

CICLO REDOX DE LA O-NAFTOQUINONA CG 10-248: FUNCION DE LA FLAVOENZIMA DT-DIAFORASA

Dubin, M.; Fernández Villamil, S.H.; Stoppani, A.O.M.*

Centro de Investigaciones Bioenergéticas, Facultad de Medicina (UBA-CONICET),
Paraguay 2155, 1121-Buenos Aires, Argentina.
e-mail: stoppani@mail.retina.ar

Received June 3, 2002. In final form: November 18, 2002

Abstract

The lipophilic o-naphthoquinone CG 10-248 (CG), an inhibitor of tumor cells growth, trypanosomatid growth and viral activity constitutes with reduced pyridine nucleotides (NAD(P)H), and the flavoenzyme DT-diaphorase from rat liver cytosol, a redox system whose action generates "reactive oxygen species", namely, superoxide and hydrogen peroxide. The quinone redox cycle includes (1) the quinone reduction by NAD(P)H, a two-electron transfer reaction catalysed by DT-diaphorase, that leads to hydroquinone production; (2) the hydroquinone oxidation by molecular oxygen, a one electron transfer reaction producing the semiquinone and superoxide; (3) a likely oxidation of the semiquinone by oxygen that produces superoxide and quinone; (4) hydrogen peroxide production by semiquinone oxidation by superoxide; (5) hydrogen peroxide production by superoxide dismutation; (6) semiquinone production by hydroquinone oxidation by the quinone. Catalase, which is present in liver cytosol, decomposed the hydrogen peroxide produced by the CG-cycle operation. Dicumarol prevented the redox cycle operation by selective inhibition of DT-diaphorase. The role of CG redox cycle as a mechanism of quinones cytotoxicity is discussed.

Resumen

La o-naftoquinona lipofílica CG 10-248 (CG), inhibe el crecimiento de células tumorales, de tripanosomatideos y la actividad viral. Constituye un sistema redox con nucleótidos de piridina reducidos (NAD(P)H) y la DT-diaforasa del citosol hepático, cuya operación genera superóxido y peróxido de hidrógeno. Ese ciclo redox implica (1) la reducción de CG a hidroquinona por transferencia de dos electrones, catalizada por la DT-diaforasa; (2) la oxidación de la hidroquinona por el oxígeno por transferencia de un electrón, con formación de la semiquinona y superóxido; (3) la oxidación similar de la semiquinona por el oxígeno, con producción de superóxido y regeneración de la quinona; (4) la producción de peróxido de hidrógeno por oxidación de la semiquinona por superóxido; (5) la producción de peróxido de hidrógeno por dismutación del superóxido catalizada por la superóxido dismutasa; (6) la producción de semiquinona por oxidación de la hidroquinona por la quinona. La catalasa del citosol, descompone el peróxido de hidrógeno formado por las reacciones mencionadas. El dicumarol inhibe la operación del ciclo redox por acción selectiva sobre la DT-diaforasa. Se discute la función del ciclo redox como mecanismo de la citotoxicidad de CG y moléculas similares.

Introducción

La *o*-naftoquinona β -lapachona se caracteriza por su capacidad para inhibir el crecimiento de células tumorales, de bacterias y de tripanosomatideos [1-3]. La β -lapachona es activa en sarcomas, carcinomas, melanomas, hepatomas, linfomas y gliomas, entre otros tumores [4-6]. La síntesis de nuevas *o*-naftoquinonas ha permitido obtener moléculas con diferentes grupos atómicos en el carbono 2 del anillo pirano [7]. Entre esas moléculas, la CG 10-248, resultó muy activa en ratones infectados con el virus de la leucemia de Rauscher o *in vitro*, sobre la DNA polimerasa-RNA dependiente del mismo virus [7]. Efectos similares se observaron con el virus de la mieloblastosis. Por otra parte, CG inhibe *in vitro* el crecimiento de tripanosomatideos como *Crithidia fasciculata*, *Leptomonas seymouri* y *Trypanosoma cruzi* [8,9].

La gran mayoría de las investigaciones sobre la acción citotóxica de las *o*-naftoquinonas lipofílicas se ha realizado con células tumorales [4-6]. Los efectos de CG *in vivo*, se obtuvieron con dosis relativamente altas (hasta 125 mg/kg/día) [7].

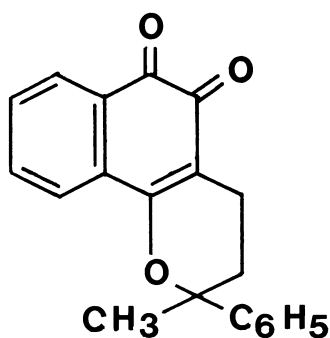


Figura 1: Estructura de la *o*-naftoquinona (CG 10-248).

Dada la actividad de CG como productora de ROS [10-12] las dosis mencionadas podrían implicar “efectos no deseados” de CG y moléculas similares. El presente estudio se ha realizado con el objeto de evidenciar la producción de ROS por CG en células normales, antecedente fundamental para cualquier aplicación terapéutica de CG. En los hepatocitos de rata, el citosol contiene DT-diaforasa, una flavoenzima [13], que reduce a las naftoquinonas por transferencia de dos electrones del NAD(P)H [14-16]. Se diferencia de otras flavoenzimas que transfieren un solo electrón al sustrato quinona [17-19]. La DT-diaforasa puede tener acción antioxidante, pro-oxidante, anticarcinogénica y antimutagénica, según las condiciones experimentales [20-28]. Es inhibida específicamente por el dicumarol [13, 15, 16].

Las observaciones que se describen en este trabajo muestran que (a) CG es sustrato de la DT-diaforasa hepática, que con NADPH como dador de electrones reduce la quinona a hidroquinona; (b) en presencia de oxígeno molecular, la hidroquinona se oxida formando semiquinona y superóxido. Se postula una cadena redox caracterizada por fases de iniciación, propagación y terminación; (c) la SOD del citosol reacciona con el superóxido resultante del ciclo redox catalizado por la DT-diaforasa formando peróxido de hidrógeno, oxígeno molecular y (d) la catalasa del citosol descompone al

peróxido de hidrógeno así formado, con producción de oxígeno. Se evalúa la función de cada una de esas reacciones ante posibles efectos tóxicos de CG.

