

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR,
FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**Alteración del crecimiento celular
por la inhibición de quinona reductasas.**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por **D. David González Aragón**,
Licenciado en Bioquímica, para optar al grado de **Doctor en Ciencias**.

Los Directores

Dr. José Manuel Villalba Montoro
Catedrático de Biología Celular
Universidad de Córdoba

Dr. Francisco Javier Alcaín Tejada
Profesor titular de Biología Celular
Universidad de Castilla-La Mancha

En Córdoba, a 6 de mayo de 2011

TITULO: *Alteración del crecimiento celular por la inhibición de quinona reductasas*

AUTOR: *David González Aragón*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2011
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

ISBN-13: 978-84-694-8023-6

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR,
FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**Alteración del crecimiento celular
por la inhibición
de quinona reductasas**

**David González Aragón
Córdoba, 2011**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR,
FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

D. José Manuel Villalba Montoro, Doctor en Ciencias y Catedrático de Universidad del Área de Biología Celular del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba,

INFORMA

Que **D. David González Aragón**, Licenciado en Bioquímica, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “**Alteración del crecimiento celular por la inhibición de quinona reductasas**”, que a su juicio reúne los méritos suficientes para optar al **Grado de Doctor en Ciencias**.

Y para que conste, firmo el presente informe en Córdoba, a 6 de mayo de 2011.

Dr. José Manuel Villalba Montoro

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

D. Francisco Javier Alcaín Tejada, Doctor en Ciencias y Profesor de la Facultad de Medicina la Universidad de Castilla-La Mancha.

INFORMA

Que **D. David González Aragón**, Licenciado en Bioquímica, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado **“Alteración del crecimiento celular por la inhibición de quinona reductasas”**, que a su juicio reúne los méritos suficientes para optar al **Grado de Doctor en Ciencias**.

Y para que conste, firmo el presente informe en Córdoba, a 6 de mayo de 2011.



Dr. Francisco Javier Alcaín Tejada



TÍTULO DE LA TESIS: ALTERACIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR POR LA INHIBICIÓN DE QUINONA REDUCTASAS

DOCTORANDO: DAVID GONZÁLEZ ARAGÓN

INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, en el periodo comprendido entre 2005 y 2010, el doctorando David González Aragón ha superado con creces los objetivos planteados al comienzo de la misma, sobre la posible utilización de inhibidores de quinona reductasas como una herramienta para estudiar el papel de la enzima antioxidantes NAD(P)H:quinona oxidorreductasa 1 (NQO1) en el control del crecimiento de células de mamífero. Desde hace años, inhibidores como el dicumarol, o más reciente el ES936, se vienen utilizando en sistemas celulares para estudiar las funciones de NQO1. El estudio desarrollado en distintos modelos de células tumorales humanas (HL-60, HeLa) ha permitido poner de manifiesto que el dicumarol produce dos efectos notables sobre las células: un incremento en la generación de superóxido y un bloqueo transitorio en la progresión a lo largo de la fase S del ciclo celular. Sin embargo, estos efectos no se relacionaron con la inhibición de NQO1, sino con la acción del inhibidor sobre el transporte electrónico mitocondrial. Por su parte, el tratamiento con ES936 produce una estimulación de la proliferación en medios carentes de suero, efecto que tampoco se debe a la inhibición de NQO1. Nuestros resultados nos ponen de manifiesto que es necesaria una mayor cautela a la hora de evaluar las funciones de NQO1 a través de abordajes farmacológicos. Asimismo, nos indican que es necesaria una re-evaluación de las funciones atribuidas a NQO1 en función de los efectos de los inhibidores citados. Además, gracias a su trabajo ha desarrollado y validado técnicas experimentales de una gran utilidad para el grupo de investigación, entre las que destacamos el silenciamiento de la expresión génica mediante RNAi. Con relación al trabajo desarrollado en su Tesis, se han realizado diversas publicaciones en *Biochemical Pharmacology* (índice de impacto 2009: 4.254) y *Chemico-Biological Interactions* (índice de impacto 2009: 2.457). Otros artículos se encuentran en fase de preparación. Su formación se ha completado con la realización de colaboraciones de investigación y docentes. Por último, el doctorando ha realizado aportaciones en congresos de ámbito nacional e internacional, y ha participado en la redacción de un capítulo de libro. Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 6 de mayo de 2011

Firmas de los directores

Fdo.: JOSÉ MANUEL VILLABA MONTORO Fdo.: FRANCISCO J. ALCAÍN TEJADA

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba, bajo la dirección de los Dres. José Manuel Villalba Montoro y Francisco Javier Alcaín Tejada. El trabajo ha estado financiado por los Proyectos de Investigación BFU2005-00137/BMC (Ministerio de Educación y Ciencia), BFU2008-00559/BMC (Ministerio de Ciencia e Innovación), el Proyecto de Excelencia grant P09-CVI-488 de la Junta de Andalucía y el Grupo PAIDI BIO-276 (Biomembranas, Antioxidantes y Estrés Oxidativo, Junta de Andalucía y Universidad de Córdoba). El doctorando recibió una ayuda del Programa Nacional de becas de FPU concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia.

