



UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**ACTIVIDAD ANTI TUMORAL *IN VITRO* DE COMPUESTOS
DERIVADOS DE LA CURCUMINA SOBRE CÉLULAS DE CÁNCER
DE MAMA HUMANO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA

ALUMNO (A): LORETO REYES LUENGO
TUTOR: Dr. SERGIO WEHINGER WEHINGER
Co-GUIA: Dr. OSCAR FORERO DORIA

TALCA-CHILE

2019

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2019

ÍNDICE DE CAPITULOS

1. RESUMEN	6
2. INTRODUCCIÓN	7
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
3.1 Curcumina	9
3.1.1 Generalidades y características estructurales	9
3.1.2 Efecto biológico de la Curcumina:.....	11
3.2 Derivados de la curcumina.....	14
3.4 Viabilidad celular	15
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	16
4.1. Hipótesis	16
4.2. Objetivo General:	16
4.2 Objetivos específicos:.....	16
5. METODOLOGIA	17
5.1 Células MCF-7	17
5.2 Células NIH/3T3	18
5.3 Cultivo celular	18
5.4 Síntesis de compuestos derivados de la Curcumina	19
5.4 Preparación de soluciones Compuestos derivados de la curcumina	22
5.5 Ensayo de viabilidad celular por MTT	22
5.6 Análisis estadístico	23
6. RESULTADOS	24
6.1 Ensayo de viabilidad celular en células MCF-7	24
.....	29
6.2 Ensayo de viabilidad celular en células NIH/3T3	30
6.3 Comparativo entre células MCF-7 y NIH/3T3	34
6.4 Curcumina v/s derivados de la Curcumina	36

7. DISCUSIÓN	38
8. CONCLUSIÓN	41
9. BIBLIOGRAFIA	43

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura de los principales polifenoles curcuminoides presentes en la planta Curcuma longa:	10
Figura 2: Estructura y efectos biológicos de la Curcumina	11
Figura 3: Reacción de Pabón.....	Error! Bookmark not defined.
Figura 4: Estructura de compuestos sintetizados derivados de la Curcumina	21
Figura 5: Porcentaje de viabilidad celular de células MCF7 frente al compuesto derivado de la curcumina C ₁	27
Figura 6: Porcentaje de viabilidad celular de células MCF7 frente al compuesto derivado de la curcumina C ₂	28
Figura 7: Porcentaje de viabilidad celular de células MCF7 frente al compuesto derivado de la curcumina C ₃	29
Figura 8: Porcentaje de viabilidad celular de células MCF7 frente al compuesto derivado de la curcumina C ₅	30
Figura 9: Porcentaje de viabilidad celular de células MCF7 frente al compuesto derivado de la curcumina s+q.....	31

Figura 10: Porcentaje de viabilidad celular de células NIH/3T3 frente al compuesto derivado de la curcumina C ₁	33
Figura 11: Porcentaje de viabilidad celular de células NIH/3T3 frente al compuesto derivado de la curcumina C ₂	34
Figura 12: Porcentaje de viabilidad celular de células NIH/3T3 frente al compuesto derivado de la curcumina C ₃	35
Figura 13: Porcentaje de viabilidad celular de células NIH/3T3 frente al compuesto derivado de la curcumina C ₅	
Figura 14: Porcentaje de viabilidad celular de células NIH/3T3 frente al compuesto derivado de la curcumina s+q.....	36
Figura 15: Gráfico comparativo del efecto de cada compuesto a 60 uM en células NIH/3T3 y MCF-7.....	38

1. RESUMEN

La incidencia del cáncer ha ido en aumento a nivel mundial en los últimos años, y entre ellos, el cáncer de mama es el más común en la mujer. Los estudios referentes al tema se han enfocado en buscar nuevas terapias quimiopreventivas, y entre ellas se ha visto a la curcumina como un prometedor compuesto terapéutico, de propiedades antioxidantes, antisépticas, analgésicas, antimicrobianas, antiinflamatorias y anticancerígenas, y se considera farmacológicamente seguro, pero su principal desventaja es la baja biodisponibilidad a nivel fisiológico. Esto limita una posible aplicación exitosa y controlada en la clínica y no permite comprender completamente qué mecanismos son activados por la molécula y cuáles por sus metabolitos. Por lo tanto, es crucial identificar derivados estables y caracterizar sus bases moleculares de acción contra la proliferación y metástasis de células cancerígenas.

Este estudio estuvo dirigido a evaluar la actividad antitumoral *in vitro* de compuestos químicos sintetizados a partir de la curcumina en una línea celular humana de cáncer de mama. Para ello se utilizaron líneas celulares MCF-7 de cáncer de mama humano y NIH/3T3 no tumorales de fibroblastos de ratón, y se evaluó el poder citotóxico de los compuestos expresados en función del porcentaje de viabilidad celular en distintas concentraciones de los compuestos. Los resultados evidenciaron una tendencia a afectar la viabilidad celular de las células tumorales y en menor grado, a las células NIH/3T3.

En base a estos resultados, se concluye que los compuestos derivados de la curcumina ejercen efecto citotóxico, siendo menos tóxico en células no tumorales.

2. INTRODUCCIÓN

En la mujer, el cáncer de mama es la primera causa de muerte por cáncer a nivel mundial, estimándose 522 mil defunciones en el año 2012 según (GLOBOCAN 2012), con una tasa estandarizada de mortalidad de 12,9 por 100.000 mujeres y una tasa de incidencia de 43,3 por 100.000 mujeres, lo que corresponde a 25,2% de la incidencia de cáncer en este grupo (1). El cáncer de mama en mujeres se ha caracterizado por una alta incidencia en países desarrollados y un aumento de la incidencia en países en desarrollo, como resultado de cambios demográficos y aumento en la prevalencia de factores de riesgo relacionados con estilos de vida y hormonales, tales como aumento de la edad de las mujeres en su primer parto, baja paridad, largo tiempo de exposición al estrógeno, producto de menarquia temprana y menopausia tardía y baja lactancia materna, entre otros (2)(3).

Entre sus múltiples agentes causales se reconocen factores genéticos, familiares y conductuales. Así, cerca del 5 al 10% obedece a causas genéticas y sobre un 80 % son esporádicos (4). Se estima que anualmente, fallecen 521.817 mujeres por esta causa, alcanzando una tasa estandarizada por edad de 12,9 por 100.000 mujeres . En Chile, el cáncer de mama en 2014 alcanzó una tasa de mortalidad observada de 15,8 por 100.000 mujeres, con 1.422 defunciones en mujeres y 14 en hombres (5).

Esta enfermedad es una de las principales causas de muerte en el mundo, razón por la que se siguen buscando nuevas opciones para su tratamiento. En este sentido, se ha estudiado tanto *in vitro* como *in vivo*, a la curcumina, compuesto aislado desde la planta *Curcuma longa*,

ya que sus propiedades químicas se asocian a efectos antiinflamatorios y antioxidantes a través de la modulación de diferentes componentes celulares (6). Sus propiedades quimiopreventivas se han asociado a la inhibición específica de componentes de vías de señalización importantes en el proceso de carcinogénesis. Los curcuminoides han sido ampliamente utilizados como agentes colorantes y/o especias en alimentos, así como en cosméticos y tienen una larga historia de uso en medicina tradicional, con sus propiedades terapéuticas recientemente exploradas en estudios científicos (7).

Entre los blancos moleculares que pueden ser modulados por este polifenol (curcumina) se encuentran factores transcripcionales, citoquinas, factores de crecimiento, quinasas y diferentes enzimas (6). A nivel estructural, posee la particularidad de interactuar con proteínas implicadas en la regulación epigenética, afectando su actividad y en algunos casos su expresión. (8) La curcumina reduce principalmente el estrés oxidativo al eliminar los radicales libres. Los estudios han demostrado que la curcumina puede eliminar directamente los radicales libres excesivos y prevenir la producción de ROS, restaurar las alternaciones anormales inducidas por factores externos y reprimir los factores de transcripción relacionados con la oxidación (9). Estos efectos ayudan a reducir el estrés oxidativo y disminuyen el riesgo de diversas enfermedades crónicas. La investigación sobre la estructura química de la curcumina muestra que los grupos donadores de electrones de ella, especialmente el grupo hidroxilo fenólico, son los principales contribuyentes a su actividad antioxidante (8)

A pesar de todo ello, la curcumina ha presentado baja efectividad por su rápida metabolización intestinal y por lo tanto, el presente estudio pretende dilucidar si compuestos derivados de la curcumina presentan actividad citotóxica antitumoral *in vitro* sobre la línea células de cáncer de mama humano MCF-7.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1 Curcumina

3.1.1 Generalidades y características estructurales

La curcumina (diferuloylmethane) se deriva del rizoma de la planta *Curcuma longa* (familia *Zingiberaceae*) nativa del sudeste asiático y representa el componente principal de la especia de la cúrcuma (10). La curcumina fue aislada por primera vez en 1815 y su estructura química fue determinada en 1870 en forma cristalina y luego se identificó como 1,6- heptadieno-3,5-diona-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil) o diferuloilmetano (11).

