

Evaluación del efecto del tratamiento combinado de mangiferina con cisplatino y 5-fluorouracilo en células CT26.WT y CHO-K1

Evaluation of combination treatment effect of mangiferin with cisplatin and 5-fluorouracil in CT26.WT and CKO-K1 cells

MSc. Julio César Rodríguez González,^I DraC. Idania Rodeiro Guerra,^{II}
MSc. Ivones Hernández Balmaceda,^{II} DrC. René Delgado Hernández^I

^I Dirección de Investigación y Desarrollo. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). La Habana, Cuba.

^{II} Centro de Bioactivos Marinos (CEBIMAR). La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: la mangiferina posee diferentes propiedades farmacológicas, y otras están por ser investigadas, tal como su actividad antitumoral como agente adyuvante a la quimioterapia antineoplásica convencional en la terapia combinada.

Objetivo: evaluar el efecto antiproliferativo de la mangiferina sola y combinada con concentraciones bajas de agentes quimioterapéuticos.

Métodos: las líneas celulares de carcinoma de colon de ratón CT26.WT y normal de ovario de hámster chino CHO-K1, se trataron con mangiferina en combinación con cisplatino y 5-fluorouracilo bajo diferentes esquemas de tratamiento (secuencial y simultáneo), a diferentes concentraciones y tiempos de incubación. La viabilidad celular se determinó por el ensayo de MTT.

Resultados: la mangiferina (1-200 µg/mL) no fue citotóxica para ambas líneas celulares. El cotratamiento secuencial con mangiferina (1-200 µg/mL) por 3 h y cisplatino a concentraciones no citotóxicas (1 µM y 5 µM) durante 72 h, mostró un incremento significativo de la muerte celular en CT26.WT, sin inducir incremento significativo de la muerte en células CHO-K1, a concentraciones bajas de ambos compuestos. En el caso de los cotratamientos con mangiferina y 5-fluorouracilo (0,1 µM y 0,5 µM), se incrementó significativamente la muerte celular en los cotratamientos simultáneo por 72 h y secuencial 5-fluorouracilo 72 h y mangiferina 24 h en células CT26.WT; pero solo en este último, no se incrementó significativamente la muerte celular en CHO-K1.

Conclusiones: la mangiferina en combinación con concentraciones bajas no citotóxicas de cisplatino y 5-fluorouracilo, promueve la muerte celular e incrementa

la citotoxicidad de estos agentes quimioterapéuticos en las condiciones de experimentación realizadas.

Palabras clave: mangiferina, productos naturales, quimiosensibilización, cisplatino, 5-fluorouracil.

ASBTRACT

Introduction: mangiferin has several pharmacological properties, but others remain to be deeply explored, such as antitumor activity since it may serve as adjuvant agent in conventional antitumoral chemotherapy in a combined treatment.

Objective: to evaluate the antiproliferative effect of the use of mangiferin alone and in combination with low concentrations of chemotherapeutic agents.

Methods: the CT26.WT mouse colon carcinoma and the CHO-K1 hamster ovary normal cell lines were treated with mangiferin in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in several treatment schedules (sequential and simultaneous), at different concentrations and incubation times. The cell viability was evaluated by MTT assay.

Results: mangiferin (1-200 µg/mL) was not cytotoxic in both cell lines. Mangiferin (1-200 µg/mL) for 3h plus cisplatin at not citotoxic concentrations (1 µM and 5 µM) for 72 h in sequential combined treatment showed a significant increase of cell death in CT26.WT, without inducing significant increase of cell death in CHO-K1 cells at low concentrations of both compounds. In the case of combined mangiferina and 5-fluorouracil (0,1 µM and 0,5 µM) treatments, cell death rose in a significant way in simultaneous combined treatments for 72 h whereas sequential combined therapy with 5-fluorouracil for 72 h plus mangiferin for 24 h in CT26.WT cells, a significant rise was not induced in the cell line death of CHO-K1 hamster

Conclusions: mangiferin in combination with low non cytotoxic concentrations of cisplatin and 5-fluorouracil promotes cell death and increases the cytotoxicity of these chemotherapeutic agents in experimental conditions of this study.

Keywords: mangiferin, natural products, chemosensitization, cisplatin, 5-fluorouracil.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es un problema de salud en el mundo. Esta enfermedad presenta tasas de incidencia y mortalidad sostenidamente crecientes, que la pueden convertir en la primera causa de muerte en los próximos años a nivel global.¹ En Cuba, desde el año 2012, el cáncer se ha convertido en la primera causa de muerte.²

El cáncer colorectal constituye actualmente un problema epidemiológico importante debido a sus sostenidas tendencias crecientes en incidencia y mortalidad mundiales. Según los datos estadísticos del 2012 de la Agencia Internacional para la Investigación sobre Cáncer de la Organización Mundial de la Salud, el cáncer colorectal ocupa el tercer lugar entre los tumores malignos más frecuentes para

ambos sexos (9,7 %): tercero en hombres (746296 casos, 10 % del total) y segundo en mujeres (614 304 casos; 9,2 % del total), para una relación 1,4:1. Constituye la cuarta causa de muerte por cáncer (693 881 muertes; 8,5 % del total) en el mundo (http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx). En Cuba, el cáncer colorectal ocupa el cuarto lugar en incidencia (9,9 %) y el tercero en mortalidad (10,2 %); esta última resulta más frecuente en el sexo femenino.²

La cirugía, radioterapia y quimioterapia son las tres variantes terapéuticas antineoplásicas, que pueden ser empleadas individualmente o combinadas. La quimioterapia, ha sido la principal opción terapéutica para el cáncer de colon avanzado, que por su propio mecanismo de acción, tiene como limitante su poca selectividad que conlleva a una elevada toxicidad de perfil amplio, con incremento de los efectos adversos. Además, induce desarrollo de quimiorresistencia y responde a un índice terapéutico limitado.³

Por más de 40 años, el 5-fluorouracilo fue el único citostático antitumoral efectivo y ha sido reconocido como el agente quimioterápico estándar para el cáncer colorectal. Desde 1996, ha sido empleado fundamentalmente combinado con nuevos citostáticos tales como irinotecan, oxaliplatino y capecitabina.⁴ Por otra parte, el potencial terapéutico del cisplatino no ha sido completamente explotado debido a sus efectos colaterales y a la inducción de resistencia tumoral al mismo que sustentan su baja eficiencia clínica en comparación con el oxaliplatino en la terapia del cáncer de colon metastático.⁵

