

## CITOTOXICIDAD DE LA $\beta$ -LAPACHONA: UNA O-NAFTOQUINONA CON POSIBLES USOS TERAPEUTICOS

**MARTA DUBIN, SILVIA H. FERNANDEZ VILLAMIL, ANDRES O.M. STOPPANI<sup>1</sup>**

*Centro de Investigaciones Bioenergéticas, Facultad de Medicina (UBA-CONICET), Universidad de Buenos Aires*

**Resumen** La  $\beta$ -lapachona ( $\beta$ -lap) es una o-naftoquinona extraída de la madera del lapacho. Las observaciones iniciales mostraron su acción inhibitoria del crecimiento del sarcoma de Yoshida y del carcinosarcoma de Walker 256. La  $\beta$ -lap genera productos reactivos del oxígeno (ROS: anión superóxido, radical hidroxilo y peróxido de hidrógeno) a los que inicialmente se atribuyó su citotoxicidad.  $\beta$ -Lap resultó un potente inhibidor de la síntesis de ADN en *T. cruzi*, de la topoisomerasas I y II y de la poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP) de diferentes orígenes, enzimas responsables de la conservación del ADN. Se investigó la citotoxicidad de  $\beta$ -lap en células de cáncer epidermoide de laringe, melanoma, *cáncer de ovario, de mama, de próstata, de pulmón, adenocarcinoma de colon y leucemia*, aportando un mejor conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la acción de  $\beta$ -lap y su relación con los procesos de apoptosis y de necrosis. Se comprobó la activación de la calpaina, proteasa cuya actividad depende de tioles, seguida por la activación de quinasas (c-JUN NH<sub>2</sub>-quinasa terminal), caspasas y nucleasas, enzimas que degradan al ADN y a las proteínas celulares. Una reacción importante para la actividad de la  $\beta$ -lap es su reducción, especialmente por la diaforasa y la NAD(P)H-quinona reductasa, que inician la producción de ROS. La acción de  $\beta$ -lap sobre células tumorales resultaría de la inhibición directa de enzimas como las topoisomerasas, PARP y el factor TNF, sumada a la acción de radicales libres. Los efectos citostáticos de  $\beta$ -lap han abierto interesantes perspectivas para la quimioterapia del cáncer.

**Palabras clave:** o-naftoquinona,  $\beta$ -lapachona, agentes citostáticos, cáncer, topoisomerasas, apoptosis.

**Abstract** *Cytotoxicity of  $\beta$ -lapachone, an o-naphthoquinone with possible therapeutic use.*  $\beta$ -Lapachone ( $\beta$ -lap) is a lipophilic o-naphthoquinone isolated from the bark of the lapacho tree. Initial observations proved its capability for inhibiting growth of Yoshida tumor and Walker 256 carcinosarcoma.  $\beta$ -Lap redox-cycling in the presence of reductants and oxygen yields "reactive oxygen species" (ROS: O<sub>2</sub><sup>-</sup>, OH and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) which cytotoxicity led to assume its role in  $\beta$ -lap activity in cells.  $\beta$ -Lap inhibited DNA synthesis in *Trypanosoma cruzi* as well as topoisomerases I and II, poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in different cells. These enzymes are essential for maintaining DNA structure.  $\beta$ -Lap inhibited growth of a large variety of tumor cells including epidermoid laryngeal cancer, prostate, colon, ovary and breast cancer and also different types of leukemia cells. Advances in knowledge of apoptosis ("programmed cell death") and necrosis provided useful information for understanding the mechanism of  $\beta$ -lap cytotoxicity. Thiol-dependent proteases (Calpaine), kinases (e.g. c-JUN NH<sub>2</sub>-terminal kinase), caspases and nucleasas are involved in  $\beta$ -lap cytotoxicity. These enzymes activity, as well as ROS production by  $\beta$ -lap redox-cycling, would be essential for  $\beta$ -lap cytotoxicity. Diaphorase and NAD(P)H-quinone reductase, which catalyse  $\beta$ -lap redox-cycling and ROS production, seem to play an essential role in  $\beta$ -lap activity. On these grounds, clinical applications of  $\beta$ -lap have been suggested.

**Key words:**  $\beta$ -lapachone, cytostatic agents, cancer, topoisomerases, PARP, apoptosis.

Los productos naturales han sido de gran utilidad para la obtención de fármacos. Basta recordar a la quinina, los opiáceos y los digitálicos, entre otros. En 1962, investigadores de la Universidad de Pernambuco, Brasil,

aislaron varias o-naftoquinonas de la corteza del lapacho (*Tabebuia avellanae*), entre ellas, la  $\beta$ -lapachona ( $\beta$ -lap; 3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-nafto[1,2-b]piran-5,6-diona)<sup>1-4</sup>. En esa molécula, los grupos carbonilos vecinos configuran una estructura electrónica que facilitan reacciones redox, generadoras de radicales libres<sup>5,6</sup>. Por su estructura,  $\beta$ -lap se diferencia del lapachol, una conocida especie química del mismo origen<sup>3,4</sup>. Algunas propiedades de  $\beta$ -lap llamaron la atención de sus descubridores en especial, su capacidad para inhibir el crecimiento

