



Evaluación *in-vitro* del efecto de la curcumina y curcumina dietil succinato sobre la viabilidad y producción de IL-6 en cultivos celulares de cáncer de mama

CONDORI S., RAMIRO¹

ROJAS H., RICARDO²

DRA. GUTIÉRREZ A., ROXANA J.³

PHD, MS, BS PINO-FIGUEROA, ALEJANDRO⁴

CORRESPONDENCIA:

RAMIRO.RCS@OUTLOOK.COM

FECHA DE RECEPCIÓN: 9 DE ABRIL DE 2015

FECHA DE ACEPTACIÓN: 14 DE MAYO DE 2015

Resumen

La curcumina es un polifenol usado como colorante natural obtenido del Turmeric (*Curcuma Longa*) oriundo de la India. Diferentes investigaciones han identificado a la curcumina como el metabolito con mayor actividad del turmeric (*Curcuma Longa*); estudios *in vitro* demuestran la actividad anti-inflamatoria, anti-oxidante y anti-cancerígena de esta sustancia. Esta investigación se efectuó en el Laboratorio de Farmacología del Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences University, Boston, Estados Unidos en el periodo mayo-agosto 2014, con el fin de evaluar la actividad de la curcumina y curcumina dietil succinato (compuesto sintético análogo a la curcumina con mayor estabilidad), sobre la viabilidad celular y uno de los mecanismos de proliferación y metástasis del cáncer de mama, el cual es la pro-

Abstract

Curcumin is a polyphenol used as natural dye obtained from Turmeric (*Curcuma Longa*) which is native from India. Different studies have identified the curcumin as the most active metabolite of turmeric (*Curcuma Longa*); *in-vitro* studies demonstrate anti-inflammatory, anti-oxidant and anti-cancer activity of curcumin. This research was carried out in the Laboratory of Pharmacology from the Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences University, Boston, USA in the period from May to August in order to assess the activity of curcumin and curcumin diethyl succinate (analogous synthetic compound of curcumin with increased stability) over the cellular viability and one of the mechanisms of proliferation and metastasis of breast cancer, which is the IL-6 production. We used cell cultures of breast cancer (MDA-MB 231 cell line) treated

1 y 2 Internos del Programa Profesional de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Cs. Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, UCSM. Calle Arequipa N° 100, Cerro Colorado, Arequipa. Telf: 995795277

3 Docente Principal Facultad de Cs. Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas UCSM, Arequipa-Perú.

4 Assistant Professor of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, MCPHS University Boston-USA.

ducción de IL-6. Se usaron cultivos celulares de cáncer de mama (línea celular MDA-MB 231) los cuales fueron tratados con curcumina y curcumina dietil succinato en concentraciones de 1 μM , 3 μM y 10 μM , en ambos casos. Posterior a la incubación, durante 24 horas, se determinó la viabilidad de los cultivos celulares tratadando utilizando los ensayos de exclusión de azul de tripán y citotoxicidad por MTS, y se midió la concentración de IL-6 mediante ELISA (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzima). Los resultados demostraron cambios en la morfología de los cultivos celulares, disminución en la proliferación de las células cancerígenas (viabilidad) con ambos tipos de curcumina en relación al control, siendo la viabilidad de los cultivos tratados con curcumina menor que la observada con la curcumina dietil succinato. En relación a la producción de IL-6 se corroboró que las células cancerígenas producen concentraciones muy elevadas de esta citocina (90-98 pg/ml, valores correspondientes a los controles empleados), los cuales fueron visiblemente disminuidos luego de incubar las células con curcumina y curcumina dietil succinato en concentraciones de 1, 3 y 10 μM . También se demostró estadísticamente que la curcumina produjo una mayor reducción en los niveles de IL-6 que la curcumina dietil succinato en concentraciones de 3 y 10 μM , sin embargo a 1 μM la curcumina sintética mostró mayor eficacia. Al relacionar la disminución de la viabilidad celular producida por ambas curcuminas, con la producción de IL-6, se observó que no existe una relación directa entre tales parámetros ya que a pesar de la significativa disminución en la proliferación celular inducida por las curcuminas, la producción de IL-6 en los cultivos celulares continuó siendo superior a los valores observados en células sanas.

