

## TESIS DOCTORALES

NUEVOS DERIVADOS CURCUMINOIDES:  
SÍNTESIS, PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS  
Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Entre los denominados productos naturales, la curcumina, el principal polifenol encontrado en la cúrcuma (Figura 1), destaca por su potencial terapéutico debido a la diversidad de moléculas diana sobre las que puede actuar en diferentes patologías [1,2]. Sin embargo, por su baja biodisponibilidad presenta limitaciones en cuanto a sus propiedades ideales para ser considerada un fármaco por lo que es necesario diseñar y desarrollar nuevos quimiotipos similares a ella, pero con funcionalidad estructural diferente, que sean más atractivos desde el punto de vista de las propiedades *drug-like*.

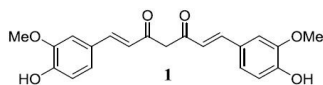


Figura 1. *Curcuma longa* (izquierda) y *curcumina* (derecha).

En la tesis doctoral realizada en el Grupo de Sistemas Supramoleculares Bioorgánicos del Departamento de Química Orgánica y Bio-Orgánica de la Facultad de Ciencias de la UNED, gracias a la concesión de la ayuda para la Formación de Personal Investigador adscrito a Grupos de Investigación de la UNED y a la financiación económica de los proyectos MINECO-CTQ2014-56833-R y MICINN-CTQ2010-1612, se muestran los resultados obtenidos de la síntesis, estudio estructural y propiedades biológicas de análogos curcuminoides, que han dado lugar a varias publicaciones [3-10].

Se sintetizaron un total de 45 análogos curcuminoides de los cuales 31 fueron preparados por primera vez: ocho  $\beta$ -dicetonas hemicurcuminoides, once pirazoles

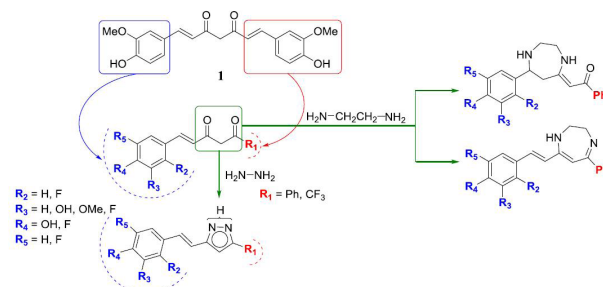


Figura 2. Esquema sintético empleado en la síntesis de análogos curcuminoides.

hemicurcuminoides y doce 1,4-diazepinas hemicurcuminoides (Figura 2). La síntesis de las  $\beta$ -dicetonas, se llevó a cabo, a partir de los correspondientes aldehídos, según el método descrito por Pabon [11]. Como dicetonas de partida se emplearon benzoiacetona o 1,1,1-trifluoropentano-2,4-diona, dando lugar a dos nuevas series: una de  $\beta$ -dicetonas hemicurcuminoides fenil sustituidas y otra serie de  $\beta$ -dicetonas hemicurcuminoides trifluorometil sustituidas. A partir de dichas dicetonas se sintetizaron los correspondientes pirazoles por reacción de éstas con hidrazina en ácido acético; y dos series de 1,4-diazepinas en función de que la reacción de las dicetonas con etilendiamina se realizase en etanol o en ácido acético.

El estudio estructural, de los compuestos sintetizados se llevó a cabo mediante RMN multinuclear ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ) en disolución y en estado sólido, y difracción de rayos X. En todos los casos se observó un gran acuerdo entre los datos experimentales y los obtenidos mediante cálculos teóricos DFT, pudiéndose determinar la forma tautomérica en la que se encuentran los distintos compuestos (Figura 3).

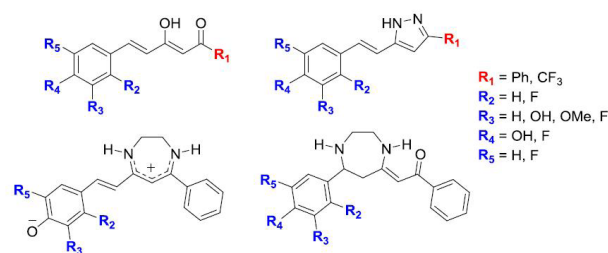


Figura 3. Formas tautoméricas predominantes de los análogos curcuminoides sintetizados.