Recibido: 10-II-2001

Aceptado: 14-III-2001

**Dirección postal:** Dr. A.O.M. Stoppani, Centro de Investigaciones Bioenergéticas, Facultad de Medicina, UBA, Paraguay 2155, 1121 Buenos Aires, Argentina  
Fax: (54-11) 4508-3680

e-mail: stoppani@mail.retina.ar

de tumores *in vivo*, como el sarcoma de Yoshida y el carcinoma de Walker<sup>3, 4</sup> y también, para inhibir el crecimiento de bacterias<sup>3, 4</sup> y tripanosomátidos, en particular del *Trypanosoma cruzi*. El efecto de  $\beta$ -lap resultó específico pues su isómero, la *p*-quinona  $\alpha$ -lapachona<sup>4</sup>, fue mucho menos activo. Investigaciones posteriores en la Universidad Federal de Río de Janeiro y en la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires confirmaron la citotoxicidad de  $\beta$ -lap<sup>7, 13</sup> especialmente en tripanosomátidos y células tumorales<sup>14</sup>, y su capacidad para generar "especies reactivas del oxígeno" (ROS: anión superóxido, radical hidroxilo y peróxido de hidrógeno)<sup>7-19</sup>. Teniendo en cuenta la citotoxicidad de ROS, se atribuyó la acción de  $\beta$ -lap a esos radicales. La ausencia de catalasa y el bajo nivel de superóxido dismutasa en *T. cruzi*<sup>20, 21</sup> y en células de tumores<sup>14</sup>, se consideraron factores propicios para explicar la actividad citotóxica de  $\beta$ -lap y sus análogos. El mismo mecanismo se propuso para la acción de  $\beta$ -lap sobre las macromoléculas del *T. cruzi*<sup>22</sup>.

Las observaciones sobre la citotoxicidad de  $\beta$ -lap se limitaron, inicialmente, a definir la relación estructura-actividad y comprobar la posible función de ROS en su acción. Se consideró la posibilidad de utilizar  $\beta$ -lap para esterilizar muestras de sangre destinadas a transfusión<sup>23</sup>, pero esa propuesta no tuvo mayor aceptación, posiblemente por la insolubilidad de  $\beta$ -lap en medio acuoso.

En los últimos diez años el interés por la citotoxicidad de  $\beta$ -lap en células tumorales ha crecido notablemente. La Tabla 1 reseña las publicaciones más importantes sobre el tema. Se puede ver que  $\beta$ -lap resultó activa sobre fibroblastos<sup>2, 3, 25, 26</sup> y numerosas células tumorales, como las de leucemia murina<sup>24</sup>, cáncer epidermoide laríngeo<sup>27, 32, 33</sup>, melanoma<sup>27</sup>, hepatoma<sup>27, 35, 43</sup>, *cáncer de ovario*<sup>28, 34</sup>, *cáncer mamario*<sup>29-36, 37, 41, 44, 45</sup>, *cáncer de pulmón*<sup>30, 31, 33, 41</sup>, de *próstata*<sup>30, 31, 33, 41</sup>, *leucemia humana*<sup>30, 31, 36, 38, 39</sup>, carcinoma de colon<sup>31, 33, 36, 40, 41</sup>, linfoma<sup>42</sup> y glioma<sup>42</sup>.

En la mayoría de esos estudios, la citotoxicidad de  $\beta$ -lap se valoró utilizando su capacidad para inhibir la proliferación celular *in vitro*, medida por recuento de células, por citometría de flujo o por la producción de colonias. Esos estudios demostraron efectos citotóxicos reproducibles con concentraciones de  $\beta$ -lap entre 1.0 y 10  $\mu$ M, en la mayoría de los tumores estudiados. Expresiones frecuentemente utilizadas para representar la citotoxicidad de  $\beta$ -lap fueron  $I_{50}$  y  $I_{75}$  (concentraciones productoras de 50 y 75% de inhibición, respectivamente). En la mayoría de las observaciones citadas, concentraciones de  $\beta$ -lap menores de 5.0  $\mu$ M produjeron efectos citotóxicos notables, incluida la muerte de las células tumorales. Sin embargo, diferentes líneas de un mismo tumor respondieron en distinta forma a  $\beta$ -lap. Por ejemplo, células de *cáncer de colon* de la línea SW116 no fueron afectadas por  $\beta$ -lap en concentraciones superiores a 100  $\mu$ M mientras que células de las líneas HT29 y DLD, dieron  $IC_{50}$  de 5.0  $\mu$ M<sup>41</sup>.

La producción de ROS por  $\beta$ -lap, permitió postular mecanismos asociados a la toxicidad de esos radicales en células tumorales. Sin embargo, un mejor conocimiento de los mecanismos moleculares afectados por  $\beta$ -lap permitió identificar acciones directas de  $\beta$ -lap, sobre enzimas o sistemas enzimáticos específicos. Entre las enzimas afectadas por  $\beta$ -lap se encuentran las topoisomerasas I y II y la poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP).

## $\beta$ -Lapachona, topoisomerasas y PARP

En la célula, el ADN está expuesto a la acción de noxas capaces de alterar su estructura como las radiaciones y reacciones metabólicas no-fisiológicas, por ejemplo, la despurinización del ADN. Esos procesos son contrarrestados por mecanismos enzimáticos específicos a los que contribuyen en forma destacada, las topoisomerasas y PARP<sup>47</sup>. Topo I y Topo II son nucleasas reversibles con función en la replicación y reparación del ADN. Topo I corta una de las cadenas polinucleotídicas del ADN lo que permite el giro de los fragmentos resultantes y la correcta alineación del polinucleótido en la cadena neoformada. La reparación consiste en el reemplazo del nucleótido mutado por su precursor normal.  $\beta$ -Lap inhibe a Topo I por un mecanismo distinto al de otros inhibidores específicos, como la camptotecina. Topo I, ADN y  $\beta$ -lap forman un complejo ternario, catalíticamente inactivo<sup>27, 29</sup>. Ese complejo resulta de la unión del ADN al complejo binario Topo I- $\beta$ -lap. El complejo binario Topo I-ADN no acepta a  $\beta$ -lap, lo que impide la inhibición de Topo I, cuando la quinona debe actuar sobre la Topo I en presencia de ADN. La formación del complejo ternario impide la última etapa de la reacción de Topo I, que consiste en la unión de dos nucleótidos vecinos por medio de la función fosfato-diéster. Ello significa el fracaso de la reparación del ADN por Topo I y por lo tanto, facilita la formación de ADNes atípicos, fuente de daño genético. La acumulación de complejos ternarios Topo I-ADN- $\beta$ -lap simula la hiperactividad de Topo I y en estudios iniciales se menciona una supuesta activación de Topo I por  $\beta$ -lap<sup>27, 29</sup>.