Se concluyó que las curcuminas modifican la morfología celular de las células cancerígenas, disminuyendo su viabilidad y la producción de IL-6, no habiéndose encontrado una relación directa entre estas dos últimas variables.

with curcumin and curcumin diethyl succinate in different concentrations: 1 μM , 3 μM and 10 μM in both cases. After incubation of 24 hours, it was determined the cellular viability with tripan blue and MTS assay, the concentration of IL-6 was determined by ELISA (Enzyme Linked Assay by immunoabsorption). Our results showed a decrease in the proliferation of cancer cells (viability) with both curcumins compared with the control group, being the viability of the cultures treated with curcumin lower than the cells with diethyl succinate curcumin.

In relation to the IL-6 production, it was confirmed that cancer cells produce very high concentrations of this cytokine (90-98 pg / ml, values corresponding to the controls used), which were visibly reduced after cell incubation with curcumin and diethyl succinate curcumin at concentrations of 1, 3 and 10 μM . Also, it was shown statistically that curcumin produced a greater reduction in IL-6 levels than the diethyl succinate curcumin in concentrations of 3 and 10 μM , however at 1 μM the synthetic curcumin was more efficient. When we relate the reduction of cell viability caused by both curcumins, with the production of IL-6, it was observed that there is not a direct relationship between such parameters because even with the significant decrease in cell proliferation induced by curcumins, IL-6 production in cell cultures remained higher than the values observed in healthy cells.

It was concluded that curcumins modify cell morphology of cancer cells, reducing their viability and IL-6 production, not having found a direct relationship between these two variables.

PALABRAS CLAVE

IL-6 (interleucina 6), viabilidad celular, curcumina, curcumina dietil succinato, células de cáncer de mama

KEY WORDS

IL-6 (interleucina 6), viabilidad celular, curcumina, curcumina dietil succinato, células de cáncer de mama

INTRODUCCIÓN

Turmeric (*Cúrcuma longa*) es una planta herbácea perenne rizomatosa de la familia del jengibre, Zingiberaceae, originaria del sureste de la India, Los componentes químicos más importantes de la cúrcuma son un grupo de compuestos llamados curcuminoides, que incluyen la curcumina (diferuloylmethane), demetoxicurcumina, y bisdemetoxicurcumina. El compuesto mejor estudiado es la curcumina, que constituye en promedio el 3,14% de la cúrcuma en polvo¹.

La curcumina es el principal curcuminoides de la especia turmeric, popularmente conocida como palillo en nuestro país, usada como colorante natural por la industria alimentaria en la que se le denomina con el código E1002. El interés de los investigadores sobre el estudio de sus propiedades biológicas en los últimos años ha llevado a la realización de numerosas investigaciones *in-vitro*, en las que se ha demostrado su actividad anti-inflamatoria, anti-oxidante y anti-cancerígena^{3,4,5,6}.

El cáncer de mama es una proliferación maligna de las células epiteliales que revisten los conductos o lobulillos de la mama, es el cáncer de mayor incidencia en la población femenina durante las consultas médicas oncológicas y actualmente su tratamiento se basa principalmente en la quimioterapia, radioterapia, terapia coadyuvante, terapia biológica y cirugía, dependiendo del estadio de la enfermedad⁷. Una estrategia para el manejo de esta patología se basa en el conocimiento de los mecanismos moleculares de proliferación, apoptosis y metástasis del cáncer. Actualmente se encuentran en estudio numerosos blancos moleculares, siendo uno de ellos la participación de la IL-6 en procesos cancerígenos^{8,9}. IL-6 es una citoquina pleiotrópica, perteneciente a la familia de las eritropoyetinas, interactúa con su receptor de citoquinas de clase II (receptor de eritropoyetinas), el receptor tiene actividad tirosinoquinasa desencadenando su mecanismo por la activación de la ruta de señalización JAK/STAT la que concluye modulando la expresión genética. Este mecanismo se ha estudiado en diferentes tipos de cáncer habiéndose encontrado que procesos oncológicos necesarios para el desarrollo de una célula cancerígena como la angiogenesis, proliferación celular y metástasis involucran la participación de IL-6^{10,11}.