Se han identificado compuestos naturales, y en particular fitoquímicos, que puedan proteger del cáncer⁶ y/o potenciar la eficacia de la quimioterapia y radioterapia convencionales⁷ a dosis bajas y con tiempos de exposición más prolongados.^{7,8} Esto ha estimulado el desarrollo de nuevos fármacos que modulen la quimiosensibilidad celular, reviertan la resistencia tumoral e incrementen los efectos terapéuticos de la quimioterapia simultáneamente con la reducción de sus limitaciones terapéuticas, como nuevas estrategias alternativas de tratamiento contra el cáncer.⁸

La mangiferina (C 2-β-D-glucopiranosil-1, 3, 6, 7-tetrahidroxixantona) es una xantona C-glicosilada ampliamente distribuida. Es un fitoquímico polifenólico natural farmacológicamente activo presente en las hojas, corteza, frutos y raíces del árbol *Mangifera indica* Linneo (Anacardiaceae), y en algunas plantas medicinales. Presenta un amplio rango de efectos farmacológicos como antioxidante, antiinflamatorio, analgésico, antitumoral, antimicrobiano, antialérgico, antiaterosclerótico e inmunomodulador entre muchos otros.^{9,10}

Escasos estudios se han realizado para evaluar el potencial antitumoral de la mangiferina como agente adyuvante a la quimioterapia antineoplásica convencional en el marco de la terapia combinada. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto antiproliferativo de la mangiferina sola y combinada con los agentes quimioterápicos cisplatino y 5-fluorouracilo.

MÉTODOS

REACTIVOS

Los medios de cultivo RPMI-1640 y F10 de Hams, dimetilsulfóxido (DMSO Hybri-Max®), suero fetal bovino, solución penicilina-estreptomicina (100 x), L-glutamina, tripsina de páncreas porcino, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y duodecil sulfato de sodio (SDS) se adquirieron de Sigma-Aldrich Inc. (Saint Louis, MO, USA).

El bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-25difenil tetrazolio (MTT), 2-propanol y ácido clorhídrico (HCl) se obtuvieron de Merck KGaA (Germany). El cisplatino (CDDP) y 5-fluorouracilo (5-FU) se adquirieron como materia prima de Shandong Boyuan Pharmaceutical Co.,Ltd y Nantong Pharmaceutical Coltol Co., Ltd, respectivamente, ambas de la República Popular China.

MATERIAL DE ESTUDIO

La mangiferina se suministró por el Centro de Química Farmacéutica, La Habana, Cuba. El producto se aisló y purificó a partir de la corteza del árbol de la *Mangifera indica* Linn (mango) por extracción con metanol y se obtuvo un polvo de color amarillo con un 95 % de pureza, (lote: 01/Dic-07).

CÉLULAS

Las líneas celulares CT26.WT (indiferenciada de carcinoma de colon de ratón inducida por N-nitroso-N-metiluretano) y CHO-K1 (normal de ovario de hámster chino) se donaron por el Centro de Inmunología Molecular, La Habana, Cuba. Estas se cultivaron en frascos de 25 cm² Falcon® (Becton Dickinson Labware, NJ, USA) en medio de cultivo RPMI-1640, en el caso de las CT26.WT, y en medio de cultivo F-10 de Ham, para las células CHO-K1. Ambos medios de cultivo se suplementaron con suero fetal bovino inactivado por calor (10 %), penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 µg/mL) y glutamina 2 mM. Las células crecieron en atmósfera humidificada, con 5 % CO₂ a 37 °C, hasta que adquirieron entre un 80 % y 90 % de confluencia celular.

TRATAMIENTOS

Las células se sembraron a una densidad de 10⁴ células/pozo, en placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano Falcon® Microtest™ (Becton Dickinson Labware, NJ, USA), y se incubaron en atmósfera con 5 % CO₂ a 37 °C. Después de 24 h, las células se trataron con los productos de forma independiente (tratamiento simple), durante 72 h en atmósfera de 5 % CO₂ a 37 °C.

La mangiferina primeramente se solubilizó en DMSO, y posteriormente se diluyó hasta 200 µg/mL en el medio de crecimiento celular. La concentración final del DMSO (vehículo) fue 0,1 %. Las concentraciones de mangiferina ensayadas fueron 1,10, 25, 50, 100 y 200 µg/mL.

Las soluciones madres de CDDP y 5-FU se prepararon en tampón fosfato salino estéril, pH 7,4 a 6 mM y 2 mM, respectivamente. Las concentraciones de ensayo de CDDP y 5-FU fueron 1, 5, 10, 20, 40 y 60 µM, y 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 25 y 50 µM, respectivamente; todas preparadas en el medio de crecimiento celular.

Las células CT26.WT se trataron con mangiferina en combinación con los agentes antineoplásicos de la manera siguiente: tratamiento secuencial con mangiferina por 3h y citostático por 72 h; tratamiento simultáneo con mangiferina y citostático durante 72 h; tratamiento secuencial con citostático por 72 h y mangiferina durante 24 h. El CDDP se utilizó a 1 µM y 5 µM, y el 5-FU a 0,1 y 0,5 µM; concentraciones no citotóxicas en cada caso. Las concentraciones de trabajo de mangiferina fueron las anteriormente referidas.

Las células normales CHO-K1 se cotrataron con los productos, solo en las condiciones experimentales donde se obtuvo incremento de la muerte celular inducida por el citostático en presencia de mangiferina para las células CT26.WT con el propósito de evaluar la especificidad del efecto quimiosensibilizante de la mangiferina.

DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

Para la determinación de la viabilidad celular se utilizó el ensayo de reducción del MTT¹¹. A cada pozo se le añadió un volumen de la solución de MTT (0,5 mg/mL) correspondiente al 10 % del volumen de incubación total, y las células se incubaron durante 4 h previas al tiempo final de tratamiento. El sobrenadante fue aspirado, y los cristales de formazán fueron disueltos por adición simultánea de SDS al 3 % y una mezcla (25:1) de 2-propanol: HCl 1M. La absorbancia fue determinada a 540 nm en un lector de microplacas POLARstar Omega (SMG Labatech, Offenburg, Germany). Con los valores de absorbancia se calculó el porcentaje de viabilidad celular: % = (Abs. tratados/Abs. control) x 100. Además, se calculó el grado de incremento de muerte celular (% de muerte celular _{mangiferina + citostático}/% de muerte celular _{citostático}) inducido por los citostáticos en presencia de mangiferina, utilizado como criterio de potenciación del efecto antiproliferativo de los citostáticos inducido por la mangiferina.