Topo II se une a las dos cadenas polinucleotídicas que constituyen el ADN y corta a ambas lo que permite la conservación de la estructura cromosómica<sup>46, 48</sup>. La inhibición de Topo II por  $\beta$ -lap se supone más importante que la inhibición de Topo I<sup>32</sup>. La inhibición de Topo II es irreversible, dependiendo de la formación previa de un complejo Topo II-ADN<sup>32, 48</sup>. La formación del complejo Topo II-ADN produce cambios conformacionales en Topo II que facilitan su reacción con  $\beta$ -lap y por lo tanto, la inactivación de Topo II.

En resumen, la acción de  $\beta$ -lap sobre Topo I y Topo II significa la inhibición de la replicación del ADN y como

TABLA 1.– Acción inhibitoria de la  $\beta$ -lapachona sobre el crecimiento celular

Células (línea)	Autores	Mecanismo postulado
Sarcoma de Yoshida; sarcoma de Walker 256	Santana y col (1968) <sup>2</sup>	No comentado
Sarcoma de Yoshida	D=Albuquerque (1978) <sup>3</sup>	No comentado
Sarcoma 180	Docampo y col (1979) <sup>14</sup>	Producción de ROS
Leucemia murina vival	Schaffner-Saba y col (1984) <sup>24</sup>	Inhibición de la transcriptasa reversa
Fibroblastos humanos	Boorstein y Pardee (1984) <sup>25</sup>	No comentado
Fibroblastos de embrión de hamster CCHEF/189	Boothman y Pardee (1989) <sup>26</sup>	Activación de la Topo I; inhibición de la PLDR
Cáncer epidemoide laringeo humano; melanoma humano (U1-mel); hepatoma (HEp-2)	Boothman y col. (1989) <sup>27</sup>	Activación de la Topo I; reforma del ADN (Aunwinding@).
Cáncer de ovario de hamster (CHO)	De Grassi y col. (1993) <sup>28</sup>	Alteraciones cromosomicas; activación de la Topo I.
Cancer mamario humano (MCF-7)	Li y col. (1993) <sup>29</sup>	Inhibición de la Topo I.
Leucemia promielocitica (HL-60); cáncer de próstata humano (LNCaP, DU-145, PC-3); cáncer mamario humano (MCF-7. WS-8, D T47-A18; MCF-7; W58; MDA, MB23)	Planchon y col. (1995) <sup>30</sup>	Formación de un complejo inactivo $\beta$ -lap Topo I; fragmentación del ADN (Aladdering@); apoptosis.
Cáncer de próstata humano (PC3, AH 145, LNCaP; leucemia promiclocitica humana (HL-60); cáncer mamario humano (MCF-7; 21 MT); carcinoma de ovario humano (AD 2780 s); adenocarcinoma de colon humano (SW 1116); carcinoma de pulmon humano (599, HS20)	Li y col. (1995) <sup>31</sup>	Inhibición de Topo I; apoptosis.
Carcinoma epidermoide humano (KB3-1, MDR1, KBV-1 KBH-3); leucemia linfoblastica humana aguda (CEM, VM-26, CEM/V1, RPM1 8401, CPF-K5, U937, U937/CR)	Frydman y col. (1997) <sup>32</sup>	Inducción del clivaje del ADN por Topo II; formación de complejo Topo II-ADN. $\beta$ -lap-inactivo; formación de aductos con los tioles de Topo II.
Cáncer de pulmón (A-549), carcinoma de colon (HT29), carcinoma de próstata (AT3, AT3-1); leucemia humana (CEM/VM1, CEM/M70-B1; HL-60, HL-60.ADR) carcinoma epidermoide humano (KB3.1, KB-V1, linforma murino FL 5.12); leucemia mielomonocitica murina WEHI 38; carcinoma mamario MCF-7	Dolan y col. (1998) <sup>33</sup>	Alteración de la relación GSH/GSSG; proliferación de peroxisomas.
Cáncer de ovario de hamster (CHO)	Vanni y col. (1998) <sup>34</sup>	Fragmentación atípica del ADN; inhibición de PARP.
Hepatoma humano (Hep A2)	Lai y col. (1998) <sup>35</sup>	Daño cromosómico; síntesis Anó programada@ de ADN; daño mitocondrial; proliferación de peroxisomas.
Leucemia promielocitica humana (HL-60); leucemia eritroblastoide (K 562), adenocarcinoma de colon (U 397); Molt 4, SN 620); cáncer mamario (MCF-7)	Chau y col. (1998) <sup>36</sup>	Apoptosis, fragmentación del ADN; producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , protección por antioxidantes y por GSH, intervención de radicales libres.
Cáncer mamario (MCF-7-W58); cáncer mamario (MCF-7; 21 MT; 21 PT, 21 NT)	Wuerzberger y col. (1998) <sup>37</sup>	Apoptosis; fragmentación del ADN y de Laminina B. Inactivación de Topo I, Topo II.
Leucemia promielocitica humana (HL-60)	Planchon y col. (1999) <sup>38</sup>	Apoptosis, fragmentación del ADN; activación de la caspasa 3 y clivaje de PARP; antagonismo de Bcl-2.

