



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
ÁREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
MENCIÓN: BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



**ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE TRES COMPLEJOS DE ORO (I)-
TRIFENILFOSFINA Y DE LA AURANOFINA: UN ESTUDIO COMPARATIVO
DE CITOTOXICIDAD SOBRE LINFOCITOS T LEUCÉMICOS *JURKAT***

AUTOR: Lic. José Luis Duque R.

TUTOR: Prof. Germán Fraile.

Maracay, abril del 2013.



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
ÁREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
MENCIÓN: BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



**ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE TRES COMPLEJOS DE ORO (I)-
TRIFENILFOSFINA Y DE LA AURANOFINA: UN ESTUDIO COMPARATIVO
DE CITOTOXICIDAD SOBRE LINFOCITOS T LEUCÉMICOS *JURKAT***

AUTOR: Lic. José Luis Duque R.

Trabajo presentado ante el Área de Estudios de Postgrado de la Universidad de Carabobo para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas.

Maracay, abril del 2013.



UNIVERSIDAD DE CARABOBO

Año Jubilar Marzo 2012 - 2013

Dirección de Asuntos Estudiantiles

Sede Aragua

Rif. 20000041-4

ACTA DE DISCUSIÓN TRABAJO DE MAESTRIA

En atención a lo dispuesto en los Artículos 127, 128, 137, 138 y 139 del Reglamento de Estudios de Postgrado de la Universidad de Carabobo, quienes suscribimos como Jurado designado por el Consejo de Postgrado de la Facultad de Ciencias de la Salud, de acuerdo a lo previsto en el Artículo 29 literal "N" del citado Reglamento, para estudiar el Trabajo de Maestría titulado:

"ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE TRES COMPUESTOS DE ORO(I)- TRIFENILFOSFINA Y DE LA AURANOFINA: UN ESTUDIO COMPARATIVO DE CITOTOXIDAD SOBRE LINFOCITOS T LEUCÉMICOS JURKAT".

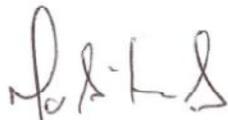
Presentado para optar al grado de **MAGISTER EN CIENCIAS BIOMEDICAS, MENCIÓN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR** por el aspirante:

DUQUE RIVERA JOSÉ LUIS
C.I. 13.308.711

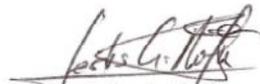
Habiendo examinado el Trabajo presentado, decidimos que el mismo está **APROBADO**. Asimismo, el jurado decidió otorgar **MENCIÓN PUBLICACIÓN** al trabajo de grado presentado por considerar que cumple con los requisitos establecidos en el literal 3, artículo 2 del Reglamento de menciones honoríficas para los egresados de la Universidad de Carabobo.

En Maracay, a los tres días del mes de Abril del año dos mil trece.


Prof. Ana C. Ferreras (Pdte)
C.I: 7.284.330


Prof. María Lucía D'Errico
C.I. 12.142.944




Prof. Jesús Rojas
C.I. 3.662.930

Gilda Marcano 04.04.13

"Democracia y Autonomía, garantía de presente y futuro Universitario"
Final Av. Leonardo Ruiz Pineda - La Morita - Edo. Aragua
Telf. 0243-2710520 - 2713471 ext. 207

A la memoria de mi madre... no hay día que no la extrañe
A mi padre... quien disfruta de mis éxitos tanto o más que yo
A mi esposa, Solmar... un punto de apoyo indispensable
A mis hijos, Edael e Isabella... porque a través de ellos he trascendido

RECONOCIMIENTOS

A los doctores Maribel Navarro y Peter Taylor, investigadores del IVIC, por suministrar los complejos de oro y la línea celular Jurkat empleados en este trabajo

A mi tutor, Germán Fraile, por introducirme en la disciplina de la Bioquímica Farmacológica y entusiasmarme por un campo de investigación fascinante; también por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, y naturalmente, gracias por conducir a feliz término esta empresa académica

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo, por el financiamiento parcial de esta investigación

Al Biomed, por facilitar sus instalaciones y sobre todo a los investigadores y personal técnico, por el apoyo operativo y el entrenamiento en el manejo de equipos compartidos y no comunes

A Ronald Reggio, por la orientación en varios de los procedimientos básicos, especialmente por las técnicas de cultivo celular

A Mait Velázquez, por el asesoramiento técnico sobre varios procedimientos importantes de laboratorio y la realización de mediciones experimentales

A Yenifer Seijas, por el apoyo en la elaboración de algunos ensayos relevantes

A mi colega y amigo Luis Manuel Pérez, por el análisis estadístico de muchos de los resultados, por la instrucción en el manejo de varios programas de estadística y la adecuada selección de pruebas e interpretación de resultados

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
LISTA DE SIGLAS Y SÍMBOLOS	x
RESUMEN	xii
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
<hr/>	
CAPÍTULO II: FUNDAMENTOS TEÓRICOS	5
<hr/>	
Usos terapéuticos de las sales de oro: algunas claves mecanicistas	5
Metabolismo redox dependiente de tiol: el sistema tioredoxina	9
Tioredoxina	9
Tioredoxina reductasa	12
El sistema tioredoxina en cáncer	13
Inhibición del sistema tioredoxina	15
Sales de oro y sus efectos sobre la tioredoxina reductasa	16
Consecuencias biológicas de la inhibición de la tioredoxina reductasa por las sales de oro	19
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	22
<hr/>	
Compuestos de oro y reactivos	22
Condiciones de cultivo celular	22
Citotoxicidad y proliferación determinada con el ensayo de MTT	23
Proliferación celular en presencia de la butionina sulfoximina	24
Determinación de glutatión	24
Citotoxicidad de los compuestos de oro en presencia de catalasa	25
Citotoxicidad de los compuestos de oro en presencia de albúmina	25
Constreñimiento de los linfocitos T <i>Jurkat</i> determinado por citometría de flujo	26
Actividad enzimática de la tioredoxina reductasa de hígado de rata	26
Obtención de lisados celulares de linfocitos T <i>Jurkat</i>	27
Actividad enzimática de la tioredoxina reductasa de los lisados de células <i>Jurkat</i>	27
Concentración proteica de los lisados celulares	27
Potencial de membrana mitocondrial determinado por sonda fluorescente	28

Viabilidad celular determinada por exclusión de azul tripano	29
Análisis estadístico	29
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	31
Crecimiento celular de los linfocitos T <i>Jurkat</i>	31
Modificación del contenido del glutatión intracelular	34
Protección de la catalasa contra la citotoxicidad de los compuestos de oro	35
Abatimiento del potencial de membrana mitocondrial de las células <i>Jurkat</i>	37
Inhibición de la enzima tioredoxina reductasa	39
Atenuación de las citotoxicidades de los compuestos de oro por la albúmina sérica bovina	42
Encogimiento celular proapoptótico y necrosis	44
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN	50
Inhibición de la tioredoxina reductasa	52
Participación de las especies reactivas de oxígeno en los efectos citotóxicos	53
La generación de especies reactivas de oxígeno induce efectos antioxidantes	55
Colapso del potencial de membrana mitocondrial de las células <i>Jurkat</i>	56
La citotoxicidad de los compuestos de oro es modulada por la albúmina sérica bovina	58
Los complejos de oro estimulan diferentes formas de muerte celular	60
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES	64
REFERENCIAS	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Estructura química de los complejos de oro (I)-fosfina y auranofina	2
2	Estructura química de tiolatos de oro (I) usados en el tratamiento de la artritis reumatoide	6
3	Reacciones y funciones de la tioredoxina reductasa en las células	10
4	Ciclo catalítico de la tioredoxina reductasa de mamíferos	14
5	Consecuencias de la inhibición de la tioredoxina reductasa	17
6	Posible secuencia de eventos que conducen a la secreción de citocromo <i>c</i> por mitocondrias aisladas tratadas con compuestos capaces de inhibir la actividad de la tioredoxina reductasa	20
7	Proliferación de los linfocitos T <i>Jurkat</i>	32
8	Alteración del contenido de glutatión intracelular de los linfocitos T <i>Jurkat</i>	34
9	Efectos de diferentes dosis de catalasa sobre la toxicidad de los compuestos de oro en linfocitos T <i>Jurkat</i>	36
10	Variación del potencial de membrana mitocondrial de las células <i>Jurkat</i>	38
11	Cinéticas de óxido-reducción representativas de las enzimas tioredoxina reductasa murina y humana	39
12	Inhibición de las actividades de las enzimas tioredoxina reductasa murina y humana	43
13	Efectos de la albúmina de suero bovino sobre la citotoxicidad de los compuestos de oro en linfocitos T <i>Jurkat</i>	44
14	Constreñimiento de los linfocitos T <i>Jurkat</i>	45
15	Viabilidad de los linfocitos T <i>Jurkat</i> determinada por exclusión del colorante azul tripano	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Pág.
1	Concentraciones extracelulares de la tioredoxina en enfermedades humanas	11
2	Efectos de compuestos metálicos sobre la tioredoxina reductasa mitocondrial	18
3	Efectos de los complejos de oro sobre la actividad de la tioredoxina reductasa	52

LISTA DE SIGLAS Y SÍMBOLOS

$\Delta\psi_m$: potencial de membrana mitocondrial.

AF: auranofina.

AR: artritis reumatoide.

ASB: albúmina de suero bovino.

ASK1: cinasa reguladora de señalización apoptótica.

AuCl₃: cloruro de oro (III).

BmAu: [bis (2-mercapto-1-metilimidazol-3-il)borato](trifenilfosfina)oro(I).

BSO: L-butionina-[S, R]-sulfoximina.

CP: carboplatino.

CQ: cloroquina.

CQAu: hexafluorofosfato de (trifenilfosfina)(cloroquina)oro(I).

CTZ: clotrimazol.

CTZAu: hexafluorofosfato de (trifenilfosfina)(clotrimazol)oro(I).

DMSO: dimetilsulfóxido.

DTNB: ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico).

ERO: especies reactivas de oxígeno.

FAD: flavina adenina dinucleótido.

FDA: agencia estadounidense para la administración de drogas y alimentos.

GSH: glutatión reducido.

HO-1: hemo-oxigenasa 1.

IC₅₀: concentración inhibitoria del 50% de la actividad del control.

IKK: cinasa de I κ B.

I κ B: inhibidor de *kappa* B.

JC-1: yoduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbocianino.

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio.

NF- κ B: factor nuclear *kappa* B.

Nrf2: *nuclear factor (erythroid-derived 2)-related factor 2*.

MAPK: proteincinasa activada por mitógeno.

PBS: solución salina de tampón fosfato Dulbecco.

SFB: suero fetal bovino.

TNB: ácido 5-mercapto-2-nitrobenzoico.

TNF- α : factor de necrosis tumoral *alfa*.

Trx: tioredoxina.

Trx2: tioredoxina mitocondrial.

TrxR: tioredoxina reductasa.

TrxR1: tioredoxina reductasa citosólica/nuclear.

RESUMEN

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE TRES COMPLEJOS DE ORO (I)- TRIFENILFOSFINA Y DE LA AURANOFINA: UN ESTUDIO COMPARATIVO DE CITOTOXICIDAD SOBRE LINFOCITOS T LEUCÉMICOS *JURKAT*

Autor: Lic. José Luis Duque R.

Tutor: Prof. Germán Fraile

Fecha: abril, 2013

En las últimas décadas, los derivados de oro se han empleado clínicamente en el tratamiento del estado avanzado de la artritis reumatoide. Aunque los mecanismos de acción de estas drogas no han sido completamente esclarecidos, cierta base de evidencia clínica y experimental sugiere que sus bondades terapéuticas se sustentan en sus actividades inmunosupresoras. Recientemente, ha habido mucho interés en la utilización de los derivados de oro en el tratamiento de otras enfermedades, especialmente contra el cáncer. En este trabajo se evaluó la citotoxicidad de tres complejos de oro (I)-trifenilfosfina y auranofina (una droga antiartrítica) sobre la línea celular de linfoma *Jurkat* y se compararon sus actividades biológicas. Con este propósito se determinó: a) la supervivencia, el crecimiento y mecanismos de muerte celular mediante el ensayo colorimétrico de MTT, cambios morfológicos por citometría de flujo y exclusión de azul tripano; b) la participación de las especies reactivas de oxígeno en los efectos citotóxicos en presencia de butionina sulfoximina y medición del glutatión intracelular usando el ensayo colorimétrico de DTNB; c) el potencial de membrana mitocondrial por citometría de flujo con la sonda fluorescente JC-1; y d) La actividad enzimática de la TrxR a través del ensayo del DTNB. Entre los hallazgos encontrados deben destacarse que los complejos de oro inhiben fuertemente la TrxR en el intervalo nanomolar de concentraciones, suprimen el potencial de membrana mitocondrial, generando estrés oxidativo y elevando los niveles de glutatión intracelular. Estos eventos se traducen en inhibición acentuada de la viabilidad y la proliferación caracterizadas por apoptosis y necrosis diferenciadas dependientes de la concentración y del tipo de compuesto de oro.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En investigaciones realizadas en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), se han explorado las propiedades terapéuticas de varios complejos organometálicos sintetizados en años recientes. Estos complejos conjugan en sus estructuras químicas metales como el cobre, oro, rodio o rutenio y drogas con actividades biológicas conocidas, entre las que se incluyen cloroquina, clotrimazol y ketoconazol. La intención detrás de esta estrategia ha sido alcanzar derivados con propiedades terapéuticas mejoradas, especialmente para el tratamiento de enfermedades tropicales (Sánchez-Delgado *et al.*, 1993; Sánchez-Delgado *et al.*, 1996; Navarro *et al.*, 1997; Sánchez-Delgado *et al.*, 1998; Navarro *et al.*, 2000, 2001, 2004a; Navarro, 2009).

Desde hace un poco más de una década, se ha conformado un grupo de trabajo entre investigadores del IVIC y del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Carabobo (BIOMED), para evaluar las posibilidades farmacológicas de algunos de estos complejos en otros ámbitos que aún no habían sido explorados para la fecha.

Los esfuerzos del grupo de trabajo IVIC-BIOMED han estado orientándose al estudio de los efectos de una variedad de complejos organometálicos sobre las funciones biológicas de células humanas y microorganismos, tales como neutrófilos (Navarro *et al.*, 2002) y levaduras (Navarro *et al.*, 2004b). De estos estudios pueden resaltarse dos complejos de oro: el hexafluorofosfato de (trifenilfosfina)(cloroquina) oro(I) (CQAu) y el hexafluorofosfato de (trifenilfosfina)(clotrimazol)oro(I) (CTZAu). Las estructuras químicas de ambos pueden observarse en la figura 1. Estos derivados de oro han mostrado la capacidad de inhibir la generación de anión superóxido (evento que forma parte del proceso conocido como estallido oxidativo) de los

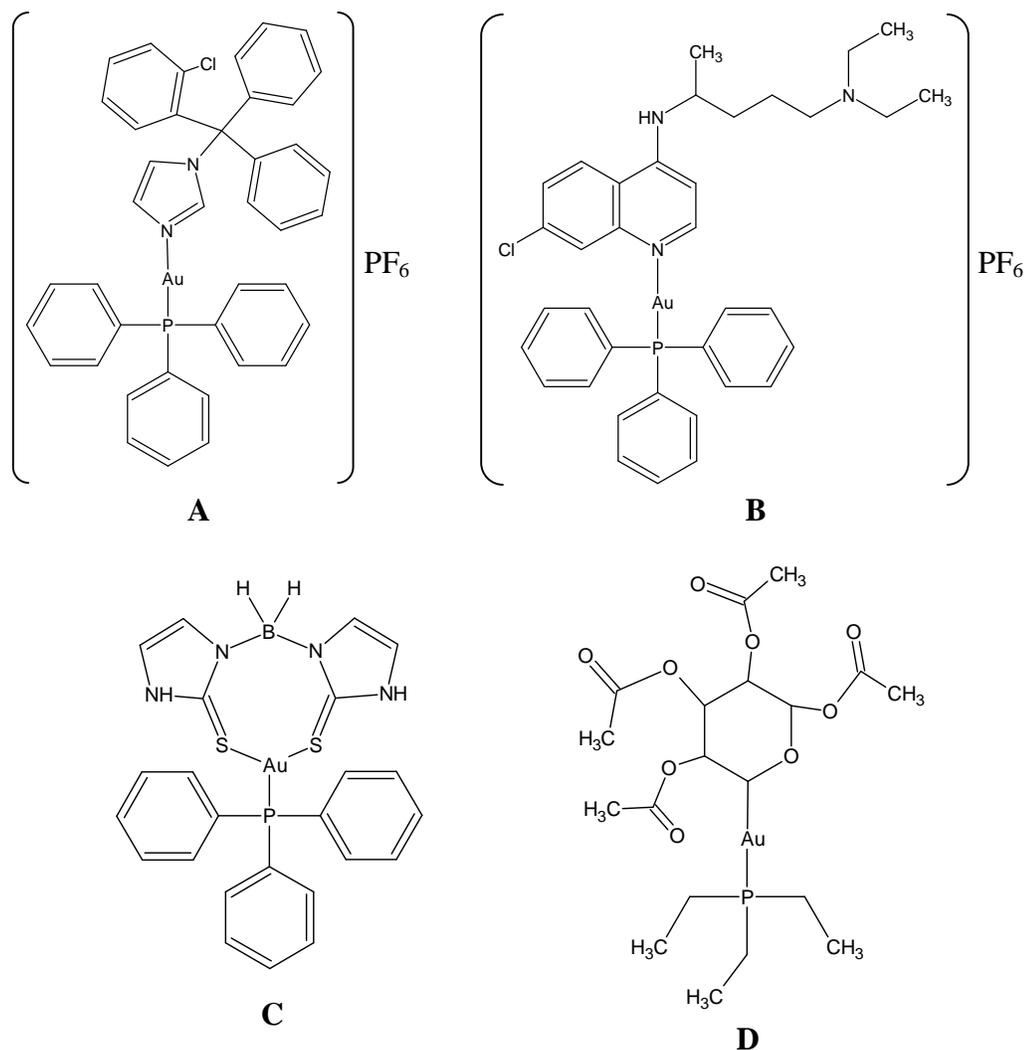


Figura 1. Estructura química de los complejos de oro (I)-fosfina y auranofina: **A**, hexafluorofosfato de (trifenilfosfina) (cloroquina) oro (I) (CQAu); **B**, hexafluorofosfato de (trifenilfosfina) (clotrimazol) oro (I) (CTZAU); **C**, [bis (2-mercapto-1-metimidazol-3-il) borato] (trifenilfosfina) oro (I) (BmAu); **D**, tetraacetatotrioglucosa de trietilfosfinaoro (I) (auranofina).

neutrófilos (Navarro *et al.*, 2004b), un tipo de célula inmune fagocítica con un papel importante en la progresión patológica de la artritis reumatoide (AR) (Németh y Mócsai, 2012).

Pero fue más recientemente, en un estudio comparativo (Navarro *et al.*, 2006) con la droga antiartrítica auranofina (AF), que se observaron propiedades inhibitorias más

prometedoras del complejo CQ Au. En ese estudio, se evaluaron los efectos de la AF y el CQ Au sobre células del sistema inmune humano y murino y sobre la respuesta antiinflamatoria de un modelo *in vivo* de ratones. Entre los resultados más importantes destacan los siguientes: 1) A una concentración de 1 $\mu\text{mol/L}$ de AF, la producción de la citocina denominada factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α , por sus siglas en inglés) de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con fitohemaglutinina, se inhibió en un 75%, mientras que niveles de inhibición similares se alcanzaron cuando se utilizó 5 $\mu\text{mol/L}$ de CQ Au. A una concentración de 1 $\mu\text{mol/L}$, ninguno de los dos compuestos de oro fue tóxico, pero a 5 $\mu\text{mol/L}$, se observó apoptosis, siendo la AF sensiblemente más tóxica que el CQ Au; 2) Tanto en la línea celular murina de macrófagos/monocitos J-774 como en ratones pretratados con AF o CQ Au (0–10 $\mu\text{mol/L}$) y luego bajo choque endotóxico inducido con lipopolisacárido, la secreción de TNF- α e interleucina 6, fue inhibida en forma similar por ambos compuestos.

Estos resultados permitieron a sus autores sugerir, que la sustitución del ligando tetraacetato de tioglucosa por el ligando cloroquina genera complejos con potencial antiinflamatorio similar al de la AF, siendo necesario realizar estudios toxicológicos para evaluar si los efectos secundarios serían menores.

Numerosos estudios en los últimos quince años (Casini y Messori, 2011), han mostrado que la AF y los complejos de oro relacionados ejercen una inhibición fuerte y específica sobre la actividad enzimática de la tioredoxina reductasa (TrxR), una proteína central del metabolismo redox celular. Este hecho es considerado clave en los efectos citotóxicos ejercidos sobre varias líneas celulares de cáncer.

Dado que el CQ Au y la AF son compuestos que muestran un desempeño antiinflamatorio semejante y que junto con el CTZ Au, poseen motivos estructurales oro (I)-fosfina similares, podría postularse que ellos operan sobre las células a través de mecanismos comunes. Es razonable plantearse entonces la siguiente interrogante:

¿poseen el CQAu, el CTZAu y los otros complejos con el motivo estructural oro (I)-fosfina propiedades terapéuticas semejantes a las atribuidas a la droga antiartrítica AF? Aproximarse a la respuesta de la pregunta anterior justifica explorar con mayor profundidad las propiedades tanto antiartríticas como antineoplásicas del CQAu, el CTZAu y de otros complejos novedosos, basados en el motivo oro (I)-fosfina, tal como el [bis (2-mercapto-1-metilimidazol-3-il) borato] (trifenilfosfina) oro (I) (BmAu) (ver figura 1), un derivado de oro sintetizado por Mohamed *et al.* (2002), cuyas propiedades terapéuticas aún no han sido investigadas.

Con base en lo anteriormente expuesto, el objetivo general de esta investigación fue el de evaluar la citotoxicidad de los complejos de oro (I)-trifenilfosfina CQAu, CTZAu, BmAu y de la auranofina, sobre linfocitos T leucémicos *Jurkat*. Los objetivos específicos fueron los siguientes:

1. Determinar los efectos de los complejos de oro (I)-fosfina sobre la supervivencia y el crecimiento celular.
2. Establecer la participación de las especies reactivas de oxígeno en los efectos ejercidos por los complejos de oro (I)-fosfina.
3. Identificar los efectores subcelulares y moleculares afectados por los mecanismos de acción de los complejos de oro (I)-fosfina.
4. Comparar las potencias inhibitorias de los diferentes complejos de oro (I)-fosfina.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Usos terapéuticos de las sales de oro: algunas claves mecanicistas

Desde la antigüedad, las preparaciones de oro se han empleado para el tratamiento de una variedad de enfermedades. El uso del oro en medicina es conocido como crisoterapia, que consiste fundamentalmente en el tratamiento clínico de la AR con sales de oro. No obstante, algunos derivados de oro han sido evaluados en otras enfermedades, tales como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, asma bronquial, malaria y cáncer (Shaw, 1999).

En cuanto al cáncer se refiere, se han hecho esfuerzos monumentales para hallar derivados de oro con propiedades quimioterapéuticas. La dimensión de toda esa actividad se refleja en el gran volumen de derivados de oro I y III que ya para principios de la década pasada superaba los 200 compuestos, la gran mayoría con actividades citotóxicas evaluadas en estudios preclínicos sobre numerosas líneas celulares de cáncer (Tiekink, 2002; Che y Sun, 2011; Berners-Price y Filipovska, 2011).

