ARTICULO

Evaluación *in vitro* de algunas actividades biológicas del complejo clotrimazol-oro(I)-trifenilfosfina en leucocitos humanos: una comparación con auranofina

Maribel Navarro[1], José L. Duque[2], Mait Velásquez[2], Ronald Reggio[2], Linmar Rodríguez[2], Germán Fraile[2].

[1]Laboratorio de Química Bioinorgánica, Centro de Química, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, IVIC, Caracas.

[2]Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Carabobo (BIOMED-UC), Facultad de Ciencias de la Salud-Sede Aragua, Maracay, Venezuela.

Correspondencia a: Germán Fraile

E-mail: gfraile@interlink.net.ve

RESUMEN

En este estudio se evaluaron las actividades *in vitro* de la droga antiartrítica auranofina (AF) y de un complejo de oro-clotrimazol [hexafluorofosfato de clotrimazol oro(I) trifenilfosfina, $Au(CTZ)(PPh_3)PF_6$; denominado CTZAu en lo sucesivo] sobre la viabilidad y función de leucocitos normales y leucémicos. Ambos complejos fueron comparados por sus efectos sobre: (a) La funcionalidad y apoptosis de neutrófilos (PMNs) en presencia o ausencia del factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-α), (b) la secreción de TNF-α por las células mononucleares activadas por lipopolisacárido (LPS) y (c) la viabilidad, proliferación, contenido de glutatión reducido (GSH) y encogimiento de las células Jurkat (una línea celular de linfocitos T). Aunque en la mayoría de los ensayos, AF demostró ser algo más activa que CTZAu, esas diferencias se relacionaron parcialmente con una mayor citotoxicidad de AF. Por otra parte, CTZAu provocó una elevación sostenida y dependiente de la dosis tanto del estallido respiratorio de los PMNs como de la síntesis del GSH en las células Jurkat. Se discutió acerca de las posibles consecuencias terapéuticas provenientes de esas diferencias. Se concluyó que el complejo CTZAu merece ser estudiado con mayor detalle debido a su posible potencial farmacológico para el tratamiento de enfermedades malignas o inflamatorias.

Palabras clave: oro, clotrimazol, leucocitos, auranofina, estallido respiratorio, apoptosis, encogimiento celular.

ABSTRACT

***In vitro* evaluation of some biological activities of the complex clotrimazole-gold(I)-triphenylphosphine in human leukocytes: A comparison with auranofin**

In this study, the *in vitro* activities of the anti-arthritic drug auranofin (AF) and a gold-clotrimazole complex [hexafluorophosphate triphenylphosphine clotrimazole gold(I), $Au(CTZ)(PPh_3)PF_6$; hereafter named CTZAu] on viability and function of normal and leukemic human leukocytes, were evaluated. Both complexes were assessed and compared for their effects on (a) functionality and apoptosis of neutrophils (PMNs) in the presence or absence of tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), (b) TNF-α secretion by lipopolysaccharide (LPS)-activated human mononuclear cells (MNLs) and (c) viability, proliferation, reduced glutathione (GSH) content and shrinkage of Jurkat T cells. Although AF proved to be somewhat more active than CTZAu in the majority of the assays, such differences were partially related to the greater cytotoxicity of AF. On the other hand, CTZAu elicited a more sustained dose-dependent elevation of both the neutrophil respiratory burst activity and the synthesis of GSH in Jurkat cells. The possible therapeutic consequences from these differences were discussed. It was concluded that CTZAu deserves further investigation as a drug with potential applications in treating malignant or inflammatory diseases.

Key words: gold, clotrimazole, leukocytes, auranofin, respiratory burst, apoptosis, cell shrinkage

INTRODUCCIÓN

Los compuestos de oro se han empleado tradicionalmente para el tratamiento de la artritis reumatoide y se clasifican en dos grupos: (a) los poliméricos e hidrofílicos tiolatos de oro(I), ejemplificados por el aurotiomalato de sodio y (b) los monoméricos y lipofílicos representados por auranofina (AF; 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-D-tiopiranosato-S-oro(I)-trietilfosfina) (1). Aunque sus efectos tóxicos han limitado su empleo, AF ha exhibido una eficacia terapéutica aceptable que probablemente se deba a sus propiedades inmunosupresoras. Sin embargo, estos compuestos también han sido evaluados en otras enfermedades tales como cáncer, sida y malaria en virtud del asombroso espectro farmacológico que ha exhibido el oro en sus estados de oxidación I y III (2). En particular, se ha sugerido que el potencial terapéutico de los complejos de oro(I) se manifiesta a través de su acción sobre diversos factores de transcripción, es decir, por su capacidad para inhibir las actividades transcripcionales de NF-κB (*Nuclear Factor kappa B*) y de AP-1 (*Activating Protein*-1) y mediante su capacidad para activar Nrf2 (*Nuclear factor-erythroid 2-related factor* 2) (3). Estos factores de transcripción se caracterizan por sus susceptibilidades de ser modulados por sustancias electrofílicas o pro-oxidantes, requisitos que pueden ser llenados por los complejos de oro en virtud de las elevadas afinidades del oro(I) por los importantes grupos sulfhidrilos (-SH) y seleniuros (-SeH) presentes en las células (4). En la búsqueda de nuevos agentes de interés terapéutico, esas propiedades han atraído la atención de varios laboratorios que han emprendido la síntesis de nuevos complejos de oro(I) relacionados con AF. Una de las estrategias básicas consiste en insertar al motivo oro-fosfina, moléculas orgánicas que por sí solas, tengan actividades antiinflamatorias (5) o antitumorales (6).

El clotrimazol (CTZ) es un ligando interesante para enlazarlo con átomos de oro(I) debido a las diversas propiedades terapéuticas que ha mostrado. En efecto, tomando en consideración que el clotrimazol (CTZ) es un agente antimicótico debido a su potente efecto inhibidor de la biosíntesis del

ergosterol, se sintetizó el complejo clotrimazol-oro(I)-trifenilfosfina (CTZAu) y se probó su actividad *in vitro* contra cultivos de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Los resultados fueron alentadores debido a que CTZAu exhibió una actividad inhibitoria del crecimiento del parásito significativamente mayor que la del clotrimazol solo (7). Además, al evaluar ese mismo complejo sobre el estallido respiratorio de los neutrófilos humanos aislados de sangre periférica, exhibió una potencia inhibitoria ~10 veces superior a la de CTZ solo (8). Otro aspecto interesante del CTZ es su capacidad de bloquear los canales de conductancia intermedia de potasio (K^+) activados por el calcio (Ca^{+2}) (IKCa1). En efecto, debido a esta propiedad, se ha demostrado que el CTZ (a) Inhibe el crecimiento de las células de cáncer endometrial (9); (b) inhibe la proliferación celular, el tamaño de los tumores y prolonga la supervivencia de ratas con gliomas intracraneales (10) y (c) exhibe algunos efectos antiartríticos (11).

