



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

ACTIVIDAD ANTITUMORAL *IN VITRO* DE COMPUESTOS  
DERIVADOS DE LA CURCUMINA EN CÉLULAS DE CÁNCER  
DE COLON HT29

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO ACADEMICO  
DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA

AUTOR: ADÁN RODRIGO BERNAL LOYOLA  
PROFESOR GUÍA: DR. TM. SERGIO WEHINGER WEHINGER  
CO-GUÍA: DR. ÓSCAR 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

	Pág.
1. Resumen	4
2. Introducción	6
3. Revisión bibliográfica	8
3.1 Propiedades de la curcumina	8
3.1.1 Propiedades fisicoquímicas	9
3.1.2 Absorción y metabolismo	11
3.1.3 Propiedades antitumorales	11
4. Hipótesis y objetivos	15
4.1 Objetivo general	15
4.2 Objetivos específicos	15
5. Materiales y métodos	16
5.1 Células HT29	16
5.2 Células NIH/3T3	16
5.3 Síntesis de sales de quinolina derivadas de curcuminoides con diferentes longitudes de cadena	17
5.4 Compuestos derivados de la curcumina, sales de quinolina	19
5.5 Concentraciones de compuestos derivados de la curcumina	20
5.6 Cultivo celular	20
5.7 Ensayo de viabilidad celular	21
5.8 Análisis estadístico	21
6. Resultados	22
6.1 Ensayos de viabilidad celular en células HT29 y NIH/3T3	22
7. Discusión	32
8. Conclusión	38
9. Bibliografía	40

## INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura química de los curcuminoides	9
Figura 2. Tautomerismo de ceto-enol, equilibrios prototrópicos y productos de degradación de la curcumina	10
Figura 3. Representación esquemática que muestra el impacto de la curcumina en múltiples vías de señalización en los cánceres	14
Figura 4. Síntesis de sales de quinolina derivadas de curcuminoides con diferentes longitudes de cadena	18
Figura 5. Compuestos derivados de la curcumina, sales de quinolina	19
Figura 6: Porcentaje de viabilidad celular de células HT29 frente al compuesto derivado de la curcumina C1	22
Figura 7: Porcentaje de viabilidad celular de células HT29 frente al compuesto derivado de la curcumina C2	23
Figura 8: Porcentaje de viabilidad celular de células HT29 frente al compuesto derivado de la curcumina C3	24
Figura 9: Porcentaje de viabilidad celular de células HT29 frente al compuesto derivado de la curcumina C5	25
Figura 10: Porcentaje de viabilidad celular de células HT29 frente al compuesto derivado de la curcumina s+q	26
Figura 11: Porcentaje de viabilidad celular de células NIH/3T3 frente al compuesto derivado de la curcumina C1	27
Figura 12: Porcentaje de viabilidad celular de células NIH/3T3 frente al compuesto derivado de la curcumina C2	28
Figura 13: Porcentaje de viabilidad celular de células NIH/3T3 frente al compuesto derivado de la curcumina C3, C5 y s+q	29
Figura 14: Comparación de viabilidad celular entre NIH/3T3 y HT29 a concentración 60 $\mu$ M de los compuestos C1, C2, C3, C5 y s+q	30
Figura 15: Comparación de viabilidad celular entre curcumina C1 y compuesto derivado C2 en células HT29 a concentración 60 $\mu$ M.	31

## 1. RESUMEN

El cáncer colorrectal (CCR) es una de las principales 5 causas de muerte en el mundo, en su origen existen factores genéticos y medioambientales, siendo estos últimos considerados como importantes, principalmente los factores asociados a la occidentalización de la población. Esto último implica respecto de la dieta que esta sea rica en carnes rojas y alimentos con uso de preservantes; bajo consumo de frutas y verduras.

Los actuales tratamientos contra el cáncer, causan una serie de síntomas en el paciente los cuales deprimen su bien estar, por esta razón se ha buscado otras alternativas que presenten menor efectos secundarios, en esta ámbito se ha presentado la posibilidad de usar diferentes compuestos entre los cuales destaca el estudio de la curcumina y su efecto anticancerígeno que presenta.

En el presente trabajo se probó la actividad antitumoral de compuestos derivados de la curcumina, los cuales presentan modificaciones químicas para generar una molécula anfipática, con mejores propiedades fisicoquímicas y biológicas, se utilizaron concentraciones entre  $5\mu\text{M}$  a  $60\mu\text{M}$ , para determinar la capacidad de disminuir la viabilidad celular en la línea de cáncer colon-rectal humana HT29.

El compuesto derivado de la curcumina C<sub>2</sub>, presenta una disminución de la viabilidad celular de la línea cancerígena HT29, además de no presentar una disminución importante en la línea no tumoral de fibroblastos NIH/3T3, lo que hace necesario realizar mayores estudios e investigaciones para comprobar como una alternativa terapéutica segura y eficaz.

## 2. INTRODUCCIÓN

El cáncer colorrectal (CCR) constituye aproximadamente el 9 al 10% de todos los nuevos cánceres diagnosticados en el mundo, siendo el cuarto cáncer más frecuente en hombres (después del de pulmón, próstata y estómago) y el tercero en la población femenina; solo precedido por el cáncer de seno y cuello uterino. Esta situación constituye un problema de salud pública no solo en los países de medianos y bajos ingresos sino también en los países del primer mundo (1).

Se ha demostrado que las modalidades de tratamiento que se utilizan actualmente para el CCR tienen una eficacia modesta y también se asocian con toxicidades significativas. Esta necesidad no satisfecha de un tratamiento efectivo de CCR ha impulsado la búsqueda de nuevas estrategias para mejorar la supervivencia y minimizar las toxicidades experimentadas por los pacientes (2).

En la búsqueda de nuevos tratamientos se ha investigado el uso de compuestos naturales, los cuales pueden presentar actividad antitumoral de forma intrínseca o inducida por modificaciones químicas. La curcumina, un compuesto fenólico de la planta *Curcuma longa*, ha mostrado un amplio espectro de propiedades quimiopreventivas, antioxidantes y antitumorales (3). A pesar de la rica historia y las probadas propiedades medicinales eficaces de la curcumina, en la actualidad no existe una declaración de salud aprobada para este polifenol (4).

Ha ganado mucha atención como agente contra el cáncer debido a su capacidad para regular múltiples vías de señalización celular, incluyendo NF- $\kappa$ B, STAT3, proteína activada-1 (AP-1), factor de crecimiento epidérmico-1 (Egr-1) y p53. , que son cruciales en el desarrollo y progresión del cáncer. Sin embargo, la aplicación clínica de curcumina está muy restringida debido a su baja solubilidad en agua, mala absorción oral y rápido metabolismo (5).

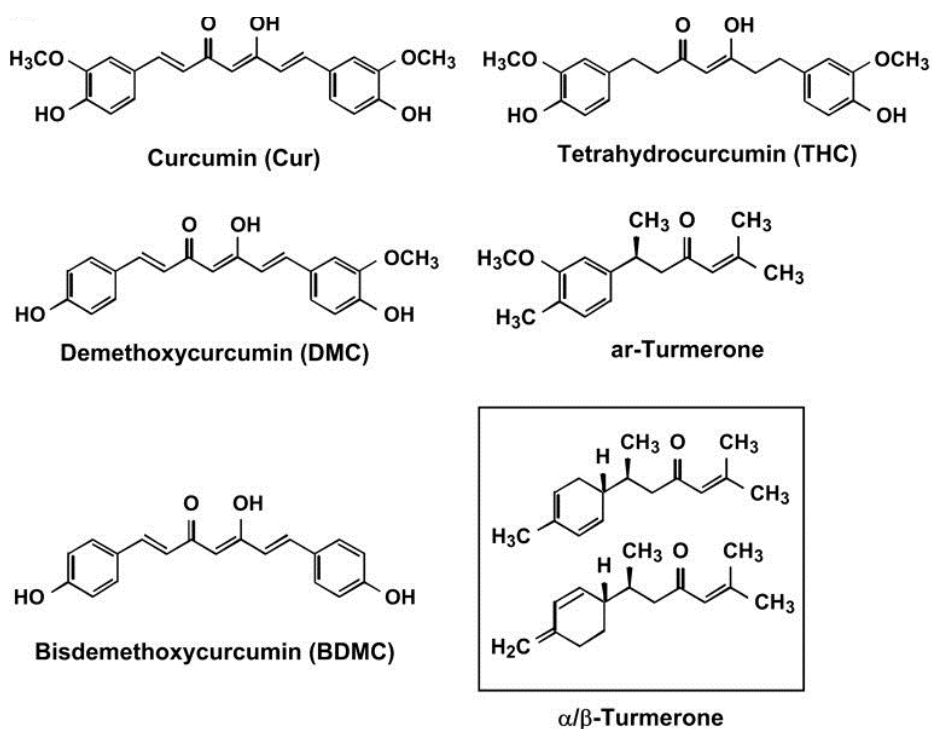
Una de las características de las células tumorales es su capacidad de resistir la muerte celular y la apoptosis, en base a esto se busca a través de modificaciones químicas de la curcumina, disminuir la viabilidad y migración de este tipo de células, específicamente células de cáncer de colon HT29.