METODOLOGÍA**Cultivo celular**

Las células de cáncer de mama (línea celular MDA-MB 231) fueron suspendidas en DMEM (Dulbecco's Modified Essential Medium) conteniendo 10% de FBS (suero fetal bovino) y 1% de AB (solución de Penicilina-Estrepto-

micina) por un periodo de 6 a 8 días, después del periodo de incubación se aíslan para trabajo experimental y/o subcultivo de una nueva generación de células para posterior uso.

Ensayo de viabilidad.

El ensayo de exclusión de azul de tripán o viabilidad celular se realizó para la selección de los cultivos celulares aptos para trabajo experimental y/o subcultivo, usando exclusivamente los cultivos con 95% de viabilidad. Estos datos junto con el conteo celular se obtuvieron usando el Cellometer® Auto T4.

Ensayo de citotoxicidad por mts.

CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) es un método colorimétrico para determinar el número de células viables en ensayos de proliferación y citotoxicidad. Se realizó el ensayo en una placa de 96 pozos, con aproximadamente 1×10^5 células/pozo, procedentes de medios de cultivo previamente incubados con curcumina (1uM, 3uM, 10uM) o curcumina dietil succinato (1uM, 3uM, 10uM). La lectura se efectuó a una longitud de onda de 490nm utilizando un espectrofotómetro para microplacas.

Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA).

Se determinaron los niveles de IL-6 mediante ELISA, a partir del sobrenadante de los diferentes grupos experimentales de cultivos de células cáncer de mama en placas de ELISA de 96 pozos. Dado que es un ensayo colorimétrico, las placas fueron analizadas en un espectrofotómetro para microplacas.

Análisis de datos.

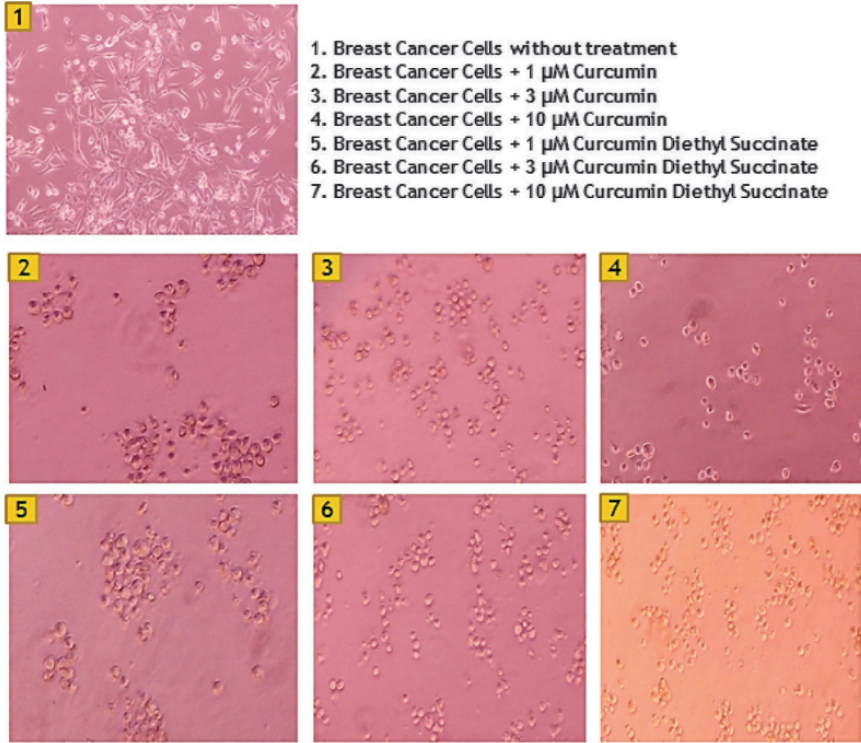
Los resultados fueron evaluados mediante el paquete estadístico Minitab 16, a través del cual se calcularon los siguientes estadígrafos: Medidas de tendencia central, media, error estándar, ANOVA, Prueba de Tukey.

RESULTADOS.

Viabilidad de los cultivos celulares. Evaluación morfológica de los cultivos celulares mediante microscopía invertida.