La viabilidad de las células tratadas con los citostáticos (control positivo) se comparó con la viabilidad de las células en ausencia de estos (controles negativos); esta última representa el 100 % de viabilidad. En el caso de las células tratadas con mangiferina, sola o combinada con los citostáticos, su viabilidad fue comparada con la de las células tratadas con DMSO al 0,1 % (control vehículo).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el procesamiento estadístico se realizó un ANOVA de una vía y las pruebas de Dunnett y t de Student, disponibles en el paquete estadístico GrahPad Prism® versión 5.01. La inhibición de la concentración media se expresó como la concentración de las sustancias que causa el decrecimiento del 50 % en el número de células viables (IC_{50}) comparada con controles no tratados y se determinó gráficamente. Los experimentos se realizaron con seis para los tratamientos simples y tres réplicas para los tratamientos combinados, en tres experimentos independientes.

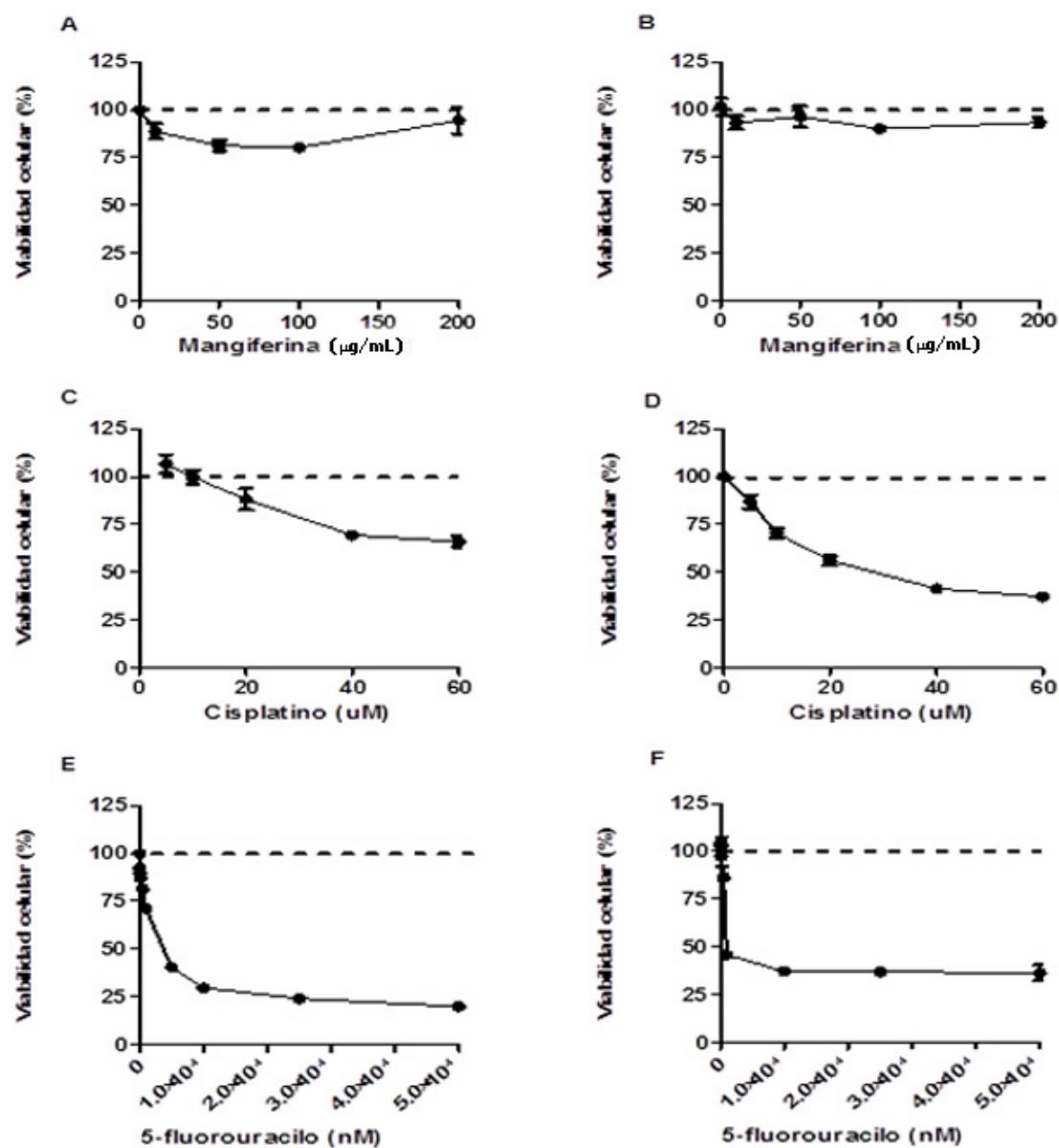
RESULTADOS

En la figura 1 se muestran los resultados del efecto de los tratamientos simples sobre la proliferación de las células tratadas por 72 h con los productos.

El tratamiento de CT26.WT (Fig. 1, A) y CHO-K1 (Fig. 1, B) con mangiferina no inhibió la proliferación celular. La viabilidad celular fue mayor que 80 % en ambos tipos de células para todas las concentraciones ensayadas, lo que no permitió el cálculo del IC_{50} ; lo cual demuestra que la mangiferina no es citotóxica para ambas células en nuestras condiciones de ensayo. El tratamiento con CDDP de las células CT26.

WT (Fig. 1, C) y CHO-K1 (Fig. 1, D) provocó inhibición de la proliferación celular dependiente de la concentración. Los valores de IC_{50} fueron 32,96 μ M y 10,36 μ M para las células CT26.WT y CHO-K1, respectivamente. Así mismo, el 5-FU provocó un efecto inhibitorio de la proliferación celular dependiente de la concentración.