### 3. REVISION BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Propiedades de la curcumina

CUR (curcumina) es  $C_{21}H_{20}O_6$ , con la nomenclatura IUPAC de [1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) -1,6-heptadieno-3,5-diona] y un peso molecular de 368.38 Da, CUR es el componente activo de *C. longa* (cúrcuma), una especia indígena nativa. En los países asiáticos, tiene una larga historia de uso contra muchas enfermedades humanas y afecciones de la piel, como el acné y la psoriasis. Además de eso, también es un agente colorante y aditivo alimentario. Es un compuesto cristalino con un aspecto brillante de color amarillo anaranjado, que contribuye a su uso como agente colorante (5). La curcumina disponible comercialmente utilizada para investigación y para ensayos clínicos (mezcla de curcumina) contiene aproximadamente 77% de curcumina pura (Cur), 17% de demetoxicurcumina (DMC) y 3% de bisdemethoxycurcumín (BDMC). Además, cuando las células se tratan con curcumina, uno de los metabolitos principales es la tetrahydrocurcumina (THC) (6).



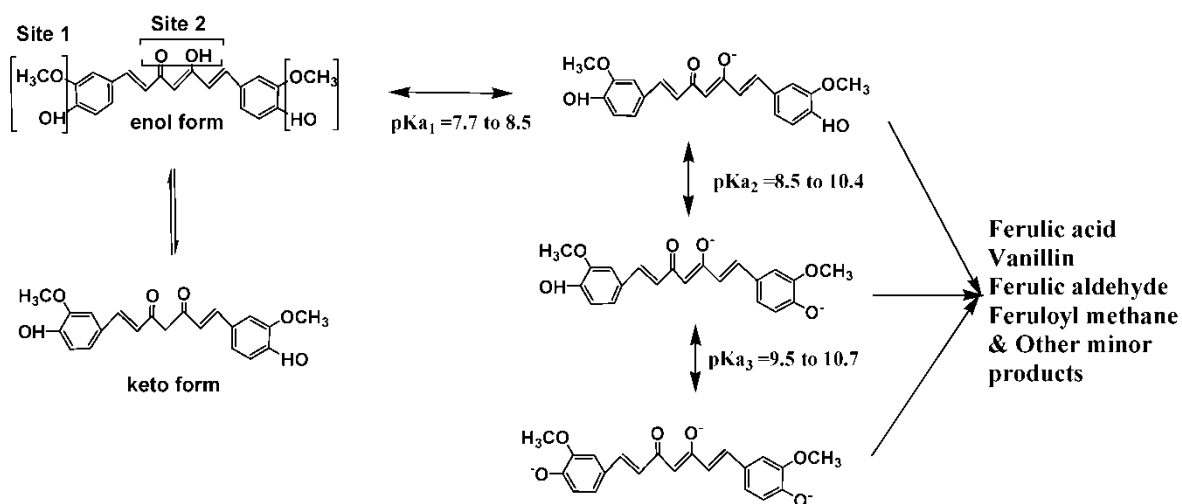
**Figura 1. Estructura química de los curcuminoides:** curcumina (Cur), DMC y BDMC; El metabolito de la curcumina, el THC y los componentes del aceite de cúrcuma, son la turmerona (ar), la  $\alpha$ -turmerona y la  $\beta$ -turmerona ( $\alpha / \beta$ ). (6)

### 3.1.1 Propiedades fisicoquímicas

La curcumina es una molécula simétrica, también conocida como diferuloyl metano. El nombre IUPAC de curcumina es (1E, 6E) -1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) -1,6-heptadieno-3,5-diona, con fórmula química  $C_{21}H_{20}O_6$ , y peso molecular de 368.38 g/mol. Tiene tres entidades químicas en su estructura: dos sistemas de anillos aromáticos que contienen grupos fenoxi o metoxi, conectados por un centro de siete carbonos que consiste en un resto  $\alpha$ ,  $\beta$ -dicetona-insaturado (7).

El espectro de absorción de la curcumina tiene dos bandas de absorción fuertes, una en la región visible con un rango máximo de 410 a 430 nm y otra banda en la región UV con un máximo de 265 nm. El coeficiente de extinción molar de la curcumina en metanol es de  $55,000 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  a 425 nm. La curcumina es un ácido de Brønsted débil, con tres protones lábiles y en consecuencia, se han estimado tres pKa correspondientes a tres equilibrios prototrópicos. Tanto RMN y espectrometría de absorción se han utilizado para estimar el pKa. El primer pKa está en el rango de pH de 7,5 a 8,5, al pasar de pH 7,5 a 8.5 cambia la curcumina de amarillo a rojo.

La reactividad química y la solubilidad de la curcumina aniónica, es decir, en el rango de pH básico aumenta y esta forma de curcumina es más soluble en agua que la forma neutra. El máximo de absorción de curcumina totalmente desprotonada (de color rojo) en pH alcalino ( $> \text{pH } 10$ ) es de 467 nm y el coeficiente de extinción molar es de  $53,000 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (8).



**Figura 2. Tautomerismo de ceto-enol, equilibrios prototrópicos y productos de degradación de la curcumina (8).**

### **3.1.2 Absorción y metabolismo**

La administración oral de CUR es bien tolerada a dosis de hasta 12 g / día en estudios clínicos. Sin embargo, a menudo tiene una biodisponibilidad pobre debido a la baja solubilidad acuosa, la absorción deficiente, el metabolismo alto de primer paso y la rápida excreción. El CUR tiene una solubilidad muy baja de 0,6 µg / ml en agua y sufre una rápida degradación en un ambiente alcalino (5, 9).

La CUR se metaboliza principalmente en el hígado y, en menor medida, en el intestino, donde la glucuronidación es la vía de metabolismo predominante. Entre los metabolitos detectados en plasma, se incluyen los conjugados de glucurónido y sulfato, siendo el metabolito principal el glucurónido de hexahidrocurcumina (10).

### **3.1.2 Propiedades antitumorales**

La CUR, solo o en combinación, muestra actividades quimiopreventivas y anticancerígenas con usos reportados contra varios cánceres, incluyendo colorrectal (5). Los mecanismos subyacentes de estos efectos son diversos y parecen implicar la regulación de varias dianas moleculares, incluidos los factores de transcripción (como el factor nuclear-κB), los factores de crecimiento (como el factor de crecimiento de células endoteliales vasculares), las citocinas inflamatorias (factor de necrosis tumoral), interleucina 1 e interleucina 6, proteína quinasas (como la diana de rapamicina en

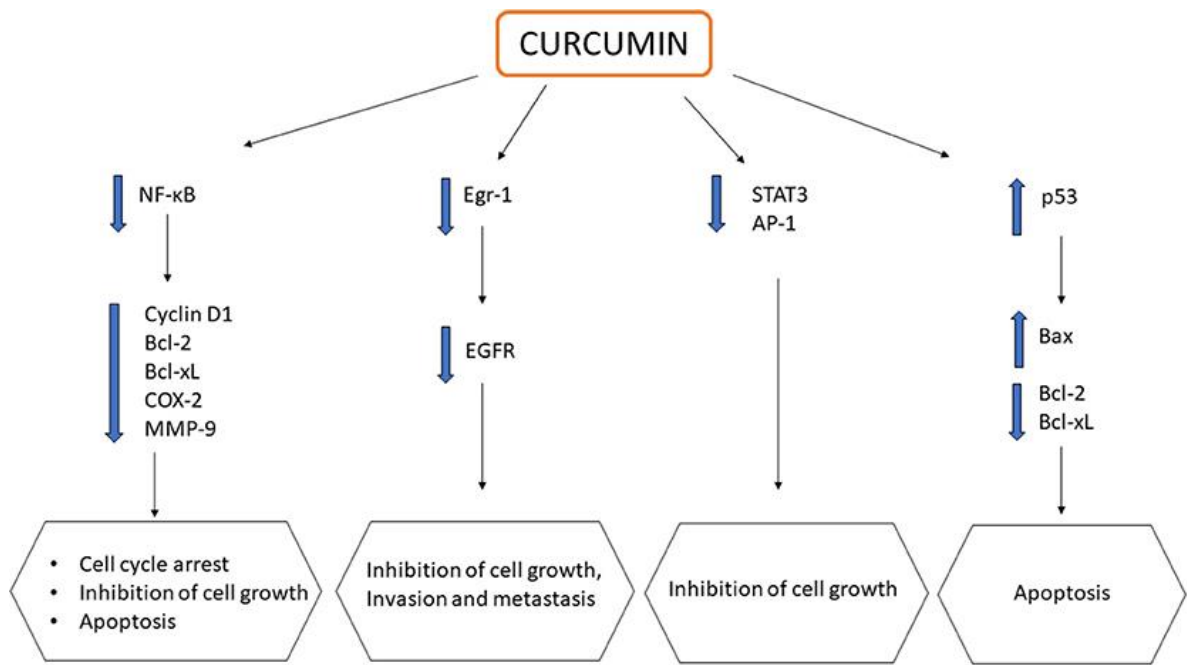
mamíferos, proteínas quinasas activadas por mitógenos y Akt) y otras enzimas (como la ciclooxigenasa 2 y 5 lipoxigenasa) (11).