En la Figura 1 se observa la morfología de los cultivos celulares MDA-MB 231: en su estado natural (recuadro 1), después de haber sido expuestas a distintas concentraciones de curcumina y curcumina dietil succinato (recuadros 2 a 7). Los cambios observados en la morfología celular sugieren que las células de cáncer de mama se encuentran en estado apoptótico

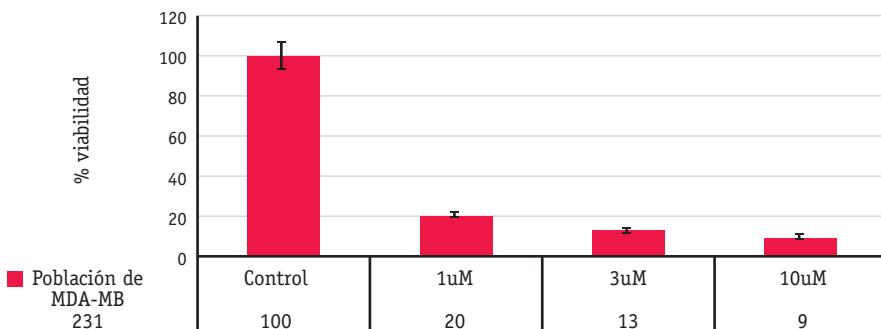
Figura 1. Morfología de la Línea Celular MDA-MB 231 a distintas concentraciones de Curcumina VS Curcumina Dietil Succinato



Ensayo de citotoxicidad por MTS.

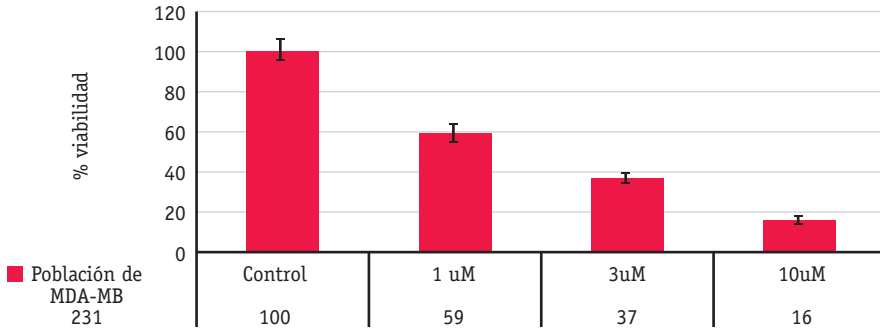
La Gráfica 1 muestra en porcentaje la población celular de cáncer de mama después de haber sido expuesta a la curcumina en concentraciones de 1,3 y 10 uM. El análisis estadístico indica que hay diferencia significativa entre el grupo control y los grupos tratados con curcumina, el grupo tratado a 1 uM es diferente de los tratados a 3 y 10 uM, y en entre estos dos últimos no hubo diferencia significativa.

Gráfico 1. Ensayo de citotoxicidad con Curcumina



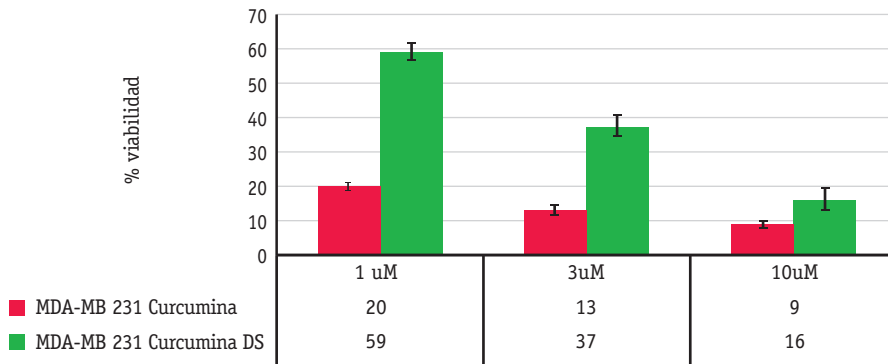
Se observa en porcentaje la población celular de cáncer de mama después de haber sido expuestas a la curcumina dietil succinato a concentraciones de 1,3 y 10 uM (Gráfica 2). El análisis estadístico indica que hay diferencia significativa entre todos los grupos.

Gráfico 2. Ensayo de citotoxicidad con Curcumina dietil succinato



Se compara la viabilidad de los cultivos de cáncer de mama con tratamiento de ambas curcuminas (Gráfica 3). El análisis estadístico muestra que la curcumina es mejor que la curcumina dietil succinato.