Debido a los argumentos antes expuestos, en el presente trabajo se hizo un estudio preliminar de algunas actividades farmacológicas *in vitro* del complejo CTZAu en leucocitos humanos normales (neutrófilos y linfocitos) y en las células Jurkat (una línea de células T derivada de una leucemia linfoblástica aguda).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales. CTZAu fue sintetizado y caracterizado tal como se describió previamente (7). Auranofina fue donado generosamente por el Dr. C. Frank Shaw III, de la Universidad del estado de Illinois (USA). El factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-α) fue suministrado por Calbiochem (La Jolla, CA, USA), los kits colorimétricos CellTiter 96®, y CytoTox 96® fueron adquiridos de Promega (Promega Corporation, Madison WI, USA) y el kit EASIA para detección de TNF-α fue obtenido de Biosource (Biosource Europa SA, Nivelles, Bélgica). El resto de los reactivos fueron suministrados por Sigma (St Louis, USA) sin purificación adicional.

Células. La línea celular de linfocitos T leucémicos Jurkat (donada por el Centro de Medicina Experimental, IVIC, Venezuela) fue cultivada en medio RPMI 1640, suplementado con suero fetal bovino al 10% v/v y glutamina 1 mmol/L en atmósfera húmeda de CO_2 al 5% en aire y a 37 ºC. Después del consentimiento y la debida información, las muestras de sangre venosa fueron obtenidas de personas sanas por donación voluntaria. Las células mononucleares humanas fueron separadas mediante técnicas estándar de centrifugación por gradientes de Ficoll/Hypaque.

Activación y cebado del estallido respiratorio de neutrófilos en sangre completa, medidos mediante quimioluminiscencia. Se siguió un protocolo propuesto por Brown y cols., (12) con algunas modificaciones. La sangre completa anticoagulada con EDTA fue diluida 1:100 en PBS, pH 7,4 y pre-calentada a 37°C por 10 min. Una alícuota de 188 µL de esta sangre diluida, se trató con 10 µL de TNF-α en PBS (concentración final: 0,5 nmol/L) durante 15 min. Posteriormente, se añadieron 2 µL de AF o CTZAu (o de solvente dimetil sulfóxido, DMSO) para alcanzar concentraciones finales en el intervalo 1-10 µmol/L y se incubaron por otros 15 min. Finalmente, se añadieron 100 µL de

zimosan opsonizado (0,43 mg/mL) junto con 600 µL de luminol (1,5 mmol/L). La quimioluminiscencia (LCL) fue inmediatamente contada en un luminómetro Bio-Orbit 1251 (Labsystems Oy, Helsinki, Finland) a intervalos de 120 s durante 20 min. La intensidad de la emisión de luz se determinó (en milivoltios por segundo, mV.s) integrando el área bajo la curva de LCL versus tiempo.

Opsonización del zymosan. Zymosan fue hervido en solución isotónica de NaCl por 1 h, lavado tres veces y suspendido (3 mg/mL) en solución balanceada de Hanks (HBSS). La opsonización se llevó a cabo incubando 1 volumen de dicha suspensión con 1 volumen de suero humano fresco por 30 min a 37 °C con tres lavados posteriores con HBSS antes de dividirlo en alícuotas y conservarlo a -80 °C hasta su utilización (13).

Determinación de apoptosis en PMNs por citometría de flujo. Se usó un ensayo adaptado del protocolo propuesto por McNamee y cols. (14). Brevemente, la sangre venosa fue recogida en tubos *vacutainer* heparinizados (BD Biosciences, San Jose, CA) y luego diluida 1:10 con RPMI (concentración final de leucocitos: 0,5-1,0 x 10^6 células/mL) y fracciones de 1 mL fueron transferidas en placas de cultivo de 10 mm. A estas placas, tratadas durante 15 min con TNF-α (0,5 nmol/L), se les añadieron AF o CTZAu, en el intervalo 1-10 µmol/L y fueron incubadas a 37°C y 5% de CO_2 durante 24 h. Se removieron alícuotas de 1 mL desde cada pozo de cultivo para el análisis por citometría de flujo. Para medir la apoptosis de los PMNs, se añadió 1 mL de la sangre diluida a un tubo del citómetro y se centrifugó a 250 x g. Se removió el sobrenadante y se añadieron 1,5 mL de solución de lisis de NH_4Cl a cada tubo y se incubó a T ambiental por 15 min. Se centrifugaron las muestras por 6 min a 250 x g y se lavaron dos veces con 2 mL de buffer PBS. Las células fueron resuspendidas en 100 µL de buffer de unión de Annexina V (BD Biosciences, San Jose, CA) y fueron marcadas para la detección de las células apoptóticas mediante la adición de 5 µL de Annexina V-FITC (BD Biosciences, San Jose, CA). Inmediatamente antes del análisis en el citómetro (FACSCanto™, BD Biosciences, San Jose, CA), se añadieron 2 µL de ioduro de propidio (PI) (1 mg/mL) (BD Biosciences, San Jose, CA) a cada muestra. Los PMNs se identificaron por su patrón de dispersión de luz hacia adelante y lateral (forward-/side scatter).

Secreción de TNF-α por células mononucleares en respuesta a LPS. Las células mononucleares (MNLs) en la presencia de diferentes concentraciones de los complejos de oro, fueron cultivadas a 5 x 10^5 células/pozo en microplacas de fondo plano de 96 pozos por 18 h en atmósfera húmeda de CO_2 al 5% en aire y a 37 ºC empleando LPS (1 µg/mL) como estímulo. La concentración de TNF-α en los sobrenadantes se evaluó usando un kit de ELISA (Biosource-Europe S.A.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Bajo idénticas condiciones experimentales, la integridad de la membrana celular fue estimada en cultivos paralelos mediante la detección de liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) siguiendo las instrucciones del kit CytoTox 96® (Promega).

Citotoxicidad basada en el ensayo del MTT. Se preincubaron 90 µL de células Jurkat (1,11 x 10^6/mL) en una microplaca de 96 pozos de fondo plano con 10 µL de catalasa a diversas concentraciones. La microplaca se dejó en un

agitador orbital por 30 min. Luego, a cada pozo se agregó 1 µL del compuesto de oro a diferentes concentraciones (1-10 µmol/L) y se incubaron en atmósfera húmeda de CO_2 al 5% en aire y a 37 ºC por 24 h. Al finalizar la incubación, a cada pozo se añadieron 10 µL de 5 mg/mL de MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio] y se reincubó en las mismas condiciones del paso anterior por 4 h. Luego, los cristales de formazan obtenidos se disolvieron con la solución detergente de Triton X-100 al 10% v/v y HCl 0,1 mol/L en isopropanol y se midió la absorbancia en un fotómetro de placas (Multiskan Ascent, Labsystems) con filtro de 550 nm. La concentración de las células se calculó mediante una curva de calibración. Todos los tratamientos fueron realizados por triplicado.

