

Participación de las especies reactivas de oxígeno en los efectos apoptóticos y antiproliferativos del complejo de oro BmAu sobre las células leucémicas

Franklin J Pacheco¹, Eddy Lucena², German Fraile³, Mait Velásquez⁴, Ronald Reggio⁵

^{1,2,3,4,5}Instituto de Investigaciones Biomédicas; Universidad de Carabobo, Venezuela

¹fpacheco2@uc.edu.ve

³gfrailev@gmail.com

⁴maitvelasquez@gmail.com

⁵ronaldreggio@gmail.com

Recibido: 15 julio 2022

Aceptado: 18 sept. 2022

RESUMEN

La búsqueda de nuevas drogas capaces de generar un efecto antiproliferativo, ha dado lugar a la síntesis de nuevos complejos de oro cuya acción están involucradas las especies reactivas de oxígenos (ROS). El estudio tuvo como objetivo establecer la participación de las ROS en los efectos apoptóticos y antiproliferativos de complejo de oro BmAu sobre las células U937. Se empleó una línea celular de monocitos leucémicos U937, soluciones de trabajo de BmAu (0,1, 1, 5 y 10 μ M) y glutatión como agente antioxidante. Para evidenciar el efecto del complejo de oro se emplearon los métodos de exclusión de azul tripano y microscopia de fluorescencia. Se observó un efecto apoptótico y antiproliferativo del complejo de oro en todo el rango de concentraciones con diferencia estadística tanto a la 24 como a las 48 horas. En presencia de glutatión se evidenció un que el este fue capaz de inhibir parcialmente las ROS. Estos hallazgos permiten concluir que el BmAu es capaz de inducir un estrés oxidativo, es decir, que existe participación de las ROS en los eventos anteriormente señalados.

PALABRAS CLAVE: Apoptosis; Proliferación; ROS; Antioxidante

ABSTRACT

Participation of reactive oxygen species in the apoptotic and antiproliferative effects of the new gold complex on leukemic cells. The search for new drugs capable of generating an antiproliferative effect has led to the synthesis of new gold complexes whose action involves reactive oxygen species (ROS). The aim of the study was to establish the participation of ROS in the apoptotic and antiproliferative effects of gold complex BmAu on U937 cells. A cell line of U937 leukemic monocytes, working solutions of BmAu (0.1, 1, 5 and 10 μ M) and glutathione as antioxidant agent were used. To evidence the effect of gold complex, trypane blue exclusion and fluorescence microscopy methods were used. It was observed an apoptotic and antiproliferative effect of gold complex in the whole range of concentrations with statistical difference at 24 and 48 hours. In presence of glutathione, it was evidenced that the east was able to partially inhibit ROS. These findings allow us to conclude that BmAu is capable of inducing oxidative stress, that is, that there is participation of ROS in the events previously mentioned.

KEYWORDS: Apoptosis; Proliferation; ROS; Antioxidant

INTRODUCCIÓN

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas que en el último orbital tienen un electrón no apareado (radical libre), los cuales confiere inestabilidad física. Se incluyen en estas especies a moléculas precursoras de los radicales libres (H_2O_2 , $HONO_2^-$) (1). Estas especies participan en procesos fisiológicos en el organismo como la apoptosis celular. Cuando la generación de ROS supera a los mecanismos de inactivación, se presenta el estado metabólico de estrés oxidante que se caracteriza por daños moleculares y celulares que conducen a predisposición o modificación de diversos padecimientos crónico-degenerativos de la célula (2). Las células cuentan con una

batería de defensas antioxidantes, cuya función es impedir la formación de ROS o neutralizarlas una vez que se han formado. Una parte importante de estas defensas se concentran en la mitocondria siendo de nuestro interés el glutatión, jugando un papel fundamental en la protección celular (3).