Además, la CUR también podría promover la apoptosis a través de la regulación positiva del gen supresor de tumores p53, causando la muerte celular en la fase G2. El efecto descendente de la activación de p53 conduce a un efecto neto de la apoptosis en células de carcinoma de colon a través de la regulación descendente de los genes anti-apoptóticos Bcl-2 / Bcl-xL y la regulación positiva de los genes pro-apoptóticos Bax (12).

Especies reactivas de oxígeno (ROS) son las moléculas activas inestables y muy pequeñas que contienen el anión superóxido radical, peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), oxígeno singlete, y el radical hidroxilo, que son los subproductos de proceso oxidativo celular normal. En las células vivas, las ROS celulares se producen principalmente de forma endógena por las mitocondrias a través de la fosforilación oxidativa mitocondrial y de otras fuentes. Estudios recientes han identificado la isoforma NOX3 de la NADPH oxidasa como la principal fuente de generación de ROS empleada por el cisplatino en la cóclea. NOX3 parece manifestar parte de su citotoxicidad a través de la activación y la inducción del potencial receptor transitorio del canal de vainilloide 1 (TRPV1). NOX3 regula los genes relacionados con el estrés en la cóclea, como TRPV1 y la molécula 1 de lesión renal (KIM-1), e inicia la apoptosis en la cóclea. Administración transtimpánica de ARN para la isoforma NOX3 de la NADPH oxidasa se ha demostrado para reducir la expresión del potencial NOX3 y receptor transitorio vainilloide 1 (TRPV1) de canal y KIM-1 (13).

Sin embargo, existe una evidencia creciente de que la producción excesiva de ROS intracelular puede causar directa o indirectamente el daño de los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, lo que finalmente conduce a la inducción de la apoptosis a través del mecanismo apoptótico. Durante la muerte celular inducida por estrés oxidativo, las ROS intracelulares finalmente activan la integridad del potencial de membrana mitocondrial que conduce a la activación de la proteína proapoptótica citosólica Bax (un miembro de la familia Bcl-2). Este Bax activado se traslada a la mitocondria y regula la liberación de citocromo c. Además, la pérdida de la integridad mitocondrial también puede facilitar la liberación del citocromo c y activar las vías apoptóticas mediadas por mitocondrias, lo que resulta en la inducción de la muerte celular apoptótica. Las evidencias más sólidas han postulado que los agentes terapéuticos que pueden inducir la apoptosis mediada por ROS se consideran agentes anticancerosos potenciales para tratar la forma mutada de Smad4 y p53 de cáncer de colon (14).

Es importante destacar que, a nivel molecular, la CUR indujo efectos antiproliferativos y antiinvasivos que se atribuyen principalmente a través de la atenuación de varias cascadas de señalización celular. La curcumina induce de forma prominente la generación de ROS y media la apoptosis independiente de ROS en células de fibroblastos L929 de ratón. Un estudio reciente ha informado que la ROS inducida por la curcumina medió la apoptosis y evitó la transición del epitelio al mesenquimatoso en el cáncer oral. Aunque los efectos anticancerígenos de la curcumina se han estudiado previamente, hasta la fecha, el papel de las ROS inducidas por la curcumina en la inducción de la muerte de las células cancerosas y la inhibición de la proliferación en Smad4 y p53 forma mutada de cáncer de colon es poco conocido (15).



**Figura 3.** Representación esquemática que muestra el impacto de la curcumina en múltiples vías de señalización en los cánceres (5).

## **4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

La modificación química de la curcumina afecta a la actividad antitumoral *in vitro* en células de colon HT29

### **4.1 Objetivo general**

- Evaluar efectos antitumorales *in vitro* de derivados de la curcumina en células de cáncer de colon humanas HT29.

### **4.2 Objetivos específicos**

- Determinar las concentraciones de los compuestos derivados de la curcumina que presentan actividad citotóxica en células HT29.
- Determinar las concentraciones máximas no citotóxicas en una línea celular no tumoral.



## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Células HT29**

Derivado inicialmente en 1964 por Jorden Fogh de una hembra caucásica de 44 años de edad, las células HT-29 forman una monocapa apretada al tiempo que exhiben similitud con los enterocitos del intestino delgado. Las células HT-29 producen en exceso el antígeno tumoral p53, pero tienen una mutación en el gen p53 en la posición 273, lo que resulta en una histidina que reemplaza a una arginina. La procedencia de las células que se utilizaron es el Lab. De Comunicaciones Celulares de la U. de Chile, Dr. Andrew Quest (16).

### **5.2 Células NIH/3T3**

Se iniciaron células de fibroblastos embrionarios de ratón NIH 3T3 a partir de una línea celular aislada en 1962 en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Nueva York. 3T3 se refiere al protocolo de transferencia e inoculación celular para la línea, y significa "transferencia de 3 días, inóculo  $3 \times 10^5$  células". La línea celular se ha convertido desde entonces en una línea celular de fibroblastos estándar. Se utilizaron en este estudio como modelo celular no tumoral (17).

### 5.3 Síntesis de sales de quinolina derivadas de curcuminoides con diferentes longitudes de cadena

El plan sintético descrito en la figura 4, para la síntesis de sales de quinolina con diferentes largos de cadena derivadas de curcuminoides, se realizó siguiendo los protocolos descritos por Pabon (18, 19). Así, la construcción de sales de quinolina **6a-c** comenzó con la formación de la fenildicetona **3** (representada en sus 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 ( $B_2O_3$ ) (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  $NaHCO_3$ , salmuera, secado con  $Na_2SO_4$  y purificación por cromatografía en columna (CC) resultando en la formación de las fenildicetona **3**.

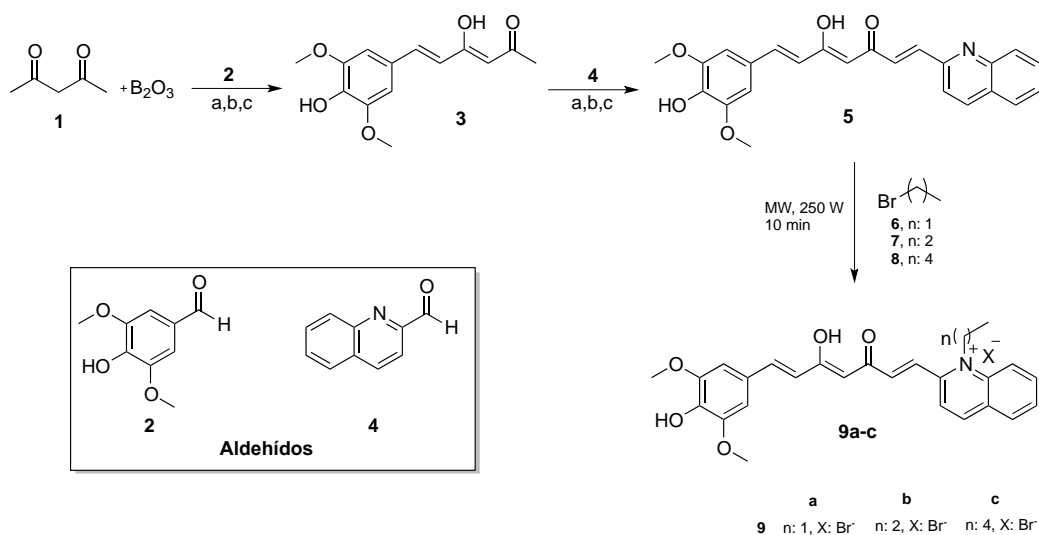
La formación del derivado asimétricos de curcumina **5** se obtuvo siguiendo el mismo procedimiento descrito para la formación de **3**, teniendo en cuenta la relación molar equivalente 1:1 entre **3** y el aldehído quinolínico **4**.

Finalmente, la reacción del curcuminóide **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 (20).