En la figura 2, pueden observarse las estructuras químicas de las sales de oro antiartríticas conocidas, éstas consisten en tiolatos de oro en el estado de oxidación +1. La administración de estas sales se hace por vía subcutánea, salvo en el caso de la AF que se realiza por vía oral. Esta última es la droga más recientemente desarrollada y es reconocida como una droga de segunda generación (Tiekink, 2002).

La eficacia terapéutica de la AF ha sido asociada a sus propiedades inmunosupresoras, entre estas cuentan: 1) la inhibición *in vitro* (Bondeson y Sundler, 1995) y *ex vivo* (Crilly *et al.*, 1994) de la secreción de citocinas proinflamatorias por los macrófagos, posiblemente mediante el bloqueo de la activación del factor nuclear de transcripción *kappa* B (NF- κ B) (Jeon *et al.*, 2000; Kataoka, 2009); 2) la inhibición

de fagocitosis, degranulación y liberación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en

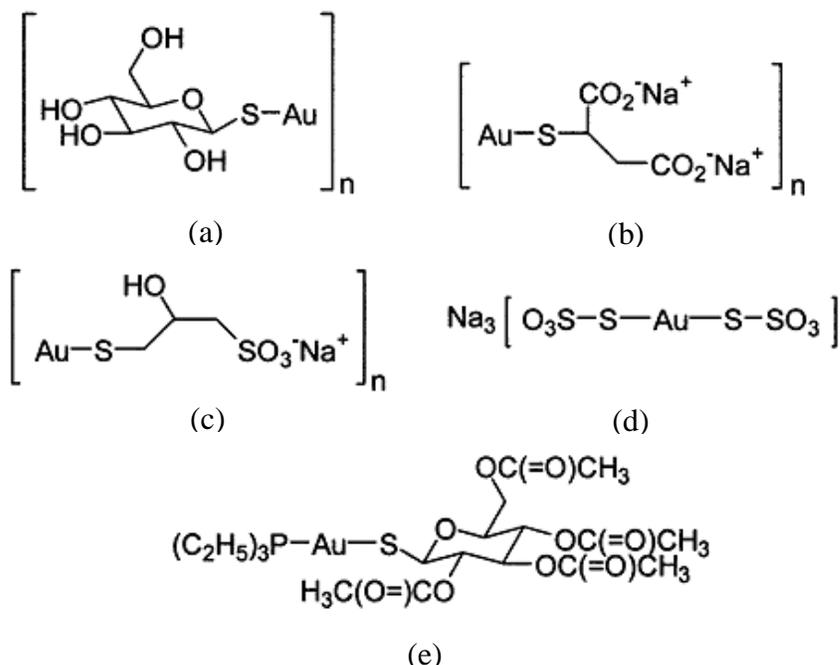


Figura 2. Estructura de química de tiolatos de oro (I) usados en el tratamiento de artritis reumatoide: **(a)** aurotioglucosa (Solganol); **(b)** aurotiomalato (Miocrisin); **(c)** sulfonato de aurotiopropanol (alocrisina); **(d)** auro-bis (tiosulfato) (sanocrisina); **(e)** AF. **Fuente:** modificado de Casini y Messori (2011).

neutrófilos (Bondeson, 1997); 3) la disminución del crecimiento celular de linfocitos humanos activados por antígenos y mitógenos, mediada por la inhibición de funciones accesorias de los monocitos (Hashimoto *et al.*, 1992).

Los blancos moleculares específicos de la AF, sin embargo, no han sido definidos con claridad, debido a la alta reactividad que el oro exhibe sobre los grupos sulfhidrilos presentes en los centros activos de numerosas proteínas intracelulares, como por ejemplo, el complejo multiproteico IKK (cinasa de $I\kappa B$), del cual depende la activación del NF- κB antes mencionado. En las células no estimuladas, el inhibidor del $kappa B$ ($I\kappa B$) forma un complejo con el NF- κB que mantiene inactivo al factor de transcripción, pero cuando las células son activadas por diversos estímulos (por ejemplo, TNF- α , interleucina 1, activadores de la proteincinasa C, virus, lipopolisacárido de origen bacterial y oxidantes), la actividad del NF- κB es inducida

mediante la fosforilación y subsiguiente degradación del I κ B, permitiendo así que el NF- κ B liberado, sea interiorizado por el núcleo para inducir la expresión de un conjunto amplio de genes que participan en enfermedades crónicas inflamatorias, incluyendo la AR. La cinasa responsable de la fosforilación del I κ B es el complejo IKK, el cual pertenece a la familia de las serina-treonina cinasas, y es capaz de fosforilar los dos residuos de serina en el I κ B necesarios para liberar al NF- κ B (DiDonato *et al.*, 1997; Häcker y Karin, 2006).

La sensibilidad de la IKK a diversos complejos organometálicos se ha vinculado a la presencia de residuos de cisteína en sus centros activos. En este sentido, en el intervalo de concentraciones de 1–10 μ mol/L, la AF inhibe la actividad de la IKK en macrófagos activados por lipopolisacárido, TNF- α o forbol-miristato-acetato, con una potencia superior a la de otros compuestos que contienen oro I, tales como las drogas antiartríticas aurotioglucosa y aurotiomalato o cloruro de oro III (AuCl₃); (Jeon *et al.*, 2000).

Aunque los hallazgos referidos anteriormente, constituyen una plausible justificación de las propiedades terapéuticas de la AF, debe destacarse que una gran cantidad de sus actividades antiinflamatorias son inhibidas en el mismo intervalo de concentraciones (1–10 μ mol/L), cuando son evaluadas en otros tipos celulares involucrados en la AR. En efecto, las inhibiciones del estallido respiratorio, quimiotaxia, fagocitosis y desgranulación de neutrófilos y la inhibición tanto de la secreción de citocinas como de la proliferación de células mononucleares humanas, ocurren con valores de concentración inhibitoria del 50% de la actividad del control (IC₅₀), incluidos dentro de ese intervalo micromolar (Bondeson, 1997). Estas coincidencias sugieren que los blancos moleculares de la AF en las células del sistema inmune son múltiples.

Paradójicamente, se ha demostrado que la AF actúa de un modo opuesto en ensayos *in vitro*, a concentraciones inferiores a 1 μ mol/L, es decir, la AF estimula en vez de inhibir algunas funciones de linfocitos y neutrófilos que son inhibidas a concentraciones mayores (Bondeson, 1997; Calabrese, 2003). Adicionalmente, se ha

mostrado que a concentraciones $\leq 1 \mu\text{mol/L}$, la AF es capaz de inhibir la apoptosis espontánea de los neutrófilos cultivados durante 24 h, mientras que las concentraciones mayores a $1 \mu\text{mol/L}$ son proapoptóticas (Liu *et al.*, 2000).

El comportamiento dual de la AF cobra relevancia cuando se considera la reactividad de ciertas proteínas del plasma sanguíneo (por ejemplo, albúmina) que tienen gran capacidad de secuestrar a los metales de transición, tales como el oro. En efecto, la AF reacciona con albúmina de tal forma que en el suero, $\sim 90\%$ de la droga es secuestrada por esa proteína (Roberts *et al.*, 1996).

En este sentido, la captura del oro por macrófagos es sensiblemente reducida, debido a la interacción de los grupos sulfhidrilos con el oro (Snyder *et al.*, 1986). Por lo tanto, si se considera que los niveles de oro total en la sangre de los pacientes artríticos que son tratados con AF están en el intervalo de $0,5\text{-}7,5 \mu\text{mol/L}$ (Dahl *et al.*, 1985), los valores de IC_{50} estarían ubicados entre 1 y $10 \mu\text{mol/L}$, dentro del intervalo adecuado. Sin embargo, las determinaciones de oro total en sangre suelen hacerse mediante técnicas (por ejemplo, absorción atómica) que no discriminan al oro libre del enlazado a la albúmina o a la AF. Entonces, es posible que las concentraciones terapéuticas efectivas de la AF se encuentren a niveles submicromolares.

A los argumentos anteriores, debe agregarse que aún no es claro bajo qué forma el oro puede ser interiorizado por las células del sistema inmune. Al respecto, es necesario puntualizar que la AF es considerada como una prodroga. De hecho, al interactuar con macrófagos *in vitro*, la AF pierde secuencialmente a los grupos tetraacetato de tioglucosa y trietilfosfina (Snyder *et al.*, 1986). Por lo tanto, no se conoce la relación de los ligandos en cuanto a las propiedades terapéuticas de estos complejos. Por ejemplo, se ha sugerido que la penetrabilidad de la AF en los macrófagos, guarda relación con la presencia del ligando hidrofóbico trietilfosfina, mientras que el tetraacetato de tioglucosa parece tener un papel secundario, ya que es rápidamente desplazado por la albúmina del suero (Snyder *et al.*, 1986). Entonces, la comprensión del papel de los diferentes ligandos permitiría el diseño de drogas con propiedades mejoradas.

Metabolismo redox dependiente de tiol: el sistema tioredoxina

Muchas proteínas contienen tioles sensibles a reacciones redox y las reacciones de los sistemas de tiol ocurren ampliamente mediante transferencias de dos electrones que no involucran radicales. Numerosas evidencias acumuladas, indican que parejas de tiol-disulfuro claves son mantenidas fuera de equilibrio en los sistemas biológicos. Esto constituye una condición en la que los cambios en abundancia y distribución de catalizadores redox y los cambios en las tasas de generación de oxidantes relevantes (por ejemplo, peróxidos) y precursores para el suministro de NADPH, pueden dar cuenta de los efectos patológicos del estrés oxidativo a través de funciones alteradas de enzimas, receptores, transportadores, factores de transcripción y elementos estructurales, sin radicales libres (Jones, 2008).

Dos sistemas redox importantes basados en tiol dependen del ubicuo glutatión (GSH) y de la tioredoxina (Trx). Este último sistema está constituido por el NADPH, la tioredoxina reductasa (TrxR) y la Trx propiamente. Aquí se hará énfasis sobre el sistema tioredoxina pues evidencias acumuladas en la última década, dejan en claro que constituye un blanco promisorio en ciertas condiciones patológicas para diversas drogas experimentales (Liu *et al.*, 2012), entre las que pueden destacarse especialmente aquellas basadas en oro, las cuales inhiben fuertemente a la TrxR, representando una interesante estrategia de intervención terapéutica contra el cáncer (Bindoli *et al.*, 2009).

Tioredoxinas

Las Trx son una familia de proteínas pequeñas de 10–12 kDa que han conservado la secuencia catalítica –Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys–. Estas proteínas desarrollan ciclos reversibles de reacciones de oxidación/reducción de dos grupos de cisteínas. La forma ditiol reducida de la Trx [Trx–(SH)₂] reduce sustratos proteicos oxidados que usualmente poseen un grupo disulfuro, y la forma disulfuro de la Trx (Trx-S₂) oxida el sustrato proteico reducido correspondiente; el proceso depende del NADPH y es mediado por la TrxR (Biaglow y Miller, 2005)

En términos generales, las funciones biológicas de las Trx parecen depender fundamentalmente de sus capacidades para suministrar los equivalentes de reducción a diversas enzimas, tales como las que se muestran en la figura 3. La participación de las Trx en diversas enfermedades y condiciones patológicas ha podido ser demostrada debido a los desarrollos recientes de ensayos inmunoenzimáticos (Burke-Gaffney *et al.*, 2005). En general, esos estudios han determinado que dichas patologías están asociadas con situaciones de estrés oxidativo y de inflamaciones, tales como cáncer, artritis, enfermedades virales, condiciones cardiacas, etc. La tabla 1 es un breve resumen de los hallazgos relacionados con este tópico.

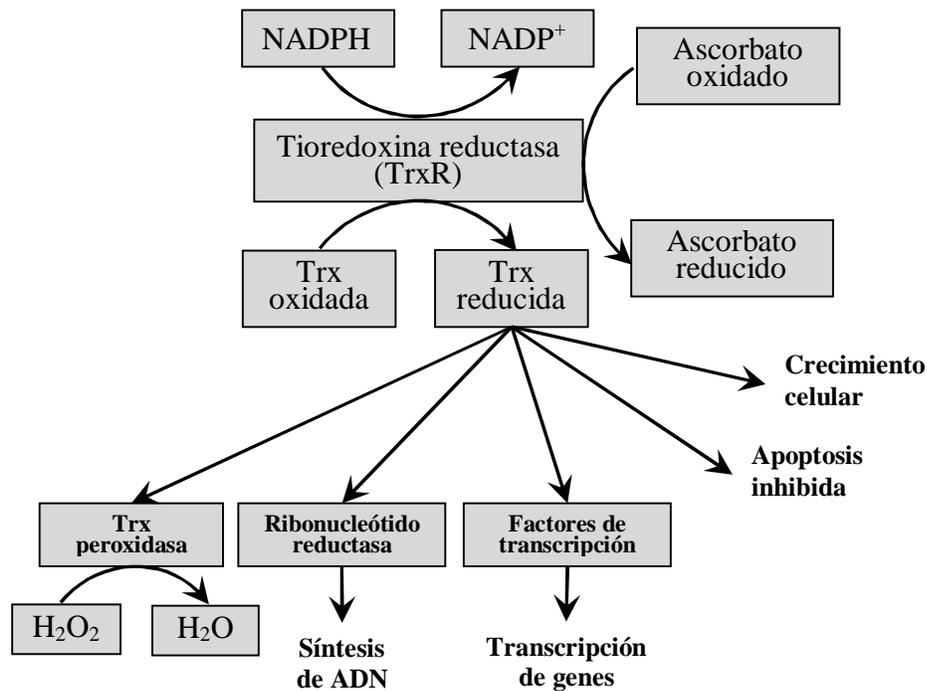


Figura 3. Reacciones y funciones de la TrxR en las células. La TrxR utiliza al NADPH para catalizar la conversión de Trx oxidado en Trx reducido y para reducir al ascorbato. La Trx reducida suministra los equivalentes de reducción a varias proteínas: a) **Trx peroxidasa**: transforma al peróxido de hidrógeno en agua; b) **Ribonucleótido reductasa**: reduce los ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos para la síntesis del ADN; y c) **Factores de transcripción**: conducen a sus uniones incrementadas al ADN, alterando la expresión de genes. Además, la Trx incrementa el crecimiento celular e inhibe la apoptosis. **Fuente:** modificado de Mustacich y Powis (2000).

Tabla 1. Concentraciones extracelulares de Trx en enfermedades humanas

Condición	Muestra	[Trx], ng/mL (control)	[Trx], ng/mL (enfermos)	Hallazgos asociados
Artritis reumatoide	Plasma	139	117	Trx en el fluido sinovial se correlaciona con infiltración de PMNs
	Fluido sinovial	106	412	
Artritis reumatoide	Suero	11,8	33,6	Trx en el fluido sinovial puede agravar la inflamación
	Fluido sinovial	24,6	103,4	
Diabetes (tipo II)	Suero	21	38	La [Trx] puede reflejar la resistencia a la insulina
Infarto agudo del miocardio	Plasma	18,3	38,8	Trx está asociada con hiperagregación plaquetaria
Carcinoma hepatocelular	Suero	81,8	147,4	-
Carcinoma pancreático	Plasma	24,4	54,8	-
HIV/SIDA	Plasma	11,7	24,5	Altas concentraciones de Trx asociadas con bajo conteo de células CD4
Hepatitis C (pacientes hemodializados)	Suero	28,0	112,3	Marcadores de daño hepático
Hepatitis C	Suero	24,9	37,3	Trx se correlaciona con los niveles de ferritina sérica

Fuente: Burke-Gaffney *et al.* (2005).

A pesar de las correlaciones positivas encontradas entre los niveles de Trx y las diversas patologías reseñadas en la tabla 1, no siempre es evidente si la Trx contribuye o previene la patología considerada. Sin embargo, ya que los datos de la tabla 1 muestran, en general, un incremento significativo de los niveles de Trx en los fluidos de los pacientes, se ha propuesto que la Trx podría ser un marcador biológico de importancia para el diagnóstico de algunas patologías que incluyen la diabetes tipo 2 (Kakisaka *et al.*, 2002), enfermedades cardiovasculares (Miyamoto *et al.*, 2005) y AR (Jikimoto *et al.*, 2001).

Además, en conjunción con otros marcadores biológicos, tales como las proteínas CD30 (receptores de membrana celular), se ha sugerido que la Trx serviría para el diagnóstico clínico temprano de varios tipos de tumores. Esto permitiría el uso de estrategias terapéuticas antitumorales que busquen la modulación farmacológica simultánea de las funciones redox y del sistema inmune (Berghella *et al.*, 2011).

Tioredoxina reductasas

Las TrxR son enzimas pertenecientes a la familia de las flavoproteínas de piridina nucleótido-disulfuro oxidorreductasas. Todas las TrxR son proteínas homodiméricas que contienen un grupo prostético flavina adenina dinucleótido (FAD) en cada monómero, un sitio que enlaza al NADPH y un disulfuro (adyacente al FAD), el cual constituye el sitio activo redox. Los electrones son transferidos a través de FAD desde el NADPH al disulfuro del sitio activo (Mustacich y Powis, 2000). Sin embargo, las TrxR de mamíferos, adicionalmente contienen un centro activo redox en forma de una secuencia de cisteína-selenocisteína. Este centro redox adicional está localizado sobre una extensión flexible del extremo carboxílico terminal, lo cual parece explicar la especificidad inusualmente amplia de sustrato que caracteriza a las TrxR (Gromer *et al.*, 1997).

Las TrxR de mamíferos se presentan en dos isoformas relativamente abundantes, una citosólica/nuclear TrxR1 (también llamada Txnrd1 o TR1) y otra mitocondrial Trx2 (también denominada Txnrd2, TR3 o TxnR2). Una tercera isoforma TrxR3

(también llamada Trnr3, TR2, TxnR3 o TGR) se expresa principalmente en células testiculares (Reeves y Hoffmann, 2009). Sus dos subunidades homólogas adoptan una conformación en su estructura de cabeza a cola. El FAD de cada subunidad se encuentra muy próximo a las cisteínas redox 59 y 64 del extremo N-terminal.

En cambio, en el caso de la variante de TrxR tipo selenoproteína, el sitio activo se ubica próximo a la cisteína 497 y selenocisteína 498, residuos activos del extremo C-terminal. La catálisis de esta enzima se lleva a cabo mediante un mecanismo tipo *ping-pong*, el cual se ilustra en la figura 4.

En principio, la enzima completamente oxidada (especie 1) es reducida por un equivalente de NADPH que dona dos electrones al FAD (especie 2). El FAD reducido transfiere un electrón a la cisteína 59 y comparte el otro con la cisteína 64, formando un complejo de transferencia de carga estable (especie 3). Seguidamente, el sitio activo N-terminal reduce el selenilsulfuro C-terminal de la otra subunidad a selenoltiol (especie 4). El FAD puede ahora de nuevo transferir electrones desde el NADPH al disulfuro regenerado en el sitio activo N-terminal, generando un complejo de transferencia de carga con la cisteína 64 (especies 5 y 6).

La mayoría de los sustratos de la TrxR1 son reducidos por el motivo selenoltiol C-terminal, lo cual restablece el selenilsulfuro, quedando este habilitado para recibir electrones desde la cisteína N-terminal nuevamente. Usando Trx2, varios sustratos también parecen ser reducidos por especies 3 *in vitro* (Prast-Nielsen, 2009).

Los agentes electrofílicos pueden modificar químicamente el selenolato del sitio activo C-terminal, presente en las especies 4-6, para formar las especies 7-9. Esto conduciría a formas de la enzima incapaces de reducir a la Trx y a la mayoría de los sustratos. Con el sitio activo N-terminal intacto, sin embargo, ciertos sustratos tales como las quinonas (Q) aún pueden ser reducidos (Prast-Nielsen, 2009).

El sistema tioredoxina en cáncer

En muchos tumores se observan altos niveles de Trx y TrxR en relación con las células saludables del mismo paciente. Esto se presenta en cánceres de tumores

sólidos, linfomas y leucemias. Asimismo, la mayoría de las células transformadas secretan altos niveles de Trx y TrxR al medio. Las Trx manifiestan diferentes funciones en las células malignas que dependen del estado de desarrollo del cáncer. En las primeras etapas, la Trx puede prevenir el cáncer debido a su capacidad para contrarrestar el estrés oxidativo causado por muchos carcinógenos. Una vez que se inicia el fenotipo canceroso, entonces altos niveles de Trx pueden sostener el desarrollo del cáncer debido a su capacidad para promover el crecimiento y controlar la apoptosis (Tonissen y Di Trapani, 2009).

En etapas tardías de la progresión del cáncer, la Trx estimula la angiogénesis y la metástasis, mostrando que es capaz de regular la expresión del factor de crecimiento endotelial y de modular también la actividad de varios integrantes de la familia de metaloproteinasas de matriz (Tonissen y Di Trapani, 2009).

Altos niveles de TrxR también han sido relacionados con la resistencia a drogas quimioterapéuticas tales como cisplatino y docetaxel. El docetaxel es una de las

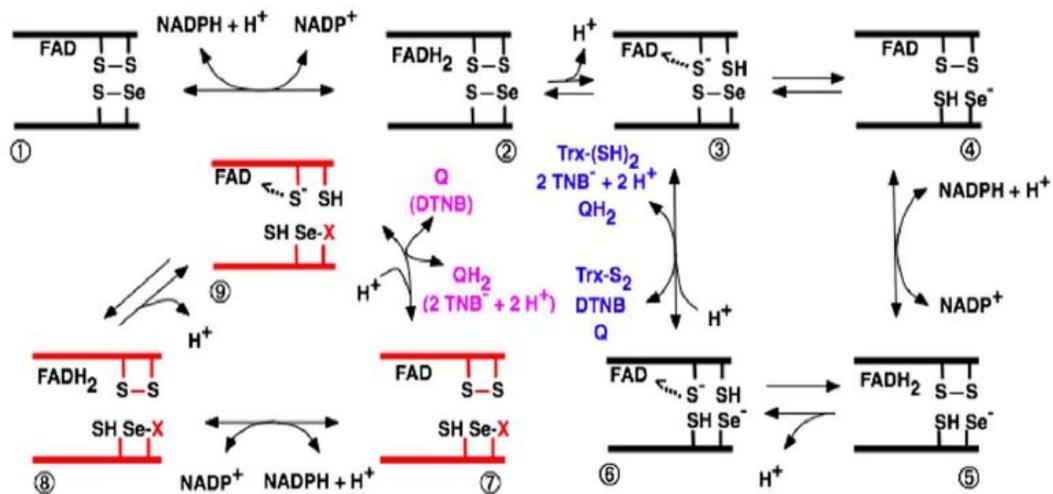


Figura 4. Ciclo catalítico de la TrxR de mamífero. Las especies 1-6 completan el ciclo normal de reacciones de la enzima. Las especies 7-9 se corresponden con reacciones que se llevan a cabo bajo la inhibición de un agente electrofílico X. La Trx es uno de principales sustratos de la TrxR, la reacción que se lleva a cabo con este sustrato es: $\text{Trx-S}_2 + \text{NADPH} + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{Trx-(SH)}_2 + \text{NADP}^+$. **Fuente:** Arnér (2009).

drogas antineoplásicas más potentes empleadas en cáncer de pecho; no obstante, una cantidad considerable de pacientes no responden al tratamiento. Estos pacientes presentan niveles más altos de Trx que los pacientes que sí responden al docetaxel. Adicionalmente, los pacientes con cáncer de pecho que expresan niveles incrementados de Trx antes de someterse a tratamiento, tienen una mayor posibilidad de desarrollar resistencia al docetaxel durante la fase del tratamiento propiamente. (Tonissen y Di Trapani, 2009).