La apoptosis y la necrosis son dos mecanismos mediante los cuales puede ocurrir muerte celular. La primera constituye una medida fisiológica de remoción celular, bajo control genético, que se caracteriza por colapso celular, condensación de la cromatina y fragmentación del ácido desoxirribonucleico (ADN), mientras que la necrosis es un proceso pasivo en la que la muerte celular se produce por un daño directo, irreversible, de las estructuras celulares, como ocurre en la isquemia severa, por acción de temperaturas extremas, por agentes químicos diversos o por trauma mecánico, entre otros (4,5). Durante las últimas décadas la investigación dedicada a la búsqueda de nuevos tratamientos antitumorales ha experimentado un gran desarrollo, con el uso particular de complejos de oro (6). Los complejos de oro son moléculas cuya estructura básica consiste en la combinación del átomo de oro al ligando fosfina y de drogas con actividades biológicas conocidas como por ejemplo: cloroquina (CQAu), clotrimazol (CTZAu) y ketoconazol (7).

En tal sentido el complejo de oro denominado BmAu [borato de bis (2-mercapto-1-metilimidazol-3-il) (trifenilfosfina)oro(I)] reúne características químicas interesantes debido a la presencia de un átomo de boro coordinado con dos grupos metilimidazol y además, el átomo central de oro(I) está coordinado con dos átomos de azufre (S) y un grupo fosfina, formando un enlace trigonal planar distorsionado (8). La ausencia de carga neta lo diferencia del resto de los complejos de oro(I) de estructura lineal tales como CTZAu y CQAu los cuales requieren por lo tanto, la presencia de un contraión (PF_6^-). Todo lo expuesto anteriormente nos llevó a plantearnos como objetivo establecer la participación de las especies reactivas de oxígeno en los efectos apoptóticos y antiproliferativos del nuevo complejo de oro (BmAu) sobre las células leucémicas U937, lo que significa un aporte importante en la búsqueda de nuevas drogas con potencial terapéutico.

METODOLOGÍA

Tipo de Investigación.

El presente trabajo es una investigación descriptiva de tipo experimental, donde se somete un cultivo de células leucémicas (monocitos) U937, a la presencia de diferentes concentraciones del nuevo complejo de oro BmAu y glutatión, con la finalidad de determinar la participación de las especies reactivas de oxígeno en los efectos apoptóticos y antiproliferativos de dicho complejo.

Muestra biológica.

Para cumplir con los objetivos planteados se realizaron una serie de ensayos *in vitro* utilizando como muestra biológica monocitos leucémicos U937 (donada por el Instituto de Inmunología de la Universidad Central de Venezuela). Estas muestras han sido cultivadas y mantenidas *in vitro* en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Carabobo (BIOMED-UC).

Procedimiento experimental.

Preparación del medio de cultivo y soluciones.

Se preparó la solución madre de BmAu 10 mM en DMSO y a partir de esta se obtuvieron las soluciones de trabajo de 0,1, 1, 5 y 10 μM . Por otra parte, el suero fetal bovino fue inactivado térmicamente (a 56 °C por 30 min). El medio de cultivo se preparó disolviendo 10,4 g de RPMI 1640 sólido, 1 g de NaHCO_3 , por cada litro de solución, adicionalmente fue suplementado con 100 U/mL de penicilina y 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomycin, y finalmente, esterilizado por filtración con membranas de 0,2 μm . El pH del medio de cultivo fue ajustado a 7,4 con Hepes 500 mM. Para la preparación

Cultivo celular

La línea celular de monocitos leucémicos U937 cultivaron en medio de RPMI 1640, suplementado con suero fetal bovino 10% v/v y glutamina 1 mM en atmósfera húmeda de CO₂ al 5% en aire y a 37 °C.

Determinación de la necrosis y apoptosis de las células U937 en ausencia y en presencia de glutatión mediante microscopia de fluorescencia.