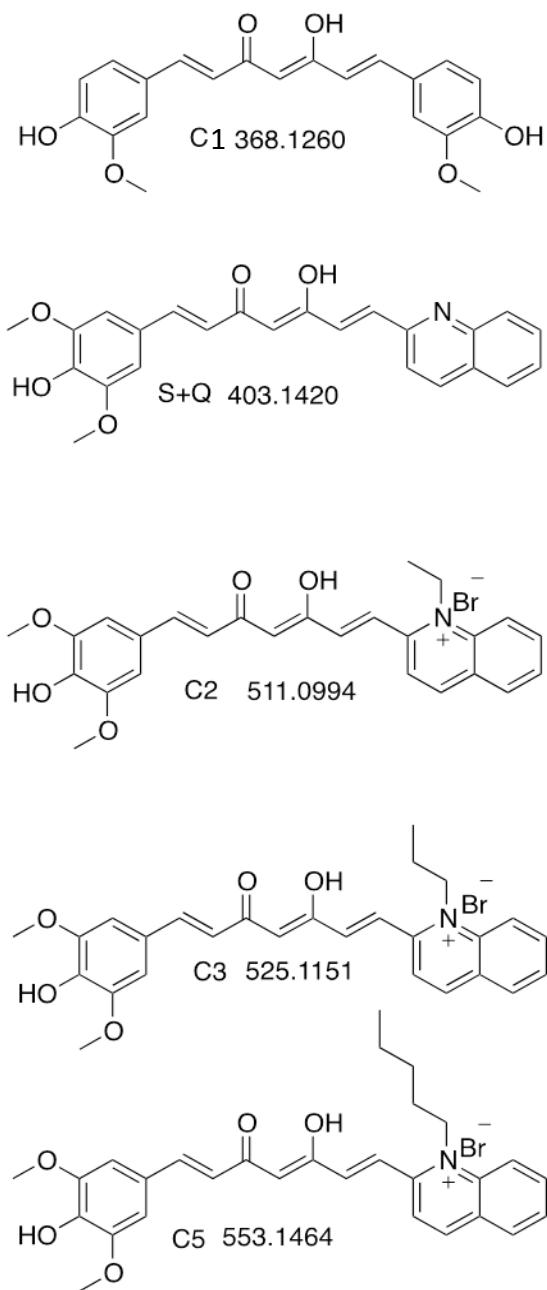
El final de la reacción en la obtención de las sales **9a-c** se marcó mediante la adición de agua (1 mL) a la mezcla de reacción, resultando en la formación de un precipitado oleoso el cual posteriormente fue lavado con éter dietílico (4 x 2 ml), separando luego esta última capa por decantación. Finalmente 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-<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, IR y espectrometría de masas (MS). Las cuales hacen parte del proyecto Fondecyt postdoctorado N° 3170757.



**Figura 4. Síntesis de sales de quinolina derivadas de curcuminoides con diferentes longitudes de cadena.** Reactivos y condiciones: (a) B(n-BuO)<sub>3</sub>, (b) n-BuNH<sub>2</sub>, 80 °C, (c) HCl, 80°C.

#### 5.4 Compuestos derivados de la curcumina, sales de quinolina



**Figura 5. Compuestos derivados de la curcumina y curcumina, sales de quinolina.** Compuesto C<sub>1</sub> curcumina y derivados C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub> y s+q, con sus respectivas masas moleculares.

## 5.5 Concentraciones de compuestos derivados de la curcumina

Se prepararon concentrados a 100.000  $\mu\text{M}$  de la curcumina C1 y de los compuestos derivados de 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 $\mu\text{M}$ , 100 $\mu\text{M}$ , 200 $\mu\text{M}$  y 600 $\mu\text{M}$ , de esta manera en el pocillo de la placa de 96, serán diluidas 10 veces logrando así las concentraciones finales deseadas de 5 $\mu\text{M}$ , 10 $\mu\text{M}$ , 20 $\mu\text{M}$  y 60 $\mu\text{M}$ , con 0.05%, 0.1%, 0.2% y 0.6% de DMSO como vehiculo, respectivamente.

## 5.6 Cultivo celular

Las células HT29 y NIH/3T3 se cultivaron en medio *DMEM-High* (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) 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  $\text{CO}_2$  a 37°C y 95% de humedad. Fueron resemebradas cada tres días o que no superara el 95% de confluencia celular en la placa, lo que ocurriera primero, al resemebrar se procedió a retirar el medio, lavar las células tres veces con PBS se retiró y se agregó tripsina 0,25% cantidad suficiente para cubrir la superficie de la placa, se dejó incubar 5 minutos, posteriormente para inactivar la tripsina se agregó 1 ml de medio *DMEM-High* 10% suero fetal bovino, se homogeniza y se retira el contenido liquido de la placa, se agrega 12 ml de medio *DMEM-High* y se dejó en una estufa de cultivo celular con una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$  a 37°C y 95% de humedad.

## **5.7 Ensayo de viabilidad celular**

Se realizó utilizando Kit MTT cell proliferation Assay (Cayman Chemical), las células se trabajaron en microplaca de 96 pocillos con concentración de 2000 células/pocillo a 24 hrs de incubación, 5% de CO<sub>2</sub>, 37°C y 95% de humedad en medio DMEM-High, se retira 10µL a cada pocillo y se procedio a agregar 10µL de medio en el blanco y 10µL de los compuestos de curcumina para obtener las concentraciones de 5µM, 10µM, 20µM y 60µM en los pocillos, los cuales se trabajaron por duplicado, se dejó incubar con los compuestos 24 hrs a 37°C, posteriormente utilizando 5µL MTT 250mM se incubo 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.

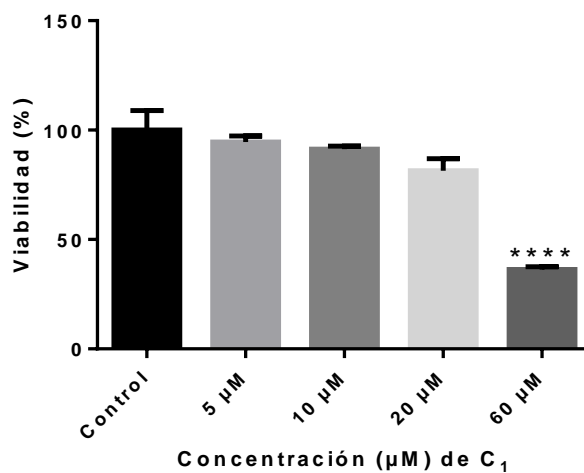
## **5.8 Análisis estadístico**

Para el análisis de datos se utilizó un ANOVA one-way y un análisis pos-test de comparaciones múltiples Bonferroni, también t test, se utilizó en ambos casos el programa estadístico GraphPad Prism 6. Se consideró como valor de significancia un valor  $p < 0,05$  (\*), determinándose un intervalo de confianza del 95%, según recomendación para el test estadístico.

## 6. RESULTADOS

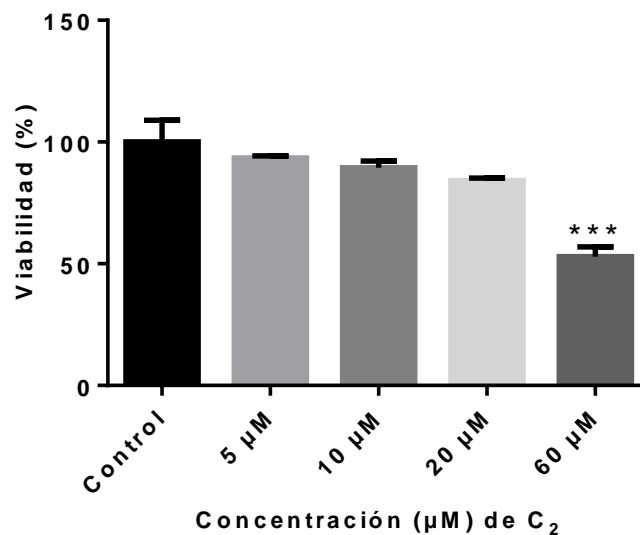
### 6.1 Ensayos de viabilidad celular en células HT29 y NIH/3T3

Se evaluó la viabilidad de las células HT29 y NIH/3T3 frente a diferentes concentraciones de los compuestos por 24 horas, como se describió detalladamente en los métodos.



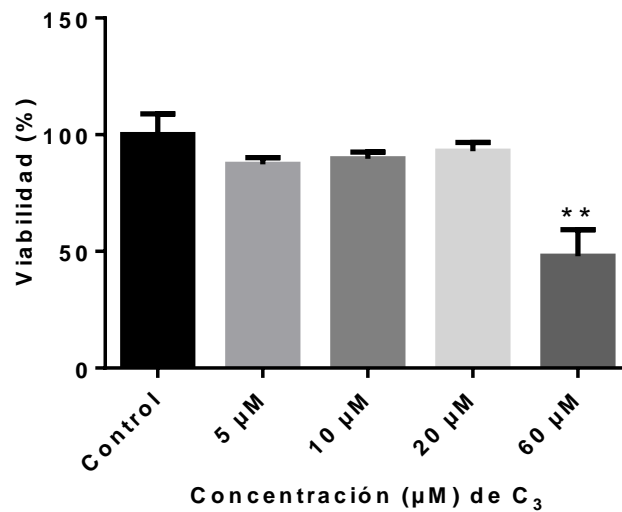
**Figura 6:** Porcentaje de viabilidad celular de células HT29 frente al compuesto curcumina C<sub>1</sub>. Las células HT29 fueron expuestas a 5, 10, 20 y 60 μM del compuesto

curcumina C<sub>1</sub>, 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, significativo respecto al control (\*\*\*\*p≤0,0001) a 60 μM.