La *Curcuma longa* contiene una clase de compuestos conocidos como curcuminoides: curcumina, demetoxycurcumina y bisdemetoxycurcumina . Los curcuminoides consisten en dos grupos fenólicos metoxilados conectados por dos grupos carbonilo α , β insaturados que existen en forma de enol a pH fisiológico. Como curcuminoides principal, la curcumina comprende aproximadamente del 2% al 5% de la cúrcuma y es en gran parte responsable tanto por su color amarillo como de sus efectos terapéuticos (12).

Es un compuesto insoluble en agua a pH ácido o neutro, y que a su vez puede ser disuelta en dimetilsulfóxido (> 11 mg/mL), etanol, ácido acético, metanol, cloroformo y otros aceites (13)

Existen dos formas estructurales de la curcumina; la enol (fig. 1A) y la estructura ceto (fig. 1B), esta última es encontrada en estado sólido. La forma enol posee un puente de hidrógeno intramolecular que ha sido asociado a una mayor actividad antioxidante. La presencia en la estructura química de grupos hidroxilos del anillo fenólico es responsable de la actividad antioxidante de este compuesto. Por otro lado, la aparición de uniones dobles y grupos ceto, proporcionan a la curcumina su actividad biológica en procesos antiinflamatorios y anticancerígenos (14).

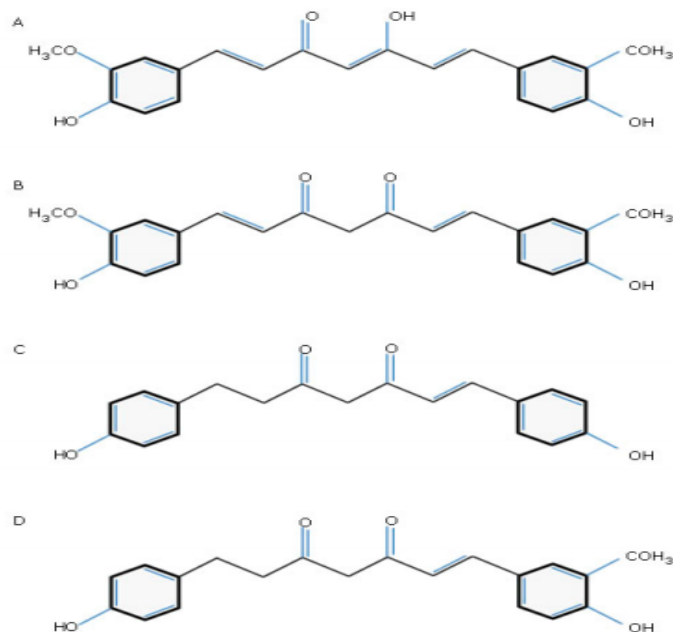


Figura 1: Estructura de los principales polifenoles curcuminoides presentes en la planta *Curcuma longa*: (A): Estructura enol de la curcumina. (B): Forma ceto de la curcumina. (C): Bisdemoxycurcumina. (D): Demoxycurcumina.

3.1.2 Efecto biológico de la Curcumina:

Se sabe que la curcumina posee propiedades antioxidantes, antisépticas, analgésicas, antimicrobianas, antiinflamatorias y anticancerígenas, y se considera farmacológicamente segura ⁽⁶⁾. Las actividades biológicas reportadas de la curcumina se presentan en la Figura 2.

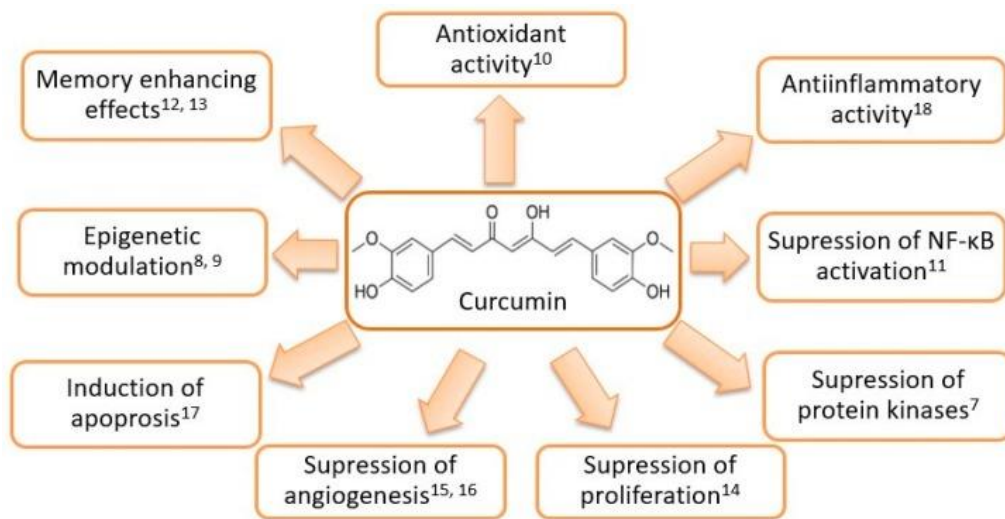


Figura 2: Estructura y efectos biológicos de la Curcumina

3.1.2.1 Efecto antioxidante de la Curcumina

Tanto *in vitro* como *in vivo* los estudios han revelado que la actividad antioxidante de la curcumina contribuye a sus diversos efectos terapéuticos (15). La investigación sobre la estructura química de la curcumina muestra que los grupos donadores de electrones de ella,

especialmente el grupo hidroxilo fenólico, son los principales contribuyentes a su actividad antioxidante (12).

La curcumina reduce principalmente el estrés oxidativo al eliminar los radicales libres (16). Los estudios han demostrado que la curcumina puede eliminar directamente los radicales libres excesivos y prevenir la producción de ROS (especies reactivas del oxígeno). Actúa como un potente eliminador de una variedad de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, incluidos los radicales de anión superóxido, radicales hidroxilos y radicales de dióxido de nitrógeno, restaura las alternaciones anormales inducidas por factores externos y reprime los factores de transcripción relacionados con la oxidación (17). Estos efectos ayudan a reducir el estrés oxidativo y disminuyen el riesgo de diversas enfermedades crónicas como el cáncer. Sin embargo, los productos de degradación de la curcumina también podrían ser responsables de los efectos biológicos observados.

3.1.2.2 Efecto anticancerígeno de la Curcumina

La curcumina ha mostrado efectos contra el cáncer a través de la inducción de la apoptosis en una variedad de cánceres. La apoptosis inducida por la curcumina conduce a las alteraciones morfológicas de las células cancerosas, que incluyen el encogimiento celular, las ampollas citoplasmáticas, la irregularidad en la forma y la externalización de la fosfatidilserina de la membrana celular. El mecanismo de apoptosis de la curcumina involucra ciertas biomoléculas y una variedad de vías de señalización (18). Los derivados y complejos de la curcumina también pueden inducir la apoptosis de las células cancerosas, lo que puede proporcionar más posibilidades en la aplicación en la terapia del cáncer.

Se ha demostrado que la curcumina induce una baja expresión génica del gen *Mcl-1* en células de cáncer de mama MCF-7, disminuyendo la viabilidad de las células cancerosas. La curcumina ha mostrado efectos anticancerígenos en diversas células cancerosas, como las células de cáncer de mama, pulmón y colon (19). Los mecanismos de acción se asocian principalmente con el crecimiento celular, proliferación, angiogénesis, apoptosis, metástasis e invasión (20). Además, la asociación de la curcumina con otros componentes y la terapia contra el cáncer tiene un efecto sinérgico para mejorar la prevención y el tratamiento de éste (19).

3.1.2.3 Efecto de la Curcumina en la inducción de apoptosis

La curcumina puede bloquear la carcinogénesis a través de la inducción de la apoptosis o muerte celular programada. Hay dos vías apoptóticas principales: la vía intrínseca (mitocondrial) y la vía extrínseca. Se ha demostrado que la curcumina induce selectivamente la apoptosis en las células tumorales a través de la regulación positiva de la expresión de p53 y el inicio de la vía apoptótica mitocondrial por un aumento en la expresión del gen Bax y la liberación del citocromo c (21). La curcumina también genera un efecto estimulante sobre la vía apoptótica extrínseca, que se desencadena por la unión de TNF- α y el ligando Fas a sus receptores de superficie celular correspondientes (22). Su activación da como resultado la estimulación de la caspasa-8 a través de la molécula adaptadora de la proteína asociada con Fas relacionada al receptor (FADD) y el inicio de la cascada de caspasa que induce la apoptosis. Además, Kim et al. informaron de la actividad citotóxica de la curcumina que involucra especies reactivas de oxígeno (ROS) en el carcinoma oral de células escamosas mediante la inducción de la apoptosis (23).