Ensayo de proliferación celular. Las células Jurkat (3 x 10^5/mL) se preincubaron con los complejos de oro tal como se describió en el ensayo del MTT. Después de 24, 48 y 72 h, se obtuvieron los datos del número de células viables empleando el kit colorimétrico CellTiter 96® AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA) basado en el colorante MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio]. Se añadieron 20 µL de MTS y se incubó en atmósfera húmeda de CO_2 al 5% en aire y a 37 ºC por 4 h. Luego, las lecturas de las absorbancias fueron tomadas a 490 nm en el fotómetro de placas. En algunos ensayos, las adiciones de los complejos de oro se hicieron 24 h después de que las células fueron pre-tratadas con 1 mmol/L de butionina sulfoximina (BSO).

Determinación de Glutatión. El ensayo de glutatión (GSH) se realizó empleando una reacción de oxido-reducción con el ácido 5,5´-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) (15). Muestras de 0,25 mL de células Jurkat (1 x 10^7/mL) fueron añadidas a 0,25 mL de ácido sulfúrico 80 mmol/L, mezcladas y dejadas en reposo por un lapso de 10 min a temperatura ambiente. Luego, se añadió 0,1 mL de tungstato de sodio al 10% m/v y se agitó durante 10 min con vortex. Se centrifugó a 11000 rpm por 10 min en una microcentrífuga y se conservó el sobrenadante. En una microplaca de 96 pozos de fondo plano se colocaron por triplicado 100 µL de sobrenadante, 100 µL de Tris-HCL 1 mol/L (pH 8) y 75 µL de DTNB 8,4 mg/dL (agua/isopropanol = 1). Se midió la absorbancia a 405 nm a los 5 min. La cantidad de mmoles de GSH se obtuvo por comparación con una curva de calibración preparada en cada ensayo con patrones frescos de GSH de 0 a 6 nmol por pozo y por triplicado a cada concentración.

Determinación del encogimiento de las células Jurkat por citometría de flujo. Las células Jurkat (1 x 10^6/mL) se colocaron con los compuestos de oro en microplacas de 96 pozos de fondo plano: en cada pozo se colocaron 100 µL de células y 1 µL de compuesto de oro a diferentes concentraciones (0,1-10 µmol/L) y luego se incubó por 24 h a 37 ºC y 5% de CO_2. Se homogeneizaron las células en los mismos pozos y se centrifugaron 200 µL de las suspensiones a 2000 rpm por 5 min. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el sedimento de células con 200 µL de buffer PBS pH 7,4. El análisis se realizó haciendo incidir radiación de láser de argón a 488 nm sobre las células y midiendo la luz dispersada lateralmente y hacia delante (side/forward scatter) con el citómetro de flujo BD FACSCanto™ II (BD Biosciences). Se registraron 10.000 eventos y el perfil de dispersión de luz de las células se plasmó en un gráfico de puntos (*dot plot*) que permitió discriminar células viables y encogidas. La distribución

porcentual de las células viables y apoptóticas fue calculada por análisis estadístico de los gráficos de puntos con el programa BD FACSDiva versión 5.0. Cada tratamiento se realizó por duplicado.

Tratamiento estadístico de los resultados. Todos los valores fueron expresados como el promedio ± S.E.M de al menos 3 ensayos diferentes. Se empleó un análisis de varianza de una sola vía y una prueba de comparación de los promedios de las condiciones experimentales contra el control (Dunnett,). Alternativamente, para comparar promedios de dos muestras, se empleó la prueba t de Student. En todos los casos, se consideró significativo cuando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Para evaluar los efectos de los complejos de oro sobre la apoptosis y el estallido respiratorio de los PMNs, los ensayos se llevaron a cabo en muestras de sangre completa debido a: (a) Se dispone de un ambiente fisiológico que emula adecuadamente las situaciones encontradas *in vivo*; (b) se evitan los artefactos provenientes de los protocolos de purificación de las células y (c) se toma en consideración cualquier tipo de interacción con diversos agentes (en particular, la albúmina) que tienen afinidad por el oro(I). Además, se realizaron experimentos para determinar si esos complejos alteran los efectos muy notables que la citocina pro-inflamatoria TNF-α produce en los PMNs: Un potente cebado del estallido respiratorio (16) y una marcada desaceleración de la apoptosis espontánea (17). Por lo tanto, es esencial que los posibles efectos de cebado debidos al aislamiento de los PMNs sean evitados y a la par, se tome en consideración la modulación que los eritrocitos y otros leucocitos presentes en la sangre puedan ejercer sobre los efectos anti-apoptóticos de TNF-α.

Efectos sobre el estallido respiratorio de los PMNs.

a) En ausencia de TNF-α: Estos efectos se estudiaron mediante un protocolo basado en la quimioluminiscencia dependiente del luminol (LCL) empleando partículas fagocitables de zimosan opsonizado como estímulo activador. La figura 1A muestra que tanto AF como CTZAu, a la concentración de 1 µmol/L, exhiben un notable efecto estimulador de la LCL. En contraste, en el rango de 5-10 µmol/L, AF exhibió una potente inhibición mientras que CTZAu mantuvo su efecto estimulador (aunque tiende a declinar al aumentar la dosis).

b) En presencia de TNF-α: Los controles en la figuras 1A y 1B muestran que el pre-tratamiento de la sangre diluida con 0,5 nmol/L de TNF-α fue suficiente para inducir un incremento significativo en la señal de LCL desde 5.580 ± 610 mV.s, hasta 19.500 ± 1.100 mV.s ($P < 0,0001$; $N = 5$). El posterior tratamiento con 1 µmol/L de AF redujo significativamente esa capacidad cebadora de TNF-α, mientras que a 5-10 µmol/L, tal respuesta fue totalmente atenuada (fig. 1B). En contraste, de nuevo el efecto cebador de TNF-α no fue afectado por 1 µmol/L de CTZAu mientras que en el intervalo 5-10 µmol/L, CTZAu produjo sólo una moderada inhibición.