“Así, puesto que los sentidos nos engañan, a las veces, quise suponer que no hay cosa alguna que sea tal y como ellos nos la presentan en la imaginación; y puesto que hay hombres que yerran al razonar, aun acerca de los más simples asuntos de geometría, y cometen paralogismos, juzgué que yo estaba tan expuesto al error como otro cualquiera, y rechacé como falsas todas las razones que anteriormente había tenido por demostrativas; y, en fin, considerando que todos los pensamientos que nos vienen estando despiertos pueden también ocurrírse nos durante el sueño, sin que ninguno entonces sea verdadero, resolví fingir que todas las cosas, que hasta entonces habían entrado en mi espíritu, no eran más verdaderas que las ilusiones de mis sueños.”

René Descartes, *Discurso del método*.

“Caminante, no hay camino,
se hace camino al andar”.

Antonio Machado, *Campos de Castilla*.

A Consuelo.

Agradecimientos

Como casi todas las cosas importantes que nos pasan en la vida, este trabajo empezó por una sucesión de casualidades. Debía ser el mes de octubre o noviembre de 2002 –año en que inicié los estudios de la Licenciatura de Bioquímica- cuando decidí subir las escaleras que llevaban al Departamento de Biología Celular para –por fin- empezar a decidir por mí mismo lo que quería ser y a dejar atrás el sometimiento de mis decisiones a voluntades ajenas. Y digo casualidades porque la primera persona que me encontré en la puerta del Departamento fue Consuelo Gómez e, inmediatamente, comprendí que había tomado una buena decisión. Dos minutos después, Rosa Rodríguez me acercó casualmente al despacho de José Manuel Villalba, a quien no tenía por entonces el gusto de conocer, y, tras media hora de conversación sobre estudios, ciencia, trabajo, familia y música, tuve la segunda certeza del día de que había tomado una buena decisión.

En los cuatro años siguientes, el laboratorio se convirtió primero en mi distracción durante el recreo de las mañanas de clase, luego en mi entretenimiento de las tardes hasta convertirse en la ocupación de las mañanas y de las tardes y de alguna noche (técnicamente a esta experiencia nocturna se le llama “experimento gregoriano” en el argot del departamentpo) y de fines de semanas y de días de Navidad y Semana Santa y del mes de agosto y todo eso que sólo conocemos los que nos hemos dedicado a la investigación (y que tanto sufren nuestras familias).

De nuevo las circunstancias me obligaron a tomar decisiones y en 2006 comienzo una nueva tesis (la de ser profesor de ESO y Bachillerato, que en los tiempos que corren está reservada sólo para valientes) y el máster de formación permanente en matrimonio (idem). Todo esto supuso, lógicamente, un cambio notable en el desarrollo del trabajo de investigación y explica, en buena medida, el retraso en su presentación.

El nacimiento de mi hija Mari Carmen en 2008 y una viñeta que José Alberto me colgó en la estantería del despacho me animaron a dar el empujón definitivo dedicando los dos últimos veranos a terminar algunos experimentos y a redactar la

tesis. Como no tenía bastante me puse a ajustar otra tarea pendiente que tenía en mi vida y en septiembre de 2008 comienzo los estudios de Medicina.

Una vez terminada –aunque, sinceramente, no es esa la sensación que me queda- compruebo que lo más difícil es escribir los agradecimientos –quién lo diría- y reconozco que tienen derecho a firmar la tesis como coautores todos los que la han hecho posible.

Siempre he estado convencido de que somos lo que somos por las personas que nos hemos encontrado a lo largo de la vida. De ahí que recuerde ahora a todos los que me han ayudado a aprender, a todos los que de una manera u otra me han enseñado que tenemos la interminable tarea de descubrir y que, más que una obligación y una carga, es una necesidad. Los primeros maestros, mis padres y hermanos, que son los que han hecho posible el resto. He tenido la suerte de nacer en una familia que nunca ha puesto trabas a mis inquietudes y que ha estado dispuesta a hacer importantes sacrificios para satisfacerlas. De mi padre aprendo – porque sigue enseñándome- la importancia de la responsabilidad y del trabajo bien hecho; de mi madre y mis hermanos, a aceptar las dificultades con tranquilidad y a no tomarme tan en serio la vida.