3.1.2.4 Efecto de la Curcumina en la inhibición de angiogénesis

En la fase final de la carcinogénesis, la curcumina ejerce efectos beneficiosos en la inhibición de la angiogénesis, que representa el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes y también es un paso fundamental en la progresión tumoral desde un estado benigno a uno maligno o invasivo (24). Las células cancerosas pueden, por lo tanto, disociarse del tumor principal y ser transportadas a través de la circulación a tejidos distantes donde se implantan e inician la formación de tumores secundarios (metástasis) (25).

Se descubrió que la curcumina suprime la migración de células malignas, la invasión y la formación de metástasis *in vivo*, que se ha relacionado principalmente con su capacidad para disminuir la expresión de la matriz (MMP), es decir, MMP-2 y MMP-9 (24).

3.2 Derivados de la curcumina

El problema que tiene este metabolito secundario es su aparente inestabilidad en el entorno fisiológico. Estudios en animales han demostrado que la curcumina se metaboliza rápidamente, se conjuga en el hígado y se excreta por las heces, teniendo por tanto una limitación en su biodisponibilidad (25). Esto limita una posible aplicación exitosa y controlada en la clínica y no permite comprender completamente qué mecanismos son activados por la molécula y cuáles por sus metabolitos. Por lo tanto, es crucial identificar

derivados estables y caracterizar sus bases moleculares de acción contra la proliferación y metástasis de células cancerígenas (26).

3.4 Viabilidad celular

A pesar de los avances científicos y tecnológicos, las terapias actuales para tratar el cáncer de mama no son efectivas para todos los pacientes, por lo que es fundamental desarrollar nuevas terapias o mejorar las terapias existentes. En la lucha contra esta enfermedad, la identificación o síntesis de moléculas que permitan inducir la muerte de las células cancerígenas es fundamental. Para el desarrollo de estas moléculas es necesario realizar la evaluación de la viabilidad celular, ya sea, para corroborar que la molécula en cuestión no afecta a las células sanas o que es capaz de eliminar a las células tumorales (28). Para ello se deben obtener resultados precisos y confiables de la viabilidad celular *in vitro* durante las etapas iniciales de la investigación, ya que esta información influye directamente en el éxito del candidato a fármaco para su posterior desarrollo. Estos ensayos deben ser suficientemente sensibles para detectar pequeñas diferencias en el número de células viables y generar resultados reproducibles bajo las condiciones experimentales controladas (29).

La viabilidad celular puede ser definida como el número de células sanas en una muestra, y los métodos que cuantifican la viabilidad de las células *in vitro* se pueden dividir en cuatro grupos de ensayos: reproductivos, de síntesis de ADN, de permeabilidad y de actividad metabólica, siendo este último el cual se utilizó en este estudio (27).

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1. Hipótesis

4.1.1. Los compuestos derivados de la curcumina presentan actividad citotóxica antitumoral *in vitro* sobre la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7.

4.2. Objetivo General:

4.2.1. Evaluar la actividad antitumoral *in vitro* de compuestos químicos sintetizados a partir de la curcumina en una línea celular humana de cáncer de mama.

4.2 Objetivos específicos:

4.2.1. Determinar la concentración *in vitro* de los compuestos derivados de la curcumina con actividad citotóxica en células MCF7.

4.2.2. Evaluar los efectos citotóxicos de los compuestos derivados de la curcumina sobre líneas celulares no tumorales NIH/3T3.

5. METODOLOGIA

5.1 Células MCF-7

Es una línea celular de cáncer epitelial ampliamente estudiada, derivada de adenocarcinoma de mama y que se aisló por primera vez en 1970 del tejido mamario de una mujer caucásica de 69 años. MCF-7 es el acrónimo de Michigan Cáncer Foundation-7, que se refiere al instituto en Detroit donde la línea celular fue establecida en 1973 por Herbert Soule y sus colaboradores.

La línea MCF7 conserva varias características del epitelio mamario diferenciado, incluida la capacidad de procesar el estradiol a través de los receptores de estrógeno citoplásmicos y la capacidad de formar cúpulas. Las células expresan el oncogén WNT7B. Las células MCF-7 son células adherentes bastante grandes, con un tamaño de célula típico que mide 20-25 micras. El medio base para esta línea celular es el Medio Esencial Mínimo de Eagle, en condiciones de 5% de CO₂, 95% de humedad, a 37°C y con 10% de suero fetal bovino. Los científicos han encontrado que, aunque las células MCF-7 son fáciles de propagar, generalmente son una población de crecimiento lento.

5.2 Células NIH/3T3

Las células provienen de una línea celular establecida en 1962 por dos científicos que se encontraban en el Departamento de Patología de la Escuela de Medicina de la Universidad de Nueva York, George Todaro y Howard Green.

La línea celular NIH/3T3, corresponde a fibroblastos de tejido embrionario de ratón suizo albino. La designación '3T3' se refiere al protocolo de transferencia e inoculación celular para la línea y significa "transferencia de 3 días, inóculo 3×10^5 células. El medio de base para esta línea celular es el medio de Eagle modificado por Dulbecco formulado por ATCC. Para hacer el medio de crecimiento completo se agrega suero fetal bovino a una concentración final del 10%. Las condiciones atmosféricas requeridas para su crecimiento son 5% de CO₂, 95% de humedad y 37°C. A los dos o tres días crece con 60% de confluencia, y a los 5 días con 80 a 90% de confluencia.

5.3 Cultivo celular

Las células MCF-7 y NIH/3T3 se cultivaron en medio *DMEM-High* (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) de *Biological Industries* (glucosa a 4,5 g/L) y suplementado con antibióticos (penicilina/estreptomicina al 1%, Gibco) y con suero fetal bovino al 10% en placas de poliestireno (FALCON). El crecimiento de las líneas celulares se realizó en una estufa de cultivo celular con una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C y 95% de humedad.

Para el cultivo de MCF7 y NIH/3T3 se descongeló un criovial y se trasvasijó a un tubo falcon de 15 ml con 3 ml de PBS al 1% y se centrifugó por 5 minutos a 800 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el medio en medio DMEM-H. Se trasvasijó el contenido a una placa de 100 mm con 10 ml de medio DMEM-H. Se realizó cambio de medio cada 2 días en ambos tipos celulares, lavando las células 3 veces con 2-3 ml de PBS al 1% y 10 ml de medio DMEM-H. Una vez que se ha obtenido un 80 % de confluencia se tripsinizó cada 2 días en las células MCF7 y cada 5 días en el caso de las NIH/3T3. Las células se lavaron 3 veces con PBS al 1% y se agregó 1 ml de tripsina 0,25% (p/v). La tripsina se dejó actuar 5 minutos en las NIH/3T3 y 7-8 minutos en las MCF7 a 37°C, 95 % de humedad y 5 % de CO₂. Se inactivó la tripsina con 1 ml de DMEM-H 10% de suero fetal bovino.

5.4 Síntesis de compuestos derivados de la Curcumina

Para la síntesis de sales de quinolina con diferentes largos de cadena derivadas de curcuminoides, se realizó siguiendo los protocolos descritos por Pabon (Pabon, 1964; Di Martino *et al.*, 2016), pero éste no fue hecho en el presente trabajo de memoria. Así, la construcción de sales de quinolina **6a-c** comenzó con la formación de la fenildicetona **3** (representada en su forma enólica), la cual se obtuvo de la siguiente forma: A una solución en agitación de 2,4-pentanodiona **1** (1 equivalente) en 10 mL de acetato de etilo (AcOEt) se adicionó trióxido de boro (B₂O₃) (1 equivalente) para generar el complejo acetona/óxido bórico. Esta reacción fue mantenida en agitación a 80 °C por un periodo de 30 minutos. Seguidamente se adicionó 0.9 equivalentes de siringaldehído **2** y 2 equivalentes de tributil borato (B(n-BuO)₃). La reacción fue mantenida en agitación a 80 °C por un periodo de 30 min, luego se adicionó una solución 0,4 M de butilamina en AcOEt y la reacción se llevó a 100 °C por 1 hora. Finalizado este tiempo se adicionó 30 mL de HCl (0,5 N) y las fases

resultantes fueron separadas en un embudo de decantación. La fase acuosa resultante fue extraída con AcOEt (3x40 mL) y la fase orgánica obtenida fue lavada con solución saturada de NaHCO₃, salmuera, secado con Na₂SO₄ y purificación por cromatografía en columna (CC) resultando en la formación de las fenildicetona **3**.

La formación del derivado asimétricos de curcumina **5** se obtuvo siguiendo el mismo procedimiento descrito para la formación de **3**, teniendo en cuenta la relación molar equivalente 1:1 entre **3** y el aldehído quinolínico **4**.