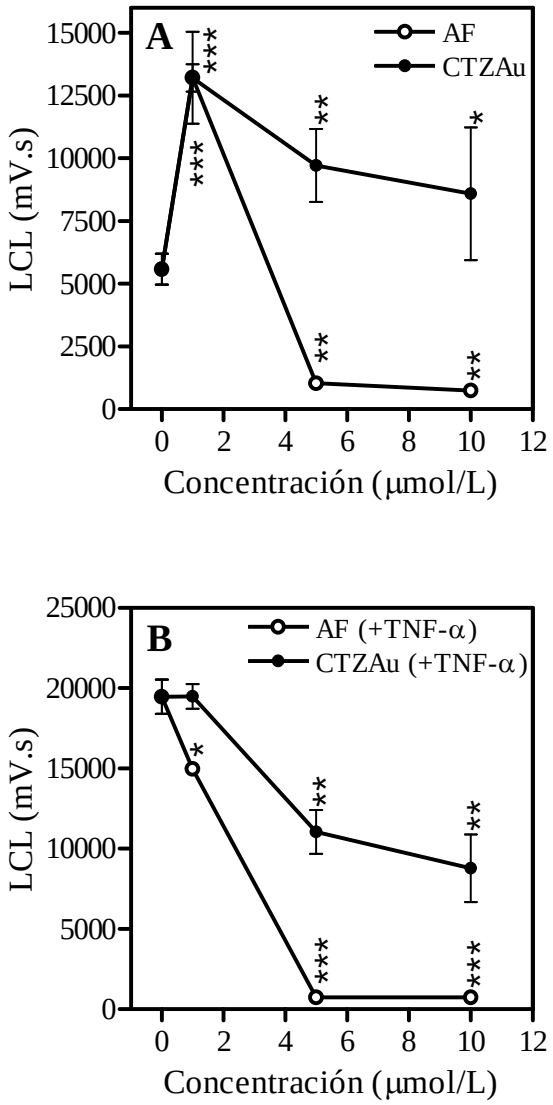

Fig 1. Efectos sobre la quimioluminiscencia dependiente del luminol (LCL). Se pre-incubó sangre completa diluida (1:100) en ausencia (A) o presencia (B) de TNF-α (5 nmol/L) durante 15 min seguidos por otros 15 min de incubación con AF o CTZAu a las concentraciones indicadas. Las células se activaron con zimosan opsonizado (0,43 mg/mL) en presencia de luminol. Los datos representan el promedio ± S.E.M de al menos cinco experimentos independientes. *$p < 0,05$; **$p < 0,01$ y ***$p < 0.001$ cuando se hizo la comparación con la muestra libre de compuesto de oro (prueba de Dunnett de dos colas)

Efectos sobre la apoptosis de los PMNs.

a) En ausencia de TNF-α: La fig. 2A revela que ambos complejos aceleran la apoptosis de los PMNs presentes en sangre completa. Sin embargo, a la concentración de 1 μmol/L solamente AF mostró efectos pro-apoptóticos significativos.

b) En presencia de TNF-α: Los controles de las figuras 2A y 2B revelan que la preincubación con TNF-α (0,5 nmol/L) disminuyó de modo significativo el porcentaje de apoptosis de los PMNs desde 38,4 ± 2,2 % hasta 20,3 ± 4,5 % (P < 0,01; N = 5). Por otra parte, los tratamientos posteriores con AF o CTZAu en el rango 1-10 µmol/L, condujeron a perfiles muy similares en las curvas de dosis-respuesta. Debe notarse que el efecto antiapoptótico de TNF-α fue revertido solamente a la mayor dosis ensayada (10 µmol/L) para ambos complejos (fig. 2B).

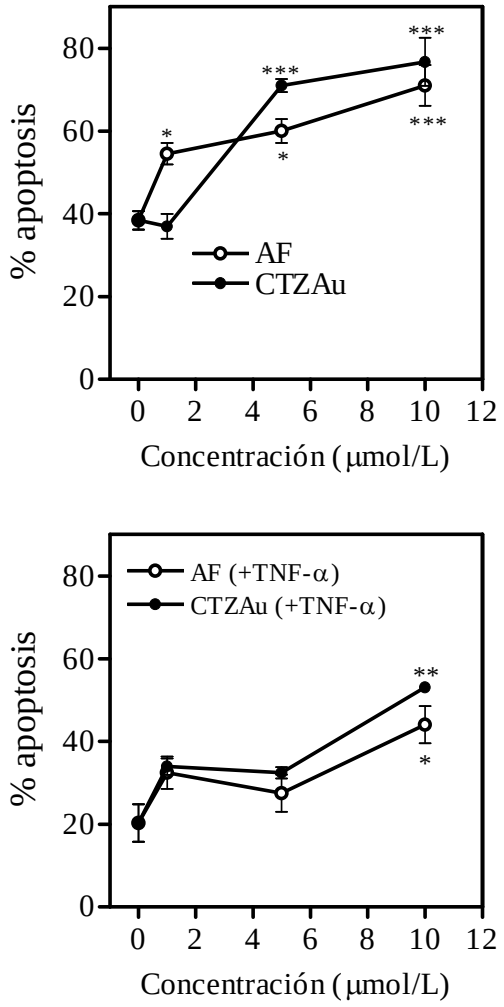

Fig. 2. Efectos de AF y CTZAu sobre la apoptosis de PMNs en sangre completa evaluados mediante citometría de flujo. Se pre-incubó la sangre completa diluida (1:10) en ausencia (A) o presencia (B) de TNF-α (0,5 nmol/L) durante 15 min. Después del tratamiento con AF o CTZAu a las concentraciones indicadas, las muestras fueron incubadas por 24 h a 37 °C y 5% CO_2. La apoptosis se determinó mediante la tinción con anexinaV-ioduro de propidio. Los datos representan el promedio ± S.E.M. de cinco experimentos separados. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$ and ***$p < 0.001$, cuando se hizo la comparación con la muestra libre de compuesto de oro (prueba de Dunnett de dos colas)

Efectos sobre la secreción de TNF-α por células mononucleares. El tratamiento de las MNLs con 0,1 µmol/L de AF, en contraste con CTZAu a la misma concentración, fue suficiente para inhibir, aunque moderadamente, la secreción de TNF-α inducida por LPS, mientras que en el rango de 1-10 µmol/L, ambos complejos atenuaron fuertemente tal secreción (fig. 3A). No obstante, en ese mismo intervalo los efectos inhibidores de AF deben ser parcialmente atribuidos a efectos tóxicos, tal como se observa en la fig. 3B. En resumen, estos resultados destacan que, en comparación con CTZAu, AF es un inhibidor más potente de la secreción de TNF-α, aunque su toxicidad es mayor.

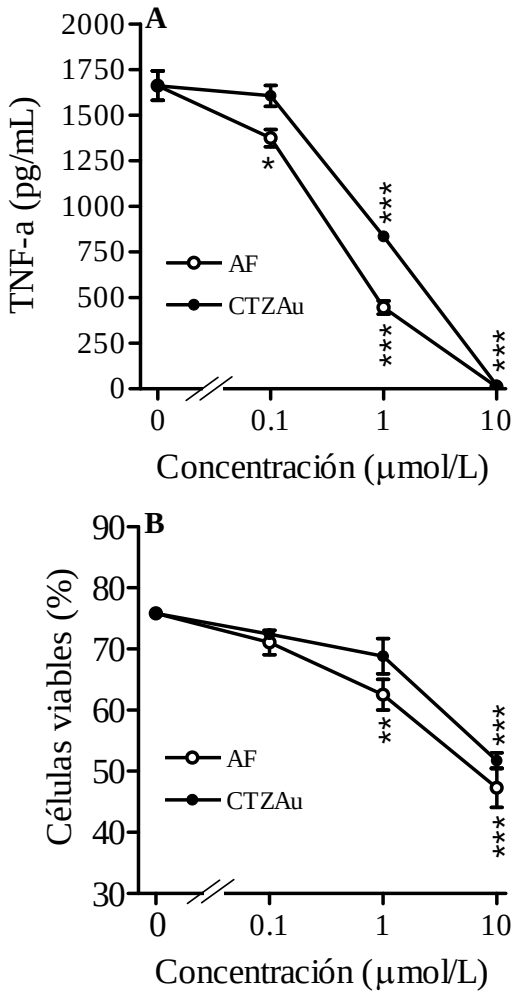

Fig 3. Efectos de AF y CTZAu sobre la secreción de TNF-α por células mononucleares humanas (MNLs). A: Las células (5 x 10^5/mL) se incubaron durante 1 h a 37°C y 5% de CO_2 con las concentraciones indicadas de AF o CTZAu. Luego, se activaron con LPS (1 mg/mL) y se incubaron durante 18 h. B: La viabilidad celular en presencia de LPS fue evaluada en pozos paralelos mediante un kit colorímétrico (Promega CytoTox 96®) que detecta la liberación de la lactato deshidrogenasa (LDH). *p < 0,05; **p < 0,01 y ***p < 0,001, cuando se compararon con la muestra libre de compuesto de oro (prueba de Dunnett de dos colas)