Parte experimental

Preparación de citosol hepático. Se utilizaron ratas Wistar (230-250 g de peso), alimentadas con una dieta de composición similar al alimento Purina. El contenido en proteína de la dieta fue de 23% e incluía amino ácidos esenciales. Las ratas fueron sometidas a un ayuno de 24 horas antes de ser sacrificadas. Los hígados se homogeneizaron con Tris-KCl (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, KCl 150 mM) en proporción de 4 o 7 ml por g de tejido hepático, lo que determinó distintas concentraciones de proteína y DT-diaforasa en el citosol. Los homogenados se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 minutos, para eliminar núcleos y fragmentos celulares, y los sobrenadantes resultantes se centrifugaron a 11000 g durante 15 minutos, para eliminar mitocondrias. Finalmente, los sobrenadantes se centrifugaron a 105000 g durante 60 minutos para obtener citosol, una fracción libre de microsomas, peroxisomas y retículo endoplasmático, que contenía proteína y DT-diaforasa como se indica en Tabla 1. El citosol se conservó a -60°C .

Reactivos. CG se obtuvo de Ciba-Geigy (Novartis), Basilea. Su análisis por HPLC dio una pureza de 98%. El espectro de absorción tenía un máximo a 548 nm con $\epsilon = 1.3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. CG se disolvió en DMFA y alícuotas de esa solución se utilizaron como se indica en Resultados. En todos los experimentos las muestras testigo recibieron el volumen correspondiente de DMFA. NADPH, NADH, dicumarol, PO_4HK_2 , $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, DMFA, citocromo *c* acetilado, SOD y catalasa se obtuvieron de Sigma Chemical Company. Otros reactivos fueron los mismos usados en experimentos anteriores [8-12] y eran de pureza analítica. El argón se obtuvo de AGA, Gases Especiales, Argentina.

Espectrofotometría. CG y NAD(P)H se midieron con un espectrofotómetro Aminco DW UV/VIS 2 A, a 30°C . Otras medidas se realizaron con un espectrofotómetro Perkin Elmer Modelo 550 a 30°C . La absorbancia de soluciones conteniendo NADPH y CG resultó de la suma de las absorbancias de todas las moléculas presentes, incluyendo moléculas ajenas a las reacciones en estudio, por ejemplo, proteínas no específicas. La medición de la concentración de las moléculas activas exigió la amplificación de las señales y como consecuencia de ello la absorbancia aparente de la mezcla de reacción excedió los límites de la escala correspondiente del espectrofotómetro. Para resolver esta dificultad se compensó parcialmente la absorbancia de la mezcla de reacción. Esto impidió representar la totalidad de la absorbancia que se representó por una ordenada parcial.

Polarografía. El consumo de oxígeno por los sistemas NADPH/CG/citosol se midió con un Oxígrafo Gilson modelo 5/6 provisto de un electrodo de Clark. La mezcla de reacción contenía fosfato de potasio 0.1 M y el pH 7.4 (concentración final en la mezcla de reacción). El citosol, CG, NADPH y dicumarol se agregaron como se indica en Resultados; el volumen total en la celda fue 1.8 ml y la temperatura 30°C .

Actividades enzimáticas. La actividad DT-diaforasa se midió a 30°C con el sistema NADPH/menadiona [29], utilizando una mezcla de reacción que contenía 20 o 100 μl de citosol, NADPH 100 μM , menadiona 100 μM y fosfato de potasio, 0.1 M, pH 7.4 (concentración final en la mezcla de reacción); volumen total de 3.0 ml. La reacción se inició con la adición de citosol. La actividad DT-diaforasa se calculó por la medida de la

velocidad de oxidación del NADPH a 30°C, utilizando $\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Una unidad de actividad enzimática (U) representa la oxidación de 1 μmol de NADPH/min. La actividad de la catalasa se midió a 30°C por espectrofotometría a 240 nm [30]. La mezcla de reacción contenía 10, 20 o 40 μl de citosol, H_2O_2 10 mM y fosfato de potasio 0.1 M, pH 7.4 (concentración final en la mezcla de reacción) y volumen total 3.0 ml. La actividad catalítica se calculó por el consumo de H_2O_2 , utilizando, $\epsilon = 0.04 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. La SOD se midió a 30°C por su acción inhibidora sobre la producción del superóxido formado por la reacción del adrenocromo [31]. La mezcla de reacción contenía 2, 5 ó 10 μl de citosol, L-epinefrina 1.0 mM, EDTA 1.0 mM, glicina-Na 50 mM, pH 10.4 (concentración final en la mezcla de reacción) y volumen total 3.0 ml. La actividad SOD se calculó por comparación con la actividad de un patrón de SOD Sigma Chemical Company (50000 U/ml).

Superóxido. Se midió a 30°C por la producción de adrenocromos utilizando la mezcla de reacción descrita [31] y también, por reducción del citocromo c acetilado [32]. Con este último método, la mezcla de reacción contenía: NADPH 300 ó 100 μM , acetil-citocromo c 15 ó 30 μM , fosfato de potasio 0.1 M, pH 7.4 (concentración final en la mezcla de reacción) y 20 ó 60 μl de citosol; volumen total, 3.0 ml. La reducción del citocromo c acetilado se midió a 30°C por espectrofotometría diferencial a 550-540 nm utilizando $\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Otras condiciones se describen en Resultados.

Estadística. Se utilizó el programa INSTAT; la probabilidad P de las diferencias se analizó con la prueba *t* de Student.

Resultados

La actividad de la DT-diaforasa en el citosol se presenta en la Tabla 1. Las diferencias en la actividad DT-diaforasa fueron consecuencia de variaciones en la concentración de proteína del citosol pues la relación DT-diaforasa/proteína no varió significativamente ($P > 0.53$). El dicumarol 15 μM inhibió la actividad DT-diaforasa confirmando así la especificidad de la reacción. La actividad de la catalasa fue de $2.15 \pm 0.24 \mu\text{mol}$ de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min/ml}$ de solución y la actividad de la SOD fue de 50 U/ml de solución (condiciones experimentales omitidas).