Finalmente, la reacción del curcuminoide **5** con bromuros de alquilo (longitudes de cadena: etilo (**6**), propilo (**7**) y pentilo (**8**)) en dimetilformamida (DMF) y una relación equivalente molar 1:1 (**5:6**, **7** o **8**), se llevó a cabo en microondas (MW) en un tiempo de 10 min como fue descrito en un trabajo previo (Forero Doria *et al.*, 2018)

El final de la reacción en la obtención de las sales **9a-c** se marcó mediante la adición de agua (1 mL) a la mezcla de reacción, resultando en la formación de un precipitado oleoso el cual posteriormente fue lavado con éter dietílico (4 x 2 ml), separando luego esta última capa por decantación. Finalmente se llevó a alto vacío durante 4 horas para obtener las sales **9a-c**. Estas sales se obtuvieron en forma de sólidos cremosos con un rendimiento de 50 (**9a**), 70(**9b**) y 85 (**9c**) %.

La elucidación estructural de las sales **9a-c**, así como los diferentes precursores sintéticos fue realizada empleando diferentes técnicas tales como: RMN-¹H y ¹³C, IR y espectrometría de masas (MS). Las cuales hacen parte del proyecto Fondecyt postdoctorado N° 3170757.

Los compuestos obtenidos se muestran en la figura 4.

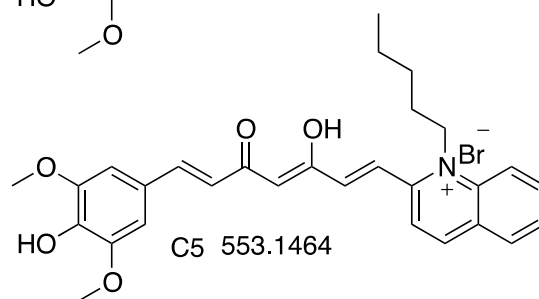
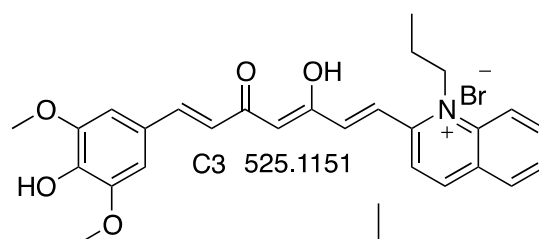
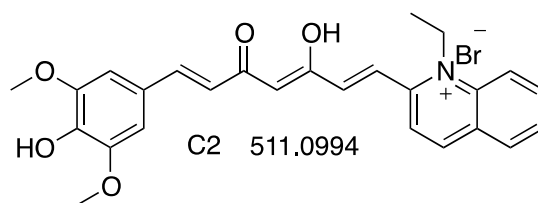
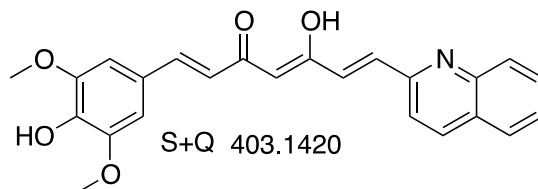
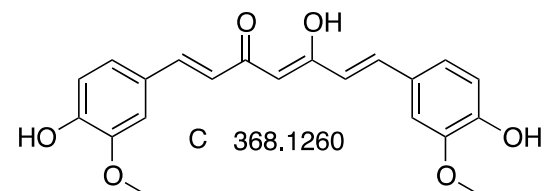


Figura 3: Estructura de compuestos sintetizados derivados de la Curcumina

5.4 Preparación de soluciones Compuestos derivados de la curcumina

Se prepararon concentrados a 100.000 μM de los compuestos curcumina C1 y derivados de la curcumina C2, C3, C5 y s+q, utilizando 100% de DMSO como disolvente, de forma consiguiente se procedió a preparar diluciones de todos los compuestos, a las concentraciones de 50 μM , 100 μM , 200 μM y 600 μM , de esta manera en el pocillo de la placa de 96, serían diluidas 10 veces logrando así las concentraciones deseadas de 5 μM , 10 μM , 20 μM y 60 μM , con 0,05%, 0,1%, 0,2% y 0,6% de DMSO respectivamente.

5.5 Ensayo de viabilidad celular por MTT

Se realiza agregando sales de tetrazolio, que es una molécula cuya estructura corresponde a un anillo formado por cuatro átomos de nitrógeno y uno de carbono y este anillo se encuentra unido a tres sustituyentes ⁽¹⁶⁾. El Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol o MTT es una sal de tetrazolio, compuesto soluble en agua, de color amarillo, que penetra con facilidad en las células viables y que puede ser reducido por éstas a formazán; compuesto de la familia de los formazanos, de color violeta e insoluble en agua, mientras que las células con daño irreparable o muertas pierden esta capacidad. Para cuantificarlo se suele disolver en un disolvente orgánico, como DMSO (dimetilsulfóxido) y se mide su color mediante la A_{570} . ^(16 y 17)

Las células MCF7 y NIH/3T3 se trabajaron en microplacas de 96 pocillos a las 24 hrs de incubación a 95 % de humedad, 5 % de CO₂ y 37°C, en medio DMEM-High. Se sembraron 2000 células/uL. Se añadieron cada uno de los compuestos derivados de la curcumina a 5, 10, 20 y 60 uM, se incubó 24 horas bajo las mismas condiciones y luego se agregó 5µL de MTT 250mM y se incubó por 3-4 hrs bajo las mismas condiciones. Posteriormente se añadieron 50µL de solución disolvente de cristales (Cayman Chemical) y se incubaron por 3-18 hrs. Para la lectura se utilizó lector de microplaca a 570 nm, con tiempo de agitación de 10- 20 segundos. Se utilizó blanco de MTT el cual contenía medio DMEM-High, MTT y solución disolvente de cristales. Los resultados fueron obtenidos a partir de al menos tres experimentos independientes.

5.6 Análisis estadístico

Para el análisis de datos se utilizó un *ANOVA one-way* y un *turkey multiple comparisons test* para comparación de variables independientes, utilizando el programa estadístico GraphPad Prism 6. Se consideró como valor de significancia un valor $p < 0,05$ (*), determinándose un intervalo de confianza de 95%. Los valores son $\text{mean} \pm \text{SEM}$, con un n de 3.

6. RESULTADOS

6.1 Ensayo de viabilidad celular en células MCF-7

Para determinar si los compuestos tienen efecto citotóxico en células de cáncer de mama se evaluó la viabilidad de las células MCF-7. Se utilizaron distintas concentraciones de curcumina y compuestos derivados de la curcumina frente a las células MCF-7 por 24 horas, como se describió detalladamente en los métodos. Se observó una tendencia a disminuir la viabilidad celular conforme aumenta la concentración del compuesto, que arrojó resultados estadísticamente significativos frente al control en todas las concentraciones en los casos de los compuestos C₁ y C₅, como se muestra en la figura 5 y 8 respectivamente. El compuesto C₂ mostró una citotoxicidad estadísticamente significativa frente al control cuando las células MCF7 fueron expuestas a 10, 20 y 60 μ M del compuesto, como se muestra en la figura 6. Cuando las células fueron expuestas a C₃, generó una disminución de la viabilidad estadísticamente significativa respecto al control a 5, 10 y 60 μ M según la figura 7, mientras que con el compuesto s+q la viabilidad celular disminuyó significativamente con respecto al control solo en las concentraciones más altas, es decir a 20 y 60 μ M del compuesto, como muestra la figura 9.

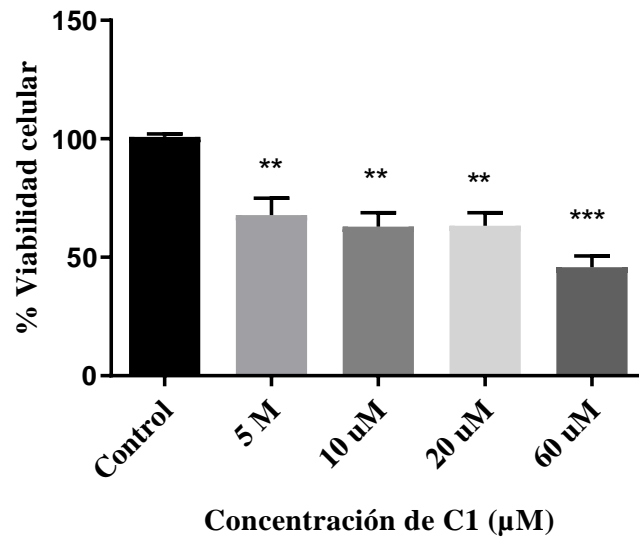


Figura 5: Porcentaje de viabilidad celular de células MCF7 frente al compuesto curcumina C₁. Las células MCF7 fueron expuestas a 5, 10, 20 y 60 μM del compuesto derivado de la curcumina C₁, por 24 horas. Los valores están expresados como porcentaje de viabilidad celular en función del compuesto C₁ (curcumina) y el control (sin el compuesto). Los resultados presentan el promedio de 3 ensayos independientes ± SEM, significativos respecto al control a 5, 10 μM (**p ≤0,01) y 20 μM y (**p ≤0,001).