Esto sugiere por un lado, que la medición preliminar de los niveles de Trx es fundamental para la selección del régimen terapéutico adecuado, y, por el otro, que permitiría identificar los pacientes que requerirían de un tratamiento previo contra la Trx o como terapia coadyuvante. Por esta vinculación del sistema Trx con muchos cánceres, hay mucho interés en el desarrollo de drogas que puedan dirigirse al sistema Trx, ya sea para que actúen solas o en combinación con otras drogas de quimioterapia (Tonissen y Di Trapani, 2009).

Inhibición del sistema tioredoxina

En los últimos años, se ha estado desarrollando un gran número de agentes terapéuticos contra el sistema Trx, con el propósito de tratar el cáncer o de complementar las terapias ya existentes. Regular el sistema Trx resultaría en la modulación del estado de redox intracelular que favorecería que los blancos celulares de interés alcancen la apoptosis debido a la acumulación de ERO. La inhibición de la Trx podría acarrear otras secuelas tales como la activación de la cinasa reguladora de señalización apoptótica (ASK1), la inhibición de la nitrosilación de la procaspasa 3 y la inhibición del NF- κ B. En todas estas circunstancias, se estimularía la apoptosis dentro de la célula (Tonissen y Di Trapani, 2009).

Los reactivos quimioterapéuticos pueden ser dirigidos tanto a la Trx como a la TrxR. Una TrxR no funcional resultaría en niveles disminuidos de la Trx reducida en la célula que comprometería la función redox de esta proteína. La afectación de la

TrxR también tendría efectos adicionales, ya que esta enzima tiene otros sustratos que la reducen directamente sin la intervención de la Trx. (Tonissen y Di Trapani, 2009).

Algunas drogas también son capaces de convertir a la TrxR en un sistema generador de ERO, en oposición a su habitual función como enzima defensiva. En la figura 5 se resumen los efectos de la inhibición de la TrxR y sus posibles consecuencias fisiológicas (Tonissen y Di Trapani, 2009).

Ya se encuentran a la disposición como quimioterapéuticos contra el cáncer, unos pocos inhibidores del sistema Trx. Entre estos pueden mencionarse los dirigidos a la TrxR, tales como el trióxido de arsénico, para el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda, con aprobación de la agencia estadounidense para la administración de drogas y alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) desde el 2000; y el cisplatino, para el tratamiento de cáncer (avalado por la FDA desde 1978), generalmente combinado con otras drogas. (Tonissen y Di Trapani, 2009).

Contra la Trx1 (una variante citosólica de la Trx) se cuenta con el inhibidor de histona deacetilasa SAHA (siglas de la frase inglesa *suberoylanilide hydroxamic acid*), destinado al tratamiento de linfoma cutáneo de células T (aprobado desde el 2006 por la FDA). Un grupo más amplio de otros inhibidores se están sometiendo a ensayos clínicos y preclínicos, siendo la mayoría dirigidos a la TrxR. Entre estos destacan las sales o complejos basados en oro, tal es el caso de la AF, una droga antiartrítica aprobada por la FDA desde 1985 (Tonissen y Di Trapani, 2009).

Sales de oro y sus efectos sobre la tioredoxina reductasa

Como ya se ha visto, abundantes evidencias apoyan la hipótesis de la participación de la Trx en la fisiopatología de enfermedades crónicas. Esta hipótesis ha sido reforzada por el hecho de que la actividad de la interleucina 1, un importante mediador en la AR, es aumentada por la Trx reducida, la cual por sí sola, es un factor de crecimiento en los tejidos linfáticos (Wakasugi *et al.*, 1990).

Adicionalmente, algunos datos más recientes subrayan la potencial participación de la enzima TrxR en la patogénesis de la AR. Por una parte, las drogas antiartríticas

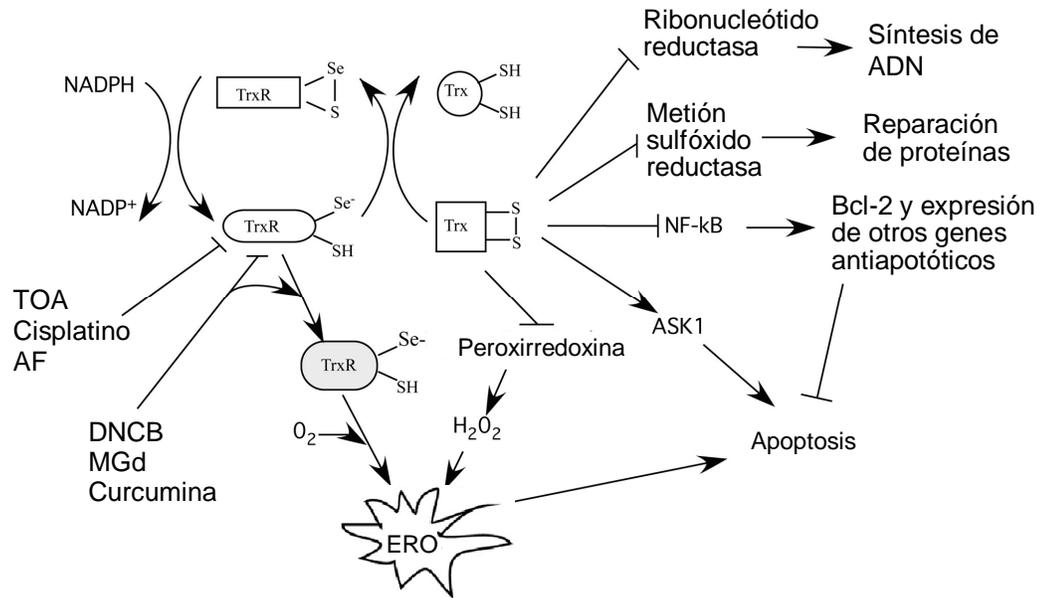


Figura 5. Consecuencias de la inhibición de la TrxR. La inhibición de la TrxR resulta en niveles incrementados de Trx oxidada y la disminución de la Trx reducida. La Trx es por lo tanto incapaz de activar los sustratos indicados, lo que implica la inhibición de funciones celulares que incluyen la reducción de la síntesis de ADN, reparación proteica, actividad de factores transcripcionales y función peroxidasa, acarreado acumulación de peróxido de hidrógeno y radicales libres. Esto conduce a condiciones de estrés oxidativo que promueven apoptosis. Otra consecuencia es que la Trx oxidada no puede represar ASK1, permitiendo que este inicie la apoptosis. Adicionalmente, algunos inhibidores alteran a la TrxR de tal manera que adquiere una función oxidasa que causa acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Inhibidores de la TrxR: **TOA**, trióxido de arsénico; **DNCB**, 1-cloro-2,4-dinitrobeneno; **MGd**, Motexafin gadolinium; curcumina, un flavonoide; cisplatino y AF, complejos metálicos. **Fuente:** modificado de Tonissen y Di Trapani (2009).

aurotioglucosa y AF inhiben la TrxR *in vitro* (Gromer *et al.*, 1998), mientras que la aurotioglucosa la inhibe *in vivo* (Smith *et al.*, 1999). Por otra parte, se ha hallado que los niveles de Trx y TrxR en el fluido sinovial y tejidos (mas no en plasma) están significativamente aumentados en los pacientes que padecen de AR. Esto no ha ocurrido en individuos con otras enfermedades de las articulaciones (Maurice *et al.*, 1999).

El aspecto más destacable de los efectos de la aurotioglucosa y la AF sobre la actividad TrxR, es que las IC₅₀ sobre esta enzima son muy bajas. En efecto, Gromer *et al.* (1998) señalaron que para la AF, el IC₅₀ es de apenas 20 nmol/L, mientras que

el correspondiente a la aurotioglucosa es de 65 nmol/L. Posteriormente, esos resultados fueron confirmados por otros grupos de investigadores quienes estudiaron, además de AF, otros iones y derivados metálicos que contienen oro (en sus estados de oxidación I y III), así como zinc, estaño, platino y cadmio (Rigobello *et al.*, 2004). En la tabla 2, se resumen los IC₅₀ reportados en ese trabajo.

De la tabla 2, se deduce que la potencia inhibitoria de la AF es mucho mayor que las del resto de las sales o complejos metálicos ensayados, sugiriendo que esa elevada especificidad podría ser la clave de sus efectos terapéuticos. Además, los datos presentados en la tabla 2, también muestran que todos los complejos de oro (I y III) son potentes inhibidores de la TrxR.

Estos resultados hacen suponer que el oro en los compuestos es el agente inhibidor de la TrxR. Las bases de esta suposición son las siguientes: 1) se ha demostrado que el ligando tioglucosa y tetraacetato de tioglucosa (presentes en la aurotioglucosa y la AF, respectivamente) no son inhibidores de la TrxR en el intervalo de concentraciones ensayado (Gromer *et al.*, 1998); 2) el agente quelante de oro 2,3-ditiopropanol, es capaz de evitar y de revertir la inhibición de TrxR causada por tres compuestos diferentes (aurotioglucosa, AF y tricloruro de oro) que solamente tienen en común la presencia de oro en su estructura (Gromer *et al.*, 1998); 3) los selenoles exhiben una mayor tendencia que los tioles a enlazar los iones de los metales pesados (Ganther, 1999).

Tabla 2. Efectos de compuestos metálicos sobre la TrxR mitocondrial

Nombre de la sal o complejo	IC ₅₀ (μmol/L)	Nombre de la sal o complejo	IC ₅₀ (μmol/L)
AF (oro I)	0,020	Aubipyxil (oro III)	0,21
TEPAu (oro I)	0,065	Tributilestaño	76,1
Aurotiomalato (oro I)	0,280	Cisplatino	36,0
Aupy (oro III)	1,42	Acetato de cadmio	23,5
Audien (oro III)	0,42	Acetato de zinc	19,5
Aubipy (oro III)	0,28	Piritionato de zinc	11,8

Fuente: Rigobello *et al.* (2004).

Estos hallazgos han permitido sugerir que el centro activo redox de la TrxR, constituido por los aminoácidos contiguos cisteína y selenocisteína presentes en el extremo carboxílico terminal, es el blanco de los inhibidores (Zhong *et al.*, 1998). La baja sensibilidad de la glutatión reductasa (que no contiene selenio) a la inhibición por AF y aurotioglucosa (Gromer *et al.*, 1998) apoya esa sugerencia debido a que dicha enzima está muy relacionada a la TrxR, estructural y mecanicistamente. Esto es importante debido a que el tricloruro de oro (AuCl_3), el cual no tiene uso terapéutico a causa de su alta toxicidad, es un fuerte inhibidor de la glutatión reductasa (Gromer *et al.*, 1998). Es decir, el AuCl_3 inhibe potentemente tanto a la glutatión reductasa como a la TrxR, mientras que la AF y la aurotioglucosa, a las mismas concentraciones que las de AuCl_3 , solo inhiben a la TrxR, sugiriendo que los complejos de oro (I) son altamente específicos para la TrxR.

Consecuencias biológicas de la inhibición de la TrxR por las sales de oro

Varias son las investigaciones que han aportado elementos sobre la importancia de la inhibición de la TrxR dependiente de los derivados de oro. En mitocondrias de hígado de rata se demostró que la AF junto con el ion calcio (Ca^{2+}), es un inductor eficiente de la permeabilización de la membrana mitocondrial (Rigobello *et al.*, 2002). La permeabilización fue monitorizada mediante el hinchamiento mitocondrial, este proceso ocurrió paralelamente con la supresión del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) y sin consecuencia sobre la respiración de esa organela.

En un estudio ulterior, se estudió la liberación mitocondrial del citocromo *c* en presencia de la AF y se concluyó que la inhibición específica de la TrxR podría ser el evento determinante para inducir la permeabilización de la membrana mitocondrial y la subsecuente expulsión del citocromo *c* (Rigobello *et al.*, 2004). Este último hallazgo es importante debido a que la secreción mitocondrial del citocromo *c* conduce a la conocida vía intrínseca de la apoptosis (Chen *et al.*, 2003). Asimismo, y de gran significación, se demostró posteriormente que a niveles nanomolares, la AF, estimula la producción de peróxido de hidrógeno en mitocondrias aisladas de

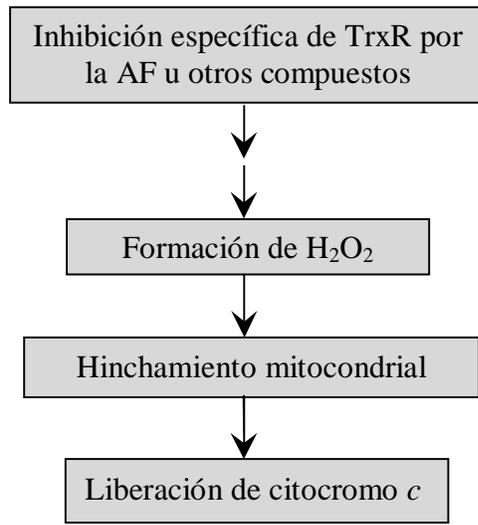


Figura 6. Posible secuencia de eventos que conducen a la secreción de citocromo *c* por mitocondrias aisladas tratadas con compuestos capaces de inhibir la actividad de la TrxR. **Fuente:** modificado de Rigobello *et al.* (2005).

corazones de rata (Rigobello *et al.*, 2005). La figura 6 muestra la secuencia de eventos que fue propuesta.

El incremento de generación de ERO mediada por la AF a concentraciones nanomolares, había sido demostrado previamente por Vint *et al.*, en 1994, en linfocitos T activados por mitógenos. Esos investigadores propusieron que los efectos terapéuticos de la AF ocurrían por la modulación de ERO, y que probablemente también podrían atribuirse los mismos a otras sales de oro. También argumentaron la posibilidad de que otros tipos celulares acusaran efectos similares, sugiriendo una razonable base para los conocidos efectos adversos que estas drogas promueven.

No obstante, en vista del desconocimiento para ese entonces de la inhibición que las sales de oro ejercían sobre TrxR, estos investigadores solo consideraron los efectos del bloqueo de la síntesis del antioxidante GSH (usando butionina sulfoximina, BSO) sobre la producción de ERO. Además, sus ensayos sugirieron que, en los casos de algunas enfermedades autoinmunes, en las que las defensas

antioxidantes intracelulares (GSH, Trx, entre otras) hayan sido disminuidas, el subsecuente estrés oxidativo puede ser potenciado por las sales de oro, acarreado apoptosis como consecuencia de dichos efectos.

CAPÍTULO III METODOLOGÍA

Compuestos de oro y reactivos

Los compuestos de oro [2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-(tio-*k*S)- β -D-glucopiranosato] (trietilfosfina)oro(I) (AF), hexafluorofosfato de (trifenilfosfina) (clotrimazol)oro(I) (CTZAu), hexafluorofosfato de (trifenilfosfina)(cloroquina)oro(I) (CQAu) y [bis(2-mercapto-1-metilimidazol-3-il)borato](trifenilfosfina)oro(I) (BmAu), fueron gentilmente suministrados por la Dra. Maribel Navarro, del Laboratorio de Química Bioinorgánica del Centro de Química del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Venezuela. De los cuatro compuestos de oro, se prepararon soluciones madres de 10 mmol/L en dimetilsulfóxido (DMSO) y a partir de éstas, se obtuvieron las soluciones de trabajo de 1–1000 μ mol/L. De la casa Sigma, fueron adquiridos los siguientes reactivos: DMSO Hibri-Max, catalasa (13500 U/mg sólido), bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT) al 98%, ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) al 99%, t-octilfenoxi polietoxietanol (Triton X-100), albúmina de suero bovino (ASB) al 96%, glutamina (200 mmol/L), medio de cultivo RPMI 1640 (con L-glutamina y sin bicarbonato de sodio), L-butionina-[S,R]ssulfoximina (BSO) al 99%; solución de penicilina (10 000 U/mL) y estreptomycinina (10 mg/mL), reactivo Bradford, solución salina de tampón fosfato Dulbecco (PBS, por sus siglas en inglés), glutatión reducido (GSH), TrxR de hígado de rata. El bicarbonato de sodio (NaHCO_3) al 99,7% se adquirió de Riedel-de Haen (Alemania). El suero fetal bovino (SFB) fue suministrado por JRH Biosciences (USA). El isopropanol al 99% se obtuvo de Centerlab (Venezuela).

Condiciones de cultivo celular

La línea celular de linfocitos T leucémicos *Jurkat* (donada por el Centro de Medicina Experimental del IVIC) se cultivó en medio de RPMI 1640, complementado con SFB

al 10% v/v y glutamina 1 mmol/L a un pH de 7,4 (ajustado con Hepes 500 mmol/L) en atmósfera húmeda de CO₂ al 5% en aire, a 37 °C. El SFB se inactivó térmicamente a 56 °C por 30 min. El medio de cultivo se preparó disolviendo 10,4 g de RPMI 1640 sólido, 1 g de NaHCO₃ por cada litro de solución; adicionalmente, se complementó con 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina, y finalmente se esterilizó por filtración con membranas de 0,2 µm.

Citotoxicidad y proliferación determinada con el ensayo de MTT

El ensayo de MTT es un método colorimétrico para medir viabilidad celular que se basa en la ruptura reductiva del anillo tetrazólico del MTT a través del sistema succinato deshidrogenasa de las mitocondrias funcionales, que conduce a la formación de formazán, un derivado insoluble en agua de color púrpura; la cantidad de formazán, medida espectrofotométricamente, es proporcional al número de mitocondrias y por lo tanto al número de células viables de una muestra (Aziz *et al.*, 2005). Las células *Jurkat* se preincubaron con los complejos de oro en una microplaca de 96 pozos de la siguiente forma: se colocaron 100 µL de células *Jurkat* ($4,9 \times 10^5$ /mL) y 1 µL de compuesto de oro a diferentes concentraciones (0,1–5 µmol/L), mientras que al control se le agregó 1 µL de DMSO, solvente en el que estuvieron disueltos los compuestos de oro (de esta forma se hizo con los controles de todos los ensayos que se describen posteriormente). Seguidamente, se incubó la microplaca en atmósfera húmeda de CO₂ al 5% en aire, a 37 °C por 24, 48 y 72 h. Al finalizar la incubación, en cada pozo se colocaron 10 µL del colorante MTT (5 mg/mL) y se reincubó en las mismas condiciones del paso anterior por 4 h, para obtener los cristales del colorante formazán, los cuales se disolvieron con 100 µL una solución detergente (Triton X-100 al 10% v/v y HCl 0,1 M en isopropanol). Finalmente, se midió la absorbancia en un fotómetro de microplaca (Multiskan Ascent, Labsystems, USA) con filtro de 550 nm. La viabilidad de las células *Jurkat* se calculó mediante una curva de calibración.

Proliferación celular en presencia de butionina sulfoximina

En una microplaca de 96 pozos de fondo plano, se colocaron 100 μL de células *Jurkat* ($3,2 \times 10^5/\text{mL}$) y 1 μL de butionina sulfoximina (BSO) 1 mmol/L. Luego, la microplaca se incubó en atmósfera húmeda de CO_2 al 5% en aire, a 37 °C por 24 h, con el objeto de propiciar la inhibición de la síntesis de glutatión. Al finalizar el pretratamiento anterior, sobre cada pozo de la misma microplaca, se añadió 1 μL de compuesto de oro (concentraciones finales: 0,1–5 $\mu\text{mol/L}$) y previa homogeneización, se reincubó en atmósfera húmeda de CO_2 al 5% en aire, a 37 °C por 24 h adicionales. Por último, la viabilidad celular se determinó con el ensayo de MTT.

Determinación de glutatión

Para la determinación de GSH se empleó el ensayo colorimétrico del DTNB, que se basa en una reacción de óxido-reducción. El GSH presente en la muestra reacciona con el DTNB para producir el glutatión oxidado y el cromógeno ácido 5-mercapto-2-nitrobenzoico (TNB), que absorbe a 405 nm. Al finalizar el tratamiento bajo atmósfera húmeda de CO_2 al 5% en aire, a 37 °C por 24 h de las células *Jurkat* ($1 \times 10^7/\text{mL}$) con los compuestos de oro (0,01–10 $\mu\text{mol/L}$), se añadieron muestras de 0,25 mL de las suspensiones celulares, a 0,25 mL de ácido sulfúrico 80 mmol/L, se mezclaron y dejaron en reposo durante 10 min, a temperatura ambiente. Luego, se añadió 0,1 mL de tungstato de sodio al 10% m/v y se agitó por 10 min con *vortex*. Se centrifugó a 11 000 r. p .m. durante 10 min en una microcentrífuga, se conservó el sobrenadante y se determinó el contenido de GSH con el ensayo del ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) de la siguiente manera: 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 GSH se obtuvo por comparación con una recta de calibración del analito (0 a 6 nmol) que se preparó con patrones frescos.

Citotoxicidad de los compuestos de oro en presencia de catalasa

Se preparó una solución madre de catalasa (1×10^5 U/mL), disolviendo la cantidad del sólido en solución PBS (pH 7,4) y luego soluciones diluidas ($1 \times 10^3 - 5 \times 10^4$ U/mL). En dos microplacas de 96 pozos de fondo plano, se pretrataron varias muestras de 90 μ L de células *Jurkat* (1×10^6 /mL) con 10 μ L de soluciones madre o diluidas de catalasa según el caso. A los controles, en lugar de catalasa, se les añadieron 10 μ L de PBS (pH 7,4). Las microplacas se mantuvieron en un agitador orbital por 30 min. Posteriormente, a cada pozo se le agregó 1 μ L de cada compuesto de oro para las concentraciones finales de 1 μ mol/L (microplaca 1) y 10 μ mol/L (microplaca 2). Después de homogeneizar, se incubaron las microplacas en atmósfera húmeda de CO₂ al 5% en aire, a 37 °C; una de ellas por 24 h. Las células *Jurkat* viables se determinaron con el ensayo del colorante MTT.

Citotoxicidad de los compuestos de oro en presencia de albúmina

En tres microplacas de 96 pozos, se preincubaron durante 30 min alícuotas de 50 μ L de soluciones que contenían ASB a diferentes concentraciones (6, 60 y 600 μ mol/L en las microplacas 1, 2 y 3, respectivamente) y los compuestos de oro a 20 μ mol/L (todas las microplacas), todo disuelto en medio de cultivo. Seguidamente, en todos los pozos se colocaron 50 μ L de células *Jurkat* (2×10^6 /mL, resuspendidas en medio de cultivo fresco) para alcanzar las siguientes concentraciones finales: ASB: 3, 30 y 300 μ mol/L (microplacas 1, 2 y 3, respectivamente); células *Jurkat*: 1×10^6 /mL y compuestos de oro: 10 μ mol/L. En una cuarta microplaca, también se evaluó la concentración de ASB de 600 μ mol/L (un nivel muy próximo a la solubilidad de esta proteína en medio acuoso). Con este propósito, se resuspendió un paquete de células *Jurkat* previamente sedimentadas (a 2 000 r.p.m. durante 10 min en una microcentrífuga) con una mezcla de ASB a 600 μ mol/L y compuesto de oro a 10 μ mol/L (mezcla preparada con medio de cultivo 30 min antes de la resuspensión). De la suspensión resultante, se colocaron alícuotas de 100 μ L en la microplaca 4. Ésta finalmente se incubó en atmósfera húmeda de CO₂ al 5% en aire, a 37 °C por 2 h. Las

células *Jurkat* viables de todas las microplacas se midieron con el ensayo de MTT.