## CARÁCTER ANTIOXIDANTE Y NEUROPROTECTOR

El estudio del potencial antioxidante y neuroprotector de las  $\beta$ -dicetonas hemicurcuminoides se llevó a cabo mediante tres ensayos antioxidantes diferentes (FRAP, ABTS y DPPH) y mediante estudios *in vitro* en la línea celular neuronal SH-SY5. Los compuestos **27** y **54** mostraron los mejores resultados en cuanto a su capacidad neuroprotectora, si bien **54** presenta un mejor comportamiento a mayor concentración de agente oxidante (Figura 4).

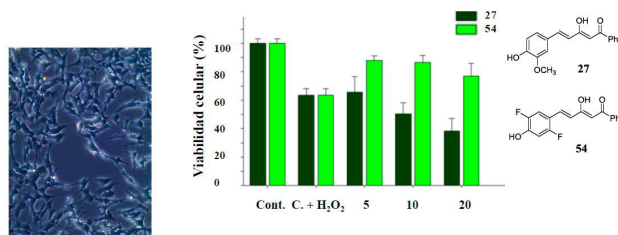


Figura 4. Porcentaje de viabilidad celular (células SH-SY5Y, izquierda) frente a la concentración de tratamiento antioxidante **27** o **54** ( $\mu\text{M}$ ), en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$   $200 \mu\text{M}$  (derecha).

## PROPIEDADES ANTIINFLAMATORIAS Y ANTICARCINOGENICAS

Las propiedades antiinflamatorias y anticarcinogénicas de los pirazoles hemicurcuminoides sintetizados fueron estudiadas mediante la determinación de la capacidad inhibidora de la actividad de la sintasa del óxido nítrico (NOS) y la determinación de la capacidad inhibidora de la expresión de los genes *hTERT* y *c-Myc* relacionados con la telomerasa.

### Capacidad inhibidora de la actividad de la sintasa del óxido nítrico (NOS)

El  $\text{NO}^\bullet$  se produce en los organismos vivos a partir del aminoácido L-arginina y oxígeno molecular, en una reacción catalizada por una familia de isoenzimas denominadas sintasas del óxido nítrico (NOS) de las que tradicionalmente se han diferenciado tres isoformas [12]. Las isoformas constitutivas se encontraron en las células del endotelio (eNOS) y en determinadas poblaciones de neuronas (nNOS), mientras que la encontrada en macrófagos solo es expresada una vez ha sido inducida por determinados agentes; de ahí que se la denominara inducible (iNOS) [13].

Si bien es cierto que los tratamientos con sustancias generadoras de NOS *in vivo* se emplean el tratamiento

de distintas cardiopatías, muchos de los efectos más desastrosos se producen cuando la generación de  $\text{NO}^\bullet$  es excesiva [14]. Por todo ello, la inhibición selectiva de las distintas isoformas de la NOS es un objetivo terapéutico primordial. Sin embargo, esta selectividad no es fácil de conseguir debido principalmente al alto grado de conservación que existe en la estructura cuaternaria del dímero así como en el centro activo.

Entre los compuestos estudiados los pirazoles de la serie fenil sustituida presentaron mayor inhibición que los pirazoles trifluorometil sustituidos, destacando entre todos ellos el pirazol hemicurcuminode fluorado **65** siendo un excelente inhibidor selectivo de iNOS (Figura 5).

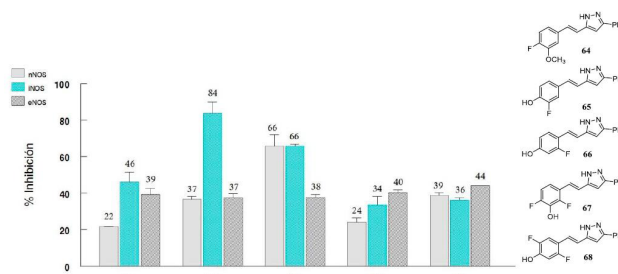


Figura 5. Porcentaje de inhibición de la actividad de nNOS, iNOS y eNOS en presencia de los pirazoles hemicurcuminoides **64-68** ( $50 \mu\text{M}$  en DMSO) comparados con el control (0% de inhibición).

### Citotoxicidad

La citotoxicidad de los pirazoles curcuminoides y de curcumina se determinó frente a tres líneas celulares tumorales (HT-29, MCF-7 y HeLa) y una no tumoral (HEK-293). Los compuestos más activos son **32** y **70** (Figura 6), que poseen alta citotoxicidad frente a todas las líneas celulares tumorales estudiadas.

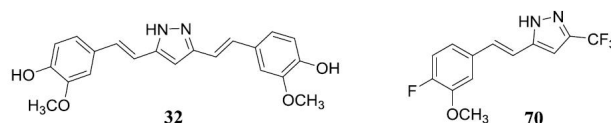


Figura 6. Compuestos que muestran alta citotoxicidad ante las líneas celulares tumorales estudiadas.