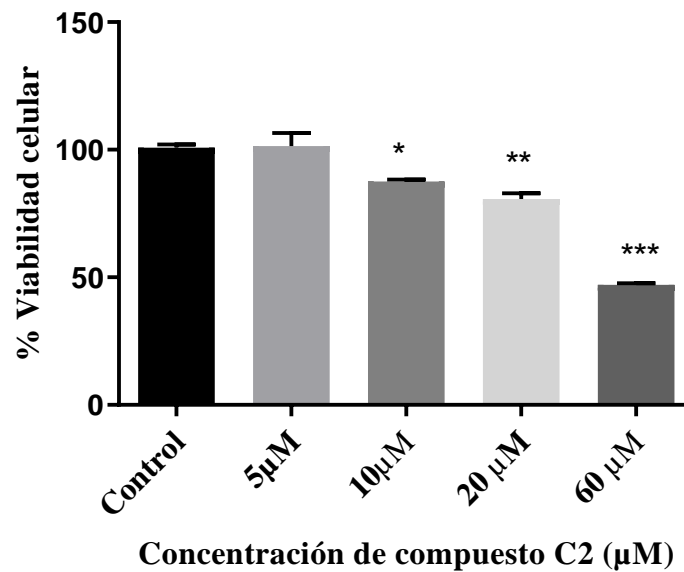


Figura 6: Porcentaje de viabilidad celular de células MCF7 frente al compuesto derivado de la curcumina C₂: Las células MCF7 fueron expuestas a 5, 10, 20 y 60 μM del compuesto derivado de la curcumina C₂, por 24 horas. Los valores están expresados como porcentaje de viabilidad en función del tipo de compuesto derivado de la curcumina analizado y el control (sin el compuesto). Los resultados presentan el promedio de 3 ensayos independientes ± SEM, siendo significativo a 10, 20 y 60 μM (*p≤0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001).

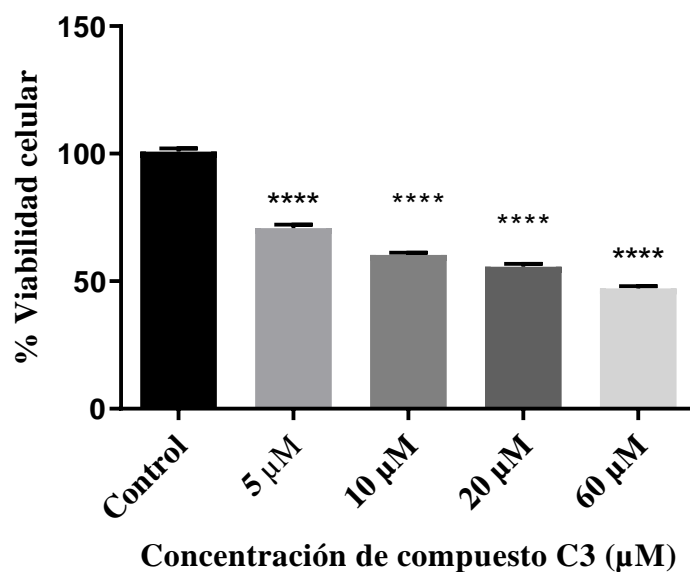


Figura 7: Porcentaje de viabilidad celular de células MCF7 frente al compuesto derivado de la curcumina C₃: Las células MCF7 fueron expuestas a 5, 10 y 60 μM del compuesto derivado de la curcumina C₃, por 24 horas. Los valores están expresados como porcentaje de viabilidad en función del tipo de compuesto derivado de la curcumina analizado y el control (sin el compuesto). Los resultados presentan el promedio de 3 ensayos independientes ± SEM, siendo estadísticamente significativo a 5, 20 y 60 μM (****p≤0,0001).

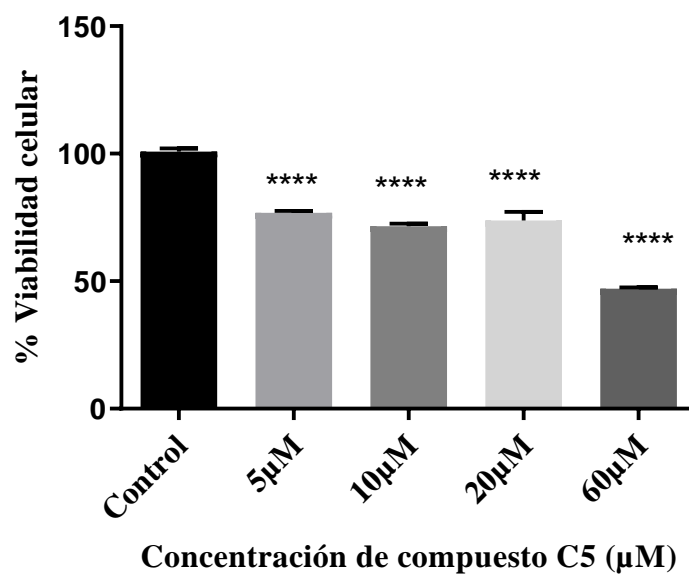


Figura 8: Porcentaje de viabilidad celular de células MCF7 frente al compuesto derivado de la curcumina C₅. Las células MCF7 fueron expuestas a 5, 10, 20 y 60 μM del compuesto derivado de la curcumina C₅, por 24 horas. Los valores están expresados como porcentaje de viabilidad en función del tipo de compuesto derivado de la curcumina analizado y el control (sin el compuesto). Los resultados presentan el promedio de 3 ensayos independientes ± SEM, siendo estadísticamente significativo en todas las concentraciones (****p≤0,0001).

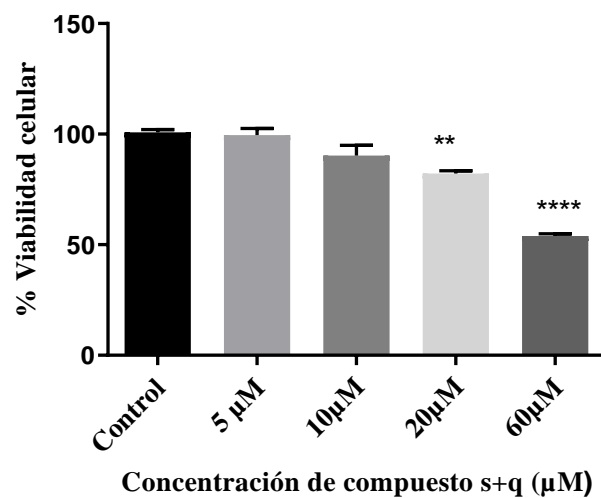


Figura 9: Porcentaje de viabilidad celular de células MCF7 frente al compuesto derivado de la curcumina s+q. Las células MCF7 fueron expuestas a 5, 10, 20 y 60 μM del compuesto derivado de la curcumina s+q, por 24 horas. Los valores están expresados como porcentaje de viabilidad en función del tipo de compuesto derivado de la curcumina analizado y el control (sin el compuesto). Los resultados presentan el promedio de 3 ensayos independientes \pm SEM, siendo estadísticamente significativo a 20 μM (** $p \leq 0,01$) y 60 μM (**** $p \leq 0,0001$).

6.2 Ensayo de viabilidad celular en células NIH/3T3

Para determinar si los compuestos tienen efecto citotóxico en líneas celulares no tumorales, se evaluó la viabilidad de los fibroblastos NIH/3T3. Se utilizaron distintas concentraciones de compuestos derivados de la curcumina frente a las células NIH/3T3 por 24 horas, como se describió detalladamente en los métodos. En este ensayo, se utilizaron las concentraciones de los compuestos que tuvieron un efecto significativo en la disminución de la viabilidad celular en las células MCF-7. Se observó una tendencia a disminuir la viabilidad celular conforme aumenta la concentración del compuesto derivado de la curcumina, en cada uno de los compuestos, siendo un valor no significativo respecto al control en el caso todas las concentraciones del C₁ y s+q empleadas (figura 10 y 14). En el caso de los compuestos C₂, C₃ y C₅, solo fue significativo el resultado a la concentración más alta, a 60 μ M (figuras 11,12 y 13)

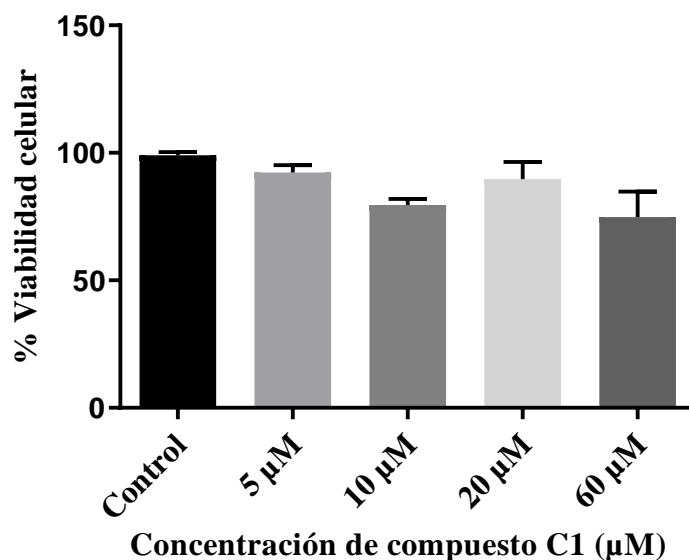


Figura 10: Porcentaje de viabilidad celular de células NIH/3T3 frente al compuesto C₁ (Curcumina). Las células NIH/3T3 fueron expuestas a 5, 10, 20 y 60 μ M del compuesto C₁, por 24 horas. Los valores están expresados como porcentaje de viabilidad en función del tipo

de compuesto analizado y el control (sin el compuesto). Los resultados presentan el promedio de 3 ensayos independientes \pm SEM, y que no fueron significativos respecto al control.