Constreñimiento de los linfocitos T *Jurkat* determinado por citometría de flujo

Las células *Jurkat* (1×10^6 /mL) se mezclaron con los compuestos de oro en una microplaca de 96 pozos: En cada pozo se colocaron 250 μ L de células y 2,5 μ L de compuestos de oro (concentraciones finales: 0,1–10 μ mol/L) y luego la microplaca se incubó en atmósfera húmeda de CO₂ al 5% en aire, a 37 °C por 24 h. Al finalizar la incubación, se homogeneizaron las células en los mismos pozos de la microplaca. Se centrifugaron 200 μ L de las células homogeneizadas a 2000 r. p. m. durante 5 min en viales de 500 μ L. En cada caso, se retiró todo el sobrenadante (medio de cultivo). Se resuspendió el sedimento de células con 200 μ L de solución PBS (pH 7,4). El análisis se realizó haciendo incidir radiación de láser de argón de 488 nm sobre las células y midiendo la luz dispersada lateralmente a 90° (*side scatter*) y frontalmente (*forward scatter*) con el citómetro de flujo BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, USA). 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 entre células encogidas y no encogidas. La distribución porcentual de las dos poblaciones celulares se calculó por análisis estadístico de los datos de dispersión con el programa BD FACSDiva versión 5.0. (2 006)

Actividad enzimática de la TrxR de hígado de rata

En una microplaca de 96 pozos de fondo plano, se preincubaron 100 μ L de solución de trabajo (tampón fosfato: 200 mmol/L [pH 7]; ASB: 0,4 mg/mL; EDTA: 20 mmol/L; NADPH: 0,5 mmol/L; TrxR de hígado de rata: 0,5 μ g/mL); con 1 μ L de los compuestos de oro durante 10 min. Luego, se añadieron 100 μ L de DTNB 6 mmol/L, disuelto en tampón fosfato 200 mmol/L, alcanzando los compuestos de oro concentraciones finales de 1–40 nmol/L. La reacción se inició inmediatamente con la adición de DTNB. En el proceso, el NADPH es oxidado a NADP⁺ y el DTNB es reducido al cromógeno TNB⁻. La absorbancia de este último se monitoreó a 405 nm por 80 min con un fotómetro de microplaca (Multiskan Ascent, Labsystems, USA).

Obtención de lisados celulares de linfocitos T *Jurkat*

Se centrifugó una suspensión con 2×10^6 de células *Jurkat* a 2 000 r. p. m. durante 5 min, para eliminar el medio de cultivo. El sedimento celular se resuspendió con 1 mL de tampón de inhibición preparado *in situ*, mezclando 940 μ L de PBS, 50 μ L de glucosa 200 mmol/L y 10 μ L de compuesto de oro 0,01–1 mmol/L (a los controles se les agregaron 10 μ L de DMSO). Luego, se incubó por 2 h en atmósfera húmeda de CO₂ al 5% en aire y a 37 °C. Nuevamente, se centrifugó a 2 000 r. p. m. durante 5 min y se retiró el sobrenadante, se lavaron las células *Jurkat* con 500 μ L de PBS Dulbecco. Se resuspendió el sedimento celular con 125 μ L de tampón de lisis preparado previamente [CelLytic™ M 189:200; Na₂EDTA: 1 mmol/L; NaCl: 50 mmol/L y coctel inhibidor de proteasas (aprotinina, bestatina, E-64, leupeptina, pesptatina A) con dilución 1:200]. Se incubó por 15 min en un agitador *vortex* a velocidad moderada. Finalmente, se centrifugó durante 15 min a 14 000 r. p. m., para obtener el lisado celular (sobrenadante).

Actividad enzimática de la TrxR de los lisados de células *Jurkat*

La actividad enzimática de la TrxR del lisado celular se ensayó de la siguiente manera: se transfirieron 100 μ L de lisado celular a una microplaca de 96 pozos de fondo plano y se mezclaron con 90 μ L de DTNB 5 mmol/L (disuelto en tampón fosfato 100 mmol/L). La mezcla se dejó reposar por 10 min, seguidamente se añadieron 10 μ L de NADPH 9 mmol/L e inmediatamente se monitoreó la absorbancia a 405 nm por 20–60 min en un fotómetro de microplaca

Concentración proteica de los lisados celulares

Se colocaron 250 μ L del reactivo de Bradford previamente agitado en los pozos de una microplaca de 96 pozos de fondo plano, luego se añadieron 5 μ L de patrones de BSA (0,25–1,4 mg/mL) y 5 μ L de cada uno de los lisados celulares. En los pozos blanco se colocaron 5 μ L de agua desprovista de iones. Se agitó durante 15 s a 720

r. p. m. con el agitador del fotómetro de microplaca. Se incubó por 10 min. Luego se midieron las absorbancias a 595 nm en el fotómetro de microplaca.

Potencial de membrana mitocondrial determinado con sonda fluorescente

Este ensayo se realizó utilizando el kit de citometría de flujo BD™ Mitoscreen (BD Biosciences), llevando a cabo algunas modificaciones al procedimiento sugerido por el fabricante. Los reactivos del kit se prepararon de la siguiente forma: 1) tampón de ensayo: el tampón original se calentó a 37 °C para disolver los cristales no disueltos, se diluyó 1:10 con agua libre de iones y se agitó durante 5 min. 2) Solución de trabajo de yoduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbocianino (JC-1): el colorante liofilizado JC-1 provisto por el kit, se disolvió con 125 µL de DMSO, se diluyó con el tampón de ensayo 1:100, agitando vigorosamente con *vortex*, se centrifugó a 13 000 × g por 3 min, se descartaron los cristales no disueltos y se conservó el sobrenadante para su uso posterior como solución de trabajo.

Por otro lado, en una microplaca de 96 pozos, se colocaron 100 µL de células *Jurkat* (2×10^6 /mL), 98 µL de medio RPMI 1640 complementado y 2 µL de compuestos de oro (concentraciones finales: 1–10 µmol/L), luego se incubó en atmósfera húmeda de CO₂ al 5% en aire, a 37 °C por 4 h. Se centrifugaron las células tratadas con los compuestos de oro a 2 500 r. p. m. durante 5 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento celular con 0,5 mL de solución de trabajo de JC-1, agitando suavemente con *vortex*; se incubó en atmósfera húmeda de CO₂ al 5% en aire, a 37 °C por 15 min, se centrifugó a 2 500 r. p. m. durante 5 min, se lavó el sedimento con 2 mL de tampón de ensayo, se centrifugó a 2 500 r. p. m. por 5 min; y se repitió el lavado con 1 mL de tampón de ensayo. Después de centrifugar, se resuspendió nuevamente el sedimento celular con 0,5 mL de tampón de ensayo y se procedió al análisis con el citómetro de flujo BD FACSCanto™ II,

Para el análisis por citometría de flujo, se inyectó automáticamente la muestra y se procedió a hacer incidir radiación de láser de argón de 488 nm sobre las células, con el propósito de excitar a las moléculas de la sonda JC-1 y medir la fluorescencia

verde a 527 nm emitida por los monómeros de JC-1 y la fluorescencia roja a 590 nm, emitida por los agregados-J (arreglos supramoleculares que se forman por acción del potencial de membrana mitocondrial). Se registraron 10 000 eventos y el perfil de fluorescencias roja y verde de las células, se plasmó en un gráfico de puntos que permitió observar indirectamente el cambio del $\Delta\psi_m$. La distribución porcentual de las dos poblaciones (células con mitocondrias polarizadas y células con mitocondrias despolarizadas) se calculó por análisis estadístico de los datos de fluorescencia, usando el programa BD FACSDiva versión 5.0 (2006)

Viabilidad celular determinada por exclusión de azul tripano

Las células *Jurkat* (1×10^6 /mL) se colocaron en una microplaca de 96 pozos con los compuestos de oro (0,1–10 $\mu\text{mol/L}$) en ausencia de BSO y se incubaron en atmósfera húmeda de CO_2 al 5% en aire, a 37 °C por 24 h. Por otro lado, el mismo número de células se pretrató con BSO 1 mmol/L por 24 h y luego se añadieron los compuestos de oro (0,01–5 $\mu\text{mol/L}$), manteniendo las mismas condiciones de incubación por 24 h adicionales. Posteriormente, se mezclaron 25 μL de células con 10 μL de azul tripano al 0,4% m/v. De esta mezcla, se colocaron 10 μL en un hemocitómetro y empleando un microscopio de contraste de fase con el objetivo 40X (Axiolab, Zeiss), se contaron al menos 150 células, de las cuales se computaron las células no viables (teñidas de azul), para así determinar el porcentaje de viabilidad.

Análisis estadístico

Los resultados del estudio se expresaron como las medias aritméticas de al menos tres experimentos independientes (salvo en algunos casos de una o dos réplicas, o ensayo representativo señalados oportunamente) con sus respectivas desviaciones estándares. En la mayoría de los casos estos resultados son mostrados a través de gráficos de barras o de dispersión. Las diferencias significativas entre las medias de los grupos experimentales se establecieron mediante el análisis de varianza de una sola vía, seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey, que permitió detectar diferencias entre los tratamientos al cotejar todas las medias entre sí. La prueba de

Tukey se aplicó en todos los ensayos salvo en los casos de *Citotoxicidad de los compuestos de oro en presencia de catalasa* (pág. 24), en los cuales se empleó la prueba de comparación múltiple de Dunnett de una sola cola, para detectar específicamente aquellos casos en que las medias de los tratamientos de interés fueran superiores a la media del tratamiento control. Todos estos análisis estadísticos se realizaron con los programas Statistix 8.0 (2 003) y MINITAB® Release 14.20 (2 005), ejecutados con el sistema operativo Windows.

Los IC50 de los compuestos de oro, derivados de los ensayos de actividad de las TrxR, se determinaron mediante la ecuación del Efecto Mediano (Chou, 2006), expresión que correlaciona la dosis (concentración) con los efectos que induce. Esta ecuación se define como $f_a/f_u = (D/D_m)^m$, donde D es la concentración del compuesto de oro, D_m es la concentración del compuesto de oro del efecto mediano (IC50), f_a es la fracción afectada por la concentración del compuesto de oro, f_u es la fracción no afectada (donde f_u = 1-f_a) y m es un exponente que denota la forma de la curva de concentración-efecto [hiperbólica (m=1), sigmoidea (m>1) o sigmoidea negativa (m <1)]. Los cálculos de D_m (IC50) se realizaron con el programa informático CalcuSyn versión 2.0 (1997) para Windows.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Crecimiento celular de los linfocitos T Jurkat

En la figura 7, se observa la proliferación celular en ausencia de compuestos de oro. Tras 48 y 72 h, el control mostró un crecimiento celular significativo y sostenido, evidenciado por el incremento paulatino de la absorbancia, que en el ensayo de MTT es una medida proporcional a la concentración de células viables.

Los linfocitos T *Jurkat* proliferaron en presencia de 0,1 $\mu\text{mol/L}$ de AF o BmAu. Sin embargo, la proliferación fue mínima con respecto al control, a las 48 y 72 h, evidenciándose un efecto antiproliferativo ligeramente significativo. A la misma concentración con CQAu o CTZAu, la proliferación de las células *Jurkat* fue igual al control desde el punto de vista estadístico. No obstante, a las 48 h, las células mostraron una ligera caída del crecimiento ante CQAu.

A mayores concentraciones, los efectos de los compuestos de oro fueron marcadamente antiproliferativos. A 1 $\mu\text{mol/L}$, se destaca sobre todo la AF, ya que la disminución de la absorbancia fue la más significativa a cualquiera de los tiempos evaluados. Pero, ha de notarse que a 1 $\mu\text{mol/L}$ de CQAu, las absorbancias de 24, 48 y 72 h no fueron significativamente diferentes entre sí; esto refleja una toxicidad claramente inferior de este compuesto de oro. Por su parte, a 5 $\mu\text{mol/L}$ los efectos antiproliferativos fueron extremos para todos los compuestos de oro, y principalmente, a las 48 y 72 h, ya que la presencia de células fue virtualmente inexistente.

Dada la alta afinidad de los compuestos de oro (I) por los tioles, ya que la proliferación es impedida en linfocitos T humanos estimulados por mitógenos cuando se ha suprimido el glutatión intracelular (Vint *et al.*, 1993), es plausible pensar que

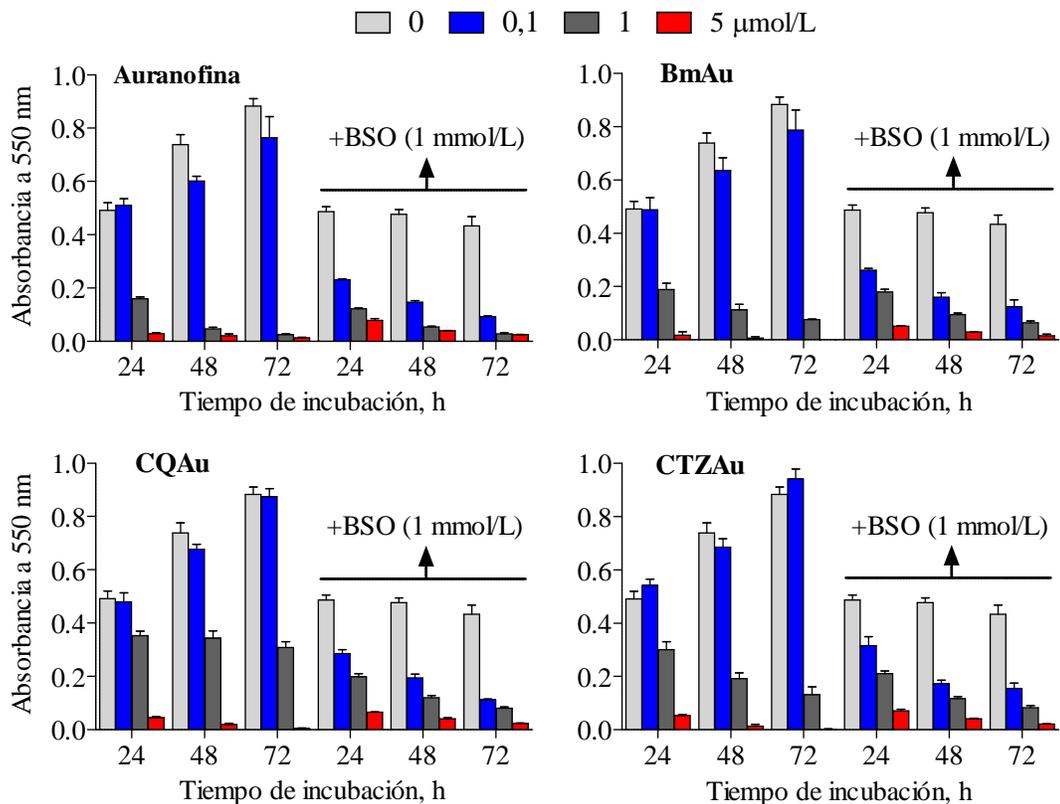


Figura 7. Proliferación de los linfocitos T *Jurkat*. Las células ($4,9 \times 10^5/\text{mL}$ y $3,2 \times 10^5/\text{mL}$ con BSO) fueron incubadas al inicio del cultivo con los compuestos de oro a las concentraciones indicadas. En los casos en que se usó BSO 1 mmol/L, el cultivo se inició después de 24 h de pretratamiento. Al cabo de 24, 48 y 72 h, se midió la absorbancia del colorante MTT a 550 nm. Cada barra es el promedio de al menos cinco ensayos independientes. Las diferencias significativas se encontraron mediante la prueba de Tukey: Sin BSO: $p < 0,001$ (AF); $p < 0,01$ (CQAu); $p < 0,05$ (CTZAu y BmAu). Con BSO: $p < 0,01$ (AF); $p < 0,05$ (CQAu, CTZAu y BmAu).

los efectos sobre la proliferación observados en este trabajo estén vinculados a una importante interacción entre el metal y los grupos $-\text{SH}$ de ciertas proteínas importantes y del GSH. Este último es el portador de tioles no proteicos de mayor abundancia. Por este motivo, se realizaron ensayos de proliferación con BSO, un inhibidor específico de la γ -glutamilcisteína sintetasa (enzima clave para la producción celular de GSH).

La inhibición efectiva de la síntesis de GSH se constató en un ensayo preliminar en el que las células *Jurkat*, se expusieron a la acción de 1 mmol/L de BSO durante

24 h. Al finalizar dicho tiempo, el contenido de GSH decayó desde $74,9 \pm 4,9$ hasta $29,2 \pm 1,0$ nmol/ 10^7 células ($p < 0,001$, $n = 5$). Debe destacarse que en la determinación colorimétrica de GSH con DTNB, puede producirse cromógeno adicional por reacciones laterales con otras moléculas no proteicas portadoras de tioles que podrían conducir a sobrestimaciones, por lo que la concentración de GSH posterior a la inhibición podría ser menor.

En el control con BSO, la concentración de linfocitos T *Jurkat* no se alteró hasta las 48 h, evidenciando la detención de la proliferación celular sin aparente pérdida de viabilidad, salvo a las 72 h que las células acusaron una leve efecto antiproliferativo significativo (figura 7). De manera análoga a los ensayos realizados sin BSO, los efectos antiproliferativos de los compuestos de oro fueron dependientes del tiempo, la cantidad de linfocitos cayó significativamente (figura 7), después de 48 y 72 h y los efectos sobre la supervivencia celular se hicieron más patentes, conforme se incrementaron las concentraciones de los compuestos de oro.

Ha de resaltarse que las absorbancias de los controles sin o con BSO a las 24 h de la incubación de los compuestos de oro, tuvieron niveles muy similares. Esto se debe a que en el ensayo con BSO, aunque la concentración celular inicial era menor, el pretratamiento con este inhibidor de GSH antes de añadir los compuestos de oro duró 24 h, lo que permitió probablemente una proliferación preliminar que equiparó las concentraciones celulares al inicio de la incubación de ambos ensayos. Este hecho es importante pues permite una comparación cualitativa de los resultados de ambos ensayos y apreciar un hallazgo resaltante: en todos los tiempos evaluados, los compuestos de oro a $0,1 \mu\text{mol/L}$ actuaron en forma sinérgica con la BSO, pues la concentración celular declinó considerablemente, en comparación con los casos en los que no estuvo presente la BSO. En cuanto a los efectos conjuntos de los compuestos de oro a 1 y $5 \mu\text{mol/L}$ con la BSO, los datos fueron similares a los obtenidos sin BSO, respectivamente.

Modificación del contenido del glutatión intracelular

Los complejos de oro pueden generar estrés oxidativo. Esto se ha evidenciado tanto en ensayos *in vitro* (Rigobello *et al.*, 2008; Cox *et al.*, 2008) como en experimentos *in vivo* (Sato *et al.*, 1995). En este sentido, es razonable considerar una potencial modificación de la cantidad intracelular de GSH, una de las principales defensas antioxidantes. Los datos de la figura 8 muestran que los compuestos de oro, a partir de 0,1 $\mu\text{mol/L}$, afectaron la cantidad de GSH intracelular en comparación con el control. Se pudieron distinguir dos tipos de comportamientos. Por un lado, el CQAu y el CTZAu indujeron un incremento significativo de GSH en los intervalos de 0,1–10 $\mu\text{mol/L}$ ($p < 0,01$) y de 1–5 $\mu\text{mol/L}$ ($p < 0,001$), respectivamente. Por otro lado, AF y BmAu exhibieron una conducta dual: elevación significativa del contenido de GSH para AF en el intervalo de 0,1–1 $\mu\text{mol/L}$ ($p < 0,01$) y para BmAu a 1 $\mu\text{mol/L}$ ($p < 0,5$); y abatimiento significativo de la concentración de GSH para AF en el intervalo de 5–10 $\mu\text{mol/L}$ ($p < 0,01$) y para BmAu a 10 $\mu\text{mol/L}$ ($p < 0,05$). Estos

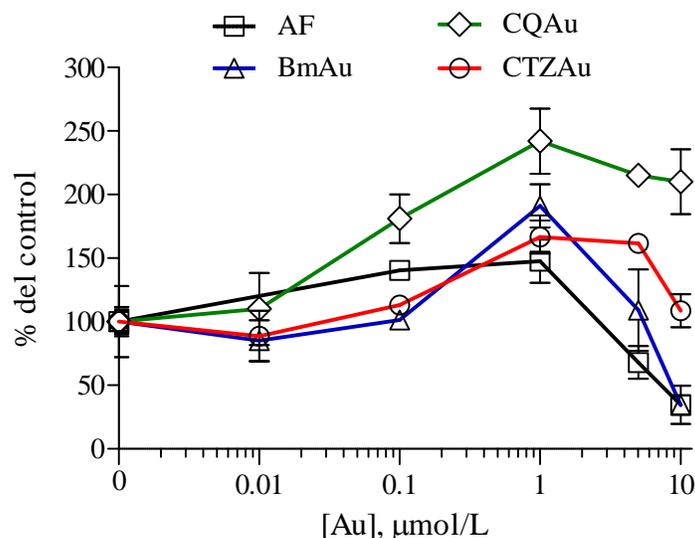


Figura 8. Alteración del contenido de glutatión intracelular de los linfocitos T *Jurkat*. Las células ($1 \times 10^7/\text{mL}$) fueron tratadas por 24 h con las concentraciones de oro señaladas y posteriormente en los lisados celulares obtenidos se midieron los niveles de glutatión intracelular. Cada punto en el gráfico es el promedio de tres ensayos independientes. Las diferencias significativas de cada serie de datos se determinaron mediante la prueba de Tukey y en el texto se señalan los detalles.

datos apuntan a que los incrementos de la cantidad de GSH intracelular, constituyen una reacción de defensa de los linfocitos T *Jurkat* frente a estímulos prooxidantes.

Protección de la catalasa contra la citotoxicidad de los compuestos de oro

El incremento de GSH observado en la figura 8 para todos los compuestos de oro, puede estar relacionado con una mayor producción de ERO. Si este es el caso, la coincubación con catalasa debería acusar un efecto protector sobre la viabilidad celular, al atenuar la acción oxidante del peróxido de hidrógeno (un tipo de ERO) inducido por los compuestos de oro.

En la figura 9, se muestran los efectos de los compuestos de oro sobre la viabilidad de los linfocitos T *Jurkat*, en presencia de cantidades variables de catalasa durante 24 h, a 1 y 10 $\mu\text{mol/L}$. En la figura 9A, para cualquier compuesto de oro puede verificarse la toxicidad, ya que en todos los casos sin catalasa, la viabilidad experimentó una caída sustancial respecto al control. Ahora bien, en el intervalo de concentraciones de catalasa evaluado, se observa protección moderada significativa a concentraciones bajas (100–1000 U/mL) y altas (10.000 U/mL); solo en el caso de CTZAu, a 1000 U/mL de catalasa, no hubo diferencia significativa. Estos datos sugieren, en términos generales, que el incremento de GSH observado podría estar asociado con la producción de ERO.

En la figura 9B, pueden observarse efectos de toxicidad más pronunciados, pero igualmente acompañados de protección parcial debida a la catalasa. Debe notarse que en ausencia de catalasa, las viabilidades celulares en presencia de CQAu y CTZAu, aun cuando fueron muy bajas, triplicaron o cuadruplicaron las viabilidades con AF y BmAu. Esto se corresponde con una protección de la enzima contra los últimos más eficaz que contra los primeros.