En la microscopia de fluorescencia el uso del colorante fluorescente naranja de acridina (NA) permite cuantificar el número de células que dentro de una población han sufrido apoptosis. Sin embargo, ese colorante no permite diferenciar entre células viables y no viables. Para hacer esta distinción, se puede recurrir a una mezcla de NA y Bromuro de etidio (BE) ya que la captación diferencial de estos dos pigmentos permite dicha diferenciación (9). Las células U937 (1x10⁶ células/mL) se incubaron con el complejo de oro en una microplaca de 96 pozos: en cada pozo se colocará 196 µL de células (diluidas ½), 2 µL de glutatión a concentración fija de 10 mM y 2 µL del complejo de oro BmAu, a diferentes concentraciones. En ausencia de glutatión se colocaron 198 µL de células (diluidas ½) y 2 µL del complejo de oro BmAu a diferentes concentraciones para ser incubadas en atmósfera húmeda de CO₂ al 5% a 37 °C durante 24 y 48 horas. Al finalizar la incubación, se homogeneizaron las células en los mismos pozos de la microplaca. Se centrifugo 200 µL de las células homogeneizadas a 2000 rpm por 5 min en viales de 500 µL. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se resuspendieron el sedimento de células con 200 µL de solución amortiguadora de PBS pH 7,4. Las células U937 se tiñeron con 1 µL de solución de NA/BE 1:1(v/v) [NA en PSB pH 7.4) (100 µg/mL)], se mezcló suavemente y se examinaron a través de un microscopio de fluorescencia Leica Modelo DMLS bajo luz azul.

Este método permitió la identificación de células con diferentes estadios según un patrón de coloración, tal como se describe a continuación:

- i) Células viables: la cromatina se observa verde brillante con estructura organizada y citoplasma rojo.
- ii) Células apoptóticas: la cromatina se observa verde brillante y altamente condensada o fragmentada.
- iii) Células necróticas: la cromatina se observa naranja brillante y citoplasma de aspecto rojizo.

Determinación de la viabilidad celular en ausencia y en presencia de glutatión mediante el método de exclusión de azul tripano.

Se basa en la capacidad que tienen las membranas celulares intactas de expulsar el colorante azul tripano una vez que ha difundido pasivamente al interior celular. Las células viables, cuya membrana celular está intacta, excluyen el colorante y se observan refringentes mientras que las no viables (necróticas) adquieren una coloración azul cuando se observan al microscopio óptico (10). Se colocaron en un portaobjeto 20 µL de una solución de azul tripano al 0,4% (p/v). Se cubrió con una laminilla y se observó al microscopio óptico (Carl Zeiss, Modelo Axiolab) con objetivo de 20X, contando el número de células no teñidas por cada 100 células contadas. Los resultados se expresaron como porcentaje de necrosis.

Análisis de Datos

Se realizó el análisis estadístico de los resultados utilizando el programa GraphPad INSTAT versión 3.01 para Windows, siendo expresados como Media ± Desviación Estándar de la propiedad determinada para la totalidad de los ensayos realizados. También se empleó un análisis de varianza y la prueba de Dunnett.

La representación de los resultados en tablas y gráficos fueron realizados utilizando el programa GraphPad Prism versión 4.0 para Windows.

RESULTADOS

En el presente trabajo se evaluaron los efectos del complejo BmAu sobre la necrosis, apoptosis y proliferación de la línea celular U937 para lo cual se hizo necesario realizar incubaciones a 24 y 48 horas en ausencia y presencia de GSH con un rango de concentraciones de BmAu entre 0,1 y 10 μM . La presencia de GSH tiene como finalidad dilucidar si los efectos evaluados se relacionan con especies reactivas de oxígeno y rutas de estrés oxidativo.

Efectos del complejo BmAu sobre la necrosis de células U937 en ausencia de GSH.

Para medir el efecto sobre la necrosis de las células U937 se empleó el método de microscopía de fluorescencia (naranja de acridina y bromuro de etidio) mediante el cual se logró determinar el % de necrosis a diferentes tiempos de incubación. Los resultados mostrados en la figura 2 (Panel A) muestra que a las 24 horas de incubación con BmAu, se evidenció un efecto estadísticamente significativo sobre la necrosis en todo el rango de concentraciones entre 1-10 μM . Por su parte, se observó que a las 48 horas de incubación (Panel B) el incremento en el % de necrosis a las concentraciones de 1 y 5 μM fue más evidente aunque con la misma significancia.