Producción de superóxido por el ciclo redox de CG.

La Figura 2 muestra el efecto de CG sobre la producción de superóxido por citosol suplementado con NADPH. En ausencia de CG, la producción de superóxido fue de 5 nmol/min/mg de proteína. La adición de CG produjo un aumento significativo dependiente de la concentración de la quinona. El aumento fue rápido con CG 1-10 μM . Concentraciones mayores de CG (10-50 μM) fueron relativamente menos activas como promotores del aumento de la producción de superóxido, lo que determinó una cinética de tipo michaeliano. La adición de SOD inhibió significativamente, 50%, la producción de superóxido confirmando así la especificidad de la reacción. La Tabla 2 muestra que la producción de superóxido fue proporcional a la concentración de DT-diaforasa en el medio de reacción. El dicumarol inhibió esa producción, confirmando así, la función de la DT-diaforasa en la generación de superóxido.

Oxidación del NADPH.

La Figura 3 A muestra la oxidación del NADPH por el sistema CG/DT-diaforasa. La adición de NADPH a la mezcla de reacción que contenía CG y DT-diaforasa produjo

el aumento de absorbancia correspondiente al NADPH, seguido por una rápida disminución resultante de la oxidación del mismo.

Citosol (mg proteína).ml ⁻¹	Naftoquinona (100 μM)	DT-diaforasa	
		U.ml ⁻¹	U.(mg proteína) ⁻¹
8.4	Menadiona	0.19 ± 0.015 (100)	0.022 ± 0.002*
	CG	0.29 ± 0.02 (81)	0.031 ± 0.003**
18	Menadiona	0.54 ± 0.09 (71)	0.030 ± 0.006*
	CG	0.83 ± 0.3 (93)	0.040 ± 0.003**
33	Menadiona	0.55 ± 0.04	0.016 ± 0.001*
	CG	0.83 ± 0.12	0.025 ± 0.004**
33	Menadiona	0.60 ± 0.25	0.018 ± 0.007*

Tabla 1: Actividad DT-diaforasa de citosol hepático. La mezcla de reacción contenía NADPH 100 μM, naftoquinona 100 μM, fosfato de potasio 0.1 M, pH 7.4, y diferentes preparaciones de citosol cuyo contenido en proteína vario entre 33 y 8.4 mg/ml, según las condiciones de la preparación. La actividad DT-diaforasa se midió por la oxidación del NADPH medida a 340 nm. La menadiona es un sustrato específico para la DT-diaforasa. En paréntesis se indican la inhibición por dicumarol 15 μM. Otras condiciones según Parte Experimental. Actividad promedio ± SD (U/ml). *: Para menadiona: 0.021 ± 0.006; **: Para CG: 0.032 ± 0.007. Probabilidad de la diferencia de actividades en función del sustrato P<0.02.

DT-diaforasa (mU/ml)	Producción de O ₂ ⁻ (μM/min)
Sin dicumarol	
0.28	1.36 ± 0.14
0.57	2.08 ± 0.17
1.14	5.09 ± 1.00
2.28	9.19 ± 1.68
Con dicumarol	
1.14	0.57 ± 0.43 (89)

TABLA 2: Efecto de la concentración de DT-diaforasa sobre la producción de superóxido por el sistema NADPH/CG/citosol. La mezcla de reacción contenía DT-diaforasa (citosol) como se indica, CG 100 μM, NADPH, 300 μM, citocromo c acetilado, 30 μM, fosfato de potasio, 0.1 M pH 7.4 y dicumarol 15 μM como se indica (concentraciones en el medio de reacción). La producción de superóxido se midió durante 1-5 minutos de incubación, según la actividad de la mezcla de reacción. Los valores representan la medida ± S.D. de por lo menos 4 determinaciones. El citosol (33 mg de proteína/ml), se añadió en volumen correspondiente a la concentración de DT-diaforasa indicada. Otras condiciones según Material y Métodos.