Continuación tabla 1

Células (línea)	Autores	Mecanismo postulado
Leucemia promielocítica humana (HL-60)	Shiah y col. (1999) <sup>39</sup>	Activación de la quinasa c-Jun NH <sub>2</sub> -terminal y de la caspasa CPP32 Yama (CP3) durante la apoptosis; dependencia de ROS.
Cáncer de colon humano (SW 450, SW 620, DLD1);	Huang y Pardee (1999) <sup>40</sup>	Bloqueo del ciclo celular; alteraciones en ciclinas; fragmentación del ADN (laddering); inducción de la proteína pro-apoptótica Bax.
Cáncer mamario humano (MEF-7, 21 MT, 21 NT, 21 PT); carcinoma de ovario humano (AD 2700 s); carcinoma de colon humano (SW1116); HT29, DLD); carcinoma de pulmón humano (G480); carcinoma de próstata humano (PC-35, DU145; LNCaP)	Li y col. (1999) <sup>41</sup>	Apoptosis y necrosis según concentración de $\beta$ -lap; daño mitocondrial con liberación de citocromo c; activación de la caspasa-3 en la apoptosis y de proteasas-SH en la necrosis.
Linfoma histiocítico humano (U 937); células T humanas (Jurkat); HeLa; glioma humano (H4)	Manna y col. (1999) <sup>42</sup>	Inhibición del factor activador NF- $\kappa$ B y de la proteína AP-1; activación de la caspasa-3; apoptosis.
Hepatoma humano (Hep-2)	Samali y col. (1999) <sup>43</sup>	Producción de apoptosis o necrosis en función de la actividad de las caspasas.
Cáncer mamario humano (MCF-7, T47D, A18), MDA-MB-468)	Pink y col. (2000) <sup>44</sup>	Citotoxicidad de $\beta$ -lap en función del ciclo redox catalizado por la flavoenzima quinona reductasa.
Cáncer mamario humano (MCF-7, T47D)	Pink y col. (2000) <sup>45</sup>	Activación de proteasas (caspasas, calpaina) y clivaje de PARP; función esencial de proteasas tioles.

consecuencia de ello, la decadencia y muerte de la célula. Esos efectos se han comprobado con fibroblastos de embrión de pollo<sup>25, 26</sup>, *cáncer epidermoide laríngeo*<sup>27, 32</sup>, *cáncer de ovario*<sup>28</sup>, *cáncer mamario*<sup>29, 31</sup>, *cáncer de próstata*<sup>30, 31</sup>, *células leucémicas*<sup>30</sup>, *cáncer de colon*<sup>31, 36, 40</sup>, etc (Tabla 1).

PARP es una enzima nuclear de 130 Da que cataliza la transferencia del ADP del NAD<sup>+</sup> (adenina-nicotinamida dinucleótido) a sí misma, y otras proteínas nucleares, incluyendo a las histonas, al factor p53<sup>47</sup>, a Topo I y Topo II. PARP se activa 50 veces al unirse a las rupturas del ADN ("nicks") y en consecuencia, es también activada por los agentes que dañan al ADN, como la radiación ionizante y ROS. PARP es así, un sensor de las rupturas del ADN, que tiene la propiedad de movilizar los mecanismos reparadores del ADN<sup>47</sup>. En esa forma PARP constituye un factor esencial para el mantenimiento de la estructura del ADN y la integridad genómica. Los siguientes ejemplos ilustran la participación de PARP en la apoptosis. En la células de *cáncer de ovario*,  $\beta$ -lap produce rupturas en el ADN, acompañadas por la inhibición de PARP<sup>34</sup>. Observaciones con *células de leucemia mieloide*, confirmaron el clivaje y la inhibición de PARP como consecuencia del tratamiento de esas células con

$\beta$ -lap<sup>38</sup>. La modificación de PARP resultó imputable a la acción de proteasas activadas por  $\beta$ -lap<sup>45</sup>, en especial, la caspasa-3. Las concentraciones de  $\beta$ -lap, utilizadas en esos experimentos (1-5  $\mu$ M) fueron menores que en el experimento con las células de tumor de ovario<sup>34</sup>. Por último, en las células de *tumor mamario*<sup>44</sup>, el tratamiento con  $\beta$ -lap dependió de la concentración de  $\beta$ -lap. A baja concentración de  $\beta$ -lap se activó la caspasa-3, que produjo el clivaje de PARP. A concentraciones mayores de  $\beta$ -lap, se activaron otras proteasas, en particular, las dependientes de tioles (calpaina)<sup>44</sup>. El uso de inhibidores específicos para la caspasa 3 (zVAD-fm), y para las proteasas-SH (iodoacetamida y NEM) confirmó la especificidad de los efectos descriptos.

### $\beta$ -Lapachona y apoptosis

El concepto de apoptosis como "muerte celular programada" y los numerosos e importantes avances realizados en su conocimiento han sido considerados en una publicación anterior<sup>49</sup>. La información actual sobre la biología molecular de la célula ha permitido explicaciones cada vez más precisas del efecto citotóxico de  $\beta$ -lap en

diferentes células tumorales y en fibroblastos. La apoptosis se puede describir como una serie de reacciones metabólicas interdependientes, catalizadas por enzimas específicas e iniciada por un determinado agente apoptogénico, por ejemplo,  $\beta$ -lap. Esas reacciones implican, la activación de quinasas y estas, a su vez, activan las caspasas, reguladas por factores específicos (Bcl-2, etc.)<sup>42-44</sup>. Las caspasas activan otras proteasas y nucleasas, cuya acción lleva a la destrucción de la estructura celular, en particular del ADN nuclear. La inhibición por  $\beta$ -lap de las enzimas reparadoras del ADN (Topo I, Topo II y PARP) contribuye a la apoptosis.

La apoptosis se manifiesta por expresiones características, entre ellos, la interrupción del ciclo reproductivo celular (la mitosis), las alteraciones del ADN<sup>44</sup> y la inactivación de PARP<sup>44</sup>. Esas expresiones varían en tiempo y magnitud, según el tipo de célula. Por ejemplo, en las células de *cáncer de ovario* y de *colon humano* tratadas con  $\beta$ -lap 2-3  $\mu$ M, el ciclo celular se detuvo al final de la fase S (fase de síntesis de ADN y formación y duplicación de los cromosomas), con variantes menores según la línea celular utilizada<sup>40</sup>. En cuanto a la cromatina nuclear, las células de *cáncer de ovario* (CHO) o de *hepatomas* tratadas con  $\beta$ -lap, mostraron deformación y fragmentación de los cromosomas, los intercambios entre cromátidas hermanas ("sister chromatide exchange") y la fragmentación del ADN<sup>34,35</sup>. Los extractos de las mismas células provocaron desenrollamiento ("unwinding") del ADN de plásmidos y la inactivación de PARP, demostrando así la existencia de factores citotóxicos inducidos por  $\beta$ -lap en esos extractos<sup>34</sup>.