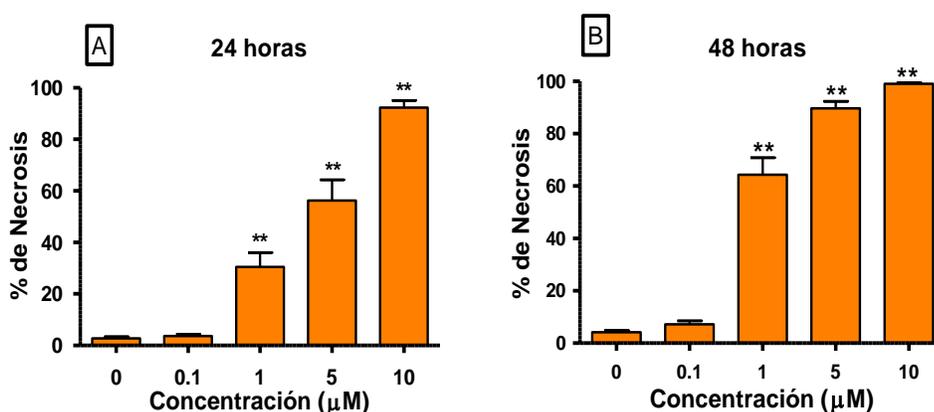


Figura 2. Efectos del BmAu sobre la necrosis de células U937 a diferentes tiempos de incubación en ausencia de GSH. Las células U937 (10^6 cel/ml) fueron incubadas con BmAu a las concentraciones señaladas durante (A) 24 y (B) 48 horas. La necrosis fue determinada mediante microscopía de fluorescencia. ** $p < 0,01$ (Dunnett; $n=6$).

Efectos del complejo BmAu sobre la necrosis de las células U937 en presencia de GSH.

Para medir el efecto de BmAu sobre la necrosis en presencia de 10 mM GSH se empleó la misma metodología anteriormente mencionada, pero solamente utilizando las concentraciones 1 y 5 μM de BmAu. Los resultados de la Figura 3 indican que la presencia de GSH ejerció su acción antioxidante porque disminuyó el % de necrosis a las 24 horas y 48 horas a la concentración de 1 μM con respecto, al obtenido para ambos tiempos de incubación en ausencia de GSH. Para una concentración de 5 μM de BmAu no se evidencia que la presencia de GSH haya logrado revertir el efecto observado para ambos tiempos de incubación en ausencia del mismo (Figura 2A y 2B).

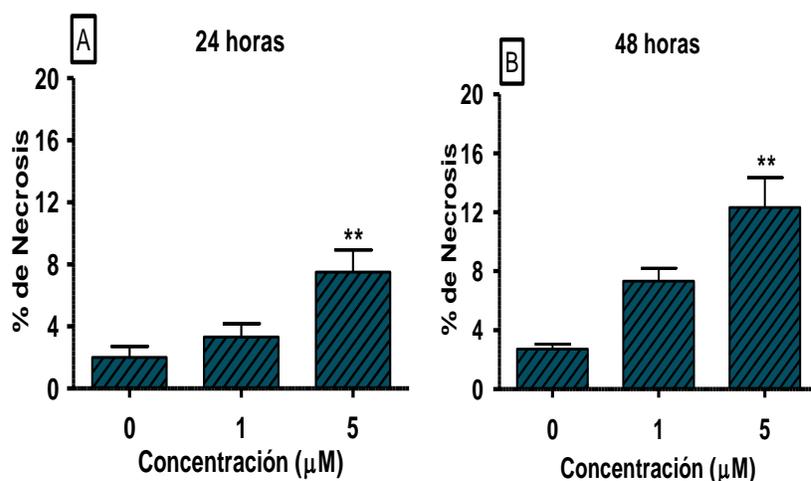


Figura 3. Efectos del BmAu sobre la necrosis de células U937 a diferentes tiempos de incubación en presencia de GSH adicionado 10 min después del complejo. Las células U937 (10^6 cel/ml) fueron incubadas con BmAu a las concentraciones señaladas durante (A) 24 y (B) 48 horas. La necrosis fue determinada mediante microscopia de fluorescencia. ** $p<0,01$ (Dunnett; $n=6$).