Las protecciones obtenidas en presencia de AF o BmAu, son sumamente significativas en todo el intervalo evaluado de concentraciones de catalasa; en cambio, se lograron protecciones moderadas para CQAu a 5.000 y 10.000 U/mL de la enzima; y sólo a 10.000 U/mL en el caso de CTZAu. Estos comportamientos

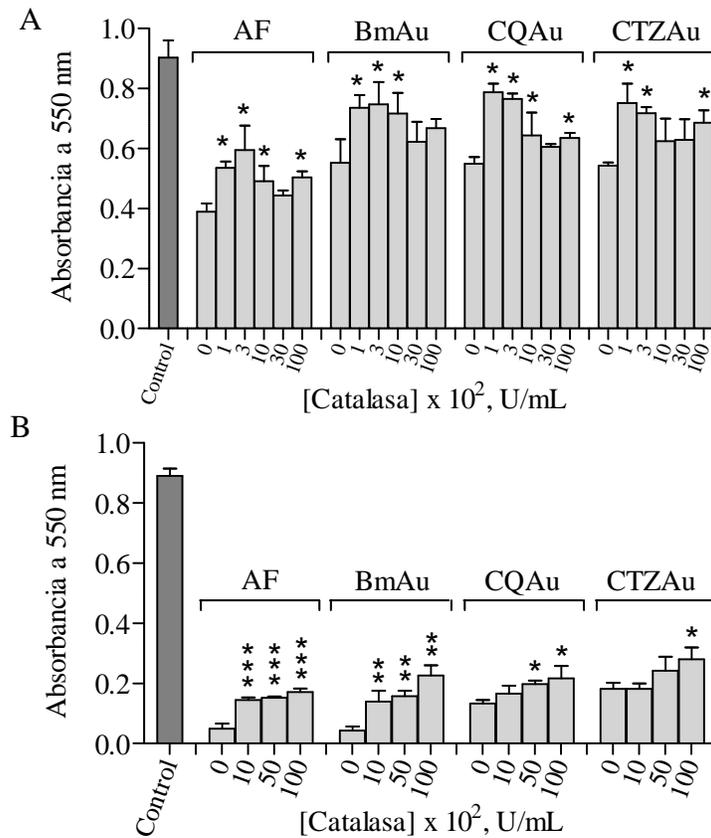


Figura 9. Efectos de diferentes dosis de catalasa sobre la toxicidad de los compuestos de oro en linfocitos T *Jurkat*. Las células (1×10^6 /mL) fueron pretratadas con catalasa a diferentes concentraciones y luego fueron incubadas con los compuestos de oro a $1 \mu\text{mol/L}$ (A) y $10 \mu\text{mol/L}$ (B) durante 20 h. Los efectos observados se obtuvieron usando el colorante de MTT. Cada barra en los gráficos es el promedio de tres ensayos independientes. Las diferencias significativas de cada subconjunto de datos se determinaron mediante la prueba de Dunnet de media cola. Los niveles de significación fueron $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) y $p \leq 0,001$ (***)

diferenciales guardan cierta correlación con la cantidad de GSH presente, a $10 \mu\text{mol/L}$ de los compuestos de oro.

La figura 8, muestra que en los casos de AF y BmAu, la cantidad de GSH respecto al control cayó hasta un 35% aproximadamente, mientras que este antioxidante con CQAu se duplicó y ante CTZAu permaneció constante. Es decir, podría postularse que a mayor cantidad de GSH intracelular, menor eficacia antioxidante se alcanza con la catalasa exógena. Esto sugiere diferencias

mecanicísticas entre los pares AF-BmAu y CQAu-CTZAu, bien sea en cuanto a la forma como inducen el estrés oxidativo o bien en cómo las células *Jurkat* encaran la toxicidad a dosis letales.

Abatimiento del potencial de membrana mitocondrial de las células Jurkat

Para indagar a qué tipo de muerte celular podría estar asociada la toxicidad observada en los resultados previos (figuras 7 y 9), se determinó a las 4 h mediante citometría de flujo con la sonda fluorescente JC-1, la pérdida del $\Delta\psi_m$, un evento apoptótico temprano que coincide con la activación de caspasas y que precede a la exteriorización de fosfatidilserina en la membrana plasmática (Mantymaa *et al.*, 2000, Korper *et al.*, 2003).

El fluorocromo JC-1 tiende a alojarse en el interior de las mitocondrias, cuando el $\Delta\psi_m$ está intacto, formando los denominados agregados-J que emiten fluorescencia roja. Las moléculas libres de JC-1 (que no forman agregados-J) prevalecen cuando el $\Delta\psi_m$ ha colapsado, es decir, cuando la membrana mitocondrial se ha despolarizado, y en ese caso emiten fluorescencia verde. El balance de ambas fluorescencias es una medida indirecta del mantenimiento o pérdida del $\Delta\psi_m$ por la acción de sustancias tóxicas.

El balance de fluorescencias en las células *Jurkat* pudo monitorearse por el cambio de las poblaciones de linfocitos que se divisaron en los gráficos de puntos obtenidos con citometría de flujo. En el panel superior de la figura 10, se recogen para cada compuesto de oro, series representativas de gráficos de puntos, que muestran en función de la concentración de los compuestos de oro, la evolución de las fluorescencias roja y verde del colorante JC-1. En dichos gráficos se pueden apreciar dos áreas demarcadas por dos polígonos contiguos: uno superior y otro inferior. Los números señalados en cada gráfico indican los porcentajes de células que se encuentran en tales áreas. A medida que se incrementó la concentración del compuesto de oro, la población de células del área inferior (P2) creció a expensas de

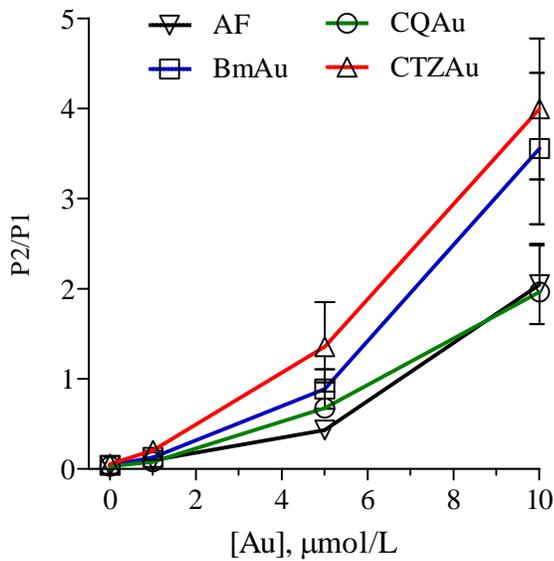
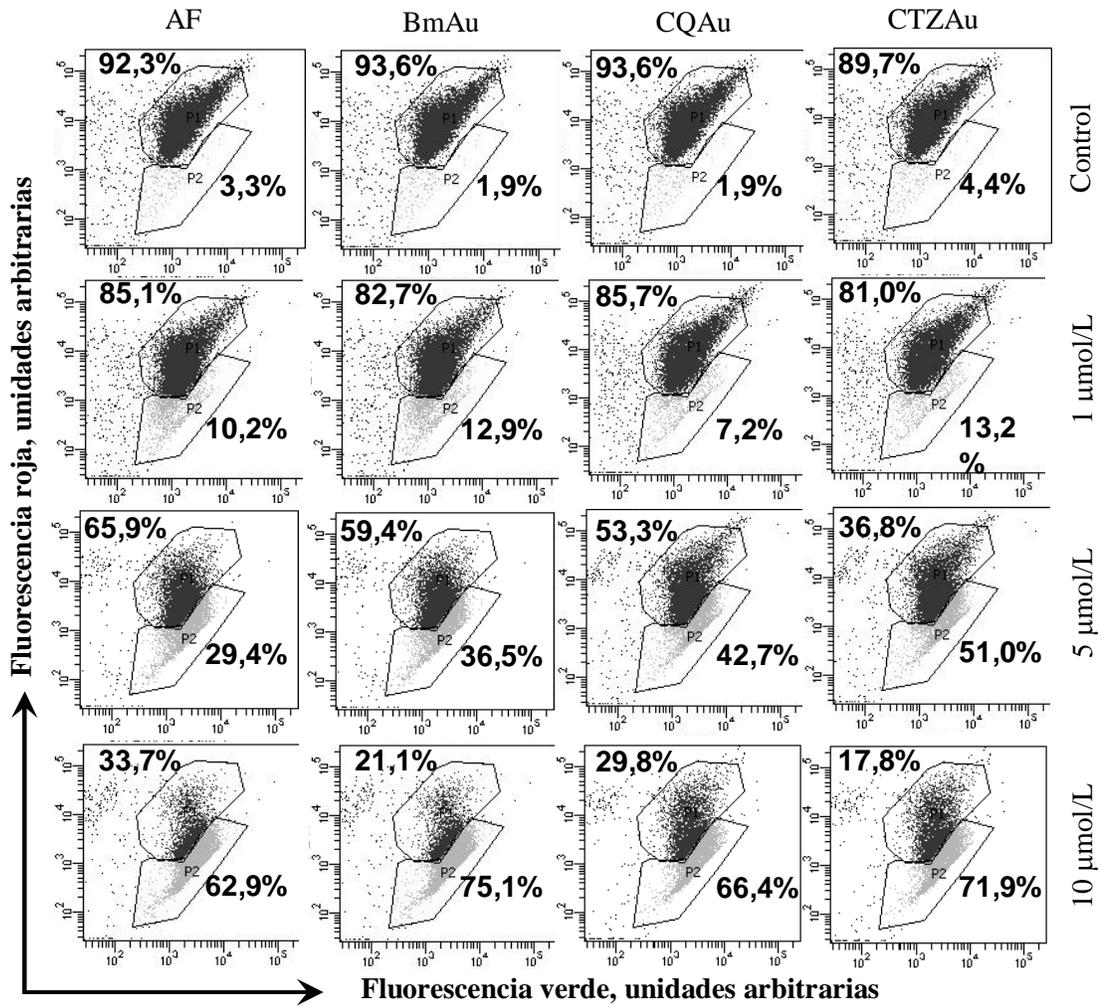


Figura 10. Variación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) de las células *Jurkat*. **Panel superior:** Gráficos de puntos obtenidos por citometría de flujo para un ensayo representativo de cada caso. En ellos se muestra, tras 4 h de tratamiento con los compuestos de oro, el balance relativo de fluorescencias roja y verde del colorante JC-1 dependiente del $\Delta\psi_m$ y la [Au]. **Panel inferior:** La variación del cociente de los porcentajes (P2/P1) es un buen indicador de la caída del $\Delta\psi_m$. Cada punto en el gráfico es el promedio de tres ensayos independientes. Las diferencias significativas de cada serie de datos se hallaron mediante la prueba de Tukey y en el texto se señalan los detalles.

la población del área superior (P1). Esto significa que a mayor toxicidad, menos células emitieron fluorescencia roja, lo que da cuenta de la merma en la cantidad de agregados-J, y, en consecuencia, del colapso del $\Delta\psi_m$ de las células *Jurkat*. Nótese, a grandes rasgos, que en los controles de cada serie, el porcentaje de células del área P2 no superó el 5%, y en la medida en que las células *Jurkat* fueron expuestas a los compuestos de oro, el porcentaje de P2 se incrementó por encima del 60%, con el concomitante decremento del porcentaje de la población P1.

Es conveniente observar estos hallazgos en términos de la variación de las tasas medias de P2/P1, ya que acusan, con mayor sensibilidad, los cambios registrados en los gráficos de puntos. Con este propósito, en el panel inferior de la figura 10, se reúnen en un gráfico de dispersión las variaciones de P2/P1, en función de la concentración de todos los compuestos de oro. Puede destacarse que en todas las series, las tasas medias de P2/P1 fueron diferentes estadísticamente: $p < 0,001$ para AF, BmAu y CTZAu y $p < 0,05$ para CQAu, respectivamente. Esto implica que las tasas P2/P1 son dependientes de la concentración en todo el intervalo (0–10 $\mu\text{mol/L}$). Finalmente, debe advertirse que la tasa P2/P1 se incrementó drásticamente (figura 10) en los casos de BmAu y CTZAu, alcanzando los valores más altos entre 3,5 y 4 unidades a 10 $\mu\text{mol/L}$, mientras que al tratarse de AF y CQAu, los valores rondaron las 2 unidades a la misma concentración, lo que mostró que los efectos del par BmAu-CTZAu sobre el $\Delta\psi_m$ fueron más potentes que los del par AF-CQAu.

Inhibición de la enzima tioredoxina reductasa

En el tratamiento de la AR son usados ampliamente los compuestos de oro, tales como la AF y la aurotioglucosa. Se sabe que estos compuestos reaccionan con residuos que contienen selenol; de hecho, la AF inhibe en cantidades estequiométricas a la TrxR humana (Gromer *et al.*, 1998), la cual posee una selenocisteína en su centro activo. Este hecho podría estar relacionado con la efectividad clínica de estos compuestos. En este sentido, establecer si el BmAu,

CQAu y CTZAu manifestaban una afinidad similar por la TrxR, fue un aspecto importante a dilucidar.

En la figura 11, se muestran algunas de las cinéticas enzimáticas de las TrxR murina y humana en presencia de los compuestos de oro y en la figura 12, se recogen los efectos de la inhibición de estos compuestos sobre las actividades específicas de estas dos enzimas.

En cuanto a la variante murina, los porcentajes de inhibición con respecto al control se evaluaron, incubando los compuestos de oro a concentraciones en el intervalo de 1 a 40 nmol/L. Las IC_{50} se ubicaron en el intervalo de 1,45 a 10,2 nmol/L, siendo la AF y el CTZAu, respectivamente, los compuestos de oro con mayor y menor poder inhibitorio.

Por su parte, la actividad de la TrxR intracelular se evaluó en los lisados de las células *Jurkat* obtenidos después de la preincubación de los complejos de oro (0,1–10 μ mol/L). Las IC_{50} se ubicaron entre 16,1 nmol/L y 434 nmol/L. Debe destacarse que los efectos inhibitorios observados tuvieron que ser dependientes del grado de penetración o solubilización intracelular de cada compuesto de oro frente a la membrana de los linfocitos. Tal penetrabilidad intracelular pareció favorecer más a la AF y menos al CQAu, ya que las correspondientes IC_{50} son la más baja y la más alta, respectivamente. La interacción de los compuestos de oro con la membrana celular propició un dinamismo a la inhibición de la TrxR que constituye un aspecto llamativo.

Posiblemente, la penetrabilidad intracelular de los compuestos de oro, condujo a un comportamiento diferencial con respecto al sistema libre de células. Obsérvese que la IC_{50} de la AF, en el caso de la TrxR humana, fue de 9 a 27 veces la de los otros compuestos de oro, contrastando claramente con los datos obtenidos para la TrxR murina en los ensayos libres de células, debido a que las IC_{50} de AF fueron de 2 a 7 veces la de los otros compuestos.

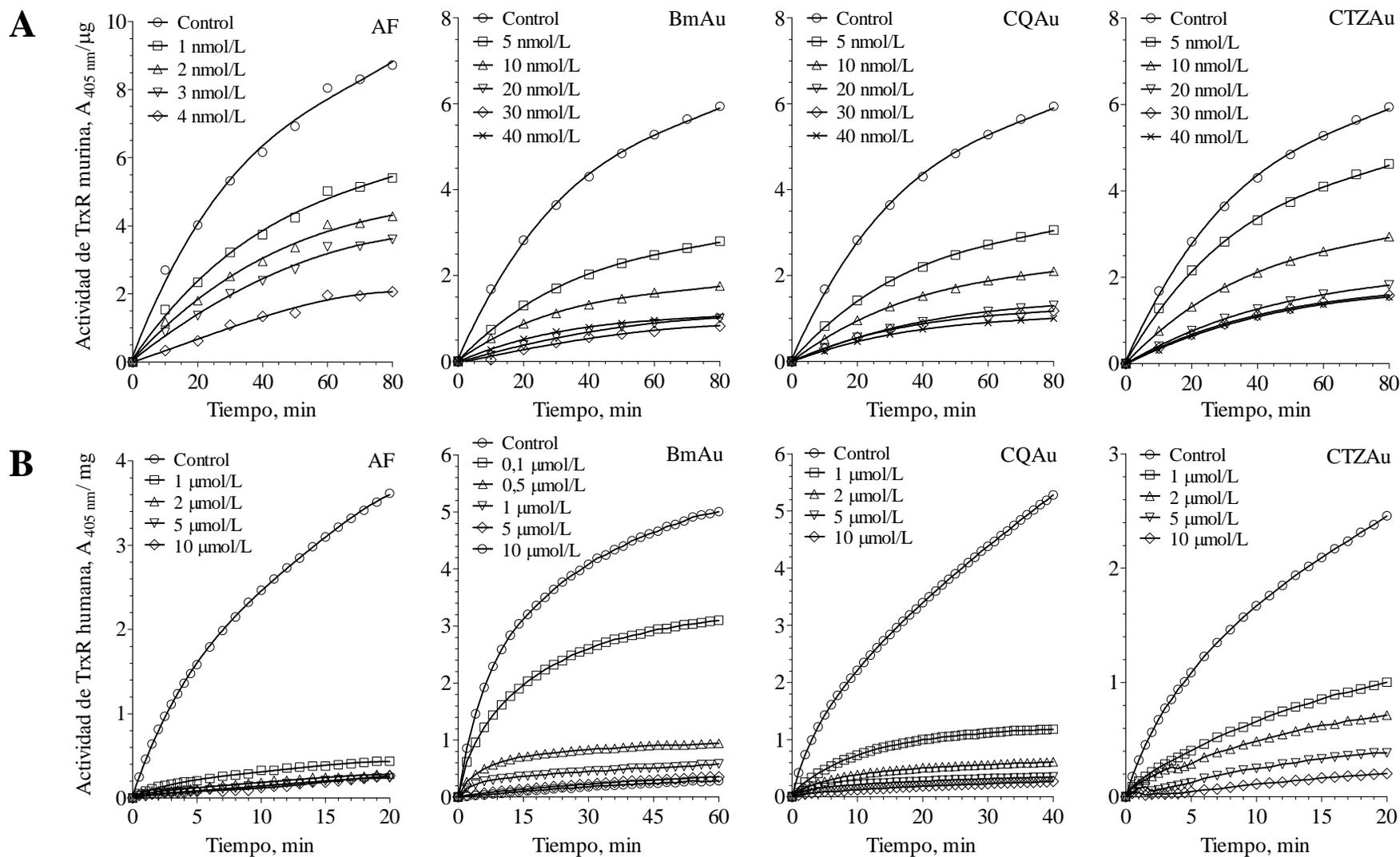


Figura 11. Cinéticas de óxido-reducción representativas de las enzimas TrxR murina y humana. Las actividades de la TrxR de hígado de rata (**panel A**) se evaluaron después de preincubar 0,05 µg de la enzima con los compuestos de oro durante 10 min, mientras que las actividades de la TrxR de células *Jurkat* (**panel B**), se evaluaron en lisados celulares obtenidos después de preincubar los compuestos de oro con 2×10^6 linfocitos durante 2 h, lavarlos y lisarlos. Las actividades enzimáticas se determinaron a través del ensayo de DTNB. Cada cinética se realizó por triplicado (las otras dos réplicas no se muestran).

Atenuación de las citotoxicidades de los compuestos de oro por ASB

Es bien conocido que el oro tiene una gran afinidad por los grupos tioles o sulfhidrilos (-SH) de moléculas pequeñas y de proteínas; por ejemplo, en condiciones *in vitro*, la albúmina experimenta reacciones casi completas con la AF y otros análogos (Roberts *et al.*, 1996). Esto explica por qué cerca del 25% de la AF permanece en el plasma, unida a la albúmina a través de cisteína e histidina después de ser administrada oralmente (Kean *et al.*, 1997). En consecuencia, valorar la toxicidad celular de los compuestos de oro en presencia de la ASB, tiene razonable pertinencia, pues constituye una aproximación a la situación fisiológica humana y podría implicar un potencial efecto modulador sobre sus toxicidades.

En la figura 13, pueden observarse las viabilidades de las células *Jurkat* en presencia de los compuestos de oro ensayados a 10 $\mu\text{mol/L}$ y con cantidades variables de ASB, con tiempos de exposición de 2 h. La curva superior del gráfico corresponde a los controles en ausencia de los compuestos de oro y a las concentraciones de ASB ensayadas, estos controles son los mismos, a efectos de comparar con los datos obtenidos de cualquier compuesto de oro.

Pueden distinguirse claramente dos comportamientos en el intervalo de [ASB] de 0 a 300 $\mu\text{mol/L}$: 1) la toxicidad de AF fue marcadamente más acentuada que la de los otros compuestos de oro, sin embargo, sus efectos sobre la viabilidad fueron revertidos progresivamente en una forma dependiente de la concentración, pues las medias de las viabilidades fueron todas significativamente diferentes ($p < 0,01$); 2) las viabilidades de las células *Jurkat* en presencia de BmAu, CQAu y CTZAu resultaron ser estadísticamente iguales dentro de cada serie (mismo compuesto) en el citado intervalo de [ASB]; no obstante, resultaron ser significativamente menores que las correspondientes viabilidades de cada control ($p < 0,001$ en las tres series). A 600 $\mu\text{mol/L}$ de ASB, situación similar a la concentración fisiológica *in vivo*, las viabilidades celulares en presencia de todos los compuestos de oro fueron estadísticamente idénticas al control.

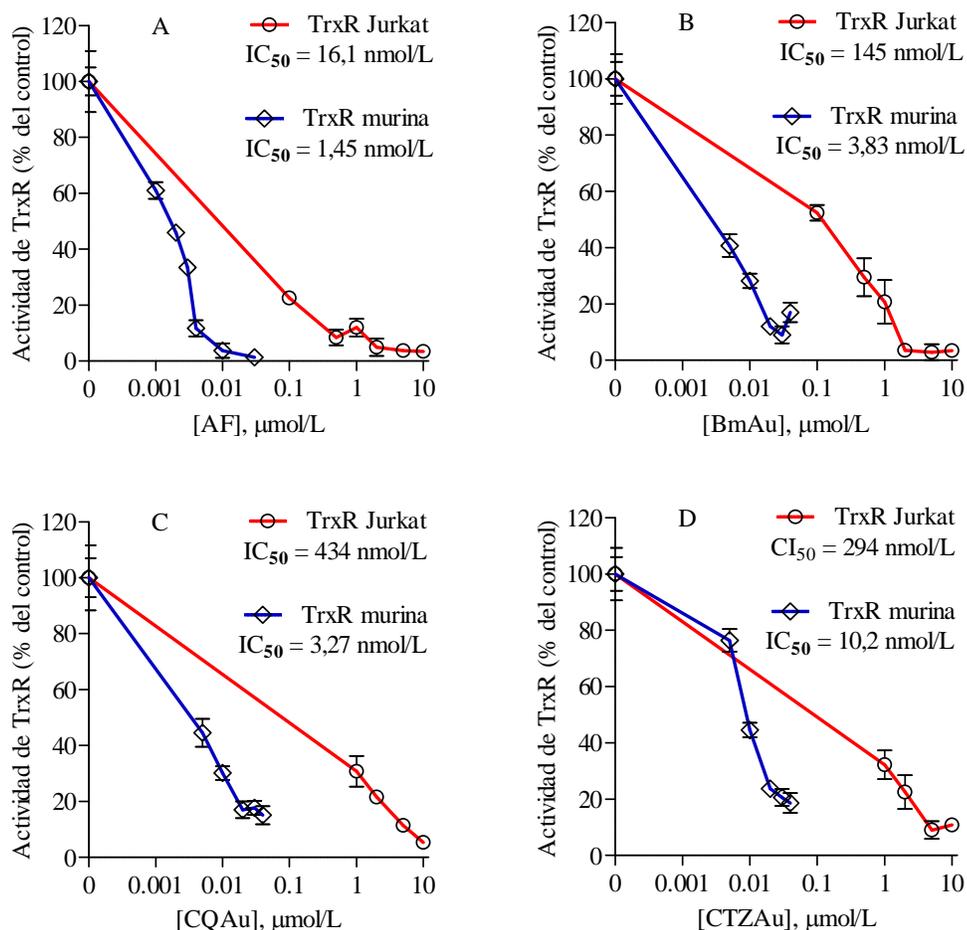


Figura 12. Inhibición de las actividades de las enzimas TrxR murina y humana. Los datos fueron expresados en función de las actividades específicas (velocidades iniciales) normalizadas respecto a los controles, derivadas de los datos de la figura 11. Tales actividades específicas se obtuvieron mediante regresión lineal por mínimos cuadrados de los datos de las cinéticas de óxido-reducción. La regresión condujo a la obtención de curvas con ecuaciones polinómicas de grados 2–5 [presentando factores de ajustes (R^2) superiores a 0,97], que al ser derivadas y evaluadas a tiempo cero, permitieron generar las velocidades iniciales. Los puntos de los gráficos son el resultado de tres ensayos independientes. En algunos casos, la barra de error es pequeña y el procesador de gráficos no la muestra. Los valores de las IC_{50} mostrados en el gráfico fueron calculados con el programa CalcuSyn (versión 2.0)

Ante este hecho, se puede afirmar que bajo una relación molar de [ASB]: [compuesto de oro] de 60:1, se obtiene una protección casi total contra los efectos citotóxicos, ya que esta proteína virtualmente “secuestraría” todo el oro disponible. Sin embargo, en el intervalo 3-300 $\mu\text{mol/L}$, se observaron diferencias notables entre

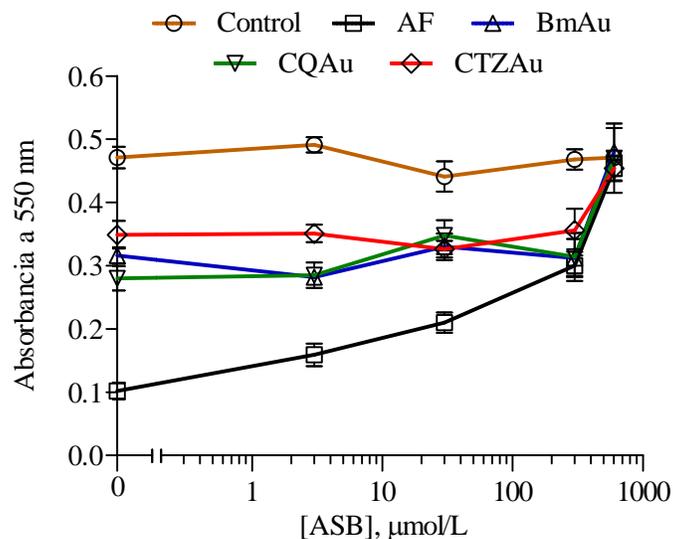


Figura 13. Efectos de la ASB sobre la citotoxicidad de los compuestos de oro en linfocitos T *Jurkat*. Las células ($1 \times 10^6/\text{mL}$) fueron incubadas con los compuestos de oro a una concentración fija de $10 \mu\text{M}$ y con ASB a diferentes concentraciones durante 2 h. El control en todos los gráficos es el mismo. Cada punto en los gráficos es el promedio de cuatro ensayos independientes. Las diferencias significativas encontradas en cada serie de datos se hallaron a través de la prueba Tukey y los pormenores se muestran en el texto

la AF y los demás compuestos de oro, en cuanto a la magnitud de sus interacciones con los grupos sulfhidrilos.