Investigaciones recientes ilustran la acción apoptogénica de  $\beta$ -lap y su complejo mecanismo. Así, en células de *cáncer de ovario*, *próstata*, *pulmón* y *mama*, el tratamiento con  $\beta$ -lap produjo apoptosis mientras que en las células de *hepatoma* produjo necrosis<sup>41,43</sup>. La apoptosis en estas células se reconoció por la inhibición de la multiplicación celular y por la "externalización" de la fosfatidil-serina en la membrana celular<sup>41,50</sup>. De especial interés resultó el daño mitocondrial, que se manifestó por la liberación de citocromo *c* y la disminución del potencial electroquímico de la membrana. La liberación del citocromo *c* de las membranas mitocondriales y su pasaje al citosol constituyó un importante factor del proceso apoptogénico<sup>51-57</sup>. El daño del ADN nuclear prevaleció en las células de *cáncer de próstata* en las que se expresó por la típica imagen en escalera ("laddering"). En esas células, la liberación del citocromo *c* fue precoz, pues ocurrió una hora después de iniciar el tratamiento con  $\beta$ -lap y antes de la pérdida de viabilidad celular o del daño al ADN. Las células apoptóticas mostraron notable aumento de la actividad de la caspasa 3, lo que no ocurrió en las células necróticas. Esas observaciones evidenciaron la importancia de las mitocondrias como blanco de  $\beta$ -lap en el proceso de apoptosis.

En células de *cáncer de colon*  $\beta$ -lap produjo apoptosis con modalidades propias de cada línea celular<sup>40</sup>. La acción sobre el crecimiento (bloqueo del ciclo celular, en la fase S/G2) precedió a la fragmentación de la cromatina nuclear. Esos efectos fueron congruentes con la disminución de las ciclinas A, B1, cdc 2 y D1.  $\beta$ -Lap también aumentó el factor Bax. Las células de la *leucemia humana* han constituido un objetivo valioso para estudiar los efectos apoptogénicos de  $\beta$ -lap. Así, el tratamiento de promielocitos con  $\beta$ -lap produjo alteraciones manifiestas, a saber, las del ADN nuclear, la disminución del zimógeno de la caspasa 3 y el clivaje de PARP<sup>38</sup>. La disminución del zimógeno se interpretó como consecuencia de su transformación en caspasa 3 y el clivaje de PARP resultó una consecuencia directa de la activación de esa caspasa, pues los inhibidores específicos de la misma previnieron el clivaje de PARP. Por otra parte, el factor Bcl-2, anti-caspasa contrarrestó el efecto de  $\beta$ -lap. El efecto de  $\beta$ -lap sobre las células HL-60 incluyó un fuerte aumento de la producción de ROS, en particular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por células incubadas con bajas concentraciones de  $\beta$ -lap<sup>36</sup>. La acción de los peróxidos fue prevenida por antioxidantes como el ascorbato. Al mismo tiempo, la quinasa c-JUN-NH<sub>2</sub>-quinasa terminal fue significativamente activada por  $\beta$ -lap mientras que los inhibidores de c-JUN NH<sub>2</sub>-quinasa terminal impidieron la acción apoptogénica de  $\beta$ -lap. Estas observaciones apoyan la producción de ROS por  $\beta$ -lap.

La intervención de ROS en la acción apoptogénica de  $\beta$ -lap en células tumorales, ha recibido apoyo de diferentes investigadores<sup>36,39,44</sup>. Las observaciones de Pink y col.<sup>44</sup> son convincentes porque demuestran con células de *cáncer mamario* la necesidad de la reacción redox de  $\beta$ -lap para la producción del efecto citotóxico. Esa reacción, catalizada por la diaforasa y la NAD(P)H-quinona oxido-reductasa produce la hidroquinona que se transforma en semiquinona e induce el daño oxidativo. Por otra parte, como consecuencia de la reacción de la diaforasa se consume NADPH, activándose las proteasas-tioles, como la calpaína. La calpaína cliva a PARP y al factor p53, promoviendo la apoptosis. Una condición necesaria para que la célula sea sensible a  $\beta$ -lap es la sobre-expresión de la diaforasa<sup>44</sup>.

La apoptosis inducida por  $\beta$ -lap implica la participación de complejos sistemas de proteasas, que actúan activándose las unas a las otras. Un ejemplo de esas interacciones se encuentra en células de *linfoma humano* (U937)<sup>42</sup>. En esas células,  $\beta$ -lap inhibió al factor TNF que normalmente es un inductor del factor de transcripción nuclear (NF- $\kappa$ B), de la proteína activadora-1 (AP-1), del translocador de p65 y de la expresión del gen de NF- $\kappa$ B<sup>42,60</sup>. La inhibición de TNF por  $\beta$ -lap se extendió a todos los otros factores dependientes de TNF. Como la actividad de TNF depende de tioles, el ditiotreitrol y la N-acetil-L-cisteína resultaron antagonistas de  $\beta$ -lap.