Efectos del complejo BmAu sobre la apoptosis de las células U937 en ausencia de GSH.

La condensación y fragmentación de la cromatina son eventos morfológicos característicos de la apoptosis tardía que puede ser fácilmente observable utilizando la microscopia de fluorescencia tiñendo las células con una mezcla de naranja de acridina y bromuro de etidio. Así, mediante la aplicación de esta técnica se demostró que a las 24 horas de incubación figura 4 (Panel A), hubo un aumento significativo de la apoptosis a las concentraciones de 1 y 5 μM. Por otra parte, se observó que a las 48 horas Figura 4 (Panel B) solo la concentración de 1 μM mantuvo el efecto proapoptótico descrito en tiempos de incubación menores.

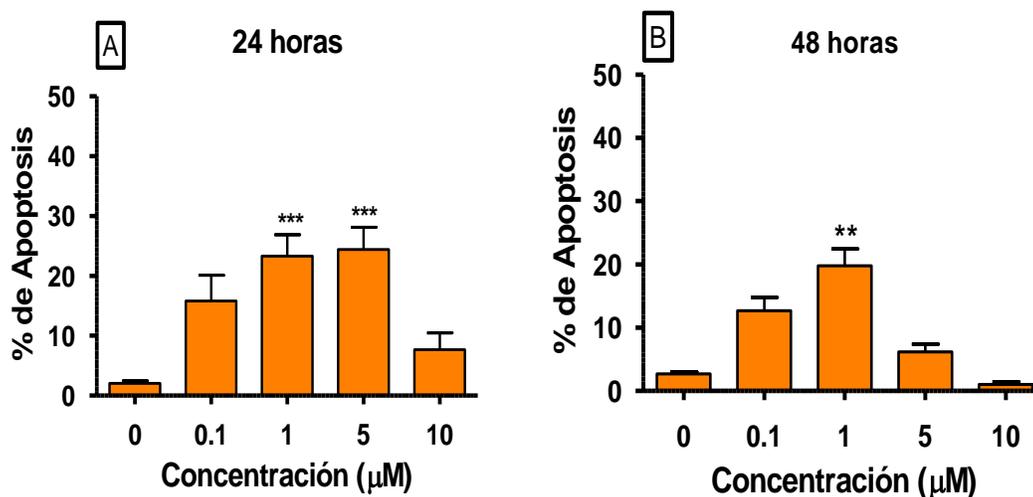


Figura 4. Efectos del BmAu sobre la apoptosis de las células U937 a distintos tiempos de incubación en ausencia de GSH y determinadas por microscopia de fluorescencia. ** $p<0,01$ y *** $p<0,001$ (Dunnett; $n=6$).

Efectos del complejo BmAu sobre la apoptosis de las células U937 en presencia de GSH.

La figura 5 (Panel A), revela que en presencia de GSH durante 24 horas de incubación la concentración 1 μM , no produjo un efecto apoptótico significativo; es decir, que en comparación con los resultados en ausencia de GSH el efecto proapoptótico fue revertido mientras que a la concentración de 5 μM el efecto proapoptótico con respecto al control fue evidente. Por otra parte, a las 48 horas de incubación se evidenció un incremento significativo de la apoptosis a ambas concentraciones con respecto al control, lo que permite presumir que se deba a un agotamiento de GSH adicionado al medio de incubación. Figura 5 (Panel B)