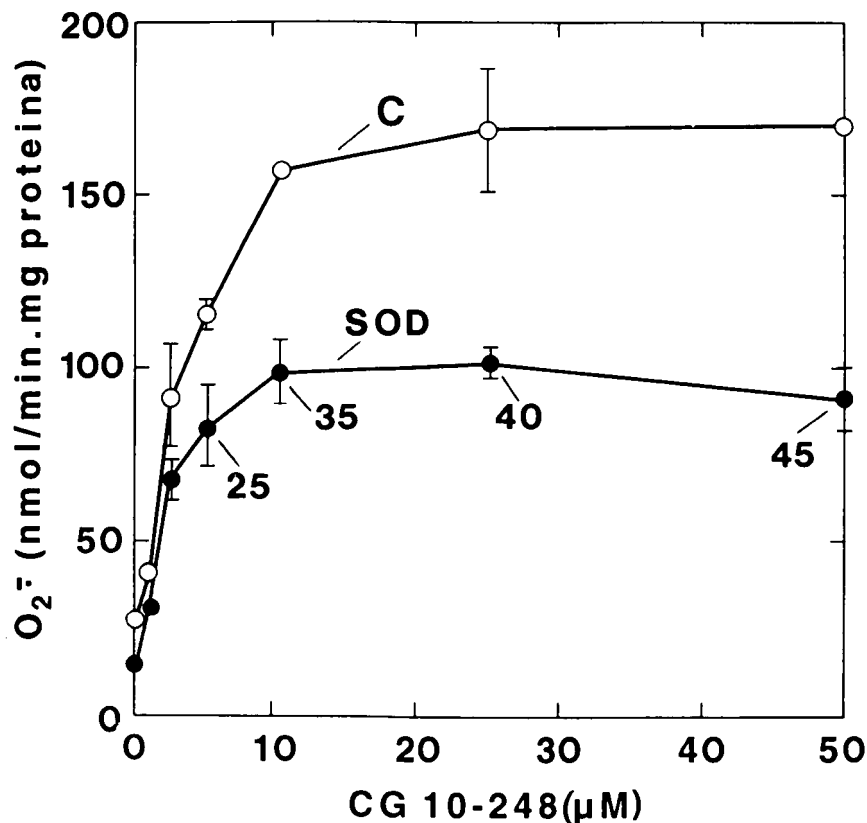


Figura 2: Efecto de CG sobre la producción de superóxido por el sistema NADPH/DT-diaforasa. La mezcla de reacción contenía NADPH 300 µM, 20 µl de citosol (1.0 mU DT-diaforasa/ml), acetil-citocromo c 15 µM, fosfato de potasio 0.1 M, pH 7.4 y CG como indica la abscisa. Volumen total, 3.0 ml. SOD (50 U/ml) se agregó como indica la figura. Otras condiciones según Parte Experimental. Los valores representan el promedio de por lo menos 4 determinaciones independientes ±SD. C, muestra control; SOD, muestra suplementada con la enzima. Las cifras bajo el trazado SOD indican la inhibición (%) de la producción de superóxido.

En esas condiciones experimentales, la velocidad de la oxidación fue superior a 180 µM/min. La velocidad de oxidación del NADPH disminuyó de manera que su concentración se estabilizó a un nivel correspondiente al 5% de la concentración inicial (100%). Una segunda adición de NADPH produjo un efecto similar al primero pero la velocidad de oxidación fue algo menor (170 µM/min). La tercera adición de NADPH produjo una velocidad de oxidación significativamente menor que las anteriores (20 µM/min). En esas condiciones, la saturación de la mezcla de reacción con oxígeno restableció la capacidad del sistema para oxidar NADPH (velocidad 180 µM/min) que confirmó una última adición de NADPH (velocidad 120 µM/min). La Figura 3B muestra que el dicumarol produjo una disminución importante (85%) de la velocidad inicial de oxidación del NADPH que se redujo a 31-25 µM/min. Finalmente la omisión del citosol de la mezcla de reacción impidió la oxidación del NADPH (Figura 3 C) confirmando así

la función de la DT-diaforasa. Los mismos resultados (omitidos) se obtuvieron con NADH en lugar de NADPH (datos experimentales omitidos).

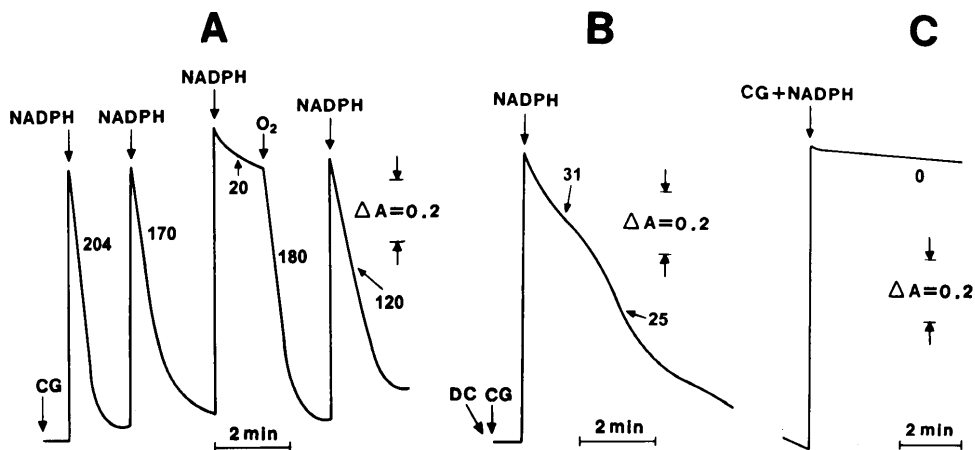


Figura 3 A: Oxidación del NADPH por el sistema DT-diaforasa/CG. La mezcla de reacción contenía CG 100 μ M, citosol (52 mU de DT-diaforasa/ml) y fosfato de potasio 0.1 mM, pH 7.4. Adición de NADPH 300 μ M y gaseado con O_2 durante 1 min como indica la figura; volumen total 3.0 ml. Absorbancia y tiempo de incubación según las escalas correspondientes. Las cifras al lado de los trazados indican la velocidad de oxidación del NADPH por el sistema CG/citosol (μ M/min). **B:** condiciones como en A, excepto dicumarol 10 μ M (DC). **C:** condiciones como en A, excepto el citosol (omitido). Trazados típicos. Otras condiciones se describen en Parte Experimental y en Resultados

Ciclo redox de CG.

La Figura 4 muestra la influencia del NADPH sobre el nivel redox de CG, en presencia de DT-diaforasa.

El estado redox de CG se visualizó por la variación de absorbancia a 548 nm, pues a esa longitud de onda la absorbancia de la hidroquinona fue nula. Se puede observar que la adición de CG al medio de reacción produjo un aumento inmediato de absorbancia, seguido por una muy lenta disminución de la misma. En esas condiciones, la adición de NADPH produjo una disminución rápida de absorbancia cuya velocidad inicial fue $> 200 \mu$ M/min. Esa velocidad disminuyó de manera que la concentración de CG se redujo a un nivel aproximadamente igual al 40% de su concentración inicial. Ese mínimo se observó entre 20 y 50 segundos después de la iniciación de la reacción. A continuación, la absorbancia aumentó progresivamente, hasta alcanzar una velocidad de aproximadamente 50 μ M/min. Finalmente, el nivel redox de CG se estabilizó a un nivel correspondiente al 80% de su concentración inicial.

La Figura 5 muestra los efectos del NADPH, el argón y el dicumarol sobre el ciclo redox de CG con mayor concentración de citosol y menor tiempo de incubación que en la Figura 4, lo que permitió visualizar mejor la cinética del ciclo redox de CG. Se puede ver que la adición inicial de CG a la mezcla de reacción produjo el previsible aumento de absorbancia seguido por una disminución lenta (7.5 μ M/min) imputable a especies reductoras propias del citosol. La primera adición de NADPH produjo un ciclo

redox de CG consistente en una reducción rápida de la quinona ($> 180 \mu\text{M}/\text{min}$) seguido por una oxidación relativamente rápida de la hidroquinona ($99 \mu\text{M}/\text{min}$) con un nivel mínimo de concentración de quinona de aproximadamente de 33-35% del valor inicial de CG lo que implicó una reducción de 65-67% (valores calculados respecto a la concentración de CG inmediatamente antes de la adición de NADPH o inmediatamente después de la adición de CG). La segunda adición de NADPH produjo un ciclo redox similar de CG, con velocidades de reducción y oxidación >180 y $92 \mu\text{M}/\text{min}$, respectivamente.