Efectos sobre la proliferación de las células Jurkat. Debido a que los complejos de oro(I) tienen alta afinidad por los grupos sulfhidrilo (-SH), es

probable que esos compuestos de oro se distribuyan entre los diferentes tioles de las moléculas proteicas y no proteicas *in vivo*. El tiol no proteico más abundante en las células es el glutatión (GSH). Por otra parte, la depleción del GSH intracelular evita la proliferación de los linfocitos T humanos estimulados por mitógenos (18). Por esas razones, estos ensayos se realizaron en ausencia y presencia de butionina sulfoximina (BSO), un inhibidor de la síntesis del GSH.

En un ensayo preliminar, cuando las células Jurkat se trataron durante 24 h con 1 µmol/L de BSO, el contenido de GSH disminuyó significativamente desde 74,9 ± 4,9 hasta 29,2 ± 1,0 nmol de GSH/10^7 células ($p<0,001$, N = 5). Los controles sin droga de la figura 4A y 4B muestran que en ausencia de BSO, el crecimiento espontáneo de las células Jurkat (una línea celular de linfocitos T) es sostenido, mientras que en presencia de 1 mmol/L de BSO, el crecimiento fue detenido sin afectar el número de células viables. La figura 4 también muestra que en ausencia de BSO, el tratamiento con AF o CTZAu a la concentración de 0,1 µmol/L no inhibe el crecimiento celular mientras que a esa misma dosis, ambas drogas sinergizan con BSO para inhibir el crecimiento de un modo significativo. En ambas situaciones, el tratamiento con los complejos a la concentración de 1 µM, se tradujo en un potente efecto inhibitorio.

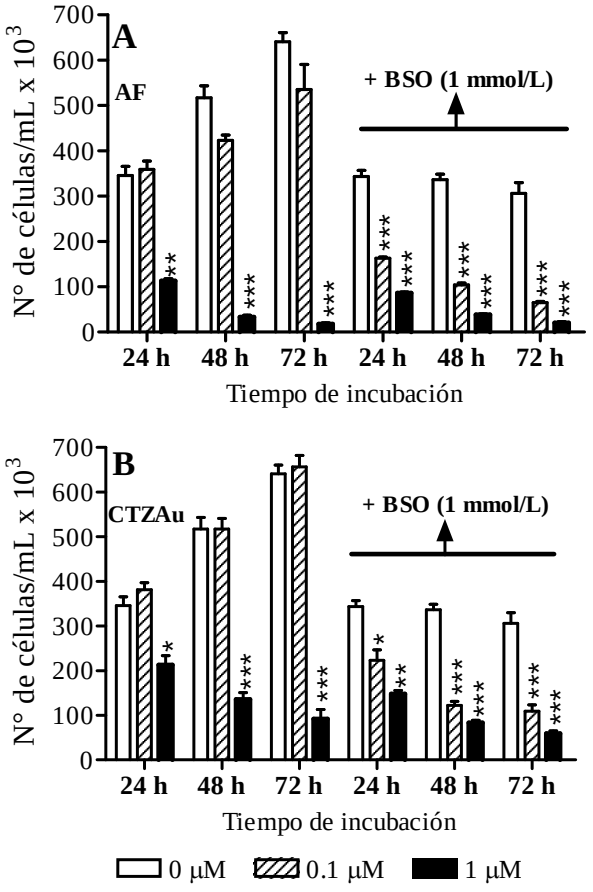

Fig 4. Efectos de AF (A) y CTZAu (B) sobre la proliferación de las células Jurkat. Las células (3 x 10^5/mL) fueron tratadas con las concentraciones indicadas de los complejos de oro al inicio del cultivo. Los datos se obtuvieron después de 24, 48 y 72 h, mediante un kit colorimétrico (CellTiter 96®, Promega). A la derecha de cada gráfico, se muestran los resultados provenientes de células pre-tratadas por 24 h con BSO (1 mmol/L). En tales ensayos, la adición de AF o CTZAu se hizo 24 h después del tratamiento con BSO. *p < 0,05; **p < 0,01 y ***p < 0,001 cuando se hizo la comparación con los controles respectivos (en ausencia o presencia de BSO, datos no apareados, prueba *t* de Student no pareada)

Efectos sobre el contenido del glutatión intracelular. Además de tener afinidad por los grupos tioles, existen algunas evidencias *in vitro* (25, 26) e *in vivo* (27) que sugieren que los complejos de oro pueden generar situaciones de estrés oxidativo. Bajo estas circunstancias, el contenido del GSH intracelular puede verse afectado. Los datos de la figura 5 indican que en células Jurkat tratadas durante 24 h, tanto AF como CTZAu en el rango 0,1-1 µmol/L, incrementan la concentración del GSH interno mientras que a dosis mayores (5-10 µmol/L) ambos complejos se diferencian notablemente. En efecto, el incremento en GSH se mantiene para 5 µmol/L de CTZAu mientras que con AF, a esa misma dosis se observó una declinación significativa. Estos datos sugieren que los incrementos observados en el contenido del GSH intracelular podrían ser consecuencia de un mecanismo de defensa de las células Jurkat ante estímulos pro-oxidantes.

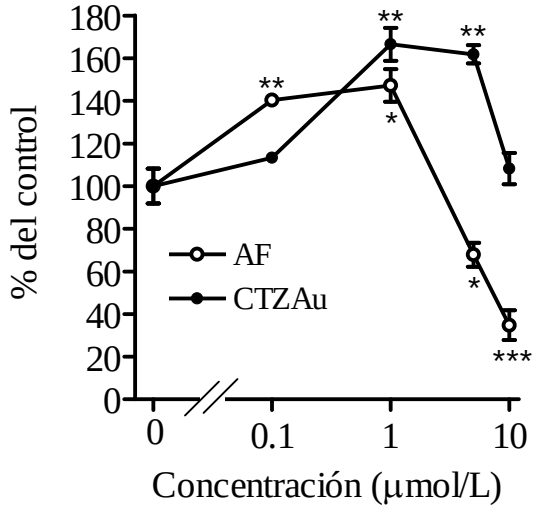

Fig 5. Efectos sobre el contenido de GSH intracelular. Las células Jurkat (1 x 10^7/mL) fueron incubadas con AF o CTZAu durante 24 h y la concentración del GSH intracelular se determinó mediante la técnica del DTNB. Los detalles son descritos en la sección de Materiales y Métodos. *p < 0,05; **p < 0,01 y ***p < 0,001, cuando se hizo la comparación con la muestra libre de compuesto de oro (prueba de Dunnett de dos colas)

Efectos de catalasa sobre la toxicidad de los complejos de oro en células Jurkat. El incremento en el contenido de GSH provocado por AF y CTZAu, sugiere que la incubación con esos complejos pudiera inducir la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). De ser así, la co-incubación de las células con catalasa, debería revertir los efectos tóxicos observados en la fig.

