

## Evaluación Físicoquímica y estudio de citotoxicidad de casiopeína III-Ea un nuevo compuesto con actividad antineoplásica

Nancy Vara-Gama<sup>a\*</sup>, Rubio Carrasco Kenneth<sup>a</sup>, Mariano García Martínez<sup>c</sup>, Lena Ruiz-Azuara<sup>b\*</sup>, Ines Fuentes-Noriega<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Facultad de química de la UNAM, laboratorio 113, edificio E, exterior S/N, C.U., Coyoacán, 04510 Ciudad de México, México.

<sup>b</sup>Facultad de química de la UNAM, laboratorio 210 del edificio B, Exterior S/N, C.U., Coyoacán, 04510 Ciudad de México, México.

<sup>c</sup>UNIPREC, UNAM

\*email del autor: nvara83@yahoo.com.mx

**Palabras clave:** casiopeínaIII-Ea, citotoxicidad, antineoplásicos, línea celular MDCK.

### Introducción

Las casiopeínas son una familia de compuestos de coordinación de cobre (II) con fórmula general:  $Cu(N-N)(O-O)NO_3$  o  $Cu(N-N)(O-N)NO_3$ ; dichos compuestos fueron diseñados como una alternativa menos tóxica al Cis-Platino.<sup>1</sup> Dentro de la familia de casiopeínas con actividad antineoplásica se encuentra la casiopeína III-Ea, la cual es un complejo de cobre que muestra actividades, citotóxicas, genotóxicas y antineoplásicas tanto en modelos *in vitro* e *in vivo*.<sup>2,3</sup> Sin embargo, dentro de las casiopeínas se desconoce la citotoxicidad de la casiopeína III-Ea en líneas celulares sanas. Por otra parte para conocer cuál sería el comportamiento de la casiopeína III-Ea en medios fisiológicos, será necesario realizar la evaluación de pruebas físicoquímicas como: pKa, solubilidad intrínseca y LogD, las pruebas van a permitir entender de mejor forma el proceso ADME de la nueva molécula y conocer aspectos importantes para el diseño y formulación de una forma farmacéutica. Para determinar y cuantificar la casiopeína III-Ea en las diferentes pruebas físicoquímicas y de citotoxicidad se necesitaron metodologías precisas y confiables. Las metodologías analíticas por HPLC-UV y espectrofotometría se validaron tomando en cuenta algunas consideraciones y criterios de aceptación de guías nacionales para la Validación de Método Bioanalíticos, como la establecida por la NOM-177-SSA1-2013.<sup>4</sup>

### Metodología

Para la validación del método espectrofotométrico y por HPLC se realizó de acuerdo a criterios de la NOM-177. La determinación del pKa de la Casiopeína III-Ea por técnica espectrofotométrica requirió la preparación de soluciones amortiguadoras de fosfatos a diferentes valores de pH, se tomaron los valores de absorbancia a 273 nm y el pKa se calculó donde el compuesto se encuentra el 50 % en forma ionizada y 50 % en su forma no ionizada respectivamente,  $pH=pKa$ . El coeficiente de determinación para Casiopeína III-Ea en el sistema n-octanol-solución amortiguadora a diferentes pH se llevó a cabo por la técnica shake-flask.<sup>5</sup> La solubilidad intrínseca se determinó añadiendo cantidades de 10 a 1900 mg de Casiopeína III-Ea en matraces de 10 mL, las muestras se analizaron por espectrofotometría a 273 nm y para conocer la concentración de Casiopeína III-Ea, los resultados se interpolaron en una curva de calibración patrón en un método previamente validado y la solubilidad se determinó hasta donde se observó la poca solubilidad de la muestra. Para evaluar la citotoxicidad se utilizó el método colorimétrico de Sulforodamina B (SRB) en placas tipo ELISA. La placa se dividió en cuadrantes para probar las siguientes concentraciones logarítmicas ( $\mu M$ ) por sextuplicado cada una: 0.22, 2.24, 22.4, 224, 2240, 11000 para casiopeína III-Ea.