Encogimiento celular proapoptótico y necrosis

La pérdida de volumen celular es un evento preliminar asociado a la apoptosis (Bortner y Cidlowski, 2002). Por ello, el seguimiento del constreñimiento celular de los linfocitos *Jurkat* es una herramienta de monitorización conveniente para valorar la actividad citotóxica de los compuestos de oro.

En el panel superior de la figura 14, se recogen para cada compuesto de oro, series representativas de gráficos de puntos obtenidos por citometría de flujo, que muestran la evolución, en función de la concentración, de la luz dispersada lateral y frontalmente por las células *Jurkat*. La dispersión de luz lateral es una medida

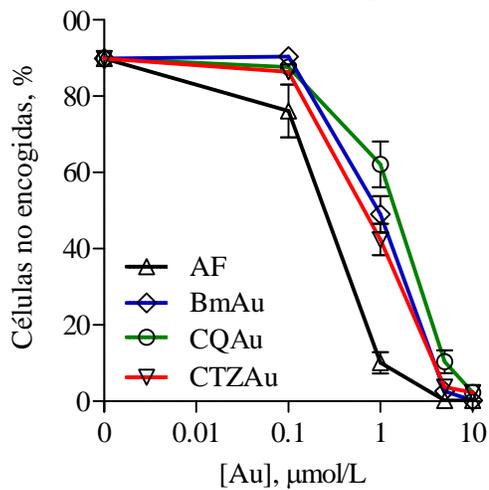
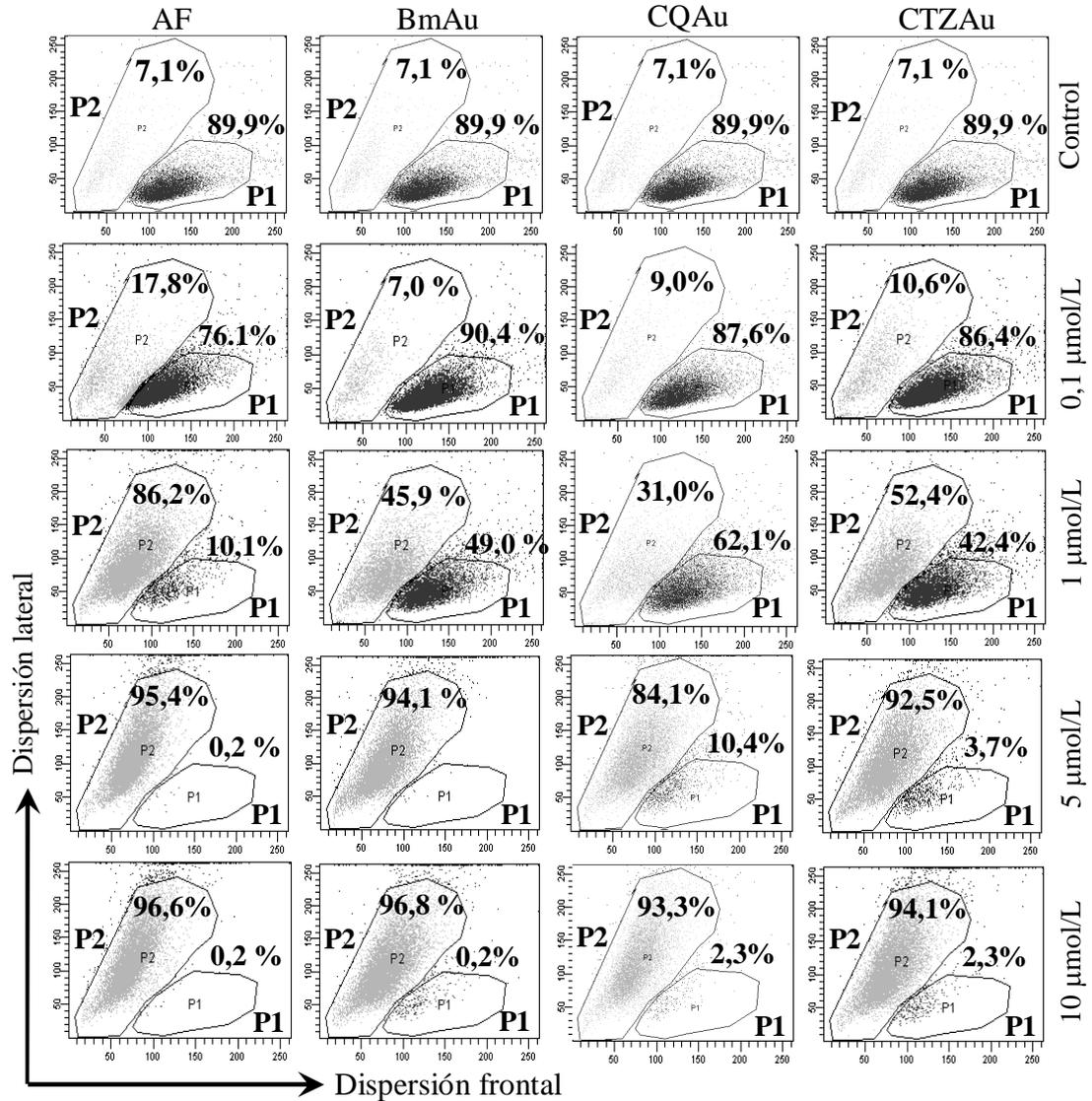


Figura 14. Constreñimiento de los linfocitos T *Jurkat*. **Panel superior:** Gráficos de puntos obtenidos por citometría de flujo. En cada caso, se presenta una serie representativa de los ensayos. Estos gráficos muestran el balance relativo de dispersión de luz lateral y frontal a 488 nm de las células, dependiente de la concentración de los compuestos de oro después de 24 h de tratamiento. **Panel inferior:** Variación porcentual de la población celular P1 (área inferior-derecha de los gráficos de puntos) que representa la cantidad relativa de células *Jurkat* no encodigadas. Cada punto en el gráfico es el promedio de dos ensayos independientes. Las diferencias significativas de cada serie de datos establecieron mediante una sola prueba de Tukey y los detalles destacables se indican en el texto.

indirecta del grado de granulaci3n celular, mientras que la dispersi3n de luz frontal es una magnitud que depende del tama1o o volumen celular (Bortner y Cidlowski, 2007). El balance entre ambos tipos de dispersi3n de luz, permiti3o obtener huellas gráficas de dos áreas que se identifican cada una con un tipo de poblaci3n celular: el área menor, ubicada hacia abajo y a la derecha, es denominada P1, y son células no encogidas (viables); el área mayor, que se extiende diagonalmente del lado izquierdo, es denominada P2. Esta área constituye células encogidas que han perdido volumen y han aumentado su granulaci3n, debido a que sufrieron apoptosis o han iniciado el programa de muerte celular.

Los porcentajes indicados en cada gráfico de puntos, indican la proporci3n de células que hay en cada área, del total de células inspeccionadas. Al comparar dichos porcentajes, puede verse diáfananamente que al aumentar las concentraciones de los compuestos de oro en el intervalo de 0–10 $\mu\text{mol/L}$, la poblaci3n P1 disminuy3 paulatinamente, desde 90% aproximadamente hasta valores inferiores al 3%, y concomitantemente, la poblaci3n P2 se increment3 desde un poco menos del 8% hasta valores superiores al 93%.

En el panel inferior de la figura 14, se registran las medias de los porcentajes de la poblaci3n P1 y puede observarse en forma comparativa el efecto de la concentraci3n de todos los compuestos de oro. La AF es el compuesto que indujo un cambio más marcado en la viabilidad celular de los linfocitos *Jurkat*, pues a una concentraci3n de 0,1 $\mu\text{mol/L}$, la viabilidad fue significativamente menor al control ($p < 0,05$) mientras que a la misma concentraci3n los demás compuestos no indujeron una variaci3n estadísticamente significativa respecto al control. Por el contrario, en el intervalo 1–10 $\mu\text{mol/L}$, todos los compuestos mermaron la viabilidad celular en forma significativa ($p < 0,05$) hasta alcanzar inclusive valores por debajo del 5%, pero es destacable que a 1 $\mu\text{mol/L}$, la viabilidad con AF cay3 hasta alrededor del 10%, mientras que las viabilidades con los demás compuestos de oro fueron más altas: BmAu, 49%; CQAu, 62% y CTZAu, 42%.

Estos resultados se corresponden con los niveles de viabilidad mostrados a las 24 h, obtenidos con el MTT (figura 7). En definitiva, el encogimiento celular es un evento biológico que tiene lugar en los linfocitos *Jurkat* en presencia de los compuestos de oro y da cuenta de muerte celular por vía apoptótica.

La apoptosis revelada por citometría de flujo no constituye el único mecanismo de

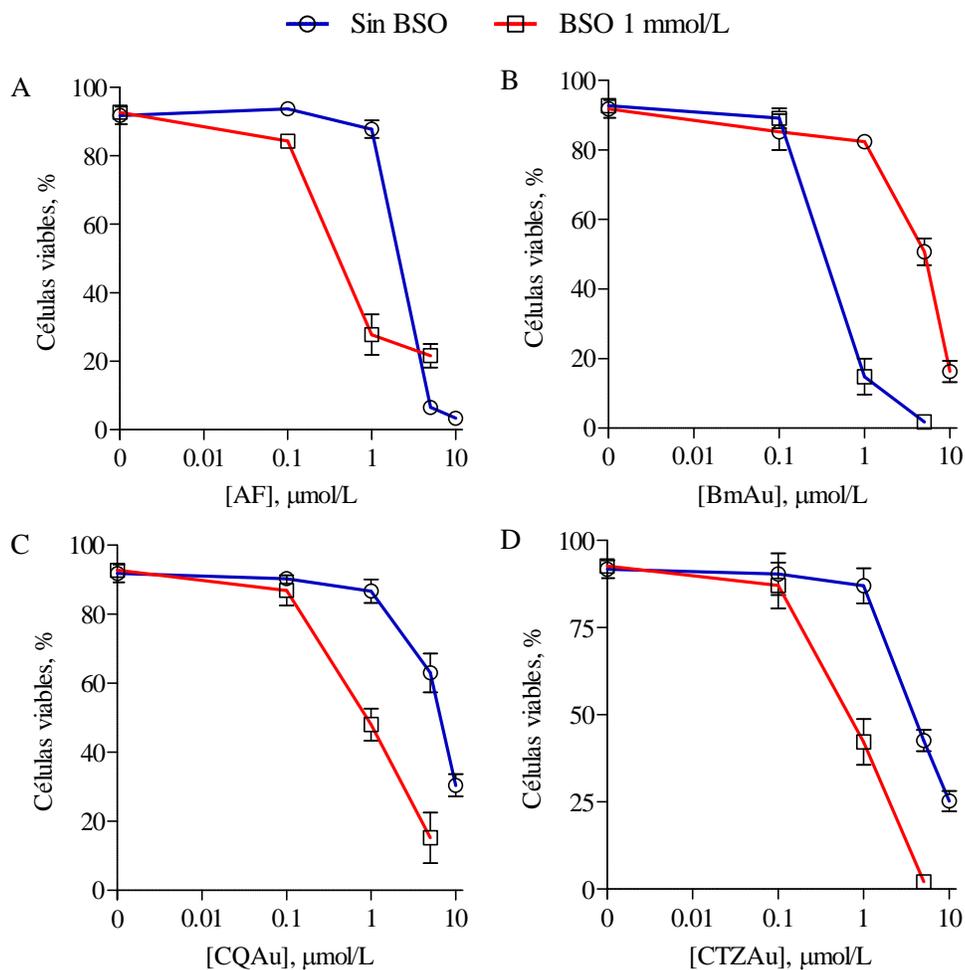


Figura 15. Viabilidad de los linfocitos T *Jurkat* determinada por exclusión del colorante azul tripano. Las células ($1 \times 10^6/\text{mL}$) fueron incubadas al inicio con los compuestos de oro a las concentraciones indicadas. En los casos en que se usó BSO 1 mmol/L, la dosificación de los compuestos de oro se realizó después de 24 h de pretratamiento, y las concentraciones ensayadas abarcaron el intervalo 0- 5 $\mu\text{mol/L}$. Cada punto en el gráfico es el promedio de tres ensayos independientes. En algunos casos, la barra de error es pequeña y el procesador de gráficos no la muestra. Las diferencias significativas encontradas en cada serie de datos se establecieron mediante la prueba de Tukey y los casos relevantes se resaltan en el texto.

muerte celular que inducen los compuestos de oro. En la figura 15, pueden apreciarse las viabilidades de las células *Jurkat* obtenidas mediante el método de exclusión del colorante azul tripano a las 24 h de tratamiento, en presencia de los compuestos de oro a diferentes concentraciones. Parte de los ensayos se llevaron a cabo preincubando con 1 mmol/L de BSO.

Estos datos permitieron discriminar cuánta necrosis estuvo asociada a los efectos citotóxicos de los compuestos de oro. En general, sin BSO en el intervalo de 0–1 $\mu\text{mol/L}$, no se observaron diferencias estadísticamente significativas para cada compuesto, pero a partir de 5 $\mu\text{mol/L}$, la AF mostró la necrosis más marcada entre los cuatro compuestos de oro. Obsérvese que la viabilidad con la AF a 5 $\mu\text{mol/L}$ cayó drásticamente a 6% ($p < 0,05$) aproximadamente, mientras que a la misma concentración, los otros compuestos de oro aunque acarrearón una declinación significativa, sus valores solo se redujeron a cerca de 50% (BmAu, $p < 0,05$), 63% (CQAu, $p < 0,05$) y 43% (CTZAu, $p < 0,05$).

Estos efectos de toxicidad contrastan con los datos observados en la figuras 7 y 14, obtenidos con el ensayo de MTT y por citometría de flujo, respectivamente, para todos los compuestos de oro, en los cuales se aprecia que la cantidad de células viables a las 24 h declinó a partir de 1 $\mu\text{mol/L}$, e inclusive para la AF, el estreñimiento celular y, por lo tanto, la eventual pérdida de células no encogidas, se pudo observar desde 0,1 $\mu\text{mol/L}$ en el mismo tiempo. Esto permite expresar que la apoptosis y la necrosis son eventos promovidos por los compuestos de oro, pero que ocurren en intervalos de concentraciones claramente diferenciados. La apoptosis en forma casi exclusiva se llevó a cabo a bajas concentraciones (0–1 $\mu\text{mol/L}$, aproximadamente) y la necrosis ocurrió concomitantemente con la apoptosis a altas concentraciones (por encima de 1 $\mu\text{mol/L}$).

En presencia de 1 $\mu\text{mol/L}$ de BSO, los compuestos de oro actuaron en forma cooperativa, para provocar toxicidades más acentuadas. El intervalo en el que no se observaron diferencias estadísticamente significativas se redujo a 0–0,1 $\mu\text{mol/L}$; pero

a 1 $\mu\text{mol/L}$, contrario a los resultados sin BSO, disminuyeron significativamente las viabilidades, mostrando la AF y el BmAu los niveles más bajos, cerca de 30% ($p < 0,05$) y 15% ($p < 0,05$), respectivamente, frente a 48% para el CQAu ($p < 0,05$) y 42% en el caso del CTZAu ($p < 0,05$).

Lo anterior significa que la caída de la proliferación en presencia de BSO observada en la figura 7, fue el resultado de una combinación más temprana de apoptosis y necrosis. Las diferencias entre la AF y los demás compuestos de oro observadas en este ensayo es clave, pues hasta el momento los resultados de la AF muestran una eficacia mayor en cuanto a sus efectos citotóxicos, pero en compensación, una menor citotoxicidad de BmAu, CQAu y CTZAu en términos de necrosis, podría constituir a futuro una ventaja de estos frente a la AF como sustancias terapéuticas potenciales.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

Los complejos de oro (I) son sustancias que pueden catalogarse como drogas citotóxicas. Los procesos de muerte celular que ellos inducen en líneas tumorales, probablemente se deban a su influencia sobre la homeostasis redox, particularmente por sus potentes efectos sobre enzimas que contienen grupos tioles (-SH) o selenotioles (-SeH) en sus centros activos. Sus potencialidades como drogas citostáticas son muy limitadas, pues al parecer la inducción de apoptosis que promueven no depende de interacciones con el ADN (Bindoli *et al.*, 2009). Es por ello, que para la evaluación de las posibilidades terapéuticas que ofrecen los complejos de este tipo, en el presente trabajo se exploraron las citotoxicidades de nuevos complejos de oro (I) y su acción sobre algunos eventos metabólicos relacionados de la línea celular neoplásica *Jurkat*.

En términos generales, los resultados de este estudio demostraron que tanto la AF como los nuevos complejos (BmAu, CQAu y CTZAu) son potentes agentes citotóxicos de las células *Jurkat*, y es posible que este hecho tenga relación con sus notables efectos inhibitorios de la actividad enzimática de la TrxR. Las inhibiciones de la proliferación (figura 7), la viabilidad (figura 9) y la inducción del colapso del $\Delta\psi_m$ (figura 10), se ubicaron en el intervalo micromolar de concentraciones mientras que las inhibiciones de la TrxR intracelular, se hallaron en el intervalo nanomolar de concentraciones (figura 12).

Aunque esas diferencias entre los efectos sobre la TrxR y los observados sobre las otras funciones biológicas evaluadas, no prueban de modo directo que la inhibición de la TrxR sea la causa de los efectos citotóxicos observados, tal suposición es consistente con otros estudios tanto *in vitro* como *in vivo* recientes. En el trabajo realizado por Yoo *et al.* (2006), se evidencia dicha relación por la reducción

sustancial de la expresión génica de la TrxR1 en una línea celular murina de carcinoma de pulmón (LLC1), mediante tecnología de interferencia de ARN, para valorar los efectos sobre el fenotipo carcinogénico y la actividad tumoral. Entre sus resultados destaca el hecho de que aun cuando en el cultivo de las células LLC1 *transfectadas* con el constructo de interferencia, la proliferación solo fue reducida ligeramente, el fenotipo de malignidad fue revertido, y además se observó en ratones sanos inyectados con las células *transfectadas*, una disminución drástica de la carcinogénesis y ausencia de metástasis.

Un estudio posterior hecho por los mismos investigadores (Yoo *et al.*, 2007), aporta evidencias adicionales de la importancia de la TrxR en la viabilidad de líneas celulares de cáncer. Se probó que varios tipos de células tumorales humanas y murinas sobreexpresaron la TrxR1, y al reducir los niveles de la TrxR con tecnología de interferencia de ARN, se comprometió la autosuficiencia en las señales de crecimiento y la expresión de ADN polimerasa α , enzima clave en la síntesis de ADN.

Estos hallazgos demuestran la dualidad funcional de la TrxR: por un lado, juega un importante papel en la prevención del cáncer, mediante la inhibición de la transformación maligna de células sanas; y por el otro, en tumores recién formados, sus altos niveles son demandados para que aporte sus equivalentes de reducción.

En definitiva, la TrxR constituye un importante objetivo primario para el tratamiento de enfermedades malignas y por ello, la conveniencia de haber evaluado en el presente estudio su actividad frente a nuevos complejos de oro con posibles propiedades anticancerígenas (Nobili *et al.*, 2010).

Por otra parte, a pesar de que todos los complejos de oro utilizados en el presente trabajo contienen el motivo estructural oro (I)-fosfina, es evidente que son muy diferentes en sus actividades citotóxicas, tal como lo indican sus efectos sobre la proliferación, viabilidad, encogimiento celular, inhibición de la TrxR, concentración intracelular del GSH, colapso del $\Delta\psi_m$ y reversión inducida por la albúmina. Por lo tanto, estas diferencias dependen muy probablemente de la identidad de los ligandos

de cada complejo. Sin embargo, también es evidente que la AF exhibe (con la única excepción del colapso del $\Delta\psi_m$) efectos bastante más potentes que el resto de los complejos.

Inhibición de la tioredoxina reductasa

La tabla 3, que contiene las IC_{50} correspondientes a las inhibiciones de las TrxR humana y murina (tomadas de la figura 12), señala claramente que las inhibiciones ocurrieron en el nivel nanomolar de concentraciones y que la AF fue el agente inhibidor más eficaz. Previamente, se han reportado inhibiciones similares de la AF para la TrxR de diferentes orígenes y tipos: IC_{50} de 20 nmol/L en TrxR de placenta humana (Gromer *et al.*, 1998); 200-250 nmol/L en TrxR de linfocitos T *Jurkat* (Cox *et al.*, 2008); 20 nmol/L en TrxR2 de rata (Rigobello *et al.*, 2004); y 5-10 nmol/L en TrxR1 de rata (Omata *et al.*, 2006)

Tabla 3. Efectos de los complejos de oro sobre la actividad de la TrxR

TrxR	IC_{50} , nmol/L			
	AF	BmAu	CQAu	CTZAu
<i>Jurkat</i>	16,1	145	434	294
Murina	1,5	3,8	3,3	10,2

La diferencia entre la AF y el resto de los complejos es mucho más marcada cuando se comparan las potencias inhibitorias de la TrxR celular. Este desempeño especial podría basarse en la alta hidrofobicidad que le confiere el ligando tetraacetato de tioglucosa más que en la hidrofobicidad de la trietilfosfina, el otro ligando enlazado al centro metálico. Esta situación sugiere que la capacidad de penetración hacia el interior de las células *Jurkat* decrece en el siguiente orden: AF > BmAu > CTZAu > CQAu.