4. El panel superior de la fig. 6 revela que la co-incubación con 1.000 U/mL de catalasa, revierte parcialmente la toxicidad de AF (1 µmol/L) y de CTZAu (1-5 µmol/L).
En la presencia de 1 µmol/L de AF o CTZAu, el efecto protector de catalasa fue significativamente dependiente de la dosis de la enzima en el rango 100-10.000 U/mL, sugiriendo de nuevo que la toxicidad de los complejos de oro se debe, al menos en parte, a la generación de estrés oxidativo.

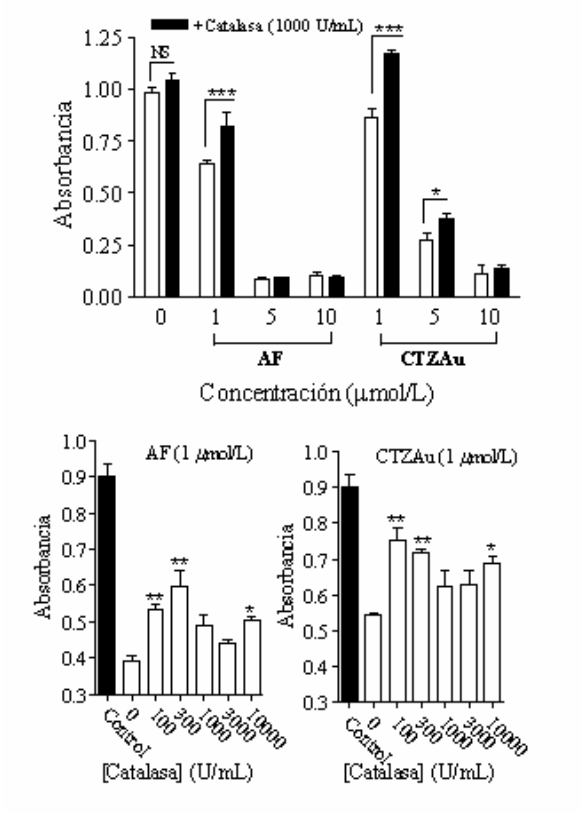

Fig 6. Efectos de catalasa sobre la toxicidad de AF y CTZAu en células Jurkat determinados con el ensayo del MTT. *Panel superior*: Las células Jurkat se incubaron por 24 h con AF o CTZAu en el rango 1-10 µmol/L en ausencia y presencia de 1000 U/mL de catalasa. *Panel inferior*: Células Jurkat tratadas con AF o CTZAu a una sola concentración (1 µmol/L), se incubaron en presencia de diferentes dosis de catalasa durante 24 h. La barra negra (control) se refiere a las células incubadas en ausencia tanto de catalasa como de los complejos de oro. Las absorbancias fueron medidas a 490 nm. En el panel superior se aplicó la prueba *t* de Student al comparar las absorbancias en ausencia y presencia de 1000 U/mL de catalasa, mientras que en el panel inferior se hicieron las comparaciones con la muestra libre de catalasa (prueba de Dunnett de dos colas)

Efectos sobre el encogimiento de las células Jurkat. El encogimiento o la pérdida del volumen celular es un evento ubicuo en muchos tipos celulares y ocurre como un requisito previo a los eventos apoptóticos que conducen a la muerte celular (19). Mediante citometría de flujo puede detectarse el aumento de la dispersión de luz lateral (side scatter) relacionado con la reducción del volumen celular. Este aumento ocurre de un modo concomitante con la reducción en la dispersión de luz hacia adelante (forward scatter). La fig. 7B muestra que 0,1 µmol/L de AF fue suficiente para disminuir el número de

células viables (no encogidas) de un modo significativo, mientras que CTZAu generó tal efecto a partir de 1 µmol/L. La misma figura muestra que esos efectos no guardan relación con necrosis, ya que ésta se hizo evidente a concentraciones mayores que 1 µmol/L.

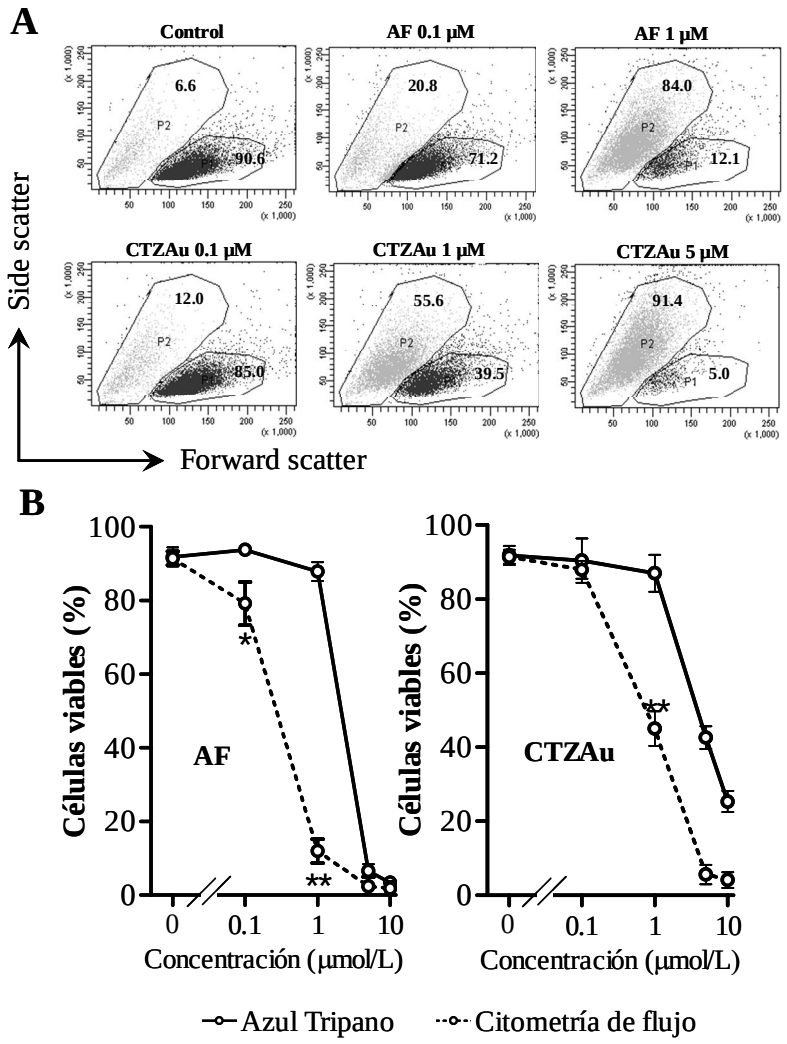

Fig 7. Efectos de AF y CTZAu sobre el encogimiento celular. Las células Jurkat (1 x 10^6/mL) fueron tratadas con AF o CTZAu a las concentraciones indicadas e incubadas por 24 h a 37°C y 5% CO_2. El análisis por citometría de flujo se hizo midiendo la luz dispersada hacia adelante (forward scatter) y lateralmente (side scatter). Se registraron 10.000 eventos y los perfiles de dispersión de la luz se plasmaron en los gráficos de puntos. En el panel **A** se muestran los resultados de un ensayo representativo. Los porcentajes de células viables obtenidos por citometría (porcentaje de aquellas células que dispersan la luz hacia delante preferencialmente) y por exclusión de azul tripano se graficaron en función de las dosis de los complejos (panel **B**).