Sus valores de IC₅₀ fueron 2,54 µM y 0,538 µM en las células CT26.WT y CHO-K1, respectivamente. La línea CT26.WT resultó ser más sensible al efecto antitumoral del 5-FU con respecto al CDDP. Mientras que la línea CHO-K1 fue más sensible que la CT26.WT a la acción antiproliferativa de ambos antineoplásicos.



A y B: células CT26.WT (A) y CHO-K1 (B) tratadas con mangiferina; C y D: células CT26.WT (C) y CHO-K1 (D) expuestas al CDDP; E y F: células CT26.WT (E) y CHO-K1 (F) tratadas con 5-FU.

Las células (1×10^4 /100 µL/pozo) fueron expuestas a los productos durante 72 h a diferentes concentraciones: mangiferina 1-200 µg/mL, CDDP 1-60 µM y 5FU 0,01-50 µM. La viabilidad celular fue determinada por MTT utilizando como 100 % la viabilidad de las células en presencia de DMSO 0,1 %. (A y B), y de las células no tratadas (C-F). Las gráficas muestran el porcentaje de viabilidad celular para cada línea celular y representan los valores medios ± DE de seis réplicas realizadas en tres experimentos independientes. La línea discontinua representa el 100 % de viabilidad celular.

Fig. 1. Efecto del tratamiento simple con mangiferina, CDDP y 5-FU sobre la proliferación celular de CT26.WT y CHO-K1.

Los resultados del porcentaje de muerte de las células CT26.WT cotratadas con mangiferina (1-200 µg/mL) y CDDP (1 µM y 5 µM) se muestran en la figura 2. El cotratamiento secuencial con mangiferina por 3 h y posteriormente con CDDP durante 72 h (Fig. 2, A) potenció más la muerte celular inducida por CDDP, lo que se refleja en un mayor grado de incremento de muerte celular que los otros cotratamientos, tanto con 1 µM como con 5 µM de CDDP (tabla 1). De manera general, la mangiferina potencia más la muerte celular inducida por CDDP 1 µM respecto a CDDP 5 µM, para iguales concentraciones de mangiferina, con la excepción del cotratamiento secuencial CDDP 72 h y mangiferina (25-200 µg/mL) por 24 h (tabla 1). Para las células CHO-K1 solo se ensayó la condición experimental de mayor incremento de muerte obtenida en CT26.WT. En este caso, la mangiferina no potenció significativamente la mortalidad celular inducida con 5 µM de CDDP, para todas sus concentraciones; en cambio, con CDDP 1 µM no hubo incremento significativo de muerte solo a bajas concentraciones (1-25 µg/mL) de mangiferina (Fig. 2, B). Lo anterior se confirma con los resultados del grado de incremento de muerte celular (tabla 1).

Tabla 1. Valores medios de grado de incremento de muerte celular inducida por los cotratamientos con mangiferina y CDDP

CDDP (µM)	Línea celular tumoral CT26.WT						Línea celular normal CHO-K1					
	Mangiferina (µg/mL)						Mangiferina (µg/mL)					
	1	10	25	50	100	200	1	10	25	50	100	200
Cotratamiento secuencial: Mangiferina 3 h + CDDP 72 h												
1	2,618 ***	3,309 ***	3,774 ***	3,423 ***	3,194 ***	6,342 ***	1,211 NS	1,044 NS	1,207 NS	1,504 **	1,378 *	1,368 **
5	1,113 NS	1,219 *	1,319 **	1,155 NS	1,217 *	1,276 **	1,065 NS	0,998 NS	1,030 NS	1,098 NS	1,131 NS	1,078 NS
Cotratamiento simultáneo: Mangiferina + CDDP 72 h												
1	1,514 **	1,418 *	1,523 **	1,443 *	1,316 NS	1,436 *	-----	-----	-----	-----	-----	-----
5	1,084 NS	1,077 NS	1,093 NS	1,096 NS	1,041 NS	1,025 NS	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cotratamiento secuencial: CDDP 72 h + Mangiferina 24 h												
1	1,353 **	1,235 *	1,060 NS	1,143 NS	1,004 NS	1,074 NS	-----	-----	-----	-----	-----	-----
5	1,123 *	1,181 ***	1,126 *	1,165 **	1,151 ***	1,116 *	-----	-----	-----	-----	-----	-----

NS: no significativo.

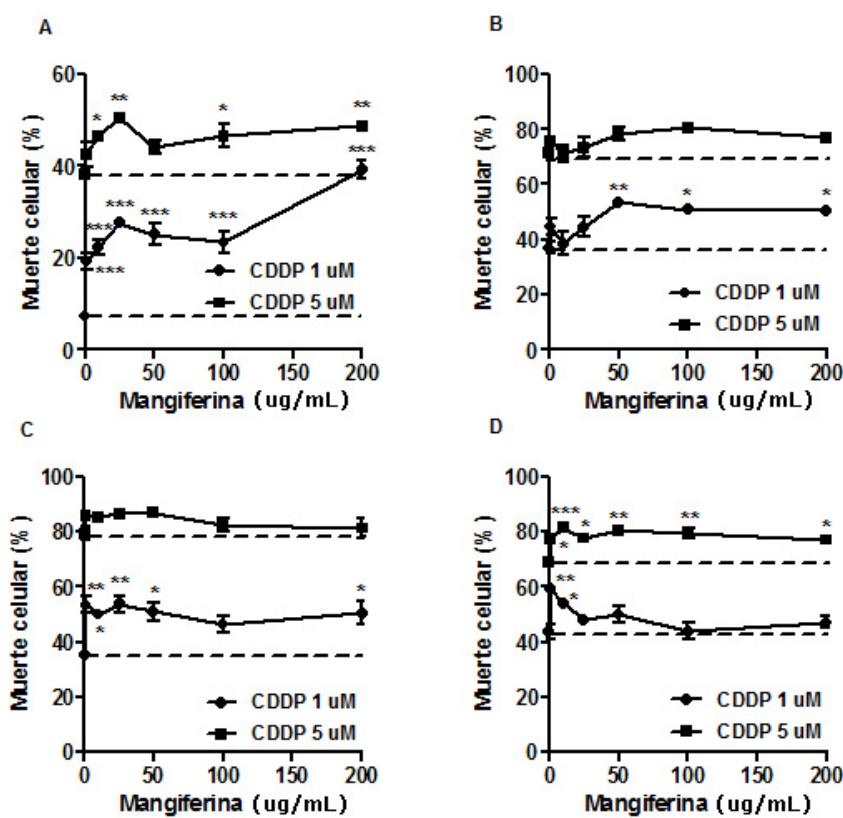
*p < 0,05, **p < 0,01, *** p < 0,001 respecto al porcentaje de muerte inducido por el control CDDP 1 µM y 5 µM.