En resumen, el efecto apoptótico de  $\beta$ -lap implica un complejo proceso que incluye (1) producción de ROS; (2) activación de la quinasa JNK; (3) activación de la caspasa 3 (CCP32/Yama) y otras; (4) clivaje e inactivación de PARP; (5) daño irreversible del ADN nuclear por activación de nucleasas e inhibición o inactivación de las enzimas conservadoras del ADN, en particular, topoisomerasas y PARP. La Figura 1 muestra un modelo plausible de mecanismo de acción de  $\beta$ -lap. Los antioxidantes como N-acetilcisteína, el tocoferol y el ascorbato contrarrestan la acción de  $\beta$ -lap, lo mismo que el glutatión (GSH). Por ello, células tumorales de bajo contenido en GSH, como HL-60, U937 y Molt-4

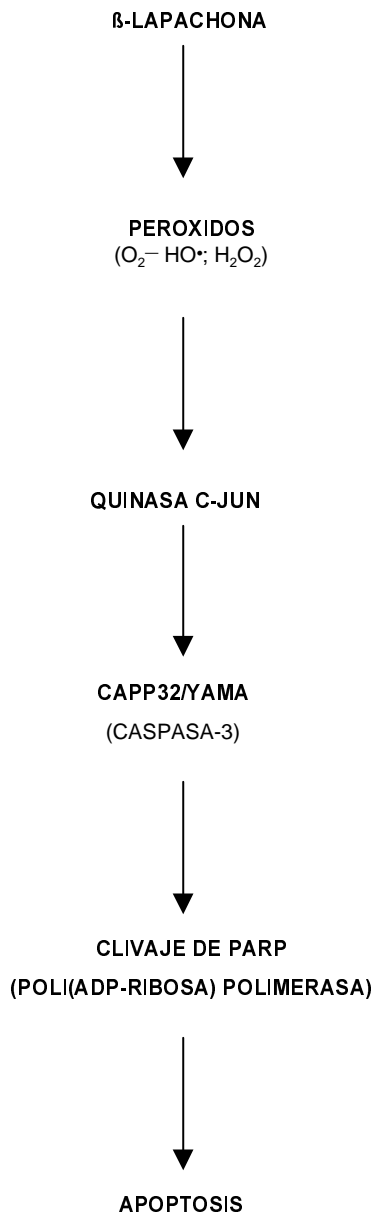


Fig. 1.- Mecanismo de producción de apoptosis por  $\beta$ -lapachona.

fueron mas sensibles a  $\beta$ -lap, que las células de alto contenido en GSH, como K562 (leucemia), MCF-7 (*cáncer mamario*) y SW 620 (adenocarcinoma de colon)<sup>33</sup>.

La constancia de los efectos apoptogénicos de  $\beta$ -lap en las numerosas especies celulares afectadas no excluye otras acciones por ejemplo, los efectos observados en *hepatomas*<sup>35</sup>. En estas células,  $\beta$ -lap bloquea al ciclo celular en la fase S y produce "síntesis no programada" de ADN, no observándose apoptosis. Además, se producen alteraciones mitocondriales (hinchamiento), vesiculización del retículo endoplásmico y proliferación de peroxisomas, estos últimos, cargados de peroxidasa pero sin catalasa. Las alteraciones mitocondriales son llamativas dada su función como productoras del ROS. Por otra parte, la ausencia de catalasa en los peroxisomas favorecería la producción de ROS por el ciclo redox de la quinona, como ocurre en *T. cruzi* y en diferentes células tumorales.

### Consideraciones finales

El hallazgo de  $\beta$ -lap permitió a sus descubridores experimentos iniciales que demostraron posibles usos terapéuticos para el tratamiento del cáncer<sup>3,4</sup>. Los datos que consigna la Tabla 1 confirman esas expectativas dada la variedad de células tumorales sensibles a  $\beta$ -lap. Las posibles aplicaciones terapéuticas de  $\beta$ -lap han sido consideradas por numerosos investigadores. Así Wuerzberger y col.<sup>37</sup>, sugieren el uso de  $\beta$ -lap en el *cáncer mamario*, como agente terapéutico directo o como complemento de la radioterapia; Huang y Pardee<sup>40</sup> proponen el tratamiento del *cáncer de colon* con  $\beta$ -lap, en el caso de que las células tumorales fuesen deficientes en el factor p53. Lo mismo opinan Li y col.<sup>41</sup>, Vanni y col.<sup>34</sup> y Dolan y col.<sup>33</sup>, respecto al uso de  $\beta$ -lap contra otras líneas celulares tumorales.

**Agradecimiento:** se agradece a la Fundación Alberto J. Roemmers por su apoyo a este estudio. M.A.E. Verón prestó excelente colaboración técnica.

### Bibliografía

1. Goncalvez de Lima O, D'Albuquerque IL, Goncalvez de Lima C, Maia D. Substancias antimicrobianas de plantas superiores. *Revta Inst Antibiot Univ Recife* 1962; 4: 3-17.
2. Ferreira de Santana C, Gonçalvez de Lima O, D'Albuquerque L, Lins Lacerda A, Gimino Martins D. Observações sobre as propriedades anti-tumorais e toxico-lógicas do extrato de líber e de alguns componentes do cerne do pau d'arco (*Tabebuia avellanedae*). *Revta Inst Antibiot Univ Recife* 1968; 8: 89-94.
3. D'Albuquerque IL, Maciel MCN, Schuler AR, et al. Preparação e primeiras observações sobre as propriedades antibióticas e antineoplásicas das naftoquinonas homólogos inferiores na série da 2-hidróxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona (lapachol). *Revta Inst Antibiot*