### Capacidad de inhibición la expresión de los genes *hTERT* y *c-Myc*

La telomerasa es una enzima que impide que las células envejecan, provocando el alargamiento telomérico. En células somáticas la telomerasa se encuentra en niveles muy bajos, por lo que no es capaz de alargar los telómeros, debido a ello la mayoría de las células humanas

tienen un tiempo de vida de tan solo unas 100 divisiones [15]. Sin embargo, alrededor del 90% de los tumores malignos presentan actividad telomerasa [16], la cual va agregando nucleótidos en cada ciclo celular lo que permite la regeneración de los telómeros y dota de inmortalidad a las células tumorales. La parte proteica hTERT únicamente se encuentra expresada en las células tumorales, por lo que la regulación transcripcional de la expresión génica de *hTERT* representa, según diversos es-

tudios, la etapa limitante en el proceso de activación de la telomerasa [17,18]. Existen una serie de factores transcripcionales que participan en la expresión génica de *hTERT*, entre los que se encuentra el protooncogen *c-Myc*. Varios estudios sugieren que *c-Myc*, sobreexpresado en multitud de tumores humanos, activa a la telomerasa induciendo expresión de *hTERT* [19], provocando consecuentemente la inmortalidad de las células tumorales.

Con el fin de determinar la capacidad de inhibición la expresión de los genes *hTERT* y *c-Myc* de los pirazoles curcuminoides sintetizados, se realizó un análisis de PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR, del inglés *reverse transcription polymerase chain reaction*) empleando células tumorales HeLa, obteniéndose los mejores resultados para los compuestos 32, 69 y 74 al ser capaces de reducir simultáneamente la expresión de ambos genes (Figura 7).

En base a los resultados obtenidos, se abre una nueva vía para un estudio más profundo de la actividad biológica de estos compuestos, así como para la síntesis de nuevos candidatos.

## REFERENCIAS

- [1] Esatbeyoglu T, Huebbe P, Ernst I, Chin D, Wagner AE, Rimbach G (2012). Curcumin, from molecule to biological function. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 51, 5308–5332.
- [2] González-Albadalejo J, Sanz D, Claramunt RM, Lavandera JL, Alkorta I, Elguero J (2015). Curcumina y curcuminoides: química, estudios estructurales y propiedades biológicas. *Anales de la Real Academia de Farmacia* 81, 278–310.
- [3] Nieto CI, Cabildo MP, Cornago MP, Sanz D, Claramunt RM, Torralba MC, Torres MR, Elguero J, García JA, López A, Acuña-Castroviejo D (2015). Fluorination Effects on NOS Inhibitory Activity of Pyrazoles Related to Curcumin. *Molecules* 20, 15643–15665.
- [4] Nieto CI, Cabildo MP, Cornago MP, Sanz D, Claramunt RM, Alkorta I, Elguero J, García JA, Lopez A, Acuña-Castroviejo D (2015). Synthesis, structure and biological activity of 3(5)-trifluoromethyl-1H-pyrazoles derived from hemicurcuminoids. *Journal of Molecular Structure* 1100, 518–529.
- [5] Sanz D, Nieto C, Claramunt RM, Alkorta I, Elguero J (2015). A multinuclear magnetic resonance study