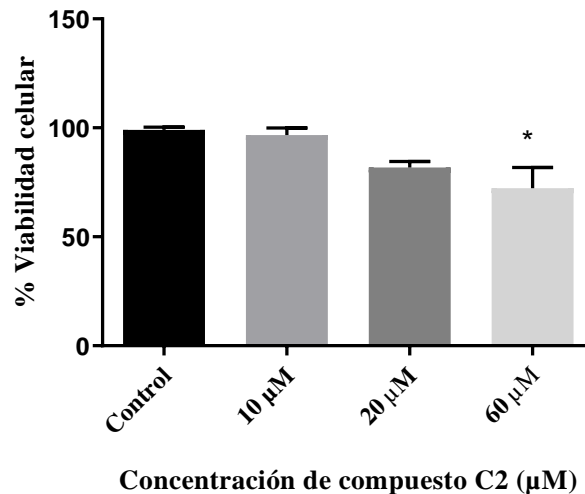


Figura 11: Porcentaje de viabilidad celular de células NIH/3T3 frente al compuesto derivado de la curcumina C₂. Las células NIH/3T3 fueron expuestas a 10, 20 y 60 μ M del compuesto derivado de la curcumina C₁, por 24 horas. Los valores están expresados como porcentaje de viabilidad en función del tipo de compuesto derivado de la curcumina analizado y el control (sin el compuesto). Los resultados presentan el promedio de 3 ensayos independientes \pm SEM, siendo estadísticamente significativo a 60 μ M respecto al control (* $p \leq 0,05$).

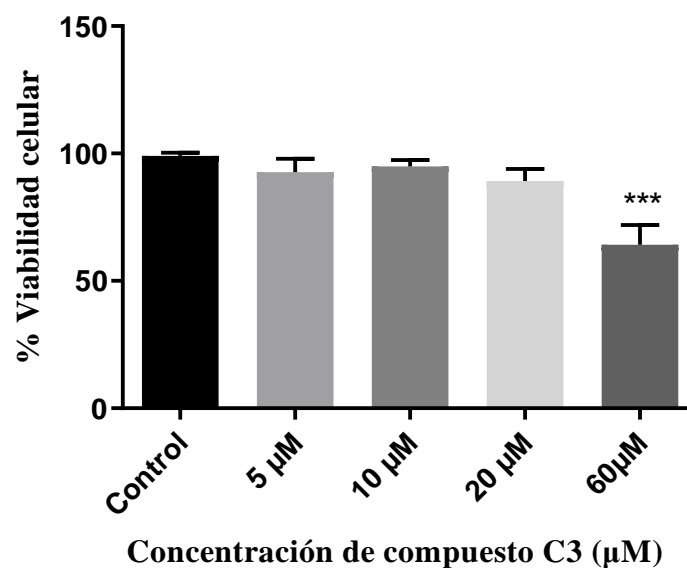


Figura 12: Porcentaje de viabilidad celular de células NIH/3T3 frente al compuesto derivado de la curcumina C₃. Las células NIH/3T3 fueron expuestas a 10, 20 y 60 μM del compuesto derivado de la curcumina C₃, por 24 horas. Los valores están expresados como porcentaje de viabilidad en función del tipo de compuesto derivado de la curcumina analizado y el control (sin el compuesto). Los resultados presentan el promedio de 3 ensayos independientes ± SEM, siendo estadísticamente significativo a 60 μM respecto al control (***) ($p \leq 0,001$).

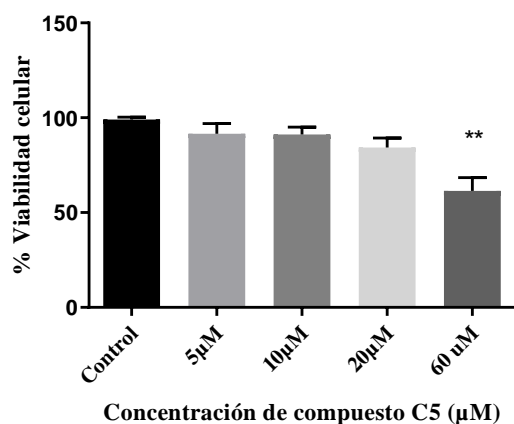


Figura 13: Porcentaje de viabilidad celular de células NIH/3T3 frente al compuesto derivado de la curcumina C₅. Las células NIH/3T3 fueron expuestas a 5, 10, 20 y 60 μM del compuesto derivado de la curcumina C₃, por 24 horas. Los valores están expresados como porcentaje de viabilidad en función del tipo de compuesto derivado de la curcumina analizado y el control (sin el compuesto). Los resultados presentan el promedio de 3 ensayos independientes ± SEM, siendo estadísticamente significativo a 60 μM respecto al control (**p≤0,01).

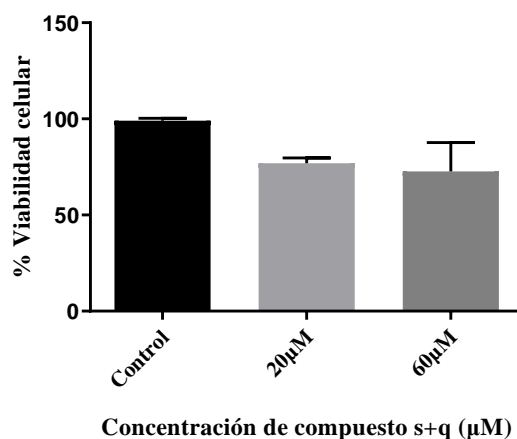


Figura 14: Porcentaje de viabilidad celular de células NIH/3T3 frente al compuesto derivado de la curcumina s+q. Las células NIH/3T3 fueron expuestas a 20 y 60 μM del

compuesto derivado de la curcumina s+q, por 24 horas. Los valores están expresados como porcentaje de viabilidad en función del tipo de compuesto derivado de la curcumina analizado y el control (sin el compuesto). Los resultados presentan el promedio de 3 ensayos independientes \pm SEM, no siendo estadísticamente significativo al respecto al control.

6.3 Comparativo entre células MCF-7 y NIH/3T3

A partir de los resultados obtenidos del ensayo de viabilidad celular por MTT de las células MCF-7 y células NIH/3T3, se realizó un comparativo del efecto de cada compuesto en la viabilidad de ambas líneas a la concentración más alta empleada, que demostró que solo es estadísticamente significativa esta diferencia a 60 μ M con el compuesto C1, curcumina. Por lo tanto ninguno de los compuestos derivados de la curcumina estableció una gran diferencia de citotoxicidad representada por el porcentaje de viabilidad entre células tumorales y no tumorales.

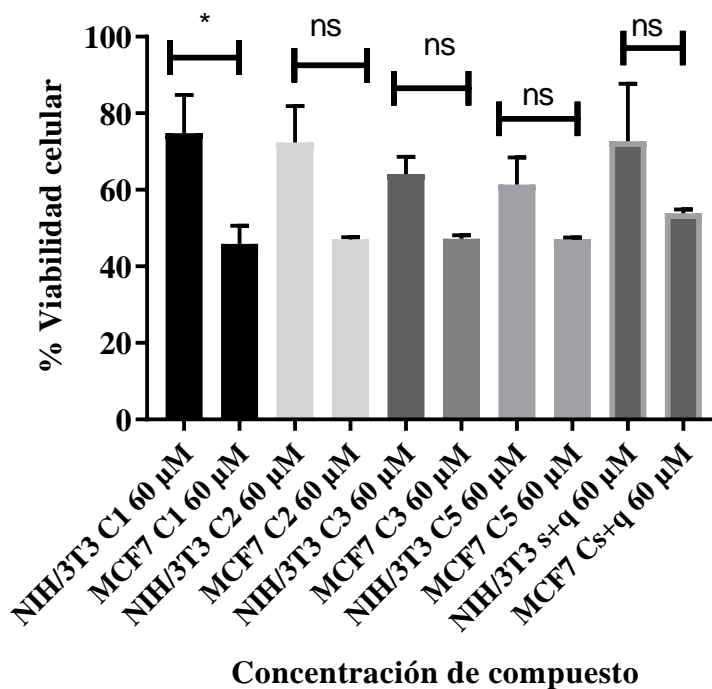


Figura 15: Gráfico comparativo del efecto de cada compuesto a 60 μM en células NIH/3T3 y MCF-7. Se comparó el porcentaje de viabilidad celular obtenido luego de exponer a cada línea celular a la curcumina y compuestos derivados de ella a 60 μM en NIH/3T3 v/s MCF7. El porcentaje de viabilidad presentó diferencias significativas solo en el compuesto C1 (*p≤0,05) y los demás compuestos no dieron resultados estadísticamente significativos.