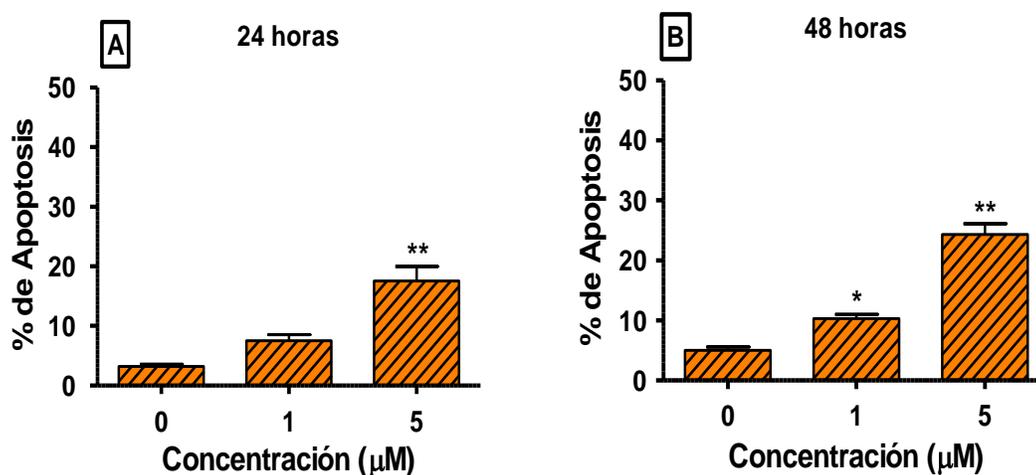


Figura 5. Efectos de BmAu sobre la apoptosis a distintos tiempos de incubación en presencia de GSH adicionado 10 min después del complejo y determinadas por microscopía de fluorescencia. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Dunnett; $n=6$)

Efectos del complejo BmAu sobre la proliferación de las células U937 en ausencia de GSH.

Para determinar el efecto de BmAu sobre la proliferación de U937 se utilizaron aquellas concentraciones que causaron efectos significativos sobre la necrosis y la apoptosis en los ensayos previos. Para ello se realizó un conteo celular con una cámara de Neubauer y los resultados se expresaron en cel/mL. Los resultados de la figura 6, muestran que las concentraciones de 1 y 5 μM inhibieron la proliferación celular tanto a las 24 como a las 48 horas.

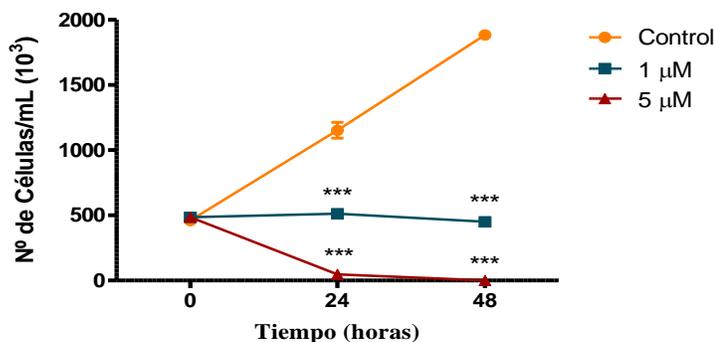


Figura 6. Efectos de BmAu sobre la proliferación de las células U937 en ausencia de GSH incubadas por 24 y 48 horas cuantificadas en cámara de Neubauer. *** $p < 0,001$ (Dunnett; $n=6$).

Efectos del complejo BmAu sobre la proliferación de las células U937 en presencia de GSH.

En la figura 7 se observó que la presencia de GSH revirtió el efecto de BmAu 1 μM observado en ausencia del mismo. Así pues se observó que la proliferación a la concentración de 1 μM no se afectó ni siquiera 48 horas después de incubación, por lo tanto el GSH ejerció un efecto protector. Por el contrario, a la concentración de 5 μM se mantuvo el efecto antiproliferativo por BmAu sobre las células U937.