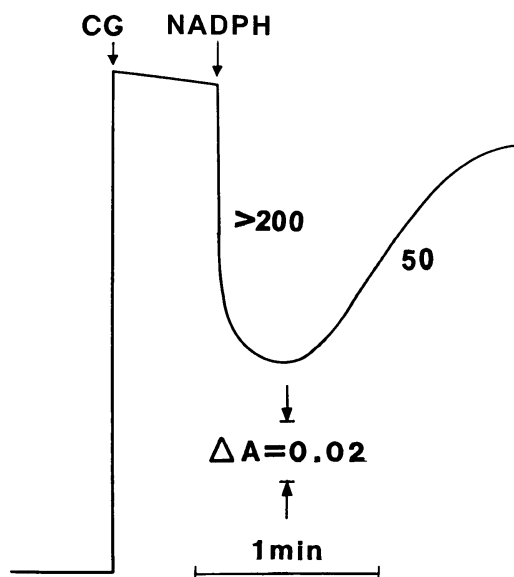


Figura 4: Ciclo redox de CG en presencia del sistema NADPH/DT-diaforasa. La mezcla de reacción contenía NADPH $300 \mu\text{M}$, CG $100 \mu\text{M}$, citosol (52 mU de DT-diaforasa/ml), fosfato de potasio 50 mM , pH 7.4. CG y NADPH se añadieron como indican la figura. Otras condiciones según Materiales y Métodos. Las cifras al lado de los trazados indican velocidad de reducción de las quinona o de oxidación de la hidroquinona ($\mu\text{M}/\text{min}$). Trazado típico

La reducción de CG, fue de 85% respecto a la concentración inicial de CG inmediatamente después de la adición de CG y 74%, respecto a la concentración inmediatamente antes de la segunda adición de NADPH. El nivel mínimo de CG oxidado después de la segunda adición de NADPH fue similar al observado después de la primera adición. La Figura 5 B muestra la influencia del argón sobre el ciclo redox de CG. Después de añadir CG a la mezcla de reacción se gaseó la misma con argón durante 1 minuto produciendo el aumento de la velocidad de reducción de la misma ($33 \mu\text{M}/\text{min}$), por los reductores propios del citosol posiblemente los mismos que redujeron CG antes de la segunda adición de NADPH en el experimento A. La adición de NADPH aumentó la velocidad de reducción de CG que alcanzó un valor ($> 180 \mu\text{M}/\text{min}$) comparable a la del experimento aeróbico, pero la reducción de CG fue mayor pues su concentración se redujo al 11% de la concentración inicial, valor significativamente menor que en el experimento aeróbico (Figura 5 A; primer ciclo redox). La velocidad de reoxidación de la

hidroquinona fue más lenta que en el experimento aeróbico (28 $\mu\text{M}/\text{min}$) probando así la intervención del oxígeno en el ciclo redox de CG. El estado estacionario final, se estabilizó a un nivel equivalente al 39% de la concentración inicial de quinona contra 85% en la muestra aeróbica. Se debe remarcar que en ausencia de oxígeno, reemplazado por argón, la oxidación de la hidroquinona fue lenta, comparada con su oxidación en presencia de oxígeno (Figura 5). La adición de dicumarol inhibió la reducción de CG (Figura 5C). Las disminuciones de absorbancia resultante de la adición de NADPH fueron imputables, en parte, a la dilución de la mezcla de reacción por la adición de reactivos.

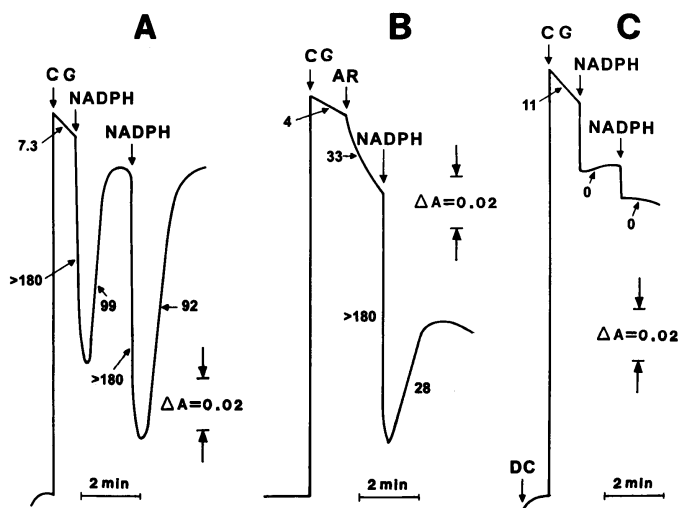


Figura 5: A: Ciclo redox de CG en presencia del sistema NADPH DT-diaforasa, influencia de la anaerobiosis y el dicumarol. La mezcla de reacción contenía CG 100 μM , citosol (95 mU/ml de DT-diaforasa), fosfato de potasio 0.1 M, pH 7.4 y NADPH 300 μM , agregado como indica la figura. Volumen total, 3.0 ml. Absorbancia y tiempo de incubación según las escalas correspondientes. Otras condiciones según Parte Experimental y Resultados. Las cifras al lado de los trazados representan velocidad de reducción de la quinona o de oxidación de la hidroquinona ($\mu\text{M}/\text{min}$). Figura B: condiciones como en A, excepto el gaseado con argón (AR; 1 min) como indica la figura. Figura C: condiciones como en A, excepto el dicumarol 15 μM (DC). Trazados típicos.

Consumo de oxígeno por el sistema NADPH/CG/citosol.