DISCUSIÓN

La mayoría de los resultados presentados en este trabajo, indican que AF es una droga de mayor potencia que CTZAu en lo que respecta a la inhibición de las funciones metabólicas evaluadas. Por ejemplo, la inhibición del estallido respiratorio de los PMNs en sangre completa y en ausencia de TNF-α, ocurrió a 5 µmol/L de AF, mientras que a esa concentración, CTZAu exhibió un efecto estimulador (fig. 1A). Además, en presencia de TNF-α, 1 µmol/L de AF fue suficiente para inhibir esa función mientras que con CTZAu, se necesitó elevar la concentración hasta 5 µmol/L para obtener una inhibición significativa (fig. 1B). Diferencias similares fueron observadas con respecto a la inhibición de la secreción de TNF-α por las MNLs (fig. 2A). Sin embargo, buena parte de los efectos de AF podrían atribuirse a la inhibición de la viabilidad celular, ya que esos eventos se pudieron evidenciar a 1 µmol/L de AF y a 10 µmol/L de CTZAu para las MNLs (fig. 2B) y a 0,1 µmol/L de AF y a 1 µmol/L de CTZAu para las células Jurkat (fig. 7B).

Los efectos estimuladores de ambos complejos sobre el estallido respiratorio de los PMNs son de particular interés debido a que esas células han sido implicadas en la cronicidad de la artritis reumatoide, probablemente debido a que son las células predominantes en el fluido sinovial donde secretan tanto enzimas lisosomales degradativas como especies reactivas de oxígeno y eicosanoides pro-inflamatorios (20). En ese sentido, cabría esperar que la inhibición de esas funciones sea beneficiosa para quienes padecen la enfermedad. Sin embargo, la historia no es tan sencilla. En efecto, las concentraciones del oro total de AF en sangre oscilan entre 0,5 y 7,5 µmol/L y la mayor parte (~90%) del oro se enlaza con la albúmina (21). Entonces, la concentración “efectiva” del oro disponible para interactuar con las células debe estar en el rango de nanomoles/L. Es precisamente a tan bajas concentraciones, que se ha observado desde hace mucho tiempo que los complejos de oro estimulan funciones de los PMNs que son inhibidas a mayores dosis (22). Entonces, la pregunta acerca de cuáles son las dosis realmente terapéuticas de los complejos de oro sigue esperando una respuesta convincente.

Muy recientemente, el tema del incremento del estallido respiratorio de los PMNs y su relación con el desarrollo de la artritis adquirió relevancia debido a los trabajos publicados por Holmdahl *et al*., (23, 24). Esos autores encontraron que la ausencia del gen Ncf1, que codifica una de las proteínas ($p47^{phox}$) componentes de la NADPH oxidasa (la enzima responsable del estallido respiratorio de los PMNs), aumenta la susceptibilidad para desarrollar diversos tipos de artritis en roedores, sugiriendo que la activación del estallido respiratorio tiene un carácter protector. En lo que respecta a los complejos de oro de este trabajo, aunque ellos no activan por sí solos a la NADPH oxidasa, la fig. 1A revela que son capaces de cebar a los PMNs para que su respuesta ante un estímulo tal como el zimosan opsonizado sea incrementada. Es interesante destacar que en esos ensayos, y en contraste con AF, CTZAu exhibió un consistente efecto estimulador en todo el intervalo de concentraciones ensayado (1-10 µmol/L).

Otro aspecto que amerita discutirse, es la capacidad que tienen los complejos de oro de generar estrés oxidativo en células diferentes a los PMNs, tales como las células Jurkat. Por ejemplo, en el presente trabajo, en todo el intervalo ensayado (0,1-10 µmol/L), CTZAu fue capaz de incrementar el contenido intracelular de GSH, mientras que AF logró tal efecto en el rango de 0,1-1 µmol/L (fig. 5). Además, los efectos citotóxicos de ambos complejos en las células Jurkat fueron parcialmente revertidos por catalasa de un modo dosis-dependiente para la enzima (fig. 6B). En este sentido, debe destacarse que en un trabajo publicado muy recientemente (25) se encontró que 1 µmol/L de AF no afectó el contenido de GSH en las células Jurkat. Sin embargo, el tiempo de incubación fue de apenas 2 h en contraste con las 24 h del presente trabajo. Por otra parte, en el mismo artículo, se demostró que 2 µmol/L de AF induce una moderada producción de H_2O_2, sin que se observaran indicios significativos de peroxidación lipídica. Ante esos hallazgos, los autores concluyeron que el estrés oxidativo generado por AF era limitado. Los resultados presentados aquí, que demuestran que los efectos citotóxicos de AF en las células Jurkat no pueden ser totalmente bloqueados por catalasa, apoyan esa conclusión.

La capacidad de los complejos de oro de inducir, aunque moderadamente, la producción de H_2O_2 en células Jurkat, puede tener implicaciones terapéuticas no suficientemente exploradas. Por ejemplo, se ha demostrado que AF puede reprimir las actividades transcripcionales sensibles al status redox intracelular, tales como las de AP-1 (*Activating Protein-1*) y las de NF-κB (*Nuclear Factor-kappa B*) así como activar al factor de transcripción Nrf2 (*Nuclear erythroid 2 p45-related factor 2* (3). Este último está involucrado en la estimulación de la expresión de diversos genes anti-oxidantes incluyendo el de la enzima gamma-glutamil-cisteinil sintetasa (γ-GCS), cuya actividad limita la velocidad de síntesis del GSH (26). Estas notables propiedades de los complejos de oro podrían ameritar que sean incluidos dentro del arsenal de nuevos fármacos que funcionen como agentes preventivos o curativos de algunos tipos de cáncer.