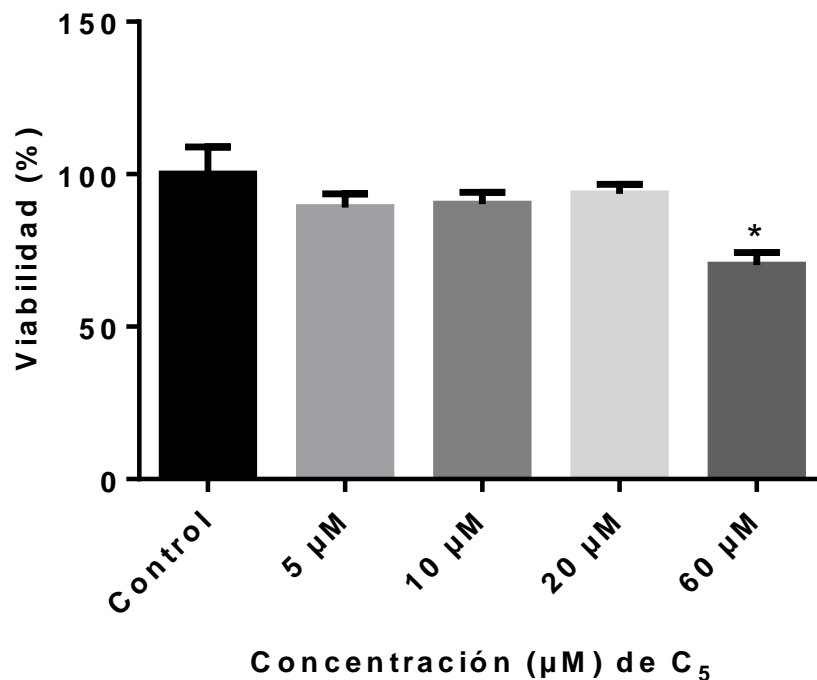


**Figura 7: Porcentaje de viabilidad celular de células HT29 frente al compuesto derivado de la curcumina C<sub>2</sub>:** Las células HT29 fueron expuestas a 5, 10, 20 y 60 μM del compuesto derivado de la curcumina C<sub>2</sub>, por 24 horas. Los valores están expresados como porcentaje de viabilidad 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, siendo significativo 60 μM (\*\*\*)p≤0,001).

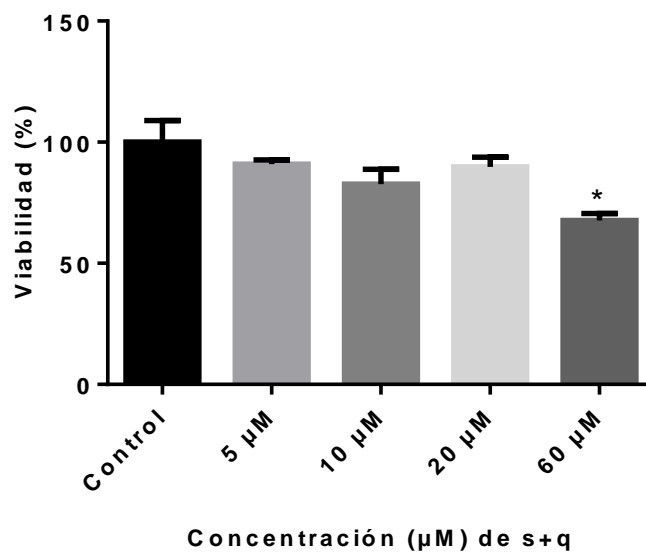




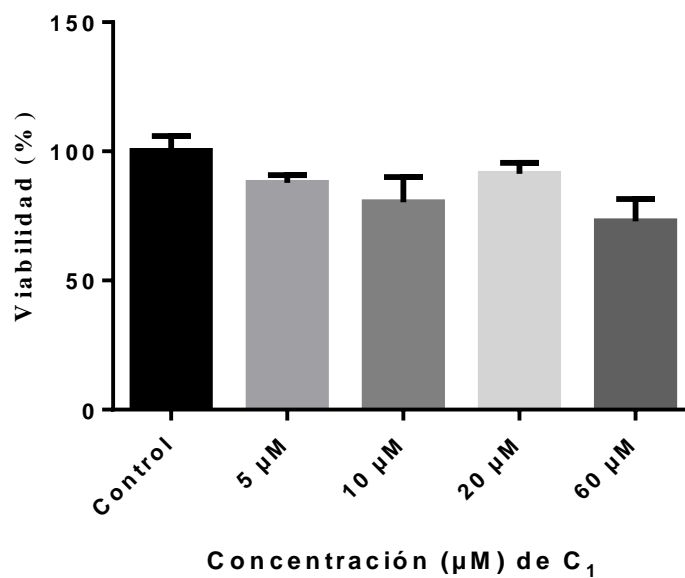
**Figura 8: Porcentaje de viabilidad celular de células HT29 frente al compuesto derivado de la curcumina C<sub>3</sub>:** Las células HT29 fueron expuestas a 5, 10, 20 y 60 µM del compuesto derivado de la curcumina C<sub>3</sub>, por 24 horas. Los valores están expresados como porcentaje de viabilidad 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, siendo estadísticamente significativo a 60 µM (\*\*p≤0,01).



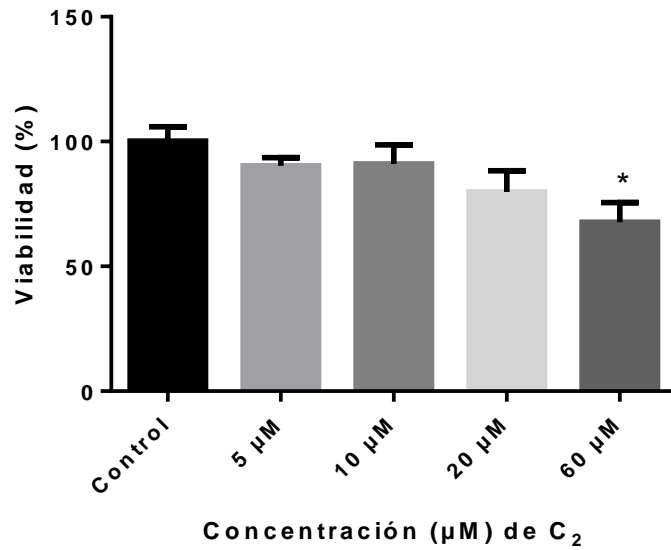
**Figura 9: Porcentaje de viabilidad celular de células HT29 frente al compuesto derivado de la curcumina C<sub>5</sub>:** Las células HT29 fueron expuestas a 5, 10, 20 y 60 μM del compuesto derivado de la curcumina C<sub>5</sub>, por 24 horas. Los valores están expresados como porcentaje de viabilidad 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, siendo estadísticamente significativo a 60 μM (\*p≤0,05).



**Figura 10: Porcentaje de viabilidad celular de células HT29 frente al compuesto derivado de la curcumina s+q:** Las células HT29 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, siendo estadísticamente significativo a 60 µM (\* $p \leq 0,05$ ).

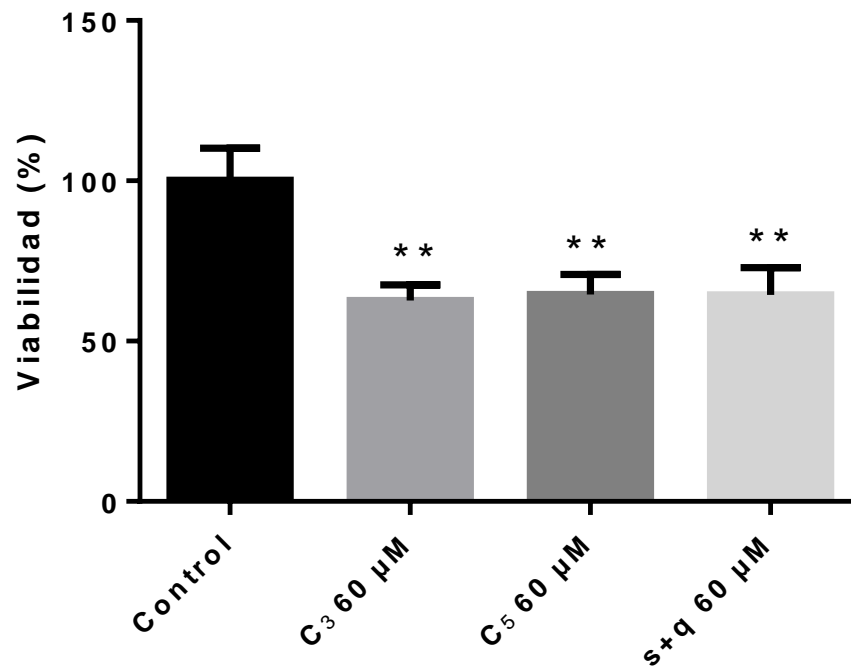


**Figura 11: Porcentaje de viabilidad celular de células NIH/3T3 frente al compuesto curcumina C<sub>1</sub>:** Las células NIH/3T3 fueron expuestas a 5, 10, 20 y 60 μM del compuesto curcumina C<sub>1</sub>, por 24 horas. Los valores están expresados como porcentaje de viabilidad en función del tipo de compuesto derivado de la curcumina analizado y el control (sin el compuesto). Los resultados presentan el promedio de 3 ensayos independientes, siendo estadísticamente significativa ninguna de las concentraciones del compuesto C<sub>1</sub>.