La operación del ciclo redox de CG determinó el consumo de oxígeno resultante de la oxidación de la hidroquinona y la semiquinona. La Figura 6A muestra el efecto de la adición de CG a la mezcla de reacción que contenía citosol y NADPH (la concentración de DT-diaforasa utilizada fue mayor que los experimentos espectrofotométricos debido a características propias del método polarográfico).

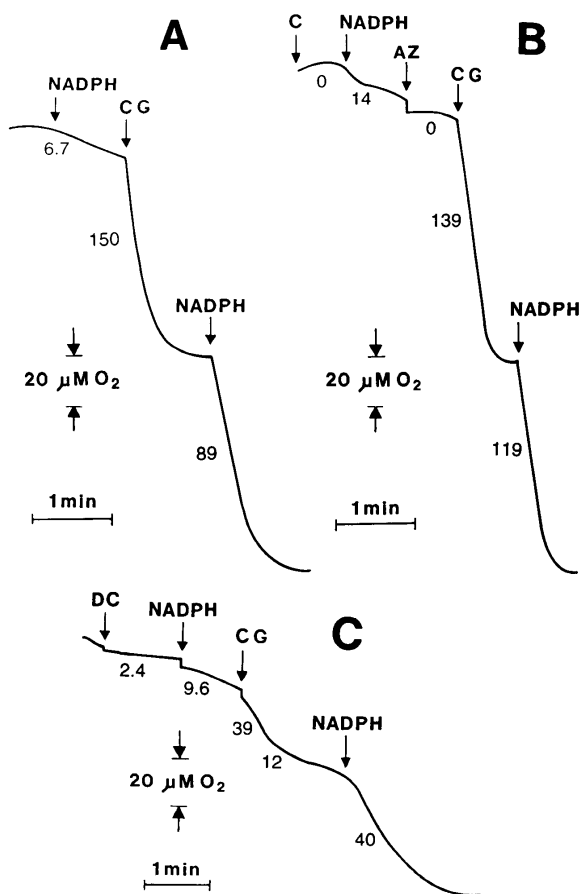


Figura 6: *A:* Consumo de oxígeno por el sistema NADPH/DT-diaforasa/CG. La mezcla de reacción contenía CG 100 μM , fosfato de potasio 0.1 M, pH 7.4, citosol (153 mU/ml de DT-diaforasa) y NADPH 300 μM . El orden de adición como indica la figura. Volumen total, 1.8 ml. *B:* condiciones como en A, excepto la adición de azida sódica, 1.0 mM (AZ). *C:* condiciones como en Figura A, excepto dicumarol 25 μM (DC). Las cifras al lado de los trazados indican consumo de oxígeno ($\mu\text{M}/\text{min}$). Trazados típicos.

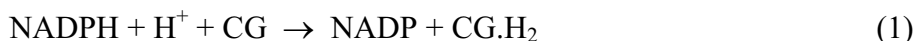
La CG provocó un rápido aumento del consumo de oxígeno que pasó de 6.7 a 150 $\mu\text{M}/\text{min}$. La reacción se detuvo cuando se consumió aproximadamente el 50% del oxígeno de la mezcla de reacción. En esas condiciones una nueva adición de NADPH restableció el consumo de oxígeno a una velocidad menor (89 $\mu\text{M}/\text{min}$) que después de la primera adición de NADPH. La adición de azida, un inhibidor de la catalasa, a la mezcla de reacción (Figura 6 B) produjo una disminución no significativa (7%) del consumo de oxígeno resultante de la primera adición de NADPH, pero la segunda adición de NADPH produjo un aumento relativo (33%) del consumo de oxígeno comparado con el control sin azida (Figura 6 A) que reflejó la producción de peróxido de hidrógeno por reacciones correspondientes a la oxidación de la hidroquinona o la semiquinona por superóxido (ver Discusión). Finalmente, la adición de dicumarol produjo una importante inhibición del consumo de oxígeno (Figura 6 C). La inhibición se manifestó en primer término sobre la oxidación de sustratos propios del citosol y después de la adición de CG sobre el

consumo de oxígeno dependiente del ciclo redox de CG con una cinética compleja que incluyó una primera fase de menor inhibición (79%) seguida por otra de mayor inhibición (92%). Resultados concordantes se obtuvieron después de la segunda adición de NADPH pero en ese caso la inhibición fue menor siendo la diferencia imputable a reacciones de oxidación de la hidroquinona no sensible al dicumarol (ver Discusión).

Discusión

Los resultados presentados en la Tabla 2 y la Figura 2 muestran que en el citosol hepático CG origina una serie de reacciones específicas que forman ROS, en particular, superóxido y peróxido de hidrógeno lo que explicaría la citotoxicidad de CG.

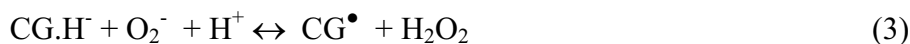
El ciclo redox del sistema NAD(P)H/DT-diaforasa/CG resulta de la reducción de la quinona por el sistema NADPH/DT-diaforasa (Reacción 1) seguido por la reoxidación de la hidroquinona por una serie de reacciones similares a las que intervienen en el ciclo redox de las *p*-quinonas (33). Esas reacciones constituyen la fase oxidativa del ciclo. La Reacción 1 se expresa por la disminución de absorbancia del NAD(P)H (Figura 3) y de CG (Figuras 4 y 5).



La fase oxidativa del ciclo se expresa por: (a) el aumento de absorbancia del sistema a 548 nm inherente a la oxidación de la hidroquinona a semiquinona o quinona (Figuras 4 y 5); (b) la producción de superóxido (Figura 2 y Tabla 2); (c) el efecto del oxígeno sobre la oxidación del NADPH (Figuras 3 B y 5 B); y (d) el consumo de oxígeno por el sistema NADPH/CG-diaforasa/DT y su modificación por el dicumarol y la azida (Figura 6). Estos efectos se explican por las reacciones siguientes. Reacción 2: oxidación de la hidroquinona (forma anión) por el oxígeno:



que forma semiquinona y superóxido. Reacción 3:



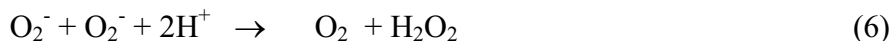
oxidación de la hidroquinona por el superóxido que forma semiquinona y peróxido de hidrógeno. Reacción 4:



oxidación de la semiquinona por el oxígeno que forma quinona y superóxido. Se deben agregar dos reacciones complementarias. Reacción 5:



dismutación de la semiquinona que produce quinona e hidroquinona (reversible) y Reacción 6:



dismutación del superóxido que produce oxígeno y peróxido de hidrógeno.