Conclusiones. Los efectos *in vitro* generados por el complejo CTZAu en diferentes tipos de leucocitos fueron en general, diferentes a los exhibidos por AF. En particular, aunque los efectos pro-apoptóticos de AF tanto en PMNs como en las células Jurkat se manifestaron a concentraciones menores que los correspondientes a CTZAu, debe destacarse que éste último exhibió menor toxicidad (en términos de necrosis) en células mononucleares incluyendo las Jurkat. Por otra parte, CTZAu mostró una notable capacidad de estimular, en un rango mayor de concentraciones que AF, tanto el estallido respiratorio de los PMNs como la síntesis de GSH en las células Jurkat. Estos resultados sugieren que es justificado emprender estudios más detallados, tanto *in vitro* como en animales de experimentación, acerca de las potencialidades farmacológicas de CTZAu. Además, se evidenció que la estrategia de combinar distintos ligandos con el motivo oro(I)-fosfina puede dar origen a drogas con propiedades terapéuticas de moderada toxicidad y de posible gran impacto para tratar enfermedades malignas o inflamatorias.

AGRADECIMIENTO. *Este trabajo fue subvencionado parcialmente por el Fonacit, Proyecto S1-2001001007.*

BIBLIOGRAFIA

1. Eisler R. Chrysotherapy: a synoptic review. Inflamm. Res. 2003;52: 487-501.
2. Whitehouse MW. Therapeutic gold. Is it due for a come back? Inflammopharmacol. 2008; 16:107-109.
3. Kataoka K, Handa H, Nishizawa M. Induction of celular antioxidative stress genes through heterodimeric transcription factor Nrf2/small Maf by antirheumatic gold(I) compounds. J. Biol. Chem. 2001; 276:34074-34081.
4. Barnard PJ, Berners-Price SJ. Targeting the mitochondrial cell death pathway with gold compounds. Coordin. Chem. Rev. 2007; 251:1889-1902.
5. Navarro M, Fraile G, Velásquez M, González E, Escalona J, Ilanjian R, Abad MJ, Taylor P. Effect of a gold-chloroquine complex on inflammation-related leukocyte functions and cell viability. Arzneimittelforschung 2006; 56:836-833.
6. Tiekink ER. Anti-cancer potential of gold complexes. Inflammopharmacol. 2008; 16:138-142.
7. Navarro M, Cisneros-Fajardo EJ, Lehmann T, Sánchez-Delgado RA, Atencio R, Silva P, Lira R, Urbina JA. Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases. 6. Synthesis and characterization of new copper(II) and gold(I) clotrimazole and ketoconazole complexes and evaluation of their activity against Trypanosoma cruzi. Inorg. Chem. 2001; 40:6879-6884.
8. Navarro M, Colmenares I, Correia H, Hernández A, Ching Y, Millán Y, Ojeda LE, Velásquez M, Fraile G. In vitro activities of transition metal derivatives of ketoconazole and clotrimazole against a wild type strain of *Saccharomyces cerevisiae* in absence or presence of human neutrophils. Arzneimittelforschung 2004; 54:752-756.
9. Wang ZH, Shen B, Yao HL, Jia YC, Ren J, Feng YJ, Wang YZ. Blockage of intermediate-conductance-Ca(2+)-activated K(+) channels inhibits progression of human endometrial cancer. Oncogene. 2007; 26:5107-5114.
10. Khalid MH, Tokunaga Y, Caputy AJ, Walters E. Inhibition of tumor growth and prolonged survival of rats with intracranial gliomas following administration of clotrimazole. J. Neurosurg. 2005; 103:79-86.
11. Dennison WB, Loeser RF, Turner RA, Johnson JA, Wells HB. A double blind placebo controlled trial of low dose clotrimazole in rheumatoid arthritis. J. Rheumatol. 1990; 17:1003-1007.
12. Brown GE, Stewart MQ, Bissonnette SA, Elia AE, Wilker E, Yaffe MB. J. Biol. Chem. 2004; 279:27059-27068.
13. Lieberman MM, Sachanandani DM, Pinney CA. Comparative study of neutrophil activation by chemiluminescence and flow cytometry. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1996; 3:654-662.
14. McNamee JP, Bellier PV, Kutzner BC, Wilkins RC. Effect of pro-inflammatory cytokines on spontaneous apoptosis in leukocyte sub-sets within a whole blood culture. Cytokine 2005; 31:161-167.
15. Voetman AA, Loos JA, Roos D. Changes in the levels of glutathione in phagocytosing human neutrophils. Blood 1980; 55:741-747.
16. van Leeuwen HJ, Van Der Tol M, Van Strijp JA, Verhoef J, van Kessel KP. The role of tumour necrosis factor in the kinetics of lipopolysaccharide-mediated neutrophil priming in whole blood. Clin. Exp. Immunol. 2005; 140:65-72.
17. Walmsley SR, Cowburn AS, Sobolewski A, Murray J, Farahi N, Sabroe I, Chilvers ER. Characterization of the survival effect of tumour necrosis factor-alpha in human neutrophils. Biochem. Soc. Trans. 2004; 32:456-460.
18. Vint IA, Chain BM, Foreman JC. The interaction of auranofin and buthionine sulfoximine blocks activation of human peripheral T lymphocytes. Cell. Immunol. 1993; 152:152-161.
19. Bortner CD, Cidlowski JA. Apoptotic volume decrease and the incredible shrinking cell. Cell Death Differ. 2002; 9:1307-1310.

20. Haynes DR. Inflammatory cells and bone loss in rheumatoid arthritis. Arthritis Res. Ther. 2007; 9:104-106.

21. Roberts JR, Xiao J, Schliesman B, Parsons DJ, Shaw CF 3rd. Kinetics and mechanism of the reaction between serum albumin and auranofin (and its isopropyl analogue) in vitro. Inorg. Chem. 1996; 35: 424-433.

22. Bondeson J. The mechanisms of action of disease-modifying antirheumatic drugs: a review with emphasis on macrophage signal transduction and the induction of proinflammatory cytokines. Gen. Pharmacol 1997; 29:127-50.

23. Hultquist M, Holmdahl R. Ncf1 (p47phox) polymorphism determines oxidative burst and the severity of arthritis in rats and mice. Cell. Immunol. 2005; 233:97-101.

24. Gelderman KA, Hultqvist M, Pizzolla A, Zhao M, Nandakumar KS, Mattsson R, Holmdahl R. Macrophages suppress T cell responses and arthritis development in mice by producing reactive oxygen species. J. Clin. Invest. 2007; 117:3020-3028.

25. Rigobello MP, Folda A, Dani B, Menabò R, Scutari G, Bindoli A. Gold(I) complexes determine apoptosis with limited oxidative stress in Jurkat T cells. Eur. J. Pharmacol. 2008; 582:26-34.

26. Cox AG, Brown KK, Arner ES, Hampton MB. The thioredoxin reductase inhibitor auranofin triggers apoptosis through a Bax/Bak-dependent process that involves peroxiredoxin 3 oxidation. Biochem. Pharmacol. 2008; 76:1097-1109.

27. Sato H, Yamaguchi M, Shibasaki T, Ishii T, Bannai S. Induction of stress proteins in mouse peritoneal macrophages by the anti-rheumatic agents gold sodium thiomalate and auranofin. Biochem. Pharmacol. 1995; 49:1453-1357.

28. Surh YJ, Kundu JK, Na HK, Lee JS. Redox-sensitive transcription factors as prime targets for chemoprevention with anti-inflammatory and antioxidative phytochemicals. J. Nutr. 2005; 135:2993S-3001S