6.4 Curcumina v/s derivados de la Curcumina

Se comparó la actividad citotóxica de la curcumina en células MCF7 v/s los compuestos derivados de la curcumina, en los compuestos y concentraciones en que hubo significancia estadísticamente significativa. Se determinó que solo el compuesto C3 mostró un comportamiento similar al de la curcumina pero no lo mejora. Los demás compuestos derivados de la curcumina no presenta uncomporamiento mejor al de la curcumina.

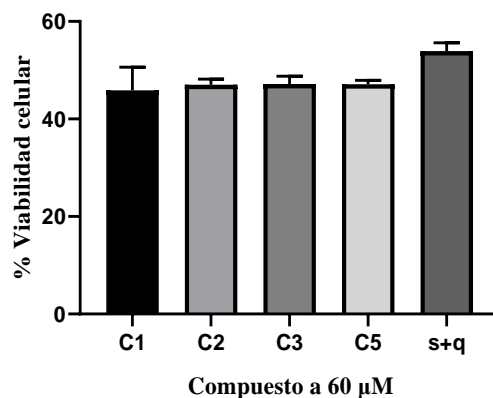
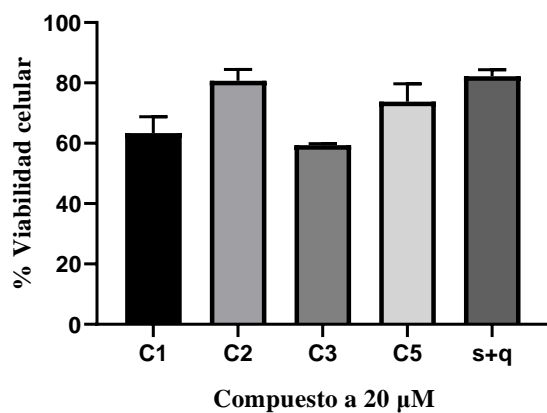
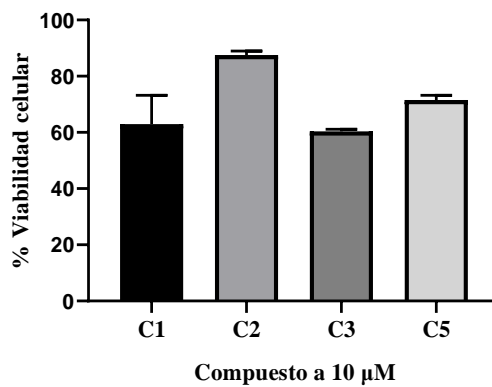
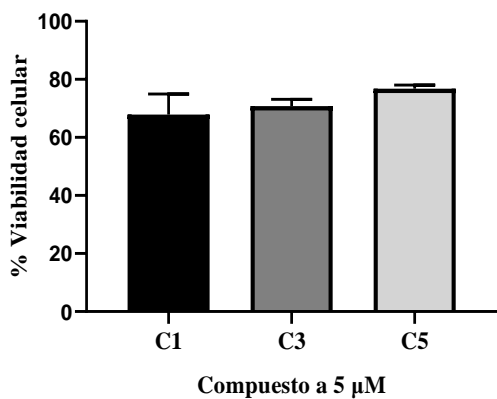


Figura 16: Comparación de efecto citotóxico de la curcumina y derivados de la curcumina: comparó la actividad citotóxica de la curcumina en células MCF7 v/s los compuestos derivados de la curcumina. Los resultados están expresados como porcentaje de viabilidad en función de una concentración determinada del tipo de compuesto derivado de la curcumina analizado y el compuesto C1 (curcumina).

7. DISCUSIÓN

En el presente estudio se determinó la actividad *in vitro* de compuestos derivados de la curcumina sobre la viabilidad de celular en células de cáncer de mama humano de origen tumoral. A través de este ensayo de viabilidad celular por MTT, se determinó el poder citotóxico y capacidad de generar la muerte celular en la línea tumoral MCF-7, frente a los compuestos C₁, C₂, C₃, C₅ y s+q a concentraciones de 5, 10, 20 y 60 μ M durante 24 horas, donde se pudo apreciar una tendencia concentración dependiente del efecto citotóxico sobre la viabilidad celular.

El C₁ tuvo un gran efecto citotóxico frente a las células MCF-7, relativamente dosis dependiente, siendo estadísticamente significativo en todas las concentraciones empleadas y generando mayor impacto en la máxima concentración (Figura 5), y no así en las células NIH/3T3, en donde se evidenció el poder citotóxico del compuesto C₁ que generó disminución de la viabilidad celular, no dosis dependiente, pero que no fue estadísticamente significativa, incluso en las concentraciones más bajas del compuesto. (Figura 10). El C₂ presenta un efecto citotóxico frente a las células MCF7, concentración dependiente, pero que requiere de concentraciones relativamente más altas para afectar la viabilidad celular, siendo significativo C₂ desde 10 μ M (Figura 6). En el caso de las NIH/3T3, este compuesto genera una disminución de la viabilidad celular estadísticamente significativa solo cuando C₂ está en su más alta concentración. (Figura 11). El C₃ presenta el mayor efecto citotóxico sobre las células MCF7 afectando significativamente sobre la viabilidad celular en todas las concentraciones, siendo dosis dependiente (Figura 7), mientras que en las células NIH/3T3, en las concentraciones bajas del C₂ casi no presenta efecto citotóxico, solo se ve y es

estadísticamente significativo cuando la concentración es máxima. (Figura 12). El C₅ presentó datos estadísticamente significativos en todas sus concentraciones en las células MCF7, cuyo efecto no parece ser dosis dependiente entre 5 y 20 uM (Figura 8). En las células NIH/3T3, la citotoxicidad del compuesto solo afectó de manera estadísticamente significativa la viabilidad celular de los fibroblastos cuando la concentración es máxima. (Figura 13). Y por último el compuesto s+q tuvo efecto citotóxico estadísticamente significativo en las células MCF-7 solo en las concentraciones más altas del compuesto con efecto dosis dependiente (Figura 9), y cuando el compuesto es enfrentado a células NIH/3T3 no genera un resultado estadísticamente significativo según la gráfica (Figura 14).

Si bien, los 5 compuestos probados presentaron una tendencia a disminuir la viabilidad de las células de cáncer de mama y fibroblastos, fueron los compuestos C₁ y C₃ quienes demostraron mayor poder citotóxico concentración dependiente y alta predilección a afectar la viabilidad celular de las células MCF-7 en contraste a las células NIH/3T3. De ello, se puede deducir que aparentemente existiría una mayor susceptibilidad al daño citotóxico por parte de las células tumorales de cáncer de mama que a células no tumorales. Por otro lado, al realizar un comparativo entre el efecto de cada compuesto sobre las células MCF-7 y NIH/3T3 en la máxima concentración, es el C₁ quien genera una diferencia significativa entre el porcentaje de viabilidad afectado en ambos tipos celulares (Figura 15).

Por lo tanto, se confirmó que la curcumina tiene efecto citotóxico en células tumorales. Además, todos los compuestos analizados fueron citotóxicos para células tumorales MCF7, lo que confirma la hipótesis planteada. El efecto fue en menor grado para células no tumorales NIH/3T3, lo que sugiere cierta predilección citotóxica hacia células tumorales. Un resultado similar reportó un estudio de captación de curcumina, que concluyó que las células tumorales EL4 y MCF7 mostraron significativamente mayor sensibilidad hacia la actividad citotóxica de la curcumina en comparación con células de fibroblastos normales NIH3T3 (31).

Todos los compuestos mostraron efectos dosis dependiente, concordante a lo reportado en un estudio de propiedades anticancerígenas de la curcumina y derivados de ella en células tumorales de cáncer de próstata (32).

Solo el compuesto C3 logró efectos similares al de la curcumina en células MCF7, sin embargo a altas concentraciones ejerció efecto citotóxico estadísticamente significativo en células no tumorales. Si bien la curcumina mostró una mayor sensibilidad citotóxica frente a células tumorales que el compuesto 3, es bastante similar a lo presentado por la curcumina.