Grado de incremento = % de muerte celular mangiferina + citostático / % de muerte celular citostático inducido por los citostáticos en presencia de mangiferina.

n = 3.

A diferencia de los resultados con CDDP, no se potenció la muerte celular inducida por 5-FU cuando las células CT26.WT fueron pretratadas durante 3 h con mangiferina en todas sus concentraciones y tratadas posteriormente con 5-FU por 72 h a 0,1 µM y 0,5 µM (Fig. 3, A). Sin embargo, cuando fueron cotratadas simultáneamente con mangiferina (10-200 µg/mL) y 5-FU 0,1 µM, y con 100 µg/mL y 200 µg/mL de mangiferina con 0,5 µM de 5-FU, se observó un aumento significativo de la muerte celular (Fig. 3, B). Cuando las células CT26.WT fueron secuencialmente cotratadas con 5-FU (0,1 µM y 0,5 µM) por 72 h y posteriormente con mangiferina por 24 h (Fig. 3, C) se observó un incremento significativo de la muerte celular, solo a concentraciones altas de mangiferina (50 µg/mL-200 µg/mL), siendo mayor a 0,1 µM de 5-FU. Los grados de incremento de muerte obtenidos fueron superiores a los obtenidos cuando las células CT26.WT se cotrataron con mangiferina y CDDP en iguales condiciones experimentales (tabla 2). En las células CHO-K1 (Fig. 3, D), se obtuvo mayor muerte celular respecto al observado en las células CT26.WT en el cotratamiento simultáneo con mangiferina (25-200 µg/mL) y

5-FU a 0,1 y 0,5 μ M (Fig. 3, B). En el tratamiento secuencial primero con 5-FU y posteriormente con mangiferina no se obtuvieron aumentos de muerte celular (Fig. 3, E) y grados de incremento significativos (tabla 2).



CT26.WT: A, tratamiento secuencial mangiferina 3 h y CDDP 72 h; C, tratamiento simultáneo mangiferina y CDDP por 72 h; D, tratamiento secuencial CDDP 72 h y mangiferina 24 h.
CHO-K1: B, tratamiento secuencial mangiferina 3 h y CDDP 72 h.

* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 frente al control de células tratadas con DMSO 0,1 % en medio de crecimiento.

La viabilidad celular fue determinada por el ensayo de MTT utilizando como 100 % la viabilidad de las células no tratadas y tratadas con DMSO 0,1 % para el cálculo del porcentaje de muerte inducido por CDDP (1 μ M y 5 μ M), y mangiferina 100 μ g/mL respectivamente, empleados como controles. Las gráficas muestran el porcentaje de muerte celular y representan las valores medios \pm DE de tres réplicas realizadas en tres experimentos independientes. Las líneas discontinuas representan el porcentaje de muerte celular inducida solo por los controles de cisplatino 1 μ M y 5 μ M.

Fig. 2. Efectos de los cotratamientos con mangiferina y CDDP (1 μ M y 5 μ M) sobre la viabilidad celular de las líneas CT26.WT y CHO-K1.

A diferencia de los resultados con CDDP, no se potenció la muerte celular inducida por 5-FU cuando las células CT26.WT fueron pretratadas durante 3 h con mangiferina en todas sus concentraciones y tratadas posteriormente con 5-FU por 72 h a 0,1 μ M y 0,5 μ M (Fig. 3, A). Sin embargo, cuando fueron cotratadas simultáneamente con mangiferina (10-200 μ g/mL) y 5-FU 0,1 μ M, y con 100 μ g/mL y 200 μ g/mL de mangiferina con 0,5 μ M de 5-FU, se observó un aumento significativo de la muerte celular (Fig. 3, B). Cuando las células CT26.WT fueron secuencialmente cotratadas con 5-FU (0,1 μ M y 0,5 μ M) por 72 h y posteriormente con mangiferina por 24 h (Fig. 3, C) se observó un incremento significativo de la muerte celular, solo a concentraciones altas de mangiferina (50 μ g/mL-200 μ g/mL), siendo mayor a 0,1 μ M de 5-FU. Los grados de incremento de muerte obtenidos fueron superiores a los obtenidos cuando las células CT26.WT se cotrataron con

mangiferina y CDDP en iguales condiciones experimentales (tabla 2). En las células CHO-K1 (Fig. 3, D), se obtuvo mayor muerte celular respecto al observado en las células CT26.WT en el cotratamiento simultáneo con mangiferina (25-200 µg/mL) y

5-FU a 0,1 y 0,5 µM (Fig. 3, B). En el tratamiento secuencial primero con 5-FU y posteriormente con mangiferina no se obtuvieron aumentos de muerte celular (Fig. 3, E) y grados de incremento significativos (tabla 2).

Tabla 2. Valores medios de grado de incremento de muerte celular inducida por los cotratamientos con mangiferina y 5-FU