- Univ Recife* 1972; 12: 31-40.
4. Stoppani AOM, Goijman S, Dubin M, et al. Cytotoxicity of lipophilic *o*-naphthoquinones: structure-activity relationship. *Trends Comp Biochem Physiol* 2000; 7: 1-16.
  5. Paulino M, Hansz M, Hikichi N, et al. Propiedades electrónicas y actividad redox de naftoquinonas. *An Asoc Quim Argent* 1994; 82: 371-89.
  6. Stoppani AOM, Dubin M, Fernández Villamil SH, et al. Citotoxicidad de *o*-naftoquinonas lipofílicas: relación estructura-actividad. *An Soc Cien Argent* 1997; 100: 117-38.
  7. Boveris A, Docampo R, Turrens JF, Stoppani AOM. Acción de  $\beta$  y  $\alpha$ -lapachona sobre la producción de  $H_2O_2$  y el crecimiento de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Arg Microbiol* 1977; 9: 54-61.
  8. Docampo R, Lopes JN, Cruz JS, De Souza W. *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural and metabolic alterations of epimastigotes by  $\beta$ -lapachone. *Exp Parasitol* 1977; 42: 142-9.
  9. Boveris A, Stoppani AOM, Docampo R, Cruz FS. Superoxide anion production and trypanocidal action of naphthoquinones on *Trypanosoma cruzi*. *Comp Biochem Physiol* 1978; 61C: 327-9.
  10. Lopez JN, Cruz FS, Docampo R, et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the toxicity of 1,4-naphthoquinone and 1,2-naphthoquinone derivatives against *Trypanosoma cruzi*. *Ann Trop Med Parasitol* 1978; 72: 523-31.
  11. Pahn EM de, Molina Portela MP, Stoppani AOM. Efecto de quinonas y nitrofuranos sobre *Trypanosoma mega* y *Crithidia fasciculata*. *Rev Arg Microbiol* 1988; 20: 107-18.
  12. Molina Portela MP, Pahn EM de, Galeffi C, Stoppani AOM. Efecto de *o*-naftoquinonas lipofílicas sobre el crecimiento y la producción de peróxidos por *Leptomonas seymouri* y *Crithidia fasciculata*. *Rev Arg Microbiol* 1991; 23: 1-14.
  13. Molina Portela MP, Stoppani AOM. Redox cycling of  $\beta$ -lapachone in the presence of dihydrolipoamide and oxygen. *Biochem Pharmacol* 1996; 51: 275-83.
  14. Docampo R, Cruz FS, Boveris A, Muñiz RPA, Esquivel DMS.  $\beta$ -lapachone enhancement of lipid peroxidation and superoxide anion and hydrogen peroxide formation by sarcoma 180 ascites tumor cells. *Biochem Pharmacol* 1979; 28: 723-8.
  15. Cruz FS, Docampo R, de Souza W. Effect of  $\beta$ -lapachone on hydrogen peroxide production in *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 1978; 35: 35-40.
  16. Cruz FS, Docampo R, Boveris A. Generation of superoxide anions and hydrogen peroxide from  $\beta$ -lapachone in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1978; 14: 630-33.
  17. Docampo R, De Souza W, Cruz FS, Roitman I, Cover B, Gutteridge WE. Ultrastructural alterations and peroxide formation induced by naphthoquinones in different stages of *Trypanosoma cruzi*. *Z Parasitenkd* 1978; 57: 189-98.
  18. Molina Portela MP, Fernández Villamil SH, Perissinotti LJ, Stoppani AOM. Redox cycling of *o*-naphthoquinones in trypanosomatids. Superoxide and hydrogen peroxide production. *Biochem Pharmacol* 1996; 52: 1875-82.
  19. Fernández Villamil SH, Dubin M, Molina Portela MP, Perissinotti LJ, Brusa MA, Stoppani AOM. Semiquinone production by lipophilic *o*-naphthoquinones. *Redox Report* 1997; 3: 245-52.
  20. Boveris A, Stoppani AOM. Hydrogen peroxide generation in *Trypanosoma cruzi*. *Experientia* 1977; 33: 1306-8.
  21. Boveris A, Sies H, Martino EE, Docampo R, Turrens JF, Stoppani AOM. Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* 1980; 188: 643-8.
  22. Goijman SG, Stoppani AOM. Effects of  $\beta$ -lapachone, a peroxide-generating quinone, on macromolecule synthesis and degradation in *Trypanosoma cruzi*. *Arch Biochem Biophys* 1985; 240: 273-80.
  23. Pinto AV, Ferreira VF, Capella RS, Gilbert V, Pinto MCR, Santana da Silva J. Activity of some naphthoquinones on blood stream forms of *Trypanosoma cruzi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; 81: 609-10.
  24. Schaffner-Sabba K, Schmidt-Ruppin KH, Wehrli W, Schuerch AR, Wasley JWF.  $\beta$ -lapachone: synthesis of derivatives and activities in tumor models. *J Med Chem* 1984; 27: 990-4.
  25. Boorstein RJ, Pardee AB.  $\beta$ -Lapachone greatly enhances MMS lethality to human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 118: 828-34.
  26. Boothman DA, Pardee AB. Inhibition of radiation-induced neoplastic transformation by  $\beta$ -lapachone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 4963-7.
  27. Boothman DA, Trask DK, Pardee AB. Inhibition of potentially lethal DNA damage repair in human tumor cells by  $\beta$ -lapachone, an activator of topoisomerase I. *Cancer Res* 1989; 49: 605-12.
  28. Degrassi F, De Salvia R, Berghella L. The production of chromosomal alterations by  $\beta$ -lapachone, an activator of topoisomerase I. *Mutat Res* 1993; 288: 263-7.
  29. Li CJ, Averboukh L, Pardee AB.  $\beta$ -lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin. *J Biol Chem* 1993; 268: 22463-8.
  30. Planchon SM, Wuerzberger S, Frydman B, et al.  $\beta$ -Lapachone-mediated apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) and human prostate cancer cells: A p53-independent response. *Cancer Res* 1995; 55: 3706-11.
  31. Li CJ, Wang C, Pardee AB. Induction of apoptosis by  $\beta$ -lapachone in human prostate cancer cells. *Cancer Res* 1995; 55: 3712-5.
  32. Frydman B, Marton LJ, Sun JS, et al. Induction of DNA topoisomerase II-mediated DNA cleavage by  $\beta$ -lapachone and related naphthoquinones. *Cancer Res* 1997; 57: 620-27.
  33. Dolan ME, Frydman B, Thompson CB, et al. Effect of 1,2-naphthoquinones on human tumor cell growth and lack of cross-resistance with other anticancer agents. *Anti-cancer Drugs* 1998; 9: 437-48.
  34. Vanni A, Fiore M, De Salvia A, Cundari E, Ricordy R, Ceccarelli R, et al. DNA damage and cytotoxicity induced by  $\beta$ -lapachone: relation to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. *Mutat Res* 1998; 401: 55-61.
  35. Lai CC, Liu TJ, Ho LK, Don MJ, Chau YP.  $\beta$ -Lapachone induced cell death in human hepatoma (HepA2) cells. *Histol Histopathol* 1998; 13: 89-97.
  36. Chau Y-P, Shiah S-G, Con M-J, Kuo M-L. Involvement of hydrogen peroxide in topoisomerase inhibitor  $\beta$ -lapachone-induced apoptosis and differentiation in human leukemia cells. *Free Radical Biol Med* 1998; 24: 660-70.
  37. Wuerzberger SM, Pink JJ, Planchon SM, Byers KL, Bornmann WG, Bothman DA. Induction of apoptosis in MCF-7-WS8 cancer cells by  $\beta$ -lapachone. *Cancer Res* 1998; 58: 1876-85.
  38. Planchon SM, Wuerzberger-Davis SM, Pink JJ, Robertson KA, Bornmann WG, Boothman DA. Bcl-2 protects against  $\beta$ -lapachone-mediated caspase 3 activation and apoptosis in human myeloid leukemia (HL-60) cells. *Oncol Rep* 1999; 6: 485-92.
  39. Shiah S-G, Chuang S-E, Chau Y-P, Shen S-C, Kuo M-L. Activation of c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase and subsequent CPP32/Yama during topoisomerase inhibitor  $\beta$ -lapachone-induced apoptosis through an oxidation dependent pathway. *Cancer Res* 1999; 59: 391-8.
  40. Huang L, Pardee AB.  $\beta$ -Lapachone induces cell cycle