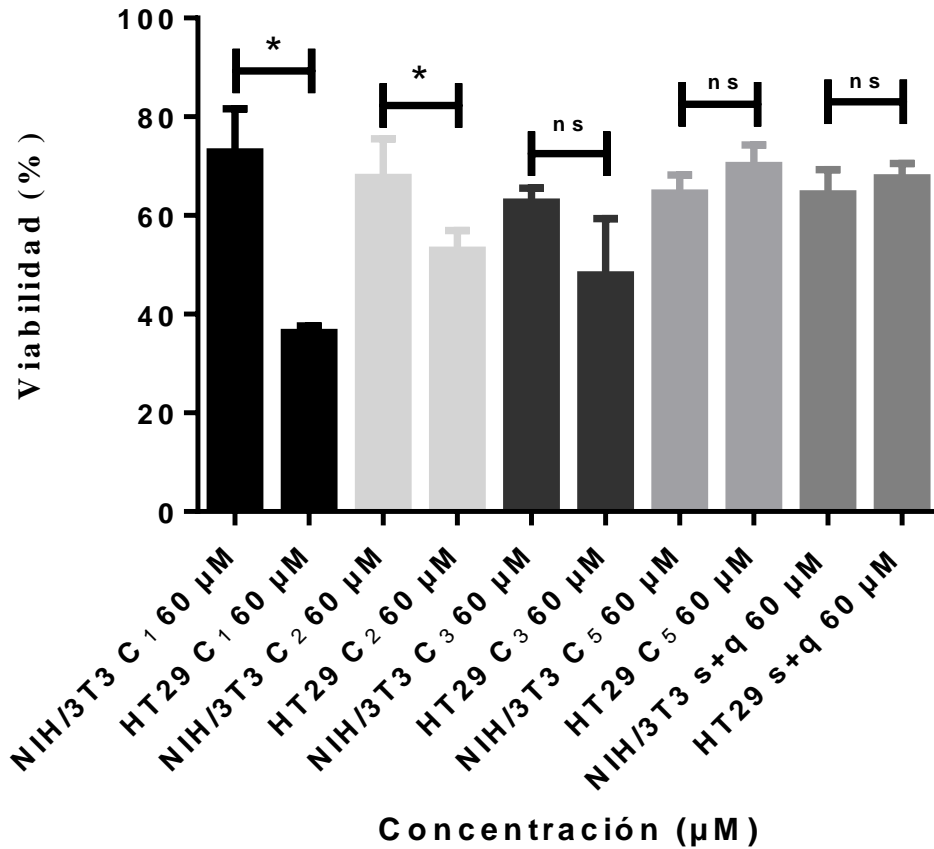


**Figura 12: Porcentaje de viabilidad celular de células NIH/3T3 frente al compuesto derivado de la curcumina C<sub>2</sub>:** Las células NIH/3T3 fueron expuestas a 5, 10, 20 y 60 μM del compuesto derivado de la curcumina C<sub>2</sub>, por 24 horas. Los valores están expresados como porcentaje de viabilidad 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, siendo estadísticamente a 60 μM (\*p≤0,05).

Los compuestos C3, C5 y s+q no presentaron una disminución significativa de la viabilidad celular a concentraciones de 5, 10 y 20  $\mu\text{M}$  en la línea celular HT29, por esta razón solo se utilizó la concentración 60  $\mu\text{M}$  para determinar la actividad que presentan en la viabilidad celular de los fibroblastos NIH/3T3.

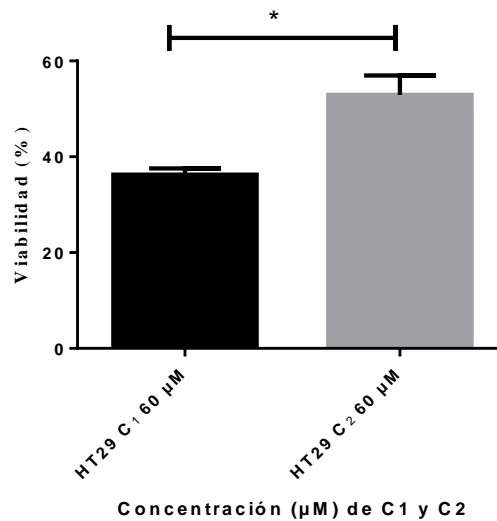


**Figura 13: Porcentaje de viabilidad celular de células NIH/3T3 frente al compuesto derivado de la curcumina C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub> y s+q:** Las células NIH/3T3 fueron expuestas a 60  $\mu\text{M}$  del compuesto derivado de la curcumina C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub> y s+q, por 24 horas. Los valores 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, siendo estadísticamente significativo a 60  $\mu\text{M}$  los tres compuestos (\*\* $p \leq 0,01$ ).



**Figura 14: Comparación de viabilidad celular entre NIH/3T3 y HT29 a concentración 60 μM de los compuestos C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub> y s+q.** Al comparar el modelo celular no tumoral NIH/3T3 con las células tumorales de cáncer colon-rectal, se observó que existe diferencia significativa en los compuestos C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> (\*p≤0,05).

El compuesto C<sub>1</sub> es curcumina sin ninguna modificación en su estructura, por lo cual es el control positivo, como muestran los resultados (figura 14) el compuesto C<sub>2</sub> es el único que presentó una disminución significativa en la viabilidad celular de la línea de cáncer de colon HT29, en comparación a la línea de fibroblastos NIH/3T3.



**Figura 15: Comparación de viabilidad celular entre curcumina C<sub>1</sub> y compuesto derivado C<sub>2</sub> en células HT29 a concentración 60 μM. C<sub>1</sub> es el control positivo, el cual es curcumina sin ninguna modificación, al comparar la viabilidad celular del compuesto C<sub>2</sub>, presentó una diferencia significativa (\*p≤0,05) en células HT29.**



## 7. DISCUSIÓN

A los compuestos derivados de la CUR se le realizaron modificaciones químicas, con la finalidad de mejorar la absorción de este compuesto y por lo tanto, su efectividad antitumoral, sin embargo, dado que la curcumina es altamente lipófila, su solubilidad en agua es muy baja, aproximadamente a 11 mg / ml. En su mayor parte, la curcumina no se absorbe en el cuerpo cuando se ingiere, lo que por lo tanto plantea un problema importante para su aplicación clínica (21).

Una vez que se absorben en el cuerpo, los polifenoles se conjugan principalmente con ácido glucurónico o ácido sulfúrico en el hígado, y algunos se excretan en el duodeno con bilis y otros se liberan en la sangre. Se cree que los metabolitos excretados en el duodeno podrían ser hidrolizados de nuevo al compuesto original mediante hidrolasas, incluida la  $\beta$ -glucuronidasa, y luego reabsorberse a través del tracto intestinal y devolverse al hígado a través de la vena porta a través de la circulación enterohepática (22).

Las pruebas de viabilidad celular que se realizan sobre compuestos derivados de la curcumina, rondan concentraciones entre 5  $\mu$ M a los 60  $\mu$ M, dependiendo de la naturaleza y la modificación química que sufrió el compuesto. De esta manera se probó el efecto en la viabilidad celular de la línea tumoral HT29, teniendo como modelo no tumoral a la línea celular NIH/3T3 (23-26).