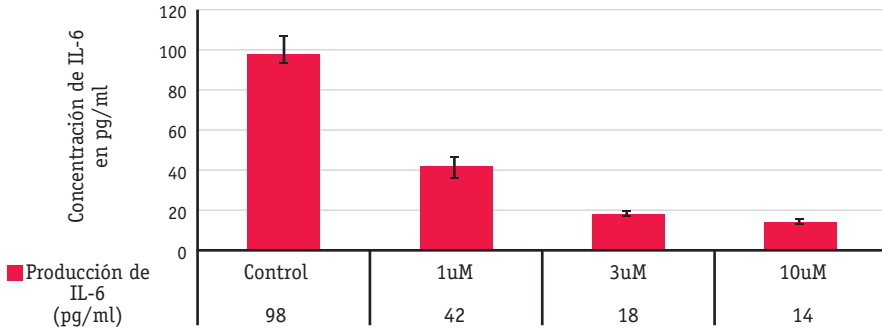
Gráfico 3. Viabilidad con Curcumina VS Viabilidad con Curcumina Dietil Succinato



Determinación de los niveles de IL-6 en los cultivos celulares. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA)

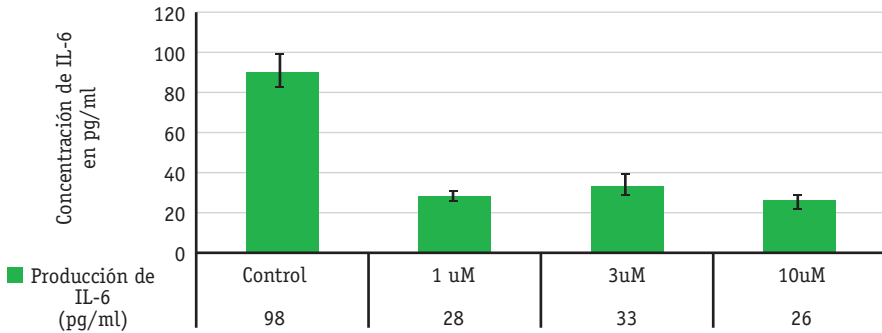
En la Gráfica 4 se puede ver la producción a 24 horas de IL-6 de las células de cáncer de mama después de haber sido expuestas a la curcumina a 1, 3 y 10 uM. El análisis estadístico indica que hay diferencia significativa entre el grupo control y los grupos tratados con curcumina. También hubo diferencia entre el grupo a 1 uM y los grupos de 3 y 10 uM, estos dos últimos resultaron ser iguales.

Gráfico 4. Producción de IL-6 con Curcumina



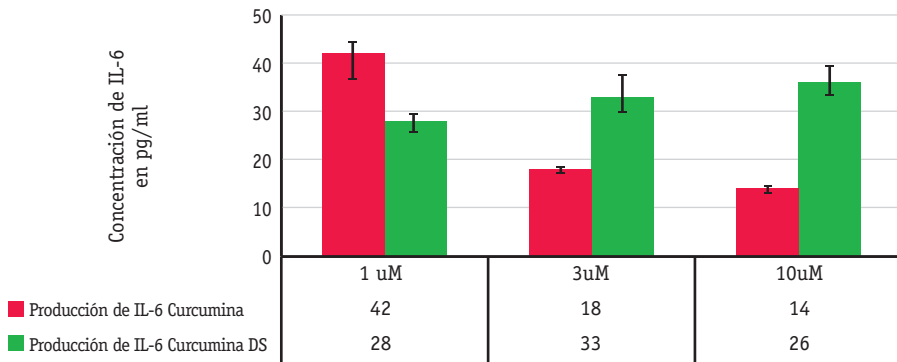
Se observa la producción a las 24 horas de IL-6 de las células de cáncer de mama después de haber sido expuestas a la curcumina dietil succinato a 1,3 y 10 uM (Gráfica 5). El análisis estadístico indica que hay diferencia significativa entre el grupo control y los grupos tratados con curcumina dietil succinato, mas no entre éstos mismos.