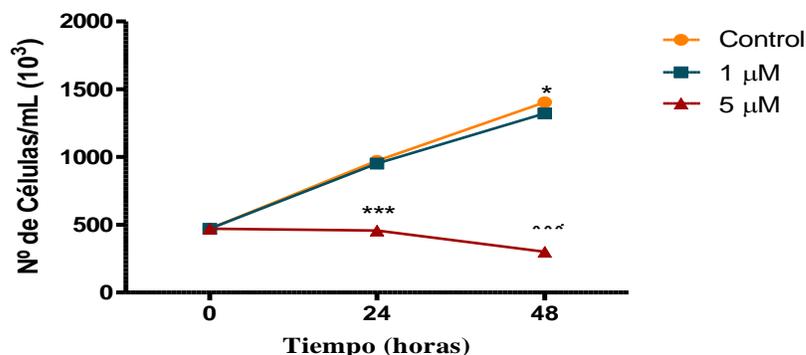


Figura 7. Efectos de BmAu sobre la proliferación de las células U937 en presencia de GSH adicionado 10 min después del complejo e incubadas por 24 y 48 horas respectivamente y cuantificadas en cámara de Neubauer. *** $p < 0,001$ (Dunnett; $n=6$)

DISCUSIÓN

En los últimos años los complejos de oro en sus estados de oxidación +1 y +3 (Au(I) y Au(III)) han sido estudiados como potenciales agentes antitumorales, generalmente en sistemas de células cultivadas en los cuales han mostrado una elevada citotoxicidad (11). Por otra parte, se ha determinado que en ciertas patologías como el cáncer y la artritis están asociadas con situaciones de estrés oxidativo que traen como consecuencia la producción de eventos celulares tales como la necrosis, apoptosis e inhibición de la proliferación (12). Además, existen algunas evidencias *in vitro* que sugieren que los complejos de oro pueden generar situaciones de estrés oxidativo (13). Sin embargo, existen defensas antioxidantes como lo es el glutatión cuya actividad sugiere que especies reactivas de oxígeno probablemente jueguen un papel relevante en el mecanismo subyacente de la muerte celular inducida por los complejos de oro (14)

Se evidenció que la co-incubación de las células U937 con 10 mM de GSH revierte parcialmente la necrosis producida a las 24 y 48 horas de incubación sólo para una concentración de 1 μM de BmAu (Figura 3A y 3B), aunque para 5 μM también se produjo una disminución notable de la necrosis, pero el efecto a esta concentración de 5 μM fue estadísticamente significativo con respecto al control. En este sentido, debe destacarse que los efectos citotóxicos en células Jurkat de algunos complejos de oro como la auranofina y clotrimazol-oro fueron parcialmente revertidos por otro antioxidante como lo es la catalasa, de un modo dosis-dependiente para esa enzima(15). así mismo otros estudios señalan que el mecanismo de acción, de algunos complejos de oro como el ([AuL1(PPh3)]TfO) posiblemente, actúa elevando los niveles de ROS debido a su capacidad de inhibir la enzima Tiorredoxina Reductasa (TrxR), además de actuar sobre la subunidad $\beta 5$ del proteasoma, provocando su inhibición(16). Es importante señalar que en ese trabajo emplearon un rango de concentración de 0,1-10 μM de los complejos de oro siendo la concentración de 1 μM auranofina y de 1- 5 μM clotrimazol-oro las que lograron revertir el efecto citotóxico. Por lo tanto, los resultados obtenidos con BmAu concuerdan con la publicación antes señalada.

Al realizar la evaluación de la apoptosis el GSH solo logró revertir el efecto apoptótico para una concentración de 1 μM de BmAu a las 24 horas de incubación (Figura 5A) mientras que para 5 μM no se logró revertir este efecto. Además, a las 48 horas de incubación se mantuvo tanto para 1 y 5 μM de BmAu (Figura 5B) el efecto proapoptótico, e inclusive para la mayor concentración de BmAu se originó un incremento de la apoptosis lo cual refleja que el efecto antioxidante del GSH es dependiente de la dosis del complejo y del tiempo de incubación. Sugiriendo que la inducción de apoptosis por BmAu se debe, al menos en parte, a la generación de estrés oxidativo.