### Resultados y discusión

Para el método espectrofotométrico se obtuvieron los siguientes resultados: La linealidad (2.5 a 15  $\mu g/mL$ ) se obtuvo con curvas de calibración  $n=3$  réplicas en los diferentes pHs de prueba con un coeficiente de correlación promedio (R) mayor a 0.9990. Para la repetibilidad (día 1) se utilizaron curvas de calibración  $n=3$  réplicas a cada pH de prueba y para reproducibilidad (día 2) fueron  $n=3$  réplicas (3 réplicas por cada día) a cada diferente pH. Se obtuvieron CV% promedio por cada nivel de concentración menores al 3%, por tanto, la metodología cumple con criterios de aceptación. Para la metodología por HPLC en solución de Hank el método se consideró selectivo ya que no se

encontraron interferencias en el tiempo de retención para casiopeína III-Ea. Se obtuvo la linealidad del método ( $n=3$  réplicas) en un rango de 1.25 a 20  $\mu g/mL$  y una R promedio de 0.9971. Para la repetibilidad (día 1) y reproducibilidad (día 2) del método por HPLC se interpolaron en una curva de calibración por cada día de análisis los siguientes puntos control por sextuplicado 2(MCB), 8(MCM) y 15(MCA)  $\mu g/mL$ . Los resultados de precisión CV% (5.91 a 10.58) y exactitud Desv. Abs. (4.99 a 5.33) fueron menores al 15% por cada nivel de concentración, por lo tanto, el método analítico cumple con criterios de aceptación. Para la Casiopeína III-Ea se obtiene un pKa de 5.01, y se comportó como una base débil. Los resultados obtenidos para el coeficiente de distribución (Log D) a pH 6.8 (-0.44) y 7.4 (-0.33) muestran que la Casiopeína III-Ea es una molécula de características hidrofílicas (hidrosoluble). Al tratarse de una molécula de alta afinidad a medios acuosos, la solubilidad intrínseca resultó de 180 mg/ml a pH de 6.8 y 170 mg/ml a pH de 7.4. El estudio de citotoxicidad de la casiopeína III-Ea en la línea celular MDCK se obtuvo el valor de la  $IC_{50}=19.07 \mu M$ , los datos se ajustaron a una ecuación sigmoideal con un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0.97 utilizando el programa estadístico GraphPad prism.

### Conclusiones

Los resultados observados muestran que la Casiopeína III-Ea se trata de una molécula de características base débil con un pKa=5.01, una molécula hidrofílica con valores por debajo de uno lo cual sugiere que prefiere los medios acuosos y lo anterior se respalda con los valores de solubilidad que se obtuvieron constatando que se trata de una molécula de alta solubilidad acuosa. De acuerdo a la citotoxicidad para la casiopeína III-Ea podemos observar que en células MDCK (19.07  $\mu M$ ) se necesitan concentraciones más altas para poder inhibir la proliferación celular al 50% ( $IC_{50}=19.07 \mu M$ ) con respecto a líneas tumorales.

### Agradecimientos

Facultad de Química de la UNAM proyecto No. PAPIIT IN221118, Unidad de investigación preclínica de la UNAM UNIPREC, Bioterio, laboratorio 05 y 113 Facultad de Química, edificio de Farmacia conjunto E, ciudad universitaria.

### Referencias

- 1.- Gracia-Mora, L. Ruiz-Ramírez. C. Gómez-Ruiz, M. Tinoco-Méndez, A. Márquez-Quiones, L. Romero-De Lila, A. Marín-Hernández, L. Macías-Rosales, Ma. E. Bravo-Gómez, Knigh's Move in the Periodic Table, from Platinum to Copper. New Anticancer compounds, Casiopeinas, *in vitro* evaluation, *Met. Based Drugs*, 2001, Vol. 8 (1), 19-28.
- 2.- M. Vidal, E. Pimentel, M. P. Cruces, S. Hernández, and L. Ruiz-Azuara, Cytotoxic and genotoxic actions of Casiopeina III-Ea (Cas III-Ea) in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*, *J. Toxicol. Environ. part A*, 2017, Vol. 80(6), 365-373.
- 3.- Antonieta Chavez-Gonzalez, Sandra Centeno-Llanosa, Dafne Moreno-Lorenzana, Miguel Angel Sandoval-Esquivala, Socrates Aviles-Vazquez, María Elena Bravo-Gomez, Lena Ruiz-Azuara, Manuel Ayala-Sanchez, Hector Torres-Martinez, Hector Mayania, Casiopeina III-Ea, a copper-containing small molecule, inhibits the *in vitro* growth of primitive hematopoietic cells from chronic myeloid leukemia, *Leuk. Res.*, 2017, Vol. 52, 8-19.
- 4.- Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable y un medicamento biotecnológico es biocomparable.
- 5.- Krisztina Takács-Novfik and Alex Avdeef, Interlaboratory study of log P determination by shake-flask and potentiometric methods, *J. Pharmaceut. Biomed.*, 1996, Vol. 14, 1405- 1413.