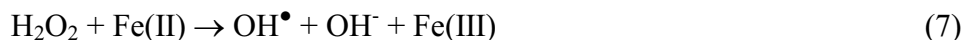
La función de esas reacciones en el ciclo redox de CG es diferente: la Reacción 2 inicia la oxidación de la hidroquinona (reacción de iniciación); las reacciones 3 y 4 multiplican la producción de ROS (reacciones de propagación); las reacciones 5 y 6 eliminan ROS, interrumpiendo la operación del ciclo (reacciones de terminación). Las reacciones 2 y 4 son lentas comparadas con las reacciones en que el superóxido es el oxidante (reacciones 3 y 4). En ese contexto la SOD tiene efectos diferentes. En la Reacciones 2 y 4 acelera la velocidad de oxidación de la hidroquinona y la semiquinona al desplazar el equilibrio hacia la derecha por descomposición del superóxido; en la Reacción 3 retarda la velocidad de oxidación al desplazar el equilibrio hacia la izquierda por eliminación del oxidante. Este efecto explica los resultados en la Tabla 2.

La simultaneidad de las Reacciones 1-6 condiciona la cinética del ciclo redox. La reducción inicial de CG (Reacción 1) es una reacción rápida resultante de la alta actividad catalítica de la DT-diaforasa pero su velocidad disminuye en función de la disminución de la concentración de quinona y de NADPH. En consecuencia, la relación CG/CG.H (quinona/hidroquinona anión) varía con el tiempo de reacción y en un determinado momento las velocidades se equilibran a un nivel mínimo de la curva redox (Figuras 4 y 5). Después la velocidad de oxidación de CG.H⁻ por el oxígeno (Reacción 2) o por el superóxido (Reacción 3) prevalece y la proporción de CG[•] (o CG) formada por las Reacciones 2-5 aumenta hasta alcanzar un valor estacionario final en el que la concentración de CG más CG[•] alcanza un valor cercano a la concentración inicial de CG (Figuras 4 y 5). Esa cinética es favorecida por el consumo de NADPH, cuya concentración disminuye en proporción a la reducción de CG (Figura 3). Como consecuencia de esa disminución, la posibilidad de reducción de la CG inicial o regenerada por oxidación de CG.H⁻ resulta cada vez menor lo que explica la estabilización de la concentración de los productos de oxidación de CG.CG⁻ a un nivel relativamente alto. La reacción 5 explica la producción de CG por re-oxidación de CG.H⁻ en ausencia de oxígeno (Figura 5 B). Las reacciones 2 y 4 (producción de superóxido) concuerdan con el efecto de la SOD en la Figura 2 y las Reacciones 3 y 6 con el efecto de la azida en la Figura 6 por la producción del sustrato de la catalasa, peróxido de hidrógeno.

La DT-diaforasa presente en el citosol hepático cataliza la Reacción 1. Su función se demuestra por: (a) la inactividad del sistema en ausencia del citosol (Figura 3 C); (b) la acción inhibitoria del dicumarol sobre la oxidación del NADPH (Figura 3 B); (c) la reducción de CG (Figuras 4 y 5) y al consumo de oxígeno resultante de la operación del sistema (Figura 6). La DT-diaforasa se caracteriza por su capacidad para transferir dos electrones al sustrato CG. La diferencia entre la DT-diaforasa y las otras flavoenzimas [17-19] se expresa en el producto de reducción de la quinona, a saber, la hidroquinona por la DT-diaforasa y la semiquinona por las otras flavoenzimas. Los resultados negativos de la espectroscopía de ESR (omitida) confirmaron la necesidad del oxígeno para la formación de semiquinona. CG pertenece al grupo de quinonas que en presencia del sistema NAD(P)H/DT-diaforasa, forma moléculas reactivas [9-12]. En virtud de esa

propiedad, CG y sus análogos se pueden considerar sustratos redox-lábiles de la DT-diaforasa [21].

El ciclo redox de CG en el citosol hepático produce sobre todo superóxido cuya citotoxicidad es conocida [35]. El superóxido se convierte en peróxido de hidrógeno (Reacción 6) cuya toxicidad es relativa [36]. En presencia de cationes metálicos como Fe(II), el peróxido de hidrógeno genera el radical hidroxilo que es muy tóxico (Reacción 7). Esa reacción contribuiría la citotoxicidad de ROS [37]. La producción de ROS promovida por el ciclo redox de la DT-diaforasa podría contribuir a la citotoxicidad de las *o*-naftoquinonas CG sobre células tumorales [24-26,28].



Agradecimientos

Este trabajo se financió con subsidios de la Universidad de Buenos Aires, del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y de la Fundación Alberto J. Roemmers. MAE Verón y S. del Valle prestaron eficaz ayuda técnica.