Gráfico 5. Producción de IL-6 con Curcumina Dietil Succinato



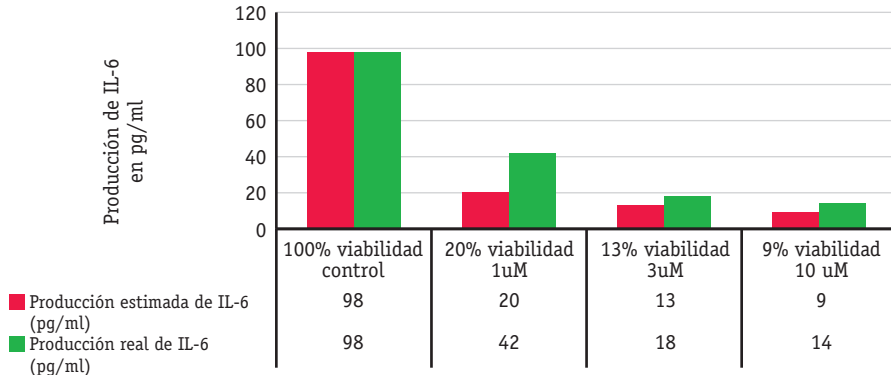
En la Gráfica 6 se compara la producción de IL-6 de los cultivos de cáncer de mama con tratamientos de ambas curcuminas, el análisis estadístico indica que la curcumina produce mejor reducción de IL-6 a 3 y 10 uM, a 1 uM la curcumina sintética fue mejor.

Gráfico 6. Producción de IL-6 con Curcumina VS Producción de IL-6 con Curcumina Dietil Succinato



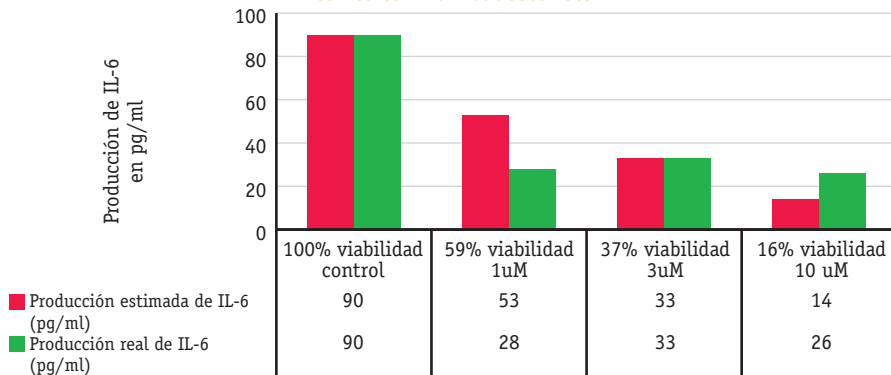
En la Gráfica 7 se aprecia en barras rojas la producción esperada de IL-6 de las células de cáncer de mama después de haber sido tratadas con curcumina a 1, 3 y 10 μM ; y en barras verdes la producción que se obtuvo en el ensayo de ELISA.

Gráfico 7. Producción de IL-6 estimada VS Producción real de población celular tratada con Curcumina



Se observa en barras rojas la producción esperada de IL-6 de las células de cáncer de mama después de haber sido expuestas a la curcumina a concentración de 1, 3 y 10 μM ; y en barras verdes la producción que se obtuvo en el ensayo de ELISA sándwich.

Gráfico 8. Producción de IL-6 estimada VS Producción real de población celular tratada con Curcumina Dietil Succinato



Se aprecia en barras rojas la producción esperada de IL-6 de las células de cáncer de mama después de haber sido tratadas con curcumina dietil succinato a 1, 3 y 10 μM (Gráfica 8); y en barras verdes la producción que se obtuvo en el ensayo de ELISA

DISCUSIÓN

Entendiendo los principales mecanismos moleculares en el progreso y agresividad del cáncer de mama, es esencial la identificación de nuevos blancos farmacológicos para su intervención y más aún en el cáncer de mama tri-

ple negativo, el cual es insensible a algunos de los tratamientos más eficaces disponibles, incluyendo el tratamiento dirigido al *HER2* como el trastuzumab, los tratamientos endocrinos como el tamoxifeno y los inhibidores de la aromatasas. Es así que se decidió trabajar con la línea celular MDA-MB 231, la cual es una línea representante del cáncer de mama triple negativo.

En nuestra investigación encontramos que la curcumina y curcumina dietil succinato tienen efecto citotóxico aparentemente apoptótico sobre la población de células de cáncer de mama, ya que después de ambos tratamientos hubo cambios en la morfología natural de la línea celular.