- arrest and apoptosis in human colon cancer cells. *Mol Med* 1999; 5: 711-20.
41. Li YZ, Li CJ, Ventura Pinto A, Pardee AB. Release of mitochondrial cytochrome C in both apoptosis and necrosis induced by  $\beta$ -lapachone in human carcinoma cells. *Mol Med* 1999; 5: 232-9.
  42. Manna S, Gad YP, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. Suppression of tumor necrosis factor-activated nuclear transcription factor-kB, activator protein-1, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis by  $\beta$ -lapachone. *Biochem Pharmacol* 1999; 57: 763-74.
  43. Samali A, Nordgren H, Zhivotovsky B, Peterson E, Orrenius S. A comparative study of apoptosis and necrosis in HepG2 cells: oxidant-induced caspase inactivation leads to necrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 255: 6-11.
  44. Pink JJ, Wuerzberger-Davis S, Tagliarino C, et al. Activation of a cysteine protease in MCF-7 and T47D breast cancer cells during  $\beta$ -lapachone-mediated apoptosis. *Exp Cell Res* 2000; 255: 144-55.
  45. Pink JJ, Planchon SM, Tagliarino C, Varnes ME, Siegel D, Boothman DA. NAD(P)H: Quinone oxidoreductase activity is the principal determinant of  $\beta$ -lapachone cytotoxicity. *J Biol Chem* 2000; 275: 5416-24.
  46. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD: Molecular Biology of the Cell. Vol. Garland Publishing, Inc., New York & London, 1989; pp. 227-238.
  47. Perrin D, Gras S, Van Hille B, Hill BT. Expression in yeast and purification of functional recombinant human poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), Comparative pharmacological profile with that of the rat enzyme. *J Enzym Inhib* 2000; 15: 461-9.
  48. Krishnan P, Bastow KF. Novel mechanisms of DNA topoisomerase II inhibition by pyranonaphthoquinone derivatives-eleutherin,  $\alpha$ -lapachone, and  $\beta$ -lapachone. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 1367-79.
  49. Dubin M, Stoppani AOM. Muerte celular programada y apoptosis. *Medicina* 2000; 60: 375-86.
  50. Deneker G, Dooms H, Van Loo G, Vercaemmen D, Grooten J, Fiers W, et al. Phosphatidyl serine exposure during apoptosis precedes release of cytochrome c and decrease in mitochondrial transmembrane potential. *FEBS Lett* 2000; 465: 47-52.
  51. Tejedo J, Bernabé JC, Ramírez R, Sobrino F, Bedoya FJ. NO induces a cGMP-independent release of cytochrome c from mitochondria which precedes caspase 3 activation in insulin producing RINm5F cells. *FEBS Lett* 1999; 459: 238-43.
  52. Garrido C, Bruey JM, Fromentin A, Hammann A, Arrigo AP, Solary E. HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. *FASEB J* 1999; 13: 2061-70.
  53. Holinger EP, Chittenden T, Lutz RJ. Bak BH3 peptides antagonize Bcl-X(-L) function and induce apoptosis through cytochrome c-independent activation of caspases. *J Biol Chem* 1999; 274: 13298-304.
  54. Balk J, Leaver CJ, McCabe PF. Translocation of cytochrome [ic] from the mitochondria to the cytosol occurs during the heat-induced programmed cell death in cucumber plants. *FEBS Lett* 1999; 463: 151-4.
  55. Haouzi D, Lekéhal M, Moreau A, et al. Cytochrome P 450-generated reactive metabolites cause mitochondrial permeability transition, caspase activation and apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology* 2000; 32: 303-11.
  56. Antonsson B, Montessuit S, Lauper S, Eskes R, Martinou JC. Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J* 2000; 345: 271-8.
  57. Saleh A, Srinivasula SM, Acharya S, Fishel R, Alnemri ES. Cytochrome [ic] and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J Biol Chem* 1999; 274: 17941-5.
  58. Ruehmele FM, Dionne S, Levy E, Seidman EG. TNF-Induced IEC-6 cell apoptosis requires activation of ICE caspases whereas complete inhibition of the caspase cascade leads to necrotic cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999; 260: 159-66.

-----

*If a little knowledge is dangerous, where is the man who has so much as to be out of danger?*

Si poca ciencia es peligrosa, ¿quién es el hombre que tiene tanta que puede presumir estar fuera de peligro?

Thomas Henry Huxley (1825-1895)

*Science and culture: on elementary instruction in physiology*