Bibliografía

- [1] Gonçalves de Lima, O.; D'Albuquerque, I.L.; Gonçalves de Lima, C.; Maia, D. *Revta. Inst. Antibiot. Univ. Recife*. **1962**, 4, 3.
- [2] Ferreira de Santana, C.; Gonçalves de Lima, O.; D'Albuquerque, L.; Lins Lacerda, A.; Gimino Martins, D. *Revta. Inst. Antibiot. Univ. Recife*. **1968**, 8, 89.
- [3] D'Albuquerque, I.L.; Maciel, M.C.N.; Schuler, A.R.; do C. de Araujo, M.; Medeiros Maciel, G.; da S.B. Cavalcanti, M.; Gimino Martins, D.; Lins Lacerda, A. *Revta. Inst. Antibiot. Univ. Recife*, **1972**, 12, 31.
- [4] Paulino, M.; Hansz, M.; Hikichi, N.; Tabares, G.; Molina Portela, M.P.; Fernández Villamil, S.H.; Sreider, C.M.; Stoppani, A.O.M. *An. Asoc. Quim. Argent*. **1994**, 82, 371.
- [5] Stoppani, A.O.M.; Goijman, S.; Dubin, M.; Fernández Villamil, S.H.; Molina Portela, M.P.; Biscardi, A.M.; Paulino, M. *Trends Comp. Biochem. Physiol*. **2000**, 7, 1.
- [6] Dubin, M.; Fernández Villamil, S.H.; Stoppani, A.O.M. *Medicina-Buenos Aires*, **2001**, 61, 343.
- [7] Schaffner-Sabba, K.; Schmidt-Ruppin, K.H.; Wehrli, W.; Schuerch, A.R.; Wasley, J.W.F. *J. Med. Chem*. **1984**, 27, 990.
- [8] Molina Portela, M.P.; de Pahn, E.M.; Galeffi, C.; Stoppani, A.O.M. *Rev. Arg. Microbiol*. **1991**, 23, 1.
- [9] Molina Portela, M.P.; Fernández Villamil, S.H.; Perissinotti, L.J.; Stoppani, A.O.M. *Biochem. Pharmacol*. **1996**, 52, 1875.
- [10] Dubin, M.; Fernández Villamil, S.H.; Stoppani, A.O.M. *Biochem. Pharmacol*. **1990**, 39, 1151.
- [11] Molina Portela, M.P.; Stoppani, A.O.M. *Biochem. Pharmacol*. **1996**, 51, 275.
- [12] Fernández Villamil, S.H.; Dubin, M.; Molina Portela, M.P.; Perissinotti, L.J.; Brusa, M.A.; Stoppani, A.O.M. *Redox Report*. **1997**, 3, 245.
- [13] Ernster, L. *Chem. Scripta* **1987**, 27, 1.
- [14] Smith, M.T.; Eastmond, D.A.; Di Monte, D. *Chem. Scripta* **1987**, 27, 105.

- [15] Huang, M.T.; Smart, R.C.; Thomas, P.E.; Pickett, C.B.; Lu, A.Y.H. *Chem. Scripta* **1987**, 27, 49.
- [16] Segura-Aguilar, J.; Kaiser, R.; Lind, C. *Biochim. Biophys. Acta*, **1992**, 33, 1120.
- [17] Prough, R.A.; Gettings, S.D.; Lubet, R.A.; Nims, R.I.; Santone, K.S.; Powis, G. *Chem. Scripta* **1987**, 27, 99.
- [18] Giulivi, C.; Cadenas, E. *Biochem. J.* **1994**, 301, 21.
- [19] Iyanagi, T. *Free Rad. Res. Comm.* **1990**, 8, 259.
- [20] Cadenas, E.; Hochstein, P. *Advanc. Enzymol.* **1992**, 65, 97.
- [21] Cadenas, E. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, 49, 127.
- [22] Munday, R. *Redox Report* **1997**, 3, 189.
- [23] Beall, H.D.; Murphy, A.M.; Siegel, D.; Hargreaves, R.H.J.; Butler, J.; Ross, D. *Mol. Pharmacol.* **1995**, 48, 499.
- [24] Schor, N.A. *Chem. Scripta* **1987**, 27, 135.
- [25] Chiou, T.-J.; Wang, Y.-T.; Tzeng, W.-F. *Toxicology* **1999**, 139, 103.
- [26] Karczewski, J.M.; Peters, J.G.P.; Noordhoek, J. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, 57, 27.
- [27] Pink, J.J.; Planchon, S.M.; Tagliarino, C.; Varnes, M.E.; Siegel, D.; Boothman, D.A. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 5416.
- [28] Winski, S.L.; Swann, E.; Hargreaves, R.H.J.; Dehn, D.L.; Butler, J.; Moody, C.J.; Ross, D. *Biochem. Pharmacol.* **2001**, 61, 1509.
- [29] Ernster, L. In *Methods in Enzymology*. (Estabrook, R.W.; Pullman, M.E., Edts.) Academic Press, New York. **1967**, 10, 309.
- [30] Bergmeyer, H.U.; Gawehn, K.; Grassi, M. In *Methods of Enzymatic Analysis*. (Bergmeyer, H.U. Ed.) Verlag Chemie International, Deerfield Beach, Florida **1981**, 1, 438.
- [31] Misra, H.P.; Fridovich, I. *J. Biol. Chem.* **1972**, 247, 3170.
- [32] McCord, J.M.; Grapo, J.D.; Fridovich, I. In *Superoxide and Superoxide Dismutase*. (Michelson, A.M.; McCord, J.M.; Fridovich, I. Ed.) Academic Press, London. **1977**, 11.
- [33] Ishii, T.; Fridovich, I. *Free Radical Biol. Med.* **1990**, 8, 21.
- [34] Munday, R. *Free Rad. Res.* **2001**, 35, 145.
- [35] Michelson, A.H. In *Superoxide and Superoxide Dismutase*. (Michelson, A.M.; McCord, J.M.; Fridovich, I. Eds.) Academic Press, New York **1977**, 245.
- [36] Halliwell, B.; Clement, M.V.; Ramalingam, J.; Long, L.H. *IUBMB LIFE* **2000**, 50, 251.
- [37] Koppenol, W.H. *Redox Report* **2001**, 6, 229.

Abreviaturas y estructuras

β -lapachona, 3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-nafto[1,2,b]piran-5,6-diona; CG, CG 10-248, 3,4-dihidro-2-metil-2-fenil-2H-nafto[1,2b]-piran-5,6-diona; CG.H₂, CG hidroquinona; CG.H⁻ forma anion de CG.H₂; CG[•], CG semiquinona; ROS, especies reactivas del oxígeno; DT-diaforasa, NAD(P)H: [quinona aceptor] oxidoreductasa; E.C. 1.6.9.9.2; SOD, superóxido dismutasa; DMFA, dimetilformamida; NAD(P)H, NADH o NADPH.