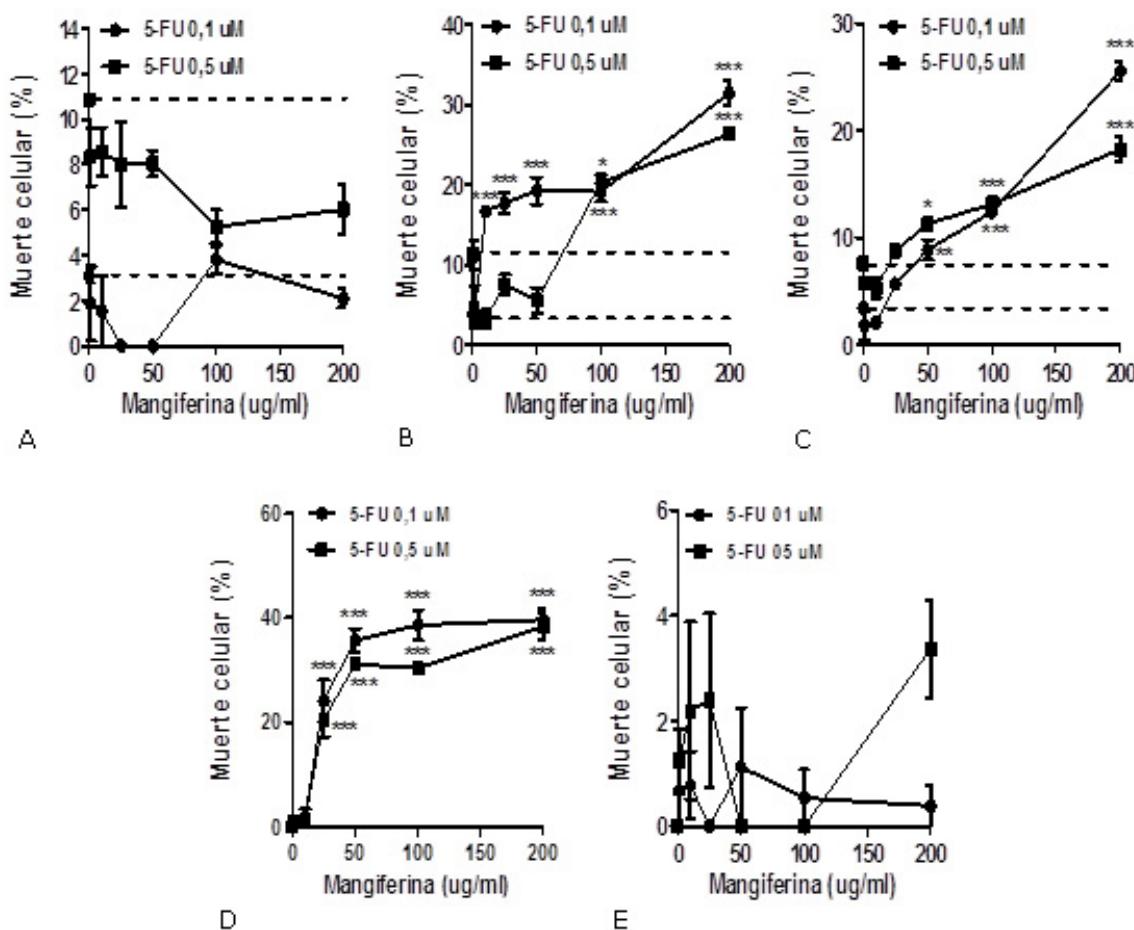
5-FU (µM)	Línea celular tumoral CT26.WT						Línea celular normal CHO-K1					
	Mangiferina (µg/mL)						Mangiferina (µg/mL)					
	1	10	25	50	100	200	1	10	25	50	100	200
Cotratamiento secuencial: mangiferina 3 h + CDDP 72 h												
0,1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
0,5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cotratamiento simultáneo: mangiferina + CDDP 72 h												
0,1	0,76 NS	4,37 ***	4,63 ***	5,03 ***	5,00 ***	8,00 ***	0,07 NS	1,72 NS	24,17 ***	35,74 ***	38,64 ***	39,67 ***
0,5	0,42 NS	0,29 NS	0,67 NS	0,49 NS	1,80 ***	2,34 ***	1,10 NS	1,38 NS	20,66 ***	31,20 ***	30,37 ***	38,43 ***
Cotratamiento secuencial: CDDP 72 h + mangiferina 24 h												
0,1	0,54 NS	0,60 NS	1,66 NS	2,59 **	3,62 ***	7,46 ***	0,68 NS	0,78 NS	0,00 NS	1,12 NS	0,54 NS	0,39 NS
0,5	0,76 NS	0,69 NS	1,15 NS	1,49 *	1,73 ***	2,40 ***	1,22 NS	2,20 NS	2,39 NS	0,00 NS	0,00 NS	3,37 NS

NS: no significativo.

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 respecto al porcentaje de muerte inducido por el control 5-FU 0,1 µM y 0,5 µM.

Grado de incremento= % de muerte celular _{mangiferina + citostático}/% de muerte celular _{citostático} inducido por los citostáticos en presencia de mangiferina.

n= 3.



CT26.WT: A, tratamiento secuencial mangiferina 3 h y 5-FU 72 h; B, tratamiento simultáneo mangiferina y 5-FU por 72 h; C, tratamiento secuencial 5-FU 72 h y mangiferina 24 h. CHO-K1: D, tratamiento simultáneo mangiferina y 5-FU por 72 h; E, tratamiento secuencial 5-FU 72 h y mangiferina 24 h.

* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 frente al control de células tratadas con DMSO 0,1 % en medio de crecimiento.

La viabilidad celular fue determinada por el ensayo de MTT utilizando como 100 % la viabilidad de las células no tratadas y tratadas con DMSO 0,1 % para el cálculo del porcentaje de muerte inducida por 5-FU 0,1 µM y 0,5 µM y mangiferina 100 µg/mL respectivamente, empleados como controles. Las gráficas muestran el porcentaje de muerte celular y representan los valores medios ± DE de tres réplicas realizadas en tres experimentos independientes. Las líneas discontinuas representan el porcentaje de muerte celular inducido solo por el control 5-FU 0,1 µM y 0,5 µM.

Fig. 3. Efectos de los cotratamientos con mangiferina y 5-FU (0,1 µM y 0,5 µM) sobre la viabilidad celular de las líneas CT26.WT y CHO-K1.

DISCUSIÓN

Se ha demostrado que varios fitoquímicos, de diversos orígenes y estructuras moleculares complejas, pueden modular varias vías de señalización molecular intracelular.^{7,8} Muchas de estas intervienen cooperadamente en la sobrevida y quimiorresistencia de las células ante señales de estrés inducidas por células cancerosas, carcinógenos y agentes quimioterapéuticos, por lo que se estima que múltiples agentes fitoquímicos ejercen su acción antitumoral a través de su capacidad para inducir quimiosensibilización.^{7,8}