La presencia de 10 mM GSH revierte la inhibición de la proliferación producida por BmAu a 1 μM tanto a las 24 horas como a las 48 horas de incubación mientras que a 5 μM dicho efecto no fue revertido (Figura 7), lo que demuestra nuevamente que el efecto protector del GSH respecto al efecto antiproliferativo producido por BmAu es dependiente de la concentración. Es importante señalar que tanto para la inducción de apoptosis como la inhibición de la proliferación celular el efecto protector del GSH se produce cuando se incubaron las células con 1 μM de BmAu, correspondiendo este resultado con la concentración reportada para auranofina, la cual no logró afectar el contenido de GSH en células Jurkat (17); sin embargo, el tiempo de incubación fue de 2 horas en contraste con las 24 y 48 horas del presente trabajo. No obstante, los resultados presentados aquí demuestran que los efectos antiproliferativos y apoptóticos de BmAu no pueden ser revertidos por el GSH en todo el rango de concentración (1- 5 μM) lo que sugiere que posiblemente la generación del estrés oxidativo por BmAu es limitado.

La capacidad mostrada por BmAu de posiblemente inducir, aunque moderadamente, la producción de especies reactivas de oxígeno en células U937, así como la mostrada por otros complejos de oro en células Jurkat, puede tener implicaciones terapéuticas no suficientemente exploradas. Aún por ejemplo, se ha demostrado que Auranofina puede reprimir las actividades transcripcionales sensibles al status redox intracelular, tales como las de AP-1 (*Activating Protein-1*) y las de NF- κ B (*Nuclear Factor-kappa B*) así como activar al factor de transcripción Nrf2 (*Nuclear erythroid 2 p45-related factor 2*). Este último está involucrado en la estimulación de la expresión de diversos genes anti-oxidantes incluyendo el de la enzima gamma-glutamyl-cisteinil sintetasa (γ -GCS), cuya actividad limita la velocidad de síntesis del GSH (18). Estas notables propiedades de los complejos de oro podrían ameritar que sean incluidos dentro del arsenal de nuevos fármacos que funcionen como agentes preventivos o curativos de algunos tipos de cáncer.

CONCLUSIONES

En conclusión, el presente trabajo demostró que los efectos citotóxicos en células U937 por BmAu fueron parcialmente revertidos por el GSH. En ese sentido, BmAu es un complejo de oro que es capaz de inducir estrés oxidativo de manera limitada en todo el rango de concentración utilizado (1-5 μM). Por otra parte, el efecto protector del GSH es dependiente tanto de las dosis como de los tiempos de incubación en las células leucémicas U937.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Navarro M, Fraile G, Velasquez M, Gonzalez-Mrcano E, Escalona J, Ilanjian R et al. Effect of a gold-chloroquine complex on inflammation-related leukocyte functions and cell viability: Comparison with auranofin. *Arzneimitt. Forsch.* 2006;56(12):826-33
2. Rigobello MP, Folda A, Dani B, Menabò R, Scutari G, Bindoli A. Gold(I) complexes determine apoptosis with limited oxidative stress in Jurkat T cells. *Eur. J. Pharmacology.* 2008; 582: 26-34.
3. Navarro M, Duque J, Velásquez M, Reggio R, Rodríguez L, Germán F. Evaluación in vitro de algunas actividades biológicas del complejo clotrimazol-oro(I)-trifenilfosfina en leucocitos humanos: una comparación con auranofina. *Salus.* 2009; 12(1): 216-232.
4. Rigobello MP, Messori L, Marcon G, Cinellu MA, Bragadin M, Folda A et al. Gold complexes inhibit mitochondrial thioredoxin reductase: consequences on mitochondrial functions. *J. Inorg. Biochem.* 2004; 98: 1634-1641.