and inhibits tumor growth in vitro and in vivo. *International journal of clinical and experimental pathology* 7:2818.

Maheshwari R, Singh AK, Gaddipati J, Srimal RC. 2006. Multiple biological activities of curcumin: a short review. *Life Sci.*, 78:2081-7.

Mehta K, Pantazis P, McQueeb T, Aggarwal B. 1997. Antiproliferative effects of curcumin (diferuloilmethane) against human breast tumor cell lines. *Anti-cancer Drugs* 8: 470-481.

Menke AL, Van Der AJ, Jochemsen AG. 1998. The Wilms' tumor 1 gene: oncogene or tumor suppressor gene? *Int. Rev. Cytol.* 181:151-212.

Menon L, Kuttan R, Kuttan G. 1995. Inhibition of lung metastasis in mice induced by B16F10 melanoma cells by polyphenolic compounds. *Cancer Lett* 95:221-225.

Mesa MD, Ramírez-Tortosa MC, Aguilera CM, Ramírez-Boscá A, Gil A. 2000. Efectos farmacológicos y nutricionales de los extractos de *Curcuma longa* L. y de los cucuminoides.

Murakami A, Ashida H, Terao J. 2008. Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Lett.*, 269:315-25.

Navis I, Sriganth P, Premalatha B. 1999. Dietary curcumin with cisplatin administration modulates tumor marker indices in experimental fibrosarcoma. *Pharmacol Res*, 39:175-179.

NIH. 1997. Panel on definition and description. Defining and describing complementary and alternative medicine. *Alternat Ther Health Med* 3:49-57

Notarbartolo, M., Poma, P., Perri, D., Dusonchet, L., Cervello, D'Alessandro, N. 2005. Antitumor effects of curcumin, alone or in combination with cisplatin or

doxorubicin, on human hepatic cancer cells. Analysis of their possible relationship to changes in NF-kB activation levels and in IAP gene expression.

Park MJ, Kim EH, Park IC, Lee HC, Woo SH, Lee JY, Hong YJ, Rhee CH, Choi SH, Shim BS, Lee S.H, Hong SI. 2002. Curcumin inhibits cell cycle progression of immortalized human umbilical vein endothelial (ECV304) cells by up-regulating cyclin-dependent kinase inhibitor, p21WAF1/CIP1, p27KIP1 and p53. *Int. J. Oncol.* 21:379-83.

Pereira M, Grubbs C, Barnes L, Li H, Olson G, Eto I, Juliana M, Whitaker L, Kelloff G, Steele V, Lubet R. 1996. Effects of the phytochemicals, curcumin and quercetin, upon azoxymethane-induced colon cancer and 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary cancer in rats. *Carcinogenesis*, 17:1305-1311.

Plummer SM, Holloway KA, Manson MM, Munks RJ, Kaptein A, Farrow S. 1999. Howells. L. Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF-kappaB activation via the NIK/IKK signalling complex. *Oncogene*, 18:6013-20.

Rao C, Rivenson A, Simi B, Reddy B. 1995. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary curcumin, a naturally occurring plant phenolic compound. *Canc Res*, 55:259-266.

Samaha H, Kelloff G, Steele V, Rao C, Reddy B. 1997. Modulation of apoptosis by sulindac, curcumin, phenylethyl-3-methylcaffeate, and 6-phenyl hexyl isothiocyanate: apoptotic index as a biomarker in colon cancer chemoprevention and promotion. *Cancer Res*, 57: 1301-1305.

Semsri S, Krig SR, Kotelawala L, Sweeney CA, Anuchapreeda S. 2011. Inhibitory mechanism of pure curcumin on Wilms' tumor (WT1) gene expression through the PKC α signaling pathway in leukemic K562 cells. *FEBS letters*, 585:2235-2242.

Shi M, Cai Q, Yao L, Mao Y, Ming Y, Ouyang G. 2006. Antiproliferation and apoptosis induced by curcumin in human ovarian cancer cells. *Cell. Biol. Int.*, 30:221-226.

Srimal R. 1997. Turmeric: a brief review of medicinal properties. *Fitoterapia*, 68: 483-493.

Srinivas L, Shalini V, Shylaja M. 1992. Turmerin: a water soluble antioxidant peptide from turmeric (*Curcuma longa*). *Arch Biochem Biophys*, 292:617-623.

Strimpakos A, Sharma R. 2008. Curcumin: preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials. *Antioxid. Redox Signal.* 10:511-45.

Sung B, Kunnumakkara AB, Sethi, G, Anand P, Guha S, Aggarwal BB. 2009. Curcumin circumvents chemoresistance in vitro and potentiates the effect of thalidomide and bortezomib against human multiple myeloma in nude mice model. *Mol. Cancer Ther.* 8:959-70.

Verma S, Goldin B, Lin P. 1998. The inhibition of the estrogenic effects of pesticides and environmental chemicals by curcumin and isoflavonoids. *Environ Health Perspect.* 106:807-812.

Villegas I, Sánchez-Fidalgo S, Alarcón de la Lastra C. 2008. New mechanisms and therapeutic potential of curcumin for colorectal cancer. *Mol. Nutr. Food Res.* 52:1040-61.

Who. 2014. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>.

Yang L, Han Y, Suarez-Saiz F, Minden MD. 2007. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story (Review). *Leukemia.* 21:868–876.

Yunos N., BEALE P., YU J., HUQ F., 2011. Synergism from Sequenced Combinations of Curcumin and Epigallocatechin-3-gallate with Cisplatin in the Killing of Human Ovarian Cancer Cells

RESUMEN BIOGRÁFICO

Evelyn Nallely Muñiz Guzmán

Candidata para el título de Maestría en Ciencias
con Orientación en Inmunobiología

Título de tesis: “EFECTO DE LA CURCUMINA EN COMBINACIÓN CON
CISPLATINO EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER *IN VITRO*”

Datos personales: Nacida en la ciudad de Guadalupe Nuevo León México el 28 de junio de 1990, hija de la Sra. María Guadalupe Guzmán Salinas y el Sr. Humberto Muñiz Varela.

Educación: Egresada como Licenciada en Biotecnología Genómica en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.