Los resultados demuestran que la mangiferina es capaz de quimiosensibilizar a las células CT26.WT a la acción antiproliferativa del CDDP, independientemente de la secuencia de tratamiento (Fig. 1, tabla 1). Esto concuerda con lo informado en células de linfoma histocítico U937 cotratadas inicialmente con mangiferina 10 µg/mL y después, con 1 µM de diversos citostáticos, entre los que se incluye el CDDP,¹² y en células de adenocarcinoma colorectal humano HT29 cotratadas simultáneamente con mangiferina 10 µg/mL y oxaliplatino 10 µM, un antineoplásico alquilante similar al CDDP.¹³ El grado de incremento de muerte celular obtenido en el pretratamiento de las células CT26.WT con 10 µg/mL mangiferina por 3 h; y posteriormente con 1 µM de CDDP por 72 h (tabla 1), son superiores a los obtenidos por Sarkar y otros en células U937 en las mismas condiciones experimentales.¹²

Como aspecto relevante, no se evidencia incremento de muerte en las células CHO-K1, desde 1 µg/mL hasta 25 µg/mL de mangiferina, lo que sugiere que el incremento de la acción antitumoral del CDDP mediante el pretratamiento de las células con mangiferina es más específico para las células tumorales CT26.WT que para las células normales CHO-K1 (Fig. 2, A y B). Estos resultados sugieren que el pretratamiento con mangiferina es el mejor esquema de tratamiento para quimiosensibilizar a las células CT26.WT a la acción antiproliferativa del CDDP.

Se ha demostrado que la inhibición de la activación del factor de transcripción nuclear B (NFkB) incrementa el efecto de las terapias antitumorales mediante la sensibilización de las células malignas.¹⁴⁻¹⁶ También se ha señalado que la mangiferina modula la expresión de genes críticos en la regulación de la apoptosis y la tumorogénesis, entre los que se encuentra el NFkB.¹⁷ El efecto quimiosensibilizador *in vitro* de la mangiferina a la muerte celular inducida por citostáticos se ha asociado con la inhibición de la activación del NFkB inducido por éstos, y han sustentado la propuesta inicial de la mangiferina como un potente agente adyuvante en la terapéutica antitumoral combinada.¹²

El bloqueo de la activación del NFkB —inducida por el factor de necrosis tumoral alfa— por la mangiferina ha sido corroborado en estudios más recientes en células de carcinoma de mama altamente invasivo MDA-MB231, así como la inhibición de la expresión de genes dependientes de la activación del NFkB relacionados con la inflamación, la invasión y la metástasis.¹⁸ Igualmente se demostró que la mangiferina inhibió la expresión de NFkB inducida por oxaliplatino en células de adenocarcinoma colorectal humano HT29 e incrementó la acción antiproliferativa del citostático cuando las células se cotrataron simultáneamente con ambos compuestos.¹³

Conociendo que la mangiferina es un inhibidor de la vía clásica de activación del NFkB,^{12,13,18} se pudiera inferir que en el cotratamiento secuencial de las células CT26.WT inicialmente con mangiferina, esta podría estar ejerciendo su efecto quimiosensibilizador a través de este mecanismo.

En contraste con los resultados obtenidos con CDDP, el incremento de la muerte celular en el cotratamiento de las células CT26.WT con mangiferina y 5-FU muestra diferencias entre las variantes de cotratamiento ensayadas (Fig. 3, tabla 2). Si bien el cotratamiento secuencial con presensibilización de las células con mangiferina no potenció la muerte celular inducida por 5-FU, el cotratamiento simultáneo con 0,1 µM de 5-FU y mangiferina refleja los mayores incrementos de muerte celular obtenidos en todos los experimentos con las células CT26.WT (Fig. 3, B; tabla 2). El aumento del grado de incremento de muerte es más sostenido en relación con el aumento de la concentración de mangiferina en el cotratamiento secuencial 5-FU 0,1 µM por 72 h y mangiferina (25-200 µg/mL) por 24 h, respecto al tratamiento simultáneo por 72 h, a igual concentración de 5-FU (Fig. 3, B y C; tabla 2). Sin embargo, el cotratamiento simultáneo provoca altos porcentajes (Fig. 3, D) e incrementos de la muerte (tabla 2) en las células CHO-K1, en comparación con el tratamiento secuencial 5FU 72 h y mangiferina 24 h.

Los resultados demuestran que las células CT26.WT fueron más sensibles al efecto antiproliferativo del 5-FU en comparación con CDDP en el tratamiento combinado con mangiferina. Además, el cotratamiento secuencial 5-FU 0,1 µM por 72 h y mangiferina (50-200 µg/mL) por 24 h, es el más efectivo, dado que incrementa significativamente la muerte de las células tumorales sin afectación significativa de la viabilidad de las células normales CHO-K1.

Al igual que lo ocurrido con CDDP, el efecto quimiosensibilizador de la mangiferina frente al 5-FU se obtiene a concentraciones no citotóxicas, siendo mayor a 0,1 µM de 5-FU. Esto corrobora que la quimiosensibilización celular con compuestos naturales ocurre a concentraciones no citotóxicas, lo que puede representar una

reducción de los efectos tóxicos y de la posibilidad de desarrollar quimiorresistencia celular a los citostáticos, responsables, en numerosas ocasiones, de la interrupción e ineffectividad de la terapia antitumoral.⁸

De lo anterior se pudiera inferir que el tipo y secuencia de tratamiento por el cual la mangiferina ejerce su acción quimiosensibilizadora sobre las células CT26.WT podría estar en relación con el mecanismo molecular de acción del citostático para inducir muerte celular.

Las drogas antitumorales activan simultáneamente vías diferentes que regulan positiva y negativamente el proceso de muerte celular, lo que indica que la regulación del equilibrio entre las señales de muerte y sobrevida celular proporciona nuevas estrategias para mejorar la eficacia de los regímenes terapéuticos actuales.¹⁹ Numerosos estudios indican que la inhibición de la activación del NFκB desplaza el equilibrio muerte-sobrevida hacia la apoptosis. Sin embargo, se ha informado que, en determinadas condiciones, la activación del NFκB pudiera conllevar a un efecto proapoptótico, y que la inhibición del NFκB contrarresta la efectividad terapéutica anticáncer.^{14-16,19-21}

En la actualidad, no están aun completamente esclarecidos los mecanismos moleculares que determinan cuando la activación del NFκB desencadena una respuesta pro o antiapoptótica, pero es lógico pensar que la respuesta estaría determinada por el perfil fenotípico del tumor en combinación con el tipo de terapia antitumoral.^{20,21}