La viabilidad después de los tratamientos se vio disminuida con ambas curcuminas probablemente a que estas modulan mecanismos relacionados con la proliferación celular, rutas de supervivencia, vías de activación de las caspasas, la actividad de proteínas tirosino-quinasa, etc.

Se pudo corroborar que los niveles de IL-6 producidos por las células de cáncer fueron elevados ya que en diversos estudios se ha demostrado que la IL-6 contribuye al crecimiento y progresión de varios cánceres y tumores por medio de la ruta de señalización JAK/STAT, la que concluye modulando la expresión genética de oncogenes.

Los niveles de IL-6 fueron reducidos con ambos tipos de curcumina debido a la disminución de la población celular, pero al analizar si las curcuminas actúan directamente sobre la producción de esta citocina, se observó que no hay relación directa ya que éstas estuvieron más elevadas de lo esperado en comparación con los niveles normales y que probablemente se trate de un mecanismo de supervivencia por parte de las células cancerígenas.

CONCLUSIONES

Se observó una morfología apoptótica de los cultivos celulares MDA-MB 231 en presencia de la curcumina y curcumina dietil succinato. Concentraciones de 3 y 10 μM para la curcumina, y de 10 μM para la curcumina dietilsuccinato mostraron mayor grado de citotoxicidad. La curcumina produjo mayor reducción de la viabilidad que la curcumina dietil succinato en todas las concentraciones empleadas. En los cultivos celulares tratados con diferentes concentraciones de ambas curcuminas se observó una notable disminución de IL-6. Las concentraciones que mostraron mayor reducción en los niveles de IL-6 fueron las de 3 y 10 μM para la curcumina, y en el caso de la curcumina sintética las tres concentraciones mostraron igual efectividad. Se demostró estadísticamente que la curcumina produjo una mayor reducción en los niveles de IL-6 que la curcumina dietil succinato en concentraciones de 3 y 10 μM ., siendo más eficaz la concentración de 1 μM para la curcumina sintética. Se observó que no existe una relación directa entre la disminución de la viabilidad celular y la producción de IL-6.

REFERENCIAS

- S.Bengmark, M.D.Mesa and A.Gil, Plant-derived health- the effects of turmeric and curcuminoids, *Nutr Hosp.* 2009; 24(3):274-281.
- Vu Thi Bich, Nguyen Thi Thuy, Nguyen Thanh Binh, Nguyen Thi Mai Huong, Pham Nguyen Dong Yen, Tran Thanh Luong, Structural and Spectral Properties of curcumin and Metal-curcumin Complex Derived From Turmeric (*Curcuma Longa*), *Springer Proceedings in Physics, Volume 127, 2009*, pp 271-278.
- Abe, Y.; Hashimoto, S.; Horie T. Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *Pharmacol. Res.* 1999, 39, 41-47.
- Chattopadhyay, I.; Biswas, K.; Bandyopadhyay, U.; Banerjee, R.K. Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications. *Curr. Sci.* 2004, 87, 44-53.
- Chainani.Wu N. Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of turmeric (*Curcuma Longa*). *J Alternative and Complementary Medicine* 2003; 9: 161-168.
- Surh YJ, Chun KS, Cha HH, et al. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kB activation. *Mutation Research* 2001; 480-481: 243-268.
- Brian MacMahon, M.D., Philip Cole, M.D. and James Brown, Ph.D, Etiology of Human Breast Cancer: A Review, *JNCI J Natl Cancer Inst* (1973) 50 (1): 21-42.
- Haverty AA, Harmey JH, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ (1997) Interleukin-6 upregulates GP96 expression in breast cancer. *J Surg Res* 69(1):145-149.
- Arihiro K, Oda H, Kaneko M, Inai K (2000) Cytokines facilitate chemotactic motility of breast carcinoma cells.
- Xin Yao, Jiaqi Huang, Haihong Zhong, Nan Shen, Raffaella Faggioni, Michael Fung, Yihong Yao, Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers, *Pharmacology and Therapeutics*, 2014, (141) 125-139.
- Miao-Fen Chen, Ping-Tsung Chen, Miang Shian Lu, Paul Yang Lin, Wen-Cheng Chen, Kuan-Der Lee, IL-6 expression predicts treatment response and outcome in squamous cell carcinoma of the esophagus, *Molecular cancer*, 2013,12:26.