Al utilizar el compuesto C<sub>1</sub> como control positivo, que es curcumina sin modificaciones (figura 5), a concentraciones 5, 10, 20 y 60  $\mu$ M en células de la línea HT29 (figura 6), se obtuvo que la diferencia en la viabilidad celular solo fue significativa en la concentración

más alta (\*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ), lo cual refiere que la viabilidad de la línea HT29 se vio disminuida significativamente a esta concentración (60  $\mu\text{M}$ ), en el caso del modelo no tumoral NIH/3T3 al probar las concentraciones 5, 10, 20 y 60  $\mu\text{M}$  no presentó una diferencia significativa de la viabilidad celular en comparación a su control correspondiente (figura 11). Al comparar la viabilidad celular de las dos líneas NIH/3T3 y HT29 que fueron tratadas con el compuesto  $C_1$  a concentración 60  $\mu\text{M}$  (figura 14), se determinó que la diferencia en esta es estadísticamente significativa ( $*p \leq 0,05$ ). En síntesis de estos resultados, el compuesto  $C_1$  disminuyó la viabilidad celular de la línea HT29 a concentración 60  $\mu\text{M}$ , además este no presentó actividad citotóxica significativa sobre la línea no tumoral NIH/3T3 en las mismas condiciones, siendo la disminución de la viabilidad en HT29 significativa ( $*p \leq 0,05$ ) en comparación a NIH/3T3.

El compuesto curcumina  $C_1$  presenta tres radicales hidroxilos (figura 5), los cuales le confieren una solubilidad en solventes polares como el agua, la curcumina, de composición química  $C_{21}H_{20}O_6$ , es un estilbenoide, un diarilheptanoide derivado de la ruta de Shikimato /Acetato-malonato. A pesar de la eficacia de la curcumina contra una amplia gama de enfermedades, su aplicación clínica está limitada debido a algunos problemas que incluyen una baja solubilidad acuosa (27).

En el compuesto  $C_2$  se probó a concentraciones de 5, 10, 20 y 60  $\mu\text{M}$  en células de la línea HT29 (figura 7), se obtuvo que la diferencia en la viabilidad celular solo fue significativa en la concentración más alta (\*\*\* $p \leq 0,001$ ) lo cual refiere que la proliferación de la línea HT29 se vio disminuida significativamente a esta concentración (60  $\mu\text{M}$ ), en el caso del modelo no tumoral NIH/3T3 al probar las concentraciones 5, 10, 20 y 60  $\mu\text{M}$ , presentó una diferencia significativa ( $*p \leq 0,05$ ) de la viabilidad celular en comparación a su control (figura 12). Al comparar la viabilidad celular de las dos líneas NIH/3T3 y HT29 que fueron tratadas con el compuesto  $C_2$  a concentración 60  $\mu\text{M}$  (figura 14), se determinó que la diferencia en esta fue estadísticamente significativa ( $*p \leq 0,05$ ).

El compuesto C<sub>2</sub> presenta agregación de una cadena alquílica de dos carbonos (figura 5), la cual le confiere una mayor lipofilia, la curcumina es poco soluble en agua, su coeficiente de reparto en octanol/agua es de 3,3 aproximadamente, por lo que a pesar de la polaridad de la parte central de la molécula y los grupos adyacentes, la molécula es más lipófila, aunque no en su totalidad. Esta propiedad genera comportamientos específicos, así la curcumina puede interactuar con aminoácidos hidrófobos en los centros activos de las proteínas e interacción con membranas lipofílicas (28).

El compuesto C<sub>3</sub> se probó a concentraciones de 5, 10, 20 y 60 µM en células de la línea HT29 (figura 8), donde se obtuvo que a la concentración más alta 60 µM causó una disminución de la viabilidad celular la que fue significativa (\*\*p≤0,01), al usar el compuesto C<sub>3</sub> en la línea celular no tumoral NIH/3T3 a la concentración 60 µM (figura 13), esta presentó una diferencia significativa en la disminución de la viabilidad celular (\*\*p≤0,01) contra el control. En la comparación de la viabilidad celular entre las dos líneas HT29 y NIH/3T3 a la concentración de 60 µM, no presentó una diferencia significativa.

El compuesto C<sub>3</sub> presenta la modificación de la agregación de una cadena alquílica de tres carbonos (figura 5), la cual le confiere una mayor lipofilia, lo cual le permitiría su interacción con membranas lipófilas, en concreto con membranas de origen biológico. Varios estudios establecen que la curcumina se localiza, en membranas biológicas, en centros ricos en hidrocarburos (28).

El compuesto C<sub>5</sub> se probó a concentraciones de 5, 10, 20 y 60 µM en células de la línea HT29 (figura 9), obteniéndose una disminución de la viabilidad celular a la concentración de 60 µM (\*p≤0,05), al comprobar la actividad en la línea celular NIH/3T3 se obtuvo una disminución de la viabilidad celular (figura 13), la cual fue significativa (\*\*p≤0,01) a la

concentración 60  $\mu\text{M}$ . Al comparar las líneas células HT29 y NIH/3T3 al aplicar el compuesto C<sub>5</sub> a 60  $\mu\text{M}$ , se obtuvo que no existe diferencia significativa entre la viabilidad celular que presentaban.

El compuesto C<sub>5</sub> presenta la agregación de una cadena alquílica 5 carbonos (figura 5), la cual le confiere una mayor lipofilia, ya que se busca generar una molécula anfipática con mejores propiedades fisicoquímicas y biológicas que la curcumina, lo cual le confiera una mayor facilidad para interactuar con membranas biológicas, con centros ricos en hidrocarburos.

El compuesto s+q se probó a concentraciones de 5, 10, 20 y 60  $\mu\text{M}$  en células de la línea HT29 (figura 10), obteniéndose una disminución significativa (\* $p \leq 0,05$ ) de la viabilidad celular a la concentración de 60  $\mu\text{M}$ . Se utilizó la concentración que presentó significancia en la línea celular NIH/3T3 presentándose una disminución de la viabilidad celular (\*\* $p \leq 0,01$ ). Al comparar la disminución de la viabilidad de las dos líneas celulares se obtuvo que no existió diferencia significativa.

El compuesto s+q solo presentó la agregación de un anillo de benceno sin ninguna cadena alquílica (figura 5), en comparación con los compuestos C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> y C<sub>5</sub>, los cuales si se le agregó una cadena alquílica.

Los compuestos C<sub>1</sub> (control positivo) y C<sub>2</sub> son los que presentaron disminuciones significativas de la viabilidad celular en las células de la línea HT29, además de no presentar una disminución de la viabilidad celular de la línea NIH/3T3, lo cual se debe en el caso de C<sub>2</sub>, a la modificación de los radicales al conformar moléculas con características anfipáticas, que le debería permitir tener una mejor solubilidad en agua, pero al mismo

tiempo tener una buena afinidad por membranas biológicas lipófilas. C<sub>2</sub> disminuyó significativamente la viabilidad celular de NIH/3T3 pero en menor grado que en HT29, por lo cual su efecto citotóxico fue significativamente menor en fibroblastos (figura 14).

El compuesto C<sub>1</sub> que es curcumina sin modificación química, es el control positivo, la actividad citotóxica se comparó al compuesto C<sub>2</sub>, el cual presentó la mayor disminución de viabilidad celular en la línea HT29 (figura 15), la diferencia es significativa (\*p≤0,05) a favor del control positivo C<sub>1</sub>, lo cual nos indica que las modificaciones químicas que presenta el compuesto C<sub>2</sub> no le confieren mayor citotoxicidad hacia la línea HT29.

El uso de la curcumina como un compuesto biológico con propiedades antitumorales se ha probado en diferentes estudios han demostrado que la curcumina puede interferir con el ciclo de las células tumorales, suprimiendo así el crecimiento de las células cancerosas y previniendo la invasión y la metástasis (6, 15).

La CUR tiene la capacidad de inhibir la invasión y la metástasis de las células cancerosas a través de la regulación de la expresión de citoquinas inflamatorias, factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, enzimas, moléculas de adhesión, proteínas relacionadas con la apoptosis y proteínas del ciclo celular. La CUR modula la actividad de los oncogenes, los genes supresores de tumores, varios factores de transcripción y sus vías de señalización (29).

Estudios actuales han probado análogos de la curcumina, como agente anticancerígenos en la evaluación preclínica. El mecanismo que han presentado en las células de cáncer de colon, demuestra según los resultados que se dirige a las tioredoxina reductasa 1 (TrxR1) y aumenta los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) celulares, lo que resulta en la

activación de la vía de señalización de la MAPK JNK en células de cáncer de colon humano (30).

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) se generan y eliminan continuamente en los sistemas biológicos y desempeñan un papel importante en diversos procesos fisiológicos y patológicos. ROS podría actuar como una espada de doble filo. Un aumento moderado de ROS puede promover la proliferación y diferenciación celular. Sin embargo, cuando el aumento de ROS alcanza un cierto nivel (el umbral tóxico), puede abrumar la capacidad antioxidante de la célula y desencadenar el proceso de muerte celular. En condiciones fisiológicas, las células normales mantienen la homeostasis redox con un bajo nivel de ROS basales al controlar el equilibrio entre la generación de ROS y la eliminación. En las células cancerosas, el aumento en la generación de ROS debido a un metabolismo distorsionado y replicación exagerada puede desencadenar una respuesta de adaptación redox, llevando a un cambio de la dinámica redox con alta generación de ROS y eliminación para mantener los niveles de ROS por debajo del umbral tóxico. Como tales, es probable que las células cancerosas con mayor estrés oxidativo sean más sensibles a los agentes que aumentan la generación de ROS (31). Numerosos estudios han demostrado que una elevación de la producción de ROS puede conducir a la inhibición del crecimiento y la apoptosis de las células de cáncer de colon. Por lo tanto, la estimulación de ROS es una estrategia terapéutica potencial para el tratamiento del cáncer de colon (32).