Debe destacarse que en los complejos AF y BmAu, el átomo de oro se encuentra directamente unidos a átomos de azufre pertenecientes a sus ligandos, mientras que

en los complejos CQAu y CTZAu, el átomo de oro está enlazado con átomos de nitrógeno de los ligandos cloroquina (CQ) y clotrimazol (CTZ), respectivamente (figura 1). Es posible entonces, que tales diferencias químicas sean reflejadas en los diferentes efectos biológicos que ejercen.

Participación de las ERO en los efectos citotóxicos

Especies reactivas de oxígeno (ERO) es la denominación general que describe ampliamente a radicales libres derivados de O_2 tales como anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$), radicales hidroxilo ($HO\cdot$), peróxilos ($RO_2\cdot$), alcoxilos ($RO\cdot$), así como también especies no radicales derivados de O_2 como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La mitocondria es la principal fuente intracelular de ERO (Circu y Aw, 2010).

Aunque la producción de las ERO en las células *Jurkat*, inducida por los complejos de oro, no fue cuantificada directamente, los efectos observados sobre la proliferación al inhibir la síntesis de GSH intracelular y sobre la viabilidad en presencia de catalasa, refuerzan la idea de que la generación de ERO está asociada a los procesos citotóxicos promovidos por los complejos de oro evaluados en este trabajo.

El GSH tiene un papel clave como defensa antioxidante de las células *Jurkat* (figura 7). Los controles con BSO muestran que las células *Jurkat* no proliferaron e inclusive que su viabilidad se redujo, evidenciándose la imposibilidad de estas células de protegerse eficazmente contra los rigores de las ERO, a pesar de mantener intactas sus otras defensas antioxidantes. Ahora bien, la pérdida dramática de la viabilidad en presencia de BSO y los compuestos de oro a $0,1 \mu\text{mol/L}$ tras 24, 48 y 72 h, sugiere un tipo de mecanismo citotóxico sinérgico, asociado quizás a la pérdida de otras defensas antioxidantes, que probablemente está vinculado a su vez a la fuerte inhibición de la TrxR, una enzima fundamental en el balance redox celular, haciendo a las células *Jurkat* más vulnerables aún a la acción oxidante de las ERO.

Esta última afirmación es amparada por los resultados de Cox *et al.* (2008), pues demostraron que en células *Jurkat*, la presencia de AF a concentraciones

proapoptóticas, inhibe potentemente la TrxR2. Tal inhibición no permite tener la Trx2 reducida, la cual es necesaria para la obtención de la peroxirredoxina 3 reducida, enzima vital para la desintoxicación mitocondrial del H₂O₂. Aunque la oxidación de la peroxirredoxina 3 comprometería las defensas antioxidantes, el estrés oxidante podría inducir la sobreexpresión de otras peroxirredoxinas.

Un estudio reciente (Magherini *et al.*, 2010) mostró, mediante un enfoque proteómico clásico, que el tratamiento de una línea de células de carcinoma de ovario con AF durante 72 horas, condujo a la sobreexpresión de unas pocas enzimas entre las cuales se destacó la peroxirredoxina 1, una isoforma citosólica.

El papel citotóxico de las ERO es también avalado por los efectos protectores de la catalasa sobre la viabilidad celular, observados a las 24 horas (figura 9), aunque la enzima antioxidante disminuyó la citotoxicidad de los compuestos de oro en forma parcial. Esto concuerda con el aumento moderado de H₂O₂ sin peroxidación lipídica importante en las células *Jurkat*, en presencia de 2 μmol/L de AF, observado por Rigobello *et al.* (2008). Estos resultados y otras evidencias del mismo trabajo permitieron a sus autores concluir que la apoptosis inducida por la AF cursaba con un estrés oxidativo limitado.

En razón de lo anterior, podría afirmarse que aunque la producción de H₂O₂ es un factor importante, no sería el mecanismo citotóxico determinante, abriéndose la posibilidad a mecanismos apoptóticos no dependientes de las ERO, como la destrucción irreversible de la capacidad reductora de la TrxR1, generando proteínas proapoptóticas (denominadas simplemente Sec-TRAPs, por sus siglas en inglés) derivadas de la TrxR, cuyos átomos de selenio han sido afectados irreversiblemente por inhibidores electrofílicos. Estos complejos mostraron ser altamente citotóxicos (Anestal *et al.*, 2008).

En estas circunstancias, la disminución de la concentración de Trx reducida puede activar al factor ASK1 proapoptótico (Soga *et al.*, 2012), el cual funciona activando a la enzima MAPK (proteincinasa activada por mitógeno) p38, y, esta a su vez, fosforila e inactiva a la proteína antiapoptótica Bcl-2 (De Chiara *et al.*, 2006).

Finalmente, un argumento más en favor de la generación de las ERO como parte de los eventos promovidos por los complejos de oro, es el comportamiento diferenciado en la proliferación de las células *Jurkat* sin BSO con concentraciones de CQAu en el orden de 1 $\mu\text{mol/L}$. Este compuesto indujo la menor citotoxicidad entre todos los compuestos de oro a las 24, 48 y 72 h (figura 7).

Esta situación parece guardar relación con el incremento aproximado de 150% de los niveles de GSH intracelular inducido por CQAu, incremento significativamente superior al de los otros compuestos de oro (figura 8). La producción extra de GSH permitiría a las células encarar más eficazmente el estrés oxidativo de las ERO.

La generación de ERO induce efectos antioxidantes

Como ya se mencionó, aunque la generación de ERO podría justificar los efectos citotóxicos observados, los compuestos de oro estarían impulsando también mecanismos de defensa antioxidante, como es el caso de la elevación de los niveles de GSH intracelular (ver figura 8). Estos incrementos de GSH de diferentes magnitudes y a distintos niveles de concentración, dan cuenta de un comportamiento diferenciado de los compuestos de oro como agentes prooxidantes. En este sentido, Kataoka *et al.* (2001) sugirieron que la sobreexpresión de GSH bajo estrés oxidativo, sería uno de los mecanismos antiinflamatorios encontrados en el tratamiento de la AR con compuestos de oro (I), tales como la AF, aurotiomalato y aurotioglucosa. Tal sugerencia se basaría en la demostración realizada en células *Jurkat* y otros tipos celulares de que los citados compuestos inducen la unión del factor de transcripción Nrf2 [*nuclear factor (erythroid-derived 2)-related factor 2*] a las regiones promotoras o acrecentadoras del ADN de varios genes antioxidantes, entre cuyos productos proteicos debe destacarse la γ -glutamilcisteína sintetasa, enzima que actúa en el paso limitante de la síntesis de GSH.

La relación entre las propiedades antiartríticas de la AF y la sobreexpresión de genes antioxidantes mediados por el Nrf2, ha sido sustentada por estudios más recientes. En efecto, Kim *et al.* (2010) en trabajos realizados en sinoviocitos extraídos

de pacientes con AR, han dilucidado que la activación transcripcional del Nrf2 también depende de la producción inicial de óxido nítrico, y que esta inducción conduce a la sobreexpresión de la hemo-oxigenasa 1 (HO-1), enzima con un papel antiinflamatorio clave.

Finalmente, en un estudio semejante realizado con ratones (Ashino *et al.*, 2011), los daños hepáticos producidos por cocaína fueron revertidos mediante el pretratamiento con AF. Según los autores de ese estudio, esta actividad citoprotectora del derivado de oro, parece estar asociada con la sobreexpresión de la proteína HO-1. Esto sugiere que la disminución de la hepatotoxicidad observada en este estudio, probablemente ocurrió a través de la inducción de la ruta antioxidante Nrf2→HO-1.

En resumen, dado que los datos de la figura 8 muestran claramente que la AF, BmAu, CQAu y CTZAu, promueven la sobreexpresión de GSH y que recientes hallazgos indican una relación sólida entre la AF y otros compuestos de oro (I) en la sobreexpresión de proteínas antioxidantes y antiinflamatorias, tales como γ -glutamylcisteína sintetasa y HO-1, puede proponerse que el CQAu es posiblemente el mejor candidato antiartrítico, ya que es el más potente impulsor de GSH. Consecuentemente, es necesario dilucidar si el CQAu es un fuerte inductor de la activación del factor Nrf2.

Colapso del potencial de membrana mitocondrial de las células Jurkat

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso homeostático involucrado en numerosos sistemas biológicos. En condiciones fisiológicas tiene un papel clave en el recambio celular, el desarrollo normal y la senescencia de los tejidos y órganos. La desregulación de la apoptosis puede ser tanto causa como consecuencia de diferentes patologías como el cáncer, desórdenes autoinmunes y neurodegenerativos. La apoptosis es un programa altamente organizado promovido por un gran conjunto de estímulos que son caracterizados, en estadios tempranos, por activación de caspasas iniciadoras, encogimiento celular, pérdida de simetría de los lípidos de membrana plasmática y condensación de cromatina. La apoptosis franca,

por su parte, involucra activación de caspasas ejecutoras y endonucleasas, formación de cuerpos apoptóticos y fragmentación celular (Franco y Cidlowski, 2009).

La pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) también es un evento del programa de muerte celular, puede ocurrir en la fase inicial de la apoptosis. Los compuestos de oro (I) evaluados en este trabajo indujeron la caída marcada del $\Delta\psi_m$ en forma dependiente de la dosis (figura 10). Esto apoya el hecho de que la mitocondria sea considerada como uno de los blancos primordiales de la AF (Casini y Messori, 2011), y sugiere una lógica similar para el CQAu, BmAu y CTZAu, especialmente porque estos compuestos impulsan colapsos de los $\Delta\psi_m$ tan o más potentes que la AF. Tales efectos se fundamentan probablemente en el hecho de que estos compuestos sean cationes lipofílicas [motivo oro (I)-fosfina] que tienden a acumularse en el interior de las mitocondrias, sin la mediación de receptores de membrana, en forma similar a los cationes de trifenilfosfonio, cuyas concentraciones en la mitocondria pueden ser cientos de veces mayores que en el medio extracelular, en razón del creciente potencial negativo de las membranas citoplasmática y mitocondrial (Smith *et al.*, 2003).

A diferencia del trifenilfosfonio, la carga positiva en los compuestos de oro radica en el centro metálico y en cuanto al carácter lipofílico, en el caso de la AF, es debido al ligando trietilfosfina, mientras que para los otros compuestos, tal carácter puede ser arrojado al ligando trifenilfosfina. Este efecto de acumulación celular de complejos de oro se ha observado en células humanas HT-29 (de carcinoma de colon), al ser expuestas a la AF, registrándose una mayor acumulación de esta sustancia (10–50 veces) respecto a la concentración de exposición inicial de 2,5–10 $\mu\text{mol/L}$ (Ott *et al.*, 2007).

Los efectos de la AF sobre el $\Delta\psi_m$, han sido documentados para sistemas libres de células. En mitocondrias intactas aisladas de hígado de rata, se ha demostrado que el colapso del $\Delta\psi_m$ ocurre rápidamente (2–20 min) y es dependiente de la concentración de AF en el intervalo de 0,5–10 μM . Además, se ha hallado una fuerte correlación

entre la inhibición de la TrxR mitocondrial inducida por la AF y la permeabilidad mitocondrial, un evento crucial para la liberación al citoplasma del citocromo *c* y el desencadenamiento posterior de apoptosis (Rigobello *et al.*, 2002).

En esta investigación, aunque la caída del $\Delta\psi_m$ se examinó en un sistema celular, tras 4 h de tratamiento con los complejos de oro, queda claro que es un evento promovido tempranamente, que allana el camino para los efectos antiproliferativos observados en el intervalo de 24–72 h (figura 7). Debe destacarse que la AF no indujo el abatimiento más potente del $\Delta\psi_m$, a pesar de ser el compuesto más citotóxico, y que el CQAu indujo un abatimiento del $\Delta\psi_m$ similar, siendo el compuesto menos citotóxico. Esta falta de correlación sugiere que la caída del $\Delta\psi_m$ no es el único determinante de la actividad citotóxica de estos compuestos de oro.

La citotoxicidad de los compuestos de oro es modulada por la ASB

La interacción de los compuestos de oro con la ASB pone de relieve otra diferencia de comportamiento entre los complejos de oro ensayados. Los resultados de la figura 13 mostraron que a una alta concentración de los compuestos (10 $\mu\text{mol/L}$), en ausencia de la ASB y en un tiempo relativamente breve (2 h), las citotoxicidades fueron marcadamente manifiestas. En el caso de la AF, la viabilidad se redujo casi en un 80%, mientras que los otros compuestos mermaron las viabilidades en forma moderada: BmAu: 33%; CQAu: 41% y CTZAu: 26%. La incorporación de la ASB en el cultivo, revierte la citotoxicidad de la AF en forma dependiente de la concentración, lo que revela una clara competencia entre la absorción celular del compuesto y la unión con la ASB.

Este hecho concuerda con la disminución de la captación celular de la AF, experimentada por las células de macrófago RW 264.7, preincubadas con albúmina (Snyder *et. al.*, 1986). La interacción de los otros compuestos con la ASB no afectó la citotoxicidad de los mismos, salvo a la concentración más alta de ASB, cuando quizás esta proteína ejerció una especie de efecto de saturación. Tal hecho sugiere

que la unión con la ASB a baja concentración no ocurre o es muy débil como para modular su acción sobre las células.

Podría pensarse que estas diferencias de reactividades con la ASB a concentraciones menores de 600 $\mu\text{mol/L}$, se justifiquen por los diferentes tipos de enlaces establecidos entre el oro (I) y los ligandos (ver figura 1). No obstante, la AF y el BmAu presentan enlaces Au–S comunes y como ya pudo verse, la modulación desplegada por la ASB en ambos casos es distinta, teniendo el BmAu un comportamiento más cercano a CQAu y CTZAu, los cuales poseen ligandos unidos por enlaces Au–N.

Posiblemente, la diferencia observada entre la AF y los otros compuestos radique en la dificultad que puede enfrentar la ASB para desplazar el tipo de ligando: en los casos de CQAu y CTZAu, podría sugerirse que ciertos impedimentos estéricos de los ligandos CQ y CTZ, respectivamente, limitarían la interacción de la ASB con el centro metálico; y en el caso de BmAu, el único de los compuestos de configuración trigonal, valdría alegar la unión múltiple del ligando bis (2-mercapto-1-metilimidazol-3-il) borato, ya que se encuentra unido mediante dos enlaces simples Au–S, haciéndose potencialmente menos lábil.

La aparente reversión total de la citotoxicidad de los compuestos de oro, sugiere una significativa interacción con la ASB, promovida por una concentración de 600 $\mu\text{mol/L}$, que implica una relación muy alta de ASB/Au, es decir, de 60/1. Bajo estas condiciones, las reacciones entre los complejos y el grupo tiolato ($-\text{S}^-$) cisteínico (Shaw III, 1999) conducirían a una situación de “secuestro” casi total de los motivos estructurales oro (I)-fosfina, dejando una fracción libre (complejo no unido a la ASB) muy pequeña para la interacción con el blanco celular que no condujo a ninguna consecuencia en un lapso de exposición realmente limitado (2 h de ensayo).

Probablemente, un tiempo de exposición más prolongado, permitiría a la fracción libre de los complejos atravesar la membrana plasmática de las células *Jurkat* y acumularse en un grado suficiente para ejercer algunos efectos; actuando el conjunto

de los aductos ASB-complejo como un reservorio acarreador de los compuestos unidos. Esta especulación tiene fundamento en los limitados pero significativos efectos observados a las 48 h sobre la proliferación (figura 7) y a las 24 h, en los niveles de GSH intracelular de los linfocitos *Jurkat* (figura 8), en ambos casos a una concentración de los complejos de 0,1 $\mu\text{mol/L}$, que representa el 1% de 10 $\mu\text{mol/L}$.

Esta modulación sobre la citotoxicidad de la ASB *in vitro*, mediante la limitación de la concentración libre de los complejos, podría tener relación con las propiedades antiartríticas de los compuestos de oro (I), observadas en sinoviocitos (Kim *et al.*, 2010). La ASB presenta una estrecha similitud con la albúmina humana, siendo esta última una proteína abundante en el suero sanguíneo, con una concentración que ronda los 600 $\mu\text{mol/L}$ en pacientes sanos; pero aproximadamente 400 $\mu\text{mol/L}$ de esta proteína tiene grupos tioles libres (cisteína 34), capaces de enlazarse a los complejos de oro; el resto se encuentra en forma de puentes disulfuro poco reactivos (Shaw, 1999). En este sentido, la albúmina probablemente module la biodistribución de las drogas orales o inyectables basadas en oro (I)-fosfina, y, en consecuencia, regule los efectos inmunosupresores y antiartríticos atribuidos a éstas (Kean *et al.*, 1997).

En oposición, Smith *et al.* (2010) restan valor a los ensayos de unión a proteínas plasmáticas *in vitro* como estrategia válida para ponderar las capacidades farmacológicas *in vivo* de drogas en desarrollo, debido fundamentalmente a que en estos ensayos no es posible sopesar los múltiples procesos dinámicos y simultáneos que ocurren *in vivo*, tales como metabolismo, enlazamiento proteico, permeabilidad a través de membranas y excreción. No obstante, en el trabajo actual, la utilidad del ensayo de unión a ASB tuvo como principal propósito calibrar los comportamientos y potencialidades del BmAu, CQAu y CTZAu frente a la AF, una droga estructuralmente relacionada.

Los complejos de oro estimulan diferentes formas de muerte celular

Los ensayos colorimétricos con el MTT, los de exclusión de azul tripano y la monitorización citométrica del encogimiento celular, dejaron claramente establecido

que la apoptosis y la necrosis se desencadenan en forma dependiente de la concentración y del tipo de compuesto, como consecuencia de la acción de los complejos de oro ensayados. Este hecho sugiere que el manejo apropiado de la cantidad y del tipo de compuesto de oro permitiría, en modelos *in vivo*, maximizar la apoptosis, evadir la necrosis y, naturalmente, las secuelas inflamatorias de esta última.

Como ya se observó, la muerte celular en los linfocitos *Jurkat* vía apoptosis, se estimula en casi todo el intervalo de concentraciones de estos complejos, mientras que niveles de necrosis superiores al 43% son promovidos en forma concomitante, a partir de 5 $\mu\text{mol/L}$. Son precisamente concentraciones altas (10–20 $\mu\text{mol/L}$) las que se observan en condiciones *in vivo* cuando se administra la AF (Shaw, 1999), por lo que ha de esperarse que bajo estas circunstancias, se induzcan niveles importantes de necrosis y quizás ello justifique las diferentes efectos laterales asociados –diarrea, erupciones, proteinuria, estomatitis, conjuntivitis, entre otros– (Kean *et al.* 1997). Por lo tanto, es razonable pensar que los compuestos de oro podrían ser administrados a concentraciones más bajas para eludir la necrosis, pero junto con otros principios activos (terapia combinada), para garantizar mejor efectividad farmacológica con menos efectos secundarios.

La coincubación de los complejos de oro y BSO ensayados en este trabajo, permite juzgar en forma preliminar el valor de esta estrategia de combinación. Todos los complejos de oro en los cuales se usó una concentración de 0,1 $\mu\text{mol/L}$, junto con BSO a 1 mmol/L , redujeron drásticamente la viabilidad celular en un lapso de 24 h (figura 7) sin necrosis significativa (figura 15). Estos resultados contrastan con los altos márgenes de necrosis (por encima del 40%) ocurridos al aumentar a 1 $\mu\text{mol/L}$ la concentración (un incremento de 10 veces) de los compuestos de oro y manteniendo la misma concentración de BSO (figura 15). Esta diferencia en los niveles de necrosis mediada por el simple cambio de un orden de magnitud en la cantidad de los complejos, sugiere la posibilidad de que esté operando un mecanismo de acción sinérgica que debería ser explorado en mayor profundidad.

Varias investigaciones recientes llevadas a cabo por D. R. Spitz y su equipo de trabajo en las que se emplearon AF y/o BSO para sensibilizar células de cáncer e incrementar la actividad antineoplásica de otros agentes, refuerzan el enfoque expresado anteriormente (Simons *et al.*, 2009; Fath *et al.*, 2011; Scarbrough *et al.*, 2012). Entre los aportes de estos investigadores se destacan los siguientes: 1) La perifosina (PER), un alquilfosfolípido antitumoral inhibidor de la proteincinasa B (empleado actualmente en ensayos clínicos de fases I y II), incrementó el estrés oxidativo e indujo muerte celular clonogénica en células de cáncer de garganta y cabeza SCC-25, que fueron sensibilizadas con la AF (0,5 $\mu\text{mol/L}$) o BSO (1 mmol/L). Debe destacarse que las células SCC-25, no fueron susceptibles al PER como único agente (Simons *et al.*, 2009); 2) La muerte celular clonogénica de la línea de cáncer de pulmón A549 fue incrementada por el tratamiento con 2-desoxi-D-glucosa (2DG) y carboplatino (CP), mediante sensibilización con la AF (0,5 $\mu\text{mol/L}$) y BSO (100 $\mu\text{mol/L}$). Adicionalmente, el crecimiento de un tumor de cáncer de pulmón (A549) implantado en ratones, fue inhibido más eficazmente cuando se combinaron CP, AF y BSO que cuando se trataron los ratones con CP y AF o CP y BSO (Fath *et al.*, 2011); 3) La sensibilización de células de cáncer de pecho (MDA-MB-231 y SUM159) y de próstata (PC-3) con AF (0,5 $\mu\text{mol/L}$) y BSO (1 mmol/L) mostró una muerte celular clonogénica más intensa al ser tratadas con 2DG y 17-Alilamin-17-demetoxigeldanamicina, un agente quimioterapéutico experimental que forma radicales libres *in vivo* (Scarbrough *et al.*, 2012).

En todas estas exploraciones, se probó razonablemente la hipótesis central de que el tratamiento simultáneo con AF y/o BSO a niveles no tóxicos, es una estrategia terapéutica ventajosa para la quimiosensibilización de los blancos celulares de interés mediante la supresión del metabolismo antioxidante del GSH y la Trx.

En definitiva, el uso combinado de derivados de oro (I)-fosfina y otros inhibidores de defensas antioxidantes, representa una perspectiva interesante para abordar nuevas alternativas terapéuticas contra el cáncer. En este sentido, una vía clave para indagar sería la quimiosensibilización a bajas dosis de compuestos de oro (I)-fosfina, con la

supresión simultánea del metabolismo redox dependiente del factor de transcripción Nrf2, ya sea que se usen inhibidores directos contra Nrf2 o que sean dirigidos a factores asociados en su metabolismo corriente arriba. Esto en sí podría representar un enfoque antineoplásico eficaz y alternativo o contribuiría a la sensibilización del cáncer ante otros agentes quimioterapéuticos experimentales o de uso clínico.

Antagónicamente, el uso a bajas dosis de los complejos de oro (I)-fosfina con activadores del Nrf2, podría mejorar la expresión de defensas antioxidantes, tales como la HO-1, enzima clave en la evolución de patologías reumáticas. En este sentido, la inducción de la HO-1 constituiría una estrategia terapéutica promisoría para desórdenes inflamatorios, tales como la AR (Kobayashi *et al*, 2006).