Lo anterior resalta la importancia de individualizar las terapias antitumorales adyuvantes que descansen en el uso de compuestos inhibidores de la activación del NFκB.^{20,21} Por otra parte, los compuestos naturales antioxidantes, como la mangiferina,^{9,10} pueden modular la respuesta a la quimioterapia por medio de la

regulación de los niveles de especies reactivas del oxígeno y la influencia reguladora de estos sobre la actividad del NFkB, y en la intercomunicación molecular intracelular entre NFkB y otras quinasas de transactivación celular —las cuales también presentan efectos opuestos en relación con la apoptosis celular— que regulan el equilibrio muerte-sobrevida en la célula.^{20,21} En este sentido, se ha demostrado que la acción antioxidante de la mangiferina es otro de los mecanismos por los cuales ejerce el bloqueo de la activación del NFkB.¹²

En resumen, la mangiferina en combinación con concentraciones bajas no citotóxicas de cisplatino y 5-fluorouracilo promueve la muerte celular e incrementa la citotoxicidad de estos agentes quimioterapéuticos en nuestras condiciones de experimentación. Los resultados indican que la mangiferina pudiera ser un prometedor agente quimioterapéutico natural adyuvante en la quimioterapia combinada contra el cáncer. La mangiferina, por su capacidad de modular varios blancos moleculares, su potencialidad como antitumoral *per se* o como adyuvante, está justamente siendo dilucidada.^{9,10} Es evidente la necesidad de continuar estos estudios en otras líneas celulares tumorales frente a otros citostáticos, abordar estudios que identifiquen los mecanismos moleculares que sustenta el efecto quimiosensibilizante de la mangiferina y su confirmación en modelos *in vivo*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Forman D, Bray F, Brewster DH, Gombe Mbalawa C, Kohler B, Piñeros M, et al. Cancer Incidence in Five Continents. Vol. X [Internet]; [cited 2013 dic 16]. Lyon, IARC. Disponible en: <http://ci5.iarc.fr>
2. Ministerio de Salud Pública. Anuario Estadístico de Salud 2012. División Nacional de Estadística [Internet]. La Habana: MINSAP; 2012 [citado 23 Nov 2013]. Disponible en: http://files.sld.cu/dne/files/2013/04/anuario_2012.pdf
3. Pritchard JR, Lauffenburger DA, Hemann MT. Understanding resistance to combination chemotherapy. Drug Resist Updat. 2012;15:249-57.
4. Wang-Gillam A, Craig Lockhart A, Picus J. Advances in Management of Metastatic Colorectal Cancer. In: Lyden D, Welch DR, Psaila B, editors. Cancer Metastasis: biologic basis and therapeutics. New York: Cambridge University Press; 2011. p. 356-68.
5. Sergent C, Franco N, Chapusot C, Lizard-Nacol S, Isambert N, Correia M, et al. Human colon cancer cells surviving high doses of cisplatin or oxaliplatin *in vitro* are not defective in DNA mismatch repair proteins. Cancer Chemotherapy Pharmacol. 2002;49:445-52.
6. Gerhauser C. Cancer chemoprevention and nutri-epigenetics: state of the art and future challenges. Top Curr Chem. 2013;329:73-132.
7. Izzotti A. Molecular medicine and the development of cancer chemopreventive agents. Ann N Y Acad Sci. 2012;1259:26-32.
8. Vinod BS, Maliekal TT, Anto RJ. Phytochemicals as chemosensitizers: from molecular mechanism to clinical significance. Antioxid Redox Signal. 2013;18:1307-48.
9. Vyas A, Syeda K, Ahmad A, Padhye S, Sarkar FH. Perspectives on medicinal properties of mangiferin. Mini Rev Med Chem. 2012;12:412-25.

10. Matkowski A, Kuśś P, Górlska E, Woźniak D. Mangiferin, a bioactive xanthonoid, not only from mango and not just antioxidant. *Mini Rev Med Chem.* 2013;13:439-55.
11. Van Meerloo J, Kaspers GJ. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Meth Mol Biol.* 2011;731:237-45.
12. Sarkar A, Sreenivasan Y, Ramesh GT, Manna SK. Beta-D-Glucoside suppresses tumor necrosis factor-induced activation of nuclear transcription factor kappa B but potentiates apoptosis. *J Biol Chem.* 2004;279:33768-81.
13. du Plessis-Stomana D, du Preezb JGH, Van de Venter M. Combination treatment with oxaliplatin and mangiferin causes Increased apoptosis and downregulation of NFkB in cancer cell lines. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2011;8:177-84.
14. Ben-Neriah Y, Karin M. Inflammation meets cancer, with NF-kB as the matchmaker. *Nat Immunol.* 2011;12:715-23.
15. Nakanishi C, Toi M. Nuclear factor- κB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer.* 2005;5:297-309.
16. Li F, Sethi G. Targeting transcription factor NF-κB to overcome chemoresistance and radioresistance in cancer therapy. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1805:167-80.
17. Leiro J, Arranza JA, Yanez M, Ubeira FM, Sanmartín ML, Orallo F. Expression profiles of genes involved in the mouse nuclear factor-kappa B signal transduction pathway are modulated by mangiferin. *Internat Immunopharmacol.* 2004;4:763-78.
18. Garcia-Rivera D, Delgado R, Bougarne N, Haegeman G, Berghe WV. Gallic acid indanone and mangiferin xanthone are strong determinants of immunosuppressive anti-tumour effects of *Mangifera indica L.* bark in MDA-MB231 breast cancer cells. *Cancer Lett.* 2011;305:21-31.
19. Petak I, Houghton JA, Kopper L. Molecular targeting of cell death signal transduction pathways in cancer. *Current Signal Transduct Ther.* 2006;1:113-31.
20. Luo JL, Kamata H, Karin M. IKK/NF-κB signaling: balancing life and death, a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest.* 2005;115:2625-32.
21. Kim HJ, Hawke N, Baldwin AS. NF-κB an d IKK as therapeutic targets in cancer. *Cell Death Differentiation.* 2006;13:738-47.

Recibido: 24 de julio de 2014.

Aprobado: 30 de agosto de 2014.

Julio César Rodríguez González. Laboratorio de Toxicología Especial y Antitumorales. Dirección de Investigación y Desarrollo. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM), Ave. 26, No 1605, entre Boyeros y Puentes Grandes, Nuevo Vedado, Plaza, La Habana, Cuba.
Correo electrónico: jcesar.rodriguez@cidem.sld.cu