## 8. CONCLUSIÓN

La curcumina es un compuesto fenólico natural extraído de la especia dietética de la cúrcuma. La seguridad, no toxicidad y tolerabilidad de la curcumina han sido bien establecidas por ensayos clínicos. Se ha encontrado que la curcumina posee propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antiinflamatorias. Más importante aún, exhibe actividad anticancerígena contra una amplia variedad de cánceres humanos.

Aunque los efectos quimioterapéuticos del cáncer de la curcumina se han verificado en múltiples tipos de células cancerosas, su eficacia es muy limitada tanto en estudios preclínicos como clínicos. Esto puede atribuirse a su baja solubilidad en agua, metabolismo rápido y absorción ineficiente. Por lo tanto, es imperativo mejorar la biodisponibilidad y la acumulación intracelular de curcumina in vivo. Se podrían aplicar varios enfoques para superar estas limitaciones. La utilización de adyuvantes como piperina, análogos estructurales y el desarrollo de vehículos de administración.

Al evaluar la actividad citotóxica que presentan los compuestos derivados de la curcumina, se determinó que el compuesto C<sub>2</sub> presentó una disminución de la viabilidad celular de la línea celular tumoral HT29, mientras que en la línea no tumoral no fue una disminución tan significativa, pero al comparar con el control positivo curcumina C<sub>1</sub> evidencio que las modificaciones químicas no le confirieron mayor citotoxicidad hacia la línea HT29. Los compuestos C3, C5 y s+q presentaron una actividad citotóxica no selectiva

contra células HT29 y NIH/3T3, por lo cual no es prometedor realizar estudios posteriores a estos tres compuestos.



## 9. BIBIOGRAFÍA

1. Rojas AER. Cáncer de colón y dieta. *Revista Colombiana de Cancerología*. 2015;19(4):191-2.
2. Lynch D, Murphy A. The emerging role of immunotherapy in colorectal cancer. *Annals of translational medicine*. 2016;4(16):305-.
3. Basile V, Ferrari E, Lazzari S, Belluti S, Pignedoli F, Imbriano C. Curcumin derivatives: Molecular basis of their anti-cancer activity. *Biochemical Pharmacology*. 2009;78(10):1305-15.
4. Nwachukwu ID, Devassy JG, Jones PJH. Curcumin and cancer: barriers to obtaining a health claim. *Nutrition Reviews*. 2015;73(3):155-65.
5. Wong KE, Ngai SC, Chan K-G, Lee L-H, Goh B-H, Chuah L-H. Curcumin Nanoformulations for Colorectal Cancer: A Review. *Frontiers in pharmacology*. 2019;10:152-.
6. Sandur SK, Pandey MK, Sung B, Ahn KS, Murakami A, Sethi G, et al. Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism. *Carcinogenesis*. 2007;28(8):1765-73.
7. Grynkiewicz G, Slifirski P. Curcumin and curcuminoids in quest for medicinal status. *Acta Biochim Pol*. 2012;59(2):201-12.
8. Priyadarsini IK. The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent. *Molecules*. 2014;19(12).

9. Naksuriya O, Okonogi S, Schiffelers RM, Hennink WE. Curcumin nanoformulations: a review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment. *Biomaterials*. 2014;35(10):3365-83.
10. Asai A, Miyazawa T. Occurrence of orally administered curcuminoid as glucuronide and glucuronide/sulfate conjugates in rat plasma. *Life Sciences*. 2000;67(23):2785-93.
11. Hongyu Z, Christopher SBaSH. The Targets of Curcumin. *Current Drug Targets*. 2011;12(3):332-47.
12. Sa G, Das T. Anti cancer effects of curcumin: cycle of life and death. *Cell Division*. 2008;3(1):14.
13. Casares C, Ramírez-Camacho R, Trinidad A, Roldán A, Jorge E, García-Berrocal JR. Reactive oxygen species in apoptosis induced by cisplatin: review of physiopathological mechanisms in animal models. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2012;269(12):2455-9.
14. Hail N. Mitochondrial reactive oxygen species affect sensitivity to curcumin-induced apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*. 2008;44(7):1382-93.
15. Agarwal A, Kasinathan A, Ganesan R, Balasubramanian A, Bhaskaran J, Suresh S, et al. Curcumin induces apoptosis and cell cycle arrest via the activation of reactive oxygen species-independent mitochondrial apoptotic pathway in Smad4 and p53 mutated colon adenocarcinoma HT29 cells. *Nutrition Research*. 2018;51:67-81.
16. Chen TR, Drabkowski D, Hay RJ, Macy M, Peterson W, Jr. WiDr is a derivative of another colon adenocarcinoma cell line, HT-29. *Cancer Genet Cytogenet*. 1987;27(1):125-34.

17. Jainchill JL, Aaronson SA, Todaro GJ. Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J Virol.* 1969;4(5):549-53.
18. Di Martino RMC, De Simone A, Andrisano V, Bisignano P, Bisi A, Gobbi S, et al. Versatility of the Curcumin Scaffold: Discovery of Potent and Balanced Dual BACE-1 and GSK-3 beta Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2016;59(2):531-44.
19. Pabon H. A synthesis of curcumin and related compounds. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas.* 1964;83(4):379-86.
20. Forero Doria O, Castro R, Gutierrez M, Gonzalez Valenzuela D, Santos L, Ramirez D, et al. Novel alkyimidazolium ionic liquids as an antibacterial alternative to pathogens of the skin and soft tissue infections. *Molecules.* 2018;23(9):2354.
21. Ozawa H, Imaizumi A, Sumi Y, Hashimoto T, Kanai M, Makino Y, et al. Curcumin  $\beta$ -D-Glucuronide Plays an Important Role to Keep High Levels of Free-Form Curcumin in the Blood. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* 2017;40(9):1515-24.
22. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004;79(5):727-47.
23. Belluti S, Orteca G, Semeghini V, Rigillo G, Parenti F, Ferrari E, et al. Potent Anti-Cancer Properties of Phthalimide-Based Curcumin Derivatives on Prostate Tumor Cells. *International Journal of Molecular Sciences.* 2018;20(1).
24. Khazaei Koohpar Z, Entezari M, Movafagh A, Hashemi M. Anticancer Activity of Curcumin on Human Breast Adenocarcinoma: Role of Mcl-1 Gene. *Iranian journal of cancer prevention.* 2015;8(3):e2331-e.
25. Ebrahimifar M, Hasanzadegan Roudsari M, Kazemi SM, Ebrahimi Shahmabadi H, Kanaani L, Alavi SA, et al. Enhancing Effects of Curcumin on Cytotoxicity of Paclitaxel,

Methotrexate and Vincristine in Gastric Cancer Cells. *Asian Pacific journal of cancer prevention* : APJCP.18(1):65-8.

26. Song G, Mao YB, Cai QF, Yao LM, Ouyang GL, Bao SD. Curcumin induces human HT-29 colon adenocarcinoma cell apoptosis by activating p53 and regulating apoptosis-related protein expression. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2005;38:1791-8.
27. Shakeri A, Zirak MR, Wallace Hayes A, Reiter R, Karimi G. Curcumin and its analogues protect from endoplasmic reticulum stress: Mechanisms and pathways. *Pharmacological Research*. 2019;146:104335.
28. González-Albadalejo J, Sanz D, Claramunt R, Lavandera J-L, Alkorta I, Elguero J. Curcumin and curcuminoids: Chemistry, structural studies and biological properties 2015. 278-310 p.
29. Deng YI, Verron E, Rohanizadeh R. Molecular Mechanisms of Anti-metastatic Activity of Curcumin. *Anticancer Research*. 2016;36(11):5639-47.
30. Zhang T, Zheng P, Shen X, Shao R, Wang B, Shen H, et al. Curcuminoid WZ26, a TrxR1 inhibitor, effectively inhibits colon cancer cell growth and enhances cisplatin-induced cell death through the induction of ROS. *Free Radical Biology and Medicine*. 2019;141:93-102.
31. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nature Reviews Drug Discovery*. 2009;8:579.
32. Jeong S, Yun HK, Jeong YA, Jo MJ, Kang SH, Kim JL, et al. Cannabidiol-induced apoptosis is mediated by activation of Noxa in human colorectal cancer cells. *Cancer Letters*. 2019;447:12-23.