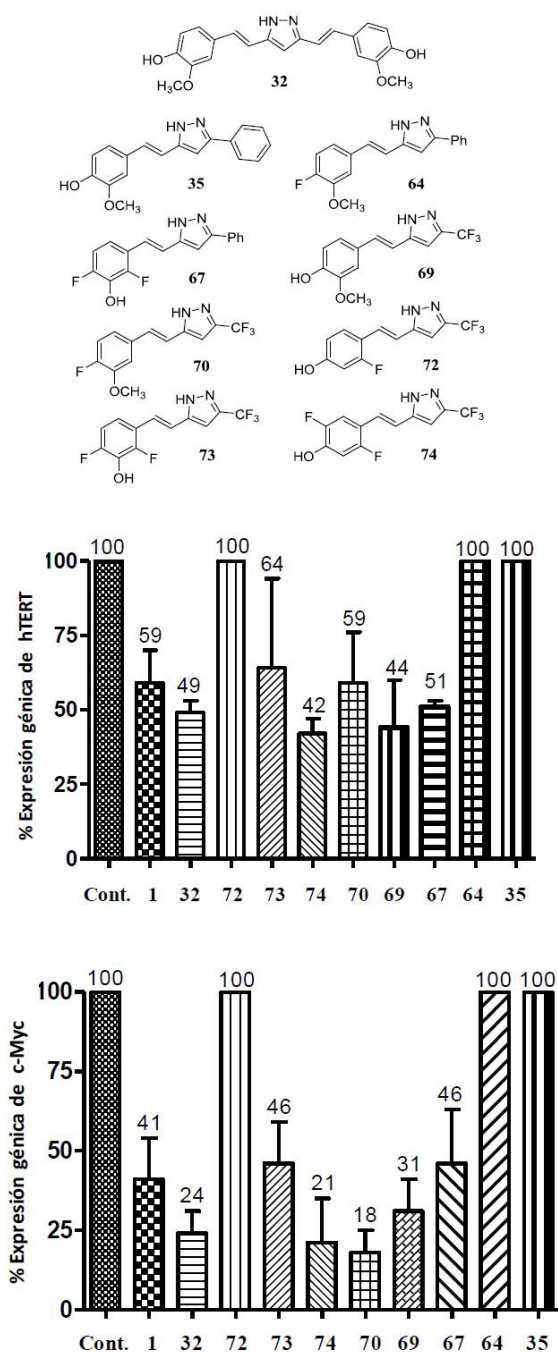


Figura 7. Porcentaje de expresión de los genes *hTERT* y *c-Myc* en células HeLa. La concentración de todos los compuestos es de 10  $\mu$ M excepto 1  $\mu$ M para 32 y 2  $\mu$ M para 35.

- of fluoro derivatives of hydroxybenzaldehydes. *Magnetic resonance in chemistry* 53, 624–631.
- [6] Nieto CI, Cabildo P, Claramunt RM, Cornago P, Sanz D, Torralba MC, Torres MR, Ferraro MB, Alkorta I, Marín-Luna M (2016). The structure of  $\beta$ -diketones related to curcumin determined by X-ray crystallography, NMR (solution and solid state) and theoretical calculations. *Structural Chemistry* 27, 705–730.
- [7] Martí-Centelles R, Falomir E, Carda M, Nieto CI, Cornago MP, Claramunt RM (2016). Effects of Curcuminoid Pyrazoles on Cancer Cells and on the Expression of Telomerase Related Genes. *Archiv der Pharmazie* 349, 532–538.
- [8] Claramunt RM, Nieto CI, Sanz D, Elguero J (2016). Curcumin derived pyrazoles and related compounds. *Afinidad* 576, 259–268.
- [9] Nieto CI, Andrade A, Sanz D, Claramunt RM, Torralba MC, Torres MR, Alkorta I, Elguero J (2017). Curcumin Related 1,4-Diazepines: Regioselective Synthesis, Structure Analysis, Tautomerism, NMR Spectroscopy, X-ray Crystallography, Density Functional Theory and GIAO Calculations. *ChemistrySelect* 2, 3732–3738.
- [10] Nieto CI, Sanz D, Claramunt RM, Torralba MC, Torres MR, Alkorta I, Elguero J (2018). Molecular structure in the solid state by X-ray crystallography and SSNMR and in solution by NMR of two 1,4-diazepines. *Journal of Molecular Structure* 1155, 205–214.
- [11] Pabon H (1964). A synthesis of curcumin and related compounds. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* 83, 379–386.
- [12] Förstermann U, Schmidt HH, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, Nakane M, Murad F (1991). Isoforms of nitric oxide synthase characterization and purification from different cell types. *Biochemical Pharmacology* 42, 1849–1857.
- [13] Lincoln J, Hoyle CH, Burnstock G (1997). Nitric oxide in health and disease. Biochemical Research Topics. Cambridge University Press, Cambridge.
- [14] Martin IN, Woodward JJ, Winter MB (2007). Design and synthesis of C5 methylated L-arginine analogues as active site probes for nitric oxide synthase. *Journal of the American Chemical Society* 129, 12563–12570.
- [15] Blasco MA (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature reviews. Genetics* 6, 611–622.
- [16] Shay JW, Cacchetti S (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *European journal of cancer* 33, 787–791.
- [17] Cong YS, Wen J, Bacchetti S (1999). The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Human molecular genetics* 8, 137–142.
- [18] Boldrini L, Faviana P, Gisfredi S, Zucconi Y, Di Quirico D, Donati V (2002). Evaluation of telomerase mRNA (hTERT) in colon cancer. *International Journal of Oncology* 21, 493–497.
- [19] Wang J, Xie LY, Allan S, Beach D, Hannon GJ (1998). Myc activates telomerase. *Genes & development* 12, 1769–1774.

Carla Isabel Nieto Gómez  
Dpto. de Química Orgánica y Bio-Orgánica