El principal obstáculo para utilizar la curcumina como agente terapéutico quimiopreventivo en los seres humanos sigue siendo su biodisponibilidad limitada, así como su inestabilidad química en condiciones fisiológicas. Diversos estudios han sugerido distintos sistemas de administración, como las vesículas lipídicas, las nanopartículas y las nanofibras, que podrían aumentar la biodisponibilidad y estabilidad de la curcumina. En el presente estudio se utilizaron compuestos derivados de la curcumina, y que cuya síntesis tiene como finalidad en primera instancia formar las sales como tal, para mejorar la solubilidad de la curcumina en solventes polares como el agua. Por otra parte, el tener cadenas alquílicas de 2, 3 y 5 átomos de carbono mejorarían la lipofilia, por lo tanto, se buscó que estas sales generen una molécula anfipática con mejores propiedades fisicoquímicas y biológicas que la curcumina.

8. CONCLUSIÓN

Los compuestos derivados de la curcumina sí presentaron actividad citotóxica antitumoral *in vitro* sobre la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7, siendo el compuesto C3 quien dio mejores resultados.

Se determinó que la concentración *in vitro* óptima para ejercer efecto citotóxico en células tumorales fue de 5 μM y que no es citotóxico para células no tumorales.

La mayoría de las modificaciones estructurales de los compuestos derivados de la curcumina podrían mejorar la eficacia de la curcumina, pues hacen a la molécula más hidrófoba y reduce su solubilidad. Por lo tanto, según los resultados del presente estudio, aunque no se demostró que algunos de los compuestos derivados de la curcumina ejercieran un mejor efecto citotóxico, podría el compuesto C3 ser una nueva alternativa al potencialmente ser más estable y mejorar la biodisponibilidad, si es que se comprobara una mejor absorción en un contexto fisiológico.

Durante siglos, la curcumina se ha consumido en la dieta y se ha utilizado como medicina herbal en varios países de oriente. La curcumina tiene propiedades quimiopreventivas del cáncer en una variedad de modelos *in vitro* y en animales de carcinogénesis química, incluidos los que producen tumores de la glándula mamaria. Sin embargo, debido a su baja biodisponibilidad en el contexto fisiopatológico se ha dificultado su uso a nivel terapéutico. Es por ello que se han postulado maneras de aumentar su biodisponibilidad, entre ellas, la modificación de la curcumina para generar derivados de ella, que además de mejorar su

absorción a nivel intestinal ejerzan mayor efecto citotóxico sobre células tumorales y no en células no tumorales.

9. BIBLIOGRAFIA

- (1) Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2014. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25220842>
- (2) Porter PL. Cáncer de mama en el mundo. *Salud Publica Mex* 2009; 51(supl 2): 141-6. 3.
- (3) Bray F, McCarron P, Parkin DM. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. *Breast Cancer Res* 2004; 6: 229-39.
- (4) Ministerio de Salud Chile. Guías Clínicas AUGE Cáncer de Mama [Internet]. 2015 [cited 2017 Oct 13]. Available from: <http://web.minsal.cl/wpcontent/uploads/2015/09/GPCCaMama.pdf>
- (5) Ministerio de Salud. Primer informe de registros poblacionales de cáncer de Chile. Quinquenio 2003-2007. *Minist Salud* [Internet]. 2012;178. Available from: <http://epi.minsal.cl/vigilancia-epidemiologica/vigilancia-de-cancer>
- (6) Taylor L. Turmeric (*Curcuma longa*). Tropical Plant Database. Available from: <http://www.rain-tree.com/tumeric.htm#.U02MVfl5PZ9>
- (7) Aggarwal B. The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease [Internet]. Aggarwal BB, Surh Y-J, Shishodia S, editors. Boston, MA: Springer US; 2007. 500 p. Disponible en: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-0-387-46401-5>
- (8) Liu Y-L, Yang H-P, Gong L, Tang C-L, Wang H-J. Hypomethylation effects of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin on WIF-1 promoter in non-small cell lung cancer cell lines. *Mol Med Rep*. 2011;4(4):675-9
- (9) Perrone D, Ardito F, Giannatempo G, Dioguardi M, Troiano G, Lo Russo L, et al. Biological and therapeutic activities, and anticancer properties of curcumin. *Exp Ther Med*. 2015;10(5):1615-23.

- (10) Gupta SC, Sung B, Kim JH, Prasad S, Li S, Aggarwal BB. Multitargeting by turmeric, the golden spice : From kitchen to clinic. *Mol Nutr Food Res*. 2012;0:1-19.
- (11) Tropical Botanical Garden. *Curcuma longa*. Available from: http://ntbg.org/plants/plant_details.php?plantid=3652
- (12) Itokawa H, Shi Q, Toshiyuki A, Morris-Natschke S, Lee KH. Recent advances in the investigation of curcuminoids. *Chin Med* 2008; 3, 11: 1-13.
- (13) Esatbeyoglu T, Huebbe P, Ernst IMA, Chin D, Wagner AE, Rimbach G. Curcumin - From molecule to biological function. *Angew Chem Int*. 2012; 51: 5308-32.
- (14) Aggarwal BB, Kumar A, Aggarwal MS, Shishodia S. Curcumin derived from Turmeric (*Curcuma longa*): a spice for all seasons. In: Bagchi, D, Preuss, HG, Eds. *Phytopharmaceuticals in Cancer Chemoprevention*. New York: CRC Press, 2005; pp. 349-87.
- (15) Maheshwari RK, Singh, A. K, Gaddipati, J, Srimal, R. C. Multiple biological activities of curcumin: a short review. *Life Sci* 2006; 78: 2081-7.
- (16) The molecular targets and therapeutical uses of curcumin in health and disease. Aggarwal, BB, Surj, YJ, Shishodia, S. New York: Springer, 2007.
- (17) Anand P, Thomas SG, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Sung B, Tharakan ST, Misra K, Priyadarsini IK, Rajasekharan KN, Aggarwal BB. Biological activities of curcumin and its analogues (congeners) made by man and mother nature. *Biochem Pharmacol* 2008; 76: 1590-1611.
- (18) Sonkaew P., Sane A., Suppakul P. Antioxidant activities of curcumin and ascorbyl dipalmitate nanoparticles and their activities after incorporation into cellulose-based packaging films. *J. Agric. Food. Chem*. 2012;60:5388–5399. doi: 10.1021/jf301311g
- (19) Aggarwal B. The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease [Internet]. Aggarwal BB, Surh Y-J, Shishodia S, editors. Boston, MA: Springer US; 2007. 500 p. Disponible en: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-0-387-46401-5>

- (20) .Devassy J.G., Nwachukwu I.D., Jones P.J.H. Curcumin and cancer: Barriers to obtaining a health claim. *Nutr. Rev.* 2015;73:155–165. doi: 10.1093/nutrit/nuu064.
- (21) Huang M.T., Wang Z.Y., Georgiadis C.A., Laskin J.D., Conney A.H. Inhibitory effects of curcumin on tumor initiation by benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Carcinogenesis*. 1992;13:2183–2186. doi: 10.1093/carcin/13.11.2183
- (22) . Itokawa H, Shi Q, Toshiyuki A, Morris-Natschke S. L Lee KH. Recent advances in the investigation of curcuminoids. *Chin Med* 2008; 3, 11: 1-13.
- (23) Esatbeyoglu T, Huebbe P, Ernst IMA, Chin D, Wagner AE, Rimbach G. Curcumin - From molecule to biological function. *Angew Chem Int.* 2012; 51: 5308-32.
- (24) Subash C, Sridevi P, Wonil K, Bharat BA. Discovery of curcumin, a component of the golden spice, and its miraculous biological activities. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2012; 39: 283-99.
- (25) Klebe G. Virtual ligand screening: Strategies, perspectives and limitations. *Drug Discov. Today.* 2006;11:580–594. doi: 10.1016/j.drudis.2006.05.012
- (26) Lee W.-H., Loo C.-Y., Bebawy M., Luk F., Mason RS, Rohanizadeh R. Curcumin y sus derivados: su aplicación en neurofarmacología y neurociencia en el siglo XXI. *Curr. Neurofarmacol*
- (27) Fang J.Y., Richardson B.C. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol.* 2005;6:322–327. doi: 10.1016/S1470-2045(05)70168-6.
- (28) Perry M.C., Demeule M., Regina A., Moumdjian R., Beliveau R. Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in glioblastoma xenografts. *Mol. Nutr. Food Res.* 2010;54:1192–1201. doi: 10.1002/mnfr.200900277.
- (29) Aggarwal B. The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease [Internet]. Aggarwal BB, Surh Y-J, Shishodia S, editors. Boston, MA: Springer US; 2007. 500 p. Disponible en: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-0-387-46401-5>
- (30) (30) Devassy J.G., Nwachukwu I.D., Jones P.J.H. Curcumin and cancer: Barriers to obtaining a health claim. *Nutr. Rev.* 2015;73:155–165. doi: 10.1093/nutrit/nuu064.

- (31) (31) A. Kunwar. Inverse Molecular Docking as a Novel Approach to Study Anticarcinogenic and Anti-Neuroinflammatory Effects of Curcumin, 2018 Dec; 23(12): 3351.
- (32) Potent anti-cancer properties of phthalimide-based curcumin derivatives on prostate tumor cells. International Journal of Molecular Sciences, 2019 enero; 20 (1): 28