En general, es necesario llevar adelante estudios adicionales *in vitro* e *in vivo*, para el análisis en profundidad de los hallazgos preliminares de este trabajo y sus implicaciones, tomando en consideración que todo esto es dependiente de la diversidad genética y fenotípica que expresan las diferentes modelos celulares.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

Los complejos de BmAu, CQAu y CTZAu, ejercieron citotoxicidad sobre las células malignas *Jurkat* en el intervalo micromolar de concentraciones. Esto se manifiesta mediante la inhibición sustancial de la viabilidad y la proliferación celular, revelando sus posibles potencialidades terapéuticas.

La citotoxicidad ejercida por los compuestos de oro evaluados se tradujo en apoptosis y necrosis en forma diferenciada. Ambos mecanismos de muerte celular son dependientes de la cantidad y del tipo de complejo. La necrosis se manifestó de modo preferencial a concentraciones altas.

La supresión del GSH mediante pretratamiento con BSO, acentuó la muerte celular de los linfocitos *Jurkat* en forma aparentemente sinérgica. Esto sustenta la tesis de que los efectos inhibitorios de los complejos de oro (I)-fosfina son mediados por estrés oxidativo y que la combinación con BSO podría ser una buena alternativa terapéutica.

Los complejos de oro (I)-fosfina generaron diferentes incrementos en las concentraciones intracelulares del GSH reducido, lo cual sugiere que las células *Jurkat* responden al estrés oxidativo generado por esos complejos, mediante la expresión de enzimas del sistema antioxidante de defensa.

Los complejos de oro (I)-fosfina suprimieron el $\Delta\psi_m$ mitocondrial e inhibieron la actividad de la TrxR en los intervalos de concentraciones micromolares y nanomolares, respectivamente. Estos eventos sugieren que como parte de los mecanismos de acción de los complejos, la mitocondria constituye un blanco importante a escala subcelular y la TrxR, un elemento clave a escala molecular.

En términos generales, los complejos BmAu, CQAu y CTZAu son menos potentes que la AF, un complejo de oro (I)-fosfina relacionado. Las diferencias de los efectos inhibitorios ejercidos sobre las distintas actividades biológicas se deben probablemente a la presencia de ligandos de diferente identidad.

REFERENCIAS

- Anestâl, K., Prast-Nielsen, S., Cenas, N., Arnér, E. S. (2008). Cell death by SecTRAPs: thioredoxin reductase as a prooxidant killer of cells. *PLoS ONE*, 3(4), e1846.
- Arnér, E. S. (2009). Focus on mammalian thioredoxin reductases--important selenoproteins with versatile functions. *Biochim. Biophys. Acta*, 1790(6), 495-526.
- Ashino, T., Sugiuchi, J., Uehara, J., Naito-Yamamoto, Y., Kenmotsu, S., Iwakura, Y., Shioda, S., Numazawa, S., Yoshida, T. (2011). Auranofin protects against cocaine-induced hepatic injury through induction of heme oxygenase-1. *J. Toxicol. Sci.*, 36(5), 635-643.
- Aziz, D.M., Ahlswede, L., Enbergs, H. (2005). Application of MTT reduction assay to evaluate equine sperm viability, *Theriogenology*, 64(6), 1350-1356.
- Berners-Price, S. J., Filipovska, A. (2011). Gold compounds as therapeutic agents for human diseases. *Metallomics*, 3(9), 863-873.
- Berghella A.M, Pellegrini P., Del Beato T., Ciccone F., Contasta I. (2011). The potential role of thioredoxin 1 and CD30 systems as multiple pathway targets and biomarkers in tumor therapy. *Cancer. Immunol. Immunother.*, 60(10), 1373-1381.
- Biaglow J.E., Miller R.A. (2005). The thioredoxin reductase/thioredoxin system: novel redox targets for cancer therapy. *Cancer. Biol. Ther.* 4(1), 6-13.
- Bindoli, A., Rigobello, M. P., Scutari, G., Gabbiani, C., Casini, A., Messori, L. (2009). Thioredoxin reductase: A target for gold compounds acting as potential anticancer drugs. *Coord. Chem. Rev.*, 253(11-12), 1692-1707.
- Bondeson, J., Sundler, R. (1995). Auranofin inhibits the induction of interleukin 1 beta and tumor necrosis factor alpha mRNA in macrophages. *Biochem. Pharmacol.*, 50, 1753-1759.
- Bondeson J. (1997). 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.*, 29, 127-150.
- Bortner, C. D., Cidlowski, J. A. (2002). Apoptotic volume decrease and the incredible shrinking cell. *Cell. Death Differ.*, 9, 1307-1310.
- Bortner, C. D., Cidlowski, J. A. (2007). Cell shrinkage and monovalent cation fluxes: role in apoptosis. *Arch. Biochem. Biophys.*, 462(2), 176-188.
- Burke-Gaffney, A., Callister, M. E., Nakamura, H. (2005). Thioredoxin: friend or foe in human disease? *Trends. Pharmacol. Sci.*, 26, 398-404.

- Calabrese, E. J. (2003). The maturing of hormesis as a credible dose-response model. *Nonlinearity Biol. Toxicol. Med.*, 1(3), 319-343.
- Casini, A., Messori, L. (2011). Molecular mechanisms and proposed targets for selected anticancer gold compounds. *Curr. Top. Med. Chem.*, 11(21), 2647-2660.
- Che, C. M., Sun, R.W. (2011). Therapeutic applications of gold complexes: lipophilic gold (III) cations and gold (I) complexes for anti-cancer treatment. *Chem. Commun. (Camb)*, 47(34), 9554-9560.
- Chen, Q., Crosby, M., Almasan, A. (2003). Redox regulation of apoptosis before and after cytochrome c release. *Korean J. Biol. Sci.*, 7, 1-9.
- Chou, T.C. (2006). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol. Rev.*, 58(3), 621-681
- Circu, M. L., Aw, T. Y. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.*, 48(6), 749-762.
- Cox, A. G., Brown, K. K., Arner, E. S., Hampton, M. B. (2008). The thioredoxin reductase inhibitor auranofin triggers apoptosis through a Bax/Bak-dependent process that involves peroxiredoxin 3 oxidation. *Biochem. Pharmacol.*, 76(9), 1097-1109.
- Crilly, A., Madhok, R., Watson, J., Capell, H. A., Sturrock, R. D. (1994). Production of interleukin-6 by monocytes isolated from rheumatoid arthritis patients receiving second-line drug therapy. *Br. J. Rheumatol.*, 33, 821-825.
- Dahl, S. L., Coleman, M. L., Williams, H. J., Altz-Smith, M., Kay, D. R., Paulus, H. E., Weinstein, A., Kaplan, S. (1985). Lack of correlation between blood gold concentrations and clinical response in patients with definite or classic rheumatoid arthritis receiving auranofin or gold sodium thiomalate. *Arthritis Rheum.*, 28, 1211-1218.
- De Chiara, G., Marcocci, M. E., Torcia, M., Lucibello, M., Rosini, P., Bonini, P., Higashimoto, Y., Damonte, G., Armirotti, A., Amodei, S., Palamara, A. T., Russo, T., Garaci, E., Cozzolino, F. (2006). Bcl-2 Phosphorylation by p38 MAPK: identification of target sites and biologic consequences. *J. Biol. Chem.*, 281(30), 21353-21361.
- DiDonato, J. A., Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E., Karin, M. (1997). A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature*, 388(6642), 548-554.
- Fath, M. A., Ahmad, I. M., Smith, C. J., Spence, J., Spitz, D. R. (2011). Enhancement of carboplatin-mediated lung cancer cell killing by simultaneous disruption of glutathione and thioredoxin metabolism. *Clin. Cancer Res.*, 17(19), 6206-6217.

- Franco, R., Cidlowski J. A. (2009). Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death Differ.*, 16(10), 1303-1314.
- Ganther, H. E. (1999) Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis*, 20, 1657-1666.
- Gromer, S., Schirmer, R. H., Becker, K. (1997). The 58 kDa mouse selenoprotein is a BCNU-sensitive thioredoxin reductasa. *FEBS Lett.*, 412, 318-320.
- Gromer, S., Arscott, L. D., Williams, C. H., Schirmer, R. H., Becker, K. (1998) Human placenta thioredoxin reductase. Isolation of the selenoenzyme steady state kinetics, and inhibition by therapeutic gold compounds. *J. Biol. Chem.*, 273, 20096-20101.
- Hashimoto, K., Whitehurst, C. E., Matsubara, T., Hirohata, K., Lipsky, P. E. (1992). Immunomodulatory effects of therapeutic gold compounds. Gold sodium thiomalate inhibits the activity of T cell protein kinase C. *J. Clin. Invest.*, 89, 1839-1848.
- Häcker, H., Karin, M. (2006). Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci. STKE*, 2006(357), re13.
- Holmgren, A., Björnstedt, M. (1995). Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Meth. Enzymol.*, 252, 199–208.
- Jeon, K. I., Jeong, J. Y., Jue, D. M. (2000). Thiol-reactive metal compounds inhibit NF-kappaB activation by blocking I kappa B kinase. *J. Immunol.*, 164, 5981-5989.
- Jikimoto, T., Nishikubo, Y., Koshiba, M., Kanagawa, S., Morinobu, S., Morinobu, A., Saura, R., Mizuno, K., Kondo, S., Toyokuni, S., Nakamura, H., Yodoi, J., Kumagai, S. (2001). Thioredoxin as a biomarker for oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *Mol. Immunol.*, 38, 765-772.
- Jones, D. P. (2008). Radical-free biology of oxidative stress. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 295(4), C849-C868.
- Kakisaka, Y., Nakashima, T., Sumida, Y., Yoh, T., Nakamura, H., Yodoi, J., Senmaru, H. (2002). Elevation of serum thioredoxin levels in patients with type 2 diabetes. *Horm. Metab. Res.*, 34, 160-164.
- Kataoka, T. (2009). Chemical biology of inflammatory cytokine signaling. *J. Antibiot.(Tokyo)*, 62(12), 655-667.
- Kataoka, K., Handa, H., Nishizawa, M. (2001). Induction of cellular antioxidative stress genes through heterodimeric transcription factor Nrf2/small Maf by antirheumatic gold(I) compounds. *J. Biol. Chem.*, 276(36), 34074-34081.

- Kean, W. F., Hart, L., Buchanan, W.W. (1997). Auranofin. *Br. J. Rheumatol.*, 36(5), 560-572.
- Kim, N.H., Oh, M.K., Park, H.J., Kim, I.S. (2010). Auranofin, a gold (I)-containing antirheumatic compound, activates Keap1/Nrf2 signaling via Rac1/iNOS signal and mitogen-activated protein kinase activation. *J. Pharmacol. Sci.*, 113(3), 246-254.
- Kobayashi, H., Takeno, M., Saito, T., Takeda, Y., Kirino, Y., Noyori, K., Hayashi, T., Ueda, A., Ishigatsubo, Y. (2006). Regulatory role of heme oxygenase 1 in inflammation of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 54(4), 1132-1142.
- Korper, S., Nolte, F., Rojewski, M.T., Thiel, E., Schrezenmeier, H. (2003). The K⁺ channel openers diazoxide and NS1619 induce depolarization of mitochondria and have differential effects on cell Ca²⁺ in CD34⁺ cell line KG-1a. *Exp. Hematol.*, 31(9), 815-823.
- Liu, J., Akahoshi, T., Namai, R., Matsui, T., Kondo, H. (2000). Effect of auranofin, an antirheumatic drug, on neutrophil apoptosis. *Inflamm. Res.*, 49, 445-451.
- Liu, Y., Li, Y., Yu, S., Zhao, G. (2012). Recent advances in the development of thioredoxin reductase inhibitors as anticancer agents. *Curr. Drug Targets.*, 11, 1432-1444.
- Magherini, F., Modesti, A., Bini, L., Puglia, M., Landini, I., Nobili, S., Mini, E., Cinellu, M.A., Gabbiani, C., Messori, L. (2010). Exploring the biochemical mechanisms of cytotoxic gold compounds: a proteomic study. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 15(4), 573-582.
- Mantymaa, P., Siitonen, T., Guttorm, T., Saily, M., Kinnula, V., Savolainen, E.R., Koistinen, P. (2000). Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase confers resistance to apoptosis in acute myeloblastic leukaemia cells exposed to etoposide. *Br. J. Haematol.*, 108(3), 574-581.
- Maurice, M.M., Nakamura, H., Gringhuis, S., Okamoto, T., Yoshida, S., Kullmann, F., Lechner, S., van der Voort, E.A., Leow, A., Versendaal, J., Muller-Ladner, U., Yodoi, J., Tak, P.P., Breedveld, G.C. Verweij, C.L. (1999). Expression of the thioredoxin-thioredoxin reductase system in the inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 42, 2430-2439.
- Miyamoto, S., Kawano, H., Hokamaki, J., Soejima, H., Kojima, S., Kudoh, T., Nagayoshi, Y., Sugiyama, S., Sakamoto, T., Yoshimura, M., Nakamura, H., Yodoi, J., Ogawa, H. (2005). Increased plasma levels of thioredoxin in patients with glucose intolerant. *Internal Med.*, 44, 1127-1132.
- Mohamed, A.A., Rabinovich, D., Fackler, J.P. (2002). [Bis(2-mercapto-1-methylimidazol-3-yl)borato](triphenylphosphine)gold(I). *Acta Cryst. Sec. E.*, 58(12), m726-m727.

- Mustacich, D., Powis, G. (2000). Thioredoxin reductase. *Biochem. J.*, 346, 1-8.
- Navarro, M., Pérez, H., Sánchez-Delgado, R.A. (1997). Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases. 3. Synthesis and antimalarial activity in vitro and in vivo of the new gold-chloroquine complex [Au(PPh₃)(CQ)]PF₆. *J. Med. Chem.*, 40(12), 1937-1939.
- Navarro, M., Lehmann, T., Cisneros-Fajardo, E.J, Fuentes, A., Sánchez-Delgado, R.A., Silva, P., Urbina, J.A., (2000). Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases: Part 5. Synthesis and characterization of new Ru (II) and Ru (III) clotrimazole and ketoconazole complexes and evaluation of their activity against *Trypanosoma cruzi*. *Polyhedron*, 19(22–23), 2319-2325.
- Navarro, M., Cisneros-Fajardo, E.J., Lehmann, T., Sánchez-Delgado, R.A., Atencio, R., Silva, P., Lira, R., Urbina, J.A. (2001). 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.*, 40(27), 6879-6884.
- Navarro, M., Vásquez, F., Velásquez, M., Medina, R., Reggio, R., Fraile, G. (2002). Effects of the gold-chloroquine complexes on respiratory burst of polymorphonuclear leukocytes. *Arzneimittelforschung*, 52, 468-474.
- Navarro, M., Vásquez, F., Sánchez-Delgado, R.A., Pérez, H., Sinou, V., Schrével, J. (2004a). Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases. 7. Synthesis and in vitro antimalarial activity of new gold-chloroquine complexes. *J. Med. Chem.*, 47(21), 5204-5209.
- Navarro, M., Colmenares, I., Correia, H., Hernández, A., Ching, Y., Millán, Y., Ojeda, L.E., Velásquez, M., Fraile, G. (2004b). *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*, 54, 746-751.
- Navarro, M., Fraile, G., Velásquez, M., González, E., Escalona, J., Ilanjan, R., Abad, M.J., Taylor, P. (2006). Effect of a gold-chloroquine complex on inflammation-related leukocyte functions and cell viability: a comparison with auranofin. *Arzneimittelforschung*, 56, 826-833.
- Navarro, M. (2009). Gold complexes as potential anti-parasitic agents. *Coord. Chem. Rev.*, 253(11–12), 1619-1626.
- Németh, T., Mócsai, A. (2012). The role of neutrophils in autoimmune diseases. *Immunol. Lett.*, 143(1), 9-19.
- Nobili, S., Mini, E., Landini, I., Gabbiani, C., Casini, A., Messori, L. (2010). Gold compounds as anticancer agents: chemistry, cellular pharmacology, and preclinical studies. *Med. Res. Rev.*, 30(3), 550-580.

- Omata, Y., Folan, M., Shaw, M., Messer, R. L., Lockwood, P. E., Hobbs, D., Bouillaguet, S., Sano, H., Lewis, J.B., John, C., Wataha, J. C. (2006). Sublethal concentrations of diverse gold compounds inhibit mammalian cytosolic thioredoxin reductase (TrxR1), *Toxicology in Vitro*, 20(6), 882-890.
- Ott, I., Scheffler, H., Gust, R. (2007). Development of a method for the quantification of the molar gold concentration in tumour cells exposed to gold-containing drugs. *ChemMedChem*, 2, 702-707.
- Prast-Nielsen, S. (2009). Exploring thioredoxin reductase as an anticancer drug target. Stockholm: Karolinska University Press.
- Reeves, M.A., Hoffmann, P.R. (2009). The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. *Cell. Mol. Life Sci.*, 66(15), 2457-2478.
- Rigobello, M.P., Scutari, G., Boscolo, R., Bindoli, A. (2002). Induction of mitochondrial permeability transition by auranofin, a gold (I)-phosphine derivative. *Br. J. Pharmacol.*, 136(8), 1162-1168.
- Rigobello, M.P., Messori, L., Marcon, G., Cinellu, M.A., Bragadin, M., Folda, A., Scutari, G., Bindoli, A. (2004). Gold complexes inhibit mitochondrial thioredoxin reductase: consequences on mitochondrial functions. *J. Inorg. Biochem.*, 98(10), 1634-1641.
- Rigobello, M.P., Folda, A., Scutari, G., Bindoli, A. (2005). The modulation of thiol redox state affects the production and metabolism of hydrogen peroxide by heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, 441, 112-122.
- Rigobello, M.P., Folda, A., Dani, B., Menabò, R., Scutari, G., Bindoli, A. (2008). Gold (I) complexes determine apoptosis with limited oxidative stress in Jurkat T cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 582, 26-34.
- Roberts, J.R., Xiao, J., Schliesman, B., Parsons, D.J., Shaw, C.F. 3rd. (1996). Kinetics and mechanism of the reaction between serum albumin and auranofin (and its isopropyl analogue) in vitro. *Inorg. Chem.*, 35, 424-433.
- Sánchez-Delgado, R.A., Lazard, K., Rincón, L., Urbina, J.A. (1993). Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases. 1. Enhancement of the efficacy of clotrimazole against *Trypanosoma cruzi* by complexation to ruthenium in RuCl₂(clotrimazole). 2. *J. Med. Chem.*, 36(14), 2041-2043.
- Sánchez-Delgado, R.A., Navarro, M., Pérez, H., Urbina, J.A. (1996). Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases. 2. Synthesis and antimalarial activity in vitro and in vivo of new ruthenium- and rhodium-chloroquine complexes. *J. Med. Chem.*, 39(5), 1095-1099.
- Sánchez-Delgado, R.A., Navarro, M., Lazard, K., Atencio, R., Capparelli, M., Vargas, F., Urbina, J.A., Bouillez, A., Noels, A.F., Masi, D. (1998). Toward a novel metal based chemotherapy against tropical diseases 4. Synthesis and

- characterization of new metal-clotrimazole complexes and evaluation of their activity against *Trypanosoma cruzi*. *Inorg. Chim. Acta*, 275–276, 528-540.
- Sato, H., Yamaguchi, M., Shibasaki, T., Ishii, T., Bannai, S. (1995). Induction of stress proteins in mouse peritoneal macrophages by the anti-rheumatic agents gold sodium thiomalate and auranofin. *Biochem. Pharmacol.*, 49, 1453-1357.
- Scarborough, P.M., Mapuskar, K.A., Mattson, D.M., Gius, D., Watson, W.H., Spitz, D.R. (2012). Simultaneous inhibition of glutathione- and thioredoxin-dependent metabolism is necessary to potentiate 17AAG-induced cancer cell killing via oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 52(2), 436-443.
- Shaw, IC. (1999). Gold-based therapeutic agents. *Chem. Rev.*, 99, 2589-2600.
- Shaw III, CF. (1999). The biochemistry of gold. En H. Schmidbaur (Ed.), *Gold: Progress in Chemistry, Biochemistry and Technology* (pp. 280-283): John Wiley & Sons Ltd.
- Simons, A.L., Parsons, A.D., Foster, K.A., Orcutt, K.P., Fath, M.A., Spitz, D.R. (2009). Inhibition of glutathione and thioredoxin metabolism enhances sensitivity to perfosine in head and neck cancer cells. *J. Oncol.*, 2009, 519563.
- Smith, A.D., Guidry, C.A., Morris, V.C., Levander, O.A. (1999). Aurothioglucose inhibits murine thioredoxin reductase activity *in vivo*. *J. Nutr.*, 129, 194-198.
- Smith, D.A., Di, L., Kerns, E.H. (2010). The effect of plasma protein binding on *in vivo* efficacy: misconceptions in drug discovery. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 9(12), 929-939.
- Smith, R.A., Porteous, C.M., Gane, A.M., Murphy, M.P. (2003). Delivery of bioactive molecules to mitochondria *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 100(9), 5407-5412.
- Snyder, R. M., Mirabelli, C.K., Crooke, S.T. (1986). Cellular association, intracellular distribution, and efflux of auranofin via sequential ligand exchange reactions. *Biochem Pharmacol.*, 35(6), 923-932.
- Soga, M., Matsuzawa, A., Ichijo, H. (2012). Oxidative Stress-Induced Diseases via the ASK1 Signaling Pathway. *Int. J. Cell. Biol.*, 2012, 439587.
- Tiekink, E. R. (2002) Gold derivatives for the treatment of cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 42(3), 225-248.
- Tonissen, K. F., Di Trapani, G. (2009) Thioredoxin system inhibitors as mediators of apoptosis for cancer therapy. *Mol. Nutr. Food. Res.*, 53(1), 87-103.
- Vint, I. A., Chain, B.M., Foreman, J. C. (1993). The interaction of auranofin and buthionine sulfoximine blocks activation of human peripheral T lymphocytes. *Cell. Immunol.*, 152, 152-161.

- Vint, I. A., Foreman, J. C., Chain, B. M. (1994). The gold anti-rheumatic drug auranofin governs T cell activation by enhancing oxygen free radical production. *Eur. J. Immunol.*, 24, 1961-1965.
- Wakasugi, N., Tagaya, Y., Wakasugi, H., Mitsui, A., Maeda, M., Yodoi, J., Tursz, T. (1990). Adult T-cell leukemia-derived factor/thioredoxin produced by both human T-lymphotropic virus type I- and Epstein-Barr virus-transformed lymphocytes acts as an autocrine growth factor and synergizes with interleukin 1 and interleukin 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 8282-8286.
- Yoo, M.H., Xu, X. M., Carlson, B.A., Gladyshev, V.N., Hatfield, D. L. (2006) Thioredoxin reductase 1 deficiency reverses tumor phenotype and tumorigenicity of lung carcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, 281(19), 13005-13008.
- Yoo, M. H., Xu, X. M., Carlson, B.A., Patterson, A. D., Gladyshev, V. N., Hatfield, D. L. (2007). Targeting thioredoxin reductase 1 reduction in cancer cells inhibits self-sufficient growth and DNA replication. *PLoS ONE*, 2(10), e1112.
- Zhao, F., Yan, J., Deng, S., Lan, L., He, F., Kuang, B., Zeng, H. (2006). A thioredoxin reductase inhibitor induces growth inhibition and apoptosis in five cultured human carcinoma cell lines. *Cancer Lett.*, 236, 46-53.
- Zhong, L., Arner, E. S., Liung, J., Aslund, F., Holmgren, A. (1998). Rat and calf thioredoxin reductase are homologous to glutathione reductase with a carboxyl-terminal elongation containing a conserved catalytically active penultimate selenocysteine residue. *J. Biol. Chem.*, 273, 8581-8591.