Tuve también la suerte de conocer grandes maestros desde pequeño que, tal vez sin saberlo, condicionaron después muchas de las decisiones que he tomado. No olvidaré nunca a D. Juan Luque (q.e.p.d.), a Abel Fernández y a Maria Luisa Delgado, de los que aprendí la importancia de ser exigente con uno mismo hasta dar lo máximo. Pili Carmona, Paco Ruiz, Eusebio Muñoz, Miguel Canino y mis años con los salesianos me ayudaron a conocerme y a descubrir el valor de la entrega desinteresada. De la Facultad de Ciencias de Granada guardo un grato recuerdo de D. Juan Caro, profesor de Botánica y de D. Antonio Almendros, profesor de Citología e Histología.

En el Departamento, Consuelo me enseñó con su ejemplo la primera lección que debe saber quien se inicia en el mundo de la investigación: que la ciencia es, en gran medida, artesanía que empieza y acaba en el laboratorio y que para obtener resultados había que trabajar, trabajar y trabajar. Tuve la suerte de aprender junto a una persona con mucha experiencia que tal vez no sea consciente de la huella que

deja en todos los que la conocemos y que hemos sido afortunados de contar con su sabiduría –porque la experiencia es sabiduría. Cuánta razón llevaba José Manuel cuando me dijo, en mis primeros días en el laboratorio, que sería “la mejor maestra que puedas tener”. Consuelo me enseñó a trabajar con las manos y José Manuel a usar la cabeza, a leer ciencia, a no conformarme con lo que un resultado parece y a sentir la pasión por descubrir, por responder a nuestro profundo deseo de comprender. Con Paco aprendí a realizar el diseño más correcto para los experimentos, la importancia de los tiempos, los controles, el ajuste de las dosis y la realización de una buena gráfica. Isabel y José Antonio han sabido transmitirme su experiencia y han estado siempre disponibles para lo que necesitara. Les deseo lo mejor y les animo a seguir transmitiendo a los jóvenes el entusiasmo por la labor científica.

Mónica, Cristina, Laura, Julia y José Alberto me han visto entrar y salir y han estado siempre dispuestos a echarme una mano. Nunca me han dicho no a nada. Echo en falta ahora haber compartido con ellos más tiempo y menos laboratorio pero las circunstancias han sido las que han manejado constantemente las manecillas de un reloj que me trae siempre de cabeza y al que trato de sacarle más segundos de los que puede darme. Me ayudaron a sobrellevar el trabajo y siempre consiguieron hacerme reír, esa sana costumbre que de forma estúpida vamos enterrando con las obligaciones y la edad. Les deseo lo mejor en el camino que han emprendido.

Y a Mari Carmen, ¿qué le puedo decir? Ella, que desde hace ya cinco años es mi compañera de estudios en esta tesis de la vida que escribimos cada día -y que ya ha dado sus dos primeros grandes frutos-, ha sido la gran sacrificada. Sólo ella es plenamente consciente del tiempo y esfuerzo empleados en este trabajo porque lo ha sufrido en primera persona. Su generosidad y su paciencia lo han hecho posible.

Y cuando ya creía que sabía todo lo que había que saber –así soy de ignorante y de ingenuo- vienen mis hijos, Mari Carmen –tres años- y David –con sus cuarenta y tres días- a enseñarme cuánto camino tengo aún por delante y cuánto me queda por descubrir y aprender...

Abreviaturas y acrónimos

2-OH-Et	2-hidroxietidio
Å	Armstrong (10^{-10} m)
aa	Aminoácido
AMP	Adenosín monofosfato
AMPc	AMP cíclico
ARE	<i>Antioxidant response element</i>
ARNi	ARN interferente
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosina trifosfato
CAK	<i>CDK-activating kinase</i>
<i>Cat</i>	Gen de la catalasa
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
CKI	<i>CDK inhibitor</i>
CuDIPS	<i>Copper [II] diisopropyl salicylate</i>
CuZnSOD	Isoenzima SOD que contiene Cu y Zn
Cys	Cisteína
CySS	Cistina
Cyt _b ₅ R	NADH-citocromo <i>b</i> ₅ reductasa
DCDFH-DA	diclorodihidrofluoresceína diacetato
DCDHF	Diclorodihidrofluoresceína
DCF	Diclorofluoresceína
DCPIP	2,6-diclorofenolindofenol
dCTP	Desoxicitosina trifosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DPNH	Reduced diphosphopyridine nucleotide
DTT	Ditiotritreitol
dTTP	Desoxirribonucleótido trifosfato de timidina
DZQ	2,5-bis-[1-aziridinil]-1,4-benzoquinona
E ⁰	Potencial estándar
EC	<i>Enzyme Commission number</i>
EDTA	Etilendiaminotetracetato

EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
FAD	Forma oxidada del dinucleótido de flavina y adenina
FADH ₂	Forma reducida del dinucleótido de flavina y adenina
FMN	Forma oxidada de mononucleótido de flavina
FMNH ₂	Forma reducida de mononucleótido de flavina
GPX	Proteínas glutatión peroxidasas
GSH	Glutatión reducido
GSSG	Glutatión oxidado
GTP	Guanosín trifosfato
HEt	Hidroetidina o dihidroetidio
Hsp	<i>Heat shock protein</i>
IC ₅₀	Concentración a la que se alcanza la mitad de la inhibición máxima
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MDR	<i>Medium-chain dehydrogenase/reductase</i>
MEF	<i>Mouse embryonic fibroblast</i>
MnSOD	Isoenzima SOD que contiene Mn
MsrA	Metionina sulfóxido reductasa A
NAC	N-acetilcisteína
NAD ⁺	Forma oxidada del dinucleótido de adenina y nicotinamida
NADH	Forma reducida del dinucleótido de adenina y nicotinamida
NADP ⁺	Forma oxidada del dinucleótido de adenina y nicotinamida
NADPH	Forma reducida del dinucleótido de adenina y nicotinamida
NQO1	NAD(P):quinona oxidorreductasa 1
NQO1*2	Polimorfismo tipo 2 de NQO1
NQO1*3	Polimorfismo tipo 3 de NQO1
NQO2	NRH:quinona oxidorreductasa
ODC	Ornitina decarboxilasa
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PMSF	<i>Phentylmethanesulfonyl fluoride</i>
pRB	Proteína retinoblastoma
Prxs	Peroxiirredoxinas
Qd	Sitio distal (más cercano al espacio intermembrana) de unión de la quinona en el complejo II mitocondrial.
Qi	Sitio de unión de la quinona orientado a la matriz en el complejo III mitocondrial.

Qo	Sitio de unión de la quinona orientado al espacio intermembrana en el complejo III mitocondrial.
Qp	Sitio proximal (más cercano a la matriz) de unión de la quinona en el complejo II mitocondrial.
RMCP	Redox model of cell proliferation
RNR	Ribonucleótido reductasa
RNS	Reactiven nitrogen species
ROS	Reactive oxigen species
-SH	Grupo sulfhidrilo
SOD	Superoxide dismutase
-SS-	Grupo disulfuro
TPNH	Nucleótido de trifosfopiridina reducido
Trx(SH ₂)	Forma reducida de la tiorredoxina
Trx(SS)	Forma oxidada de la tiorredoxina
TrxR	Tiorredoxina reductasa
TTFA	Tenoiltrifluoroacetona
U. A.	Unidades arbitrarias
UMP	Uridina-5'-monofosfato
UQ	Ubiquinona
UQH ₂	Ubiquinol
v/v	Volumen/volumen (unidad de concentración)
XRE	Xenobiotic response element
μCi	Microcurio

Índice

Agradecimientos	17
Abreviaturas y acrónimos	21
Índice	25
INTRODUCCIÓN	31
Primera parte: Estado redox celular	33
1. Conceptos básicos	33
2. Especies reactivas de oxígeno (ROS).....	38
3. Fuentes celulares de ROS. Importancia de la mitocondria.....	41
4. La doble cara de las ROS.....	45
Segunda parte: Estado redox y ciclo celular	49
1. El ciclo celular	49
2. Alteraciones del balance redox durante el ciclo celular	52
3. Estado redox celular y proteínas reguladoras del ciclo celular	56
Tercera parte: Enzimas antioxidantes y ciclo celular	64
1. Superóxido dismutasa (SOD)	64
2. Catalasa	66
3. Glutati3n peroxidasa.....	67
4. Otras prote3nas antioxidantes.....	68
Cuarta parte: Enzimas antioxidantes y ciclo celular	73
1. Quinonas y quinona reductasas	73
2. Quinona reductasas de dos electrones: NQO1	74
2.1. Caracter3sticas y expresi3n del gen <i>NQO1</i>	75

2.2. Características estructurales de la proteína NQO1	76
2.3. Distribución intracelular de NQO1	79
2.4. Polimorfismos de NQO1	80
2.5. Funciones de NQO1	82
2.5.1. NQO1 como reductasa de quinonas	84
2.5.2. NQO1 como enzima bioactivadora.....	84
2.5.3. NQO1 como enzima antioxidante.....	85
2.5.4. NQO1 como <i>scavenger</i> de $O_2^{\cdot-}$	85
2.5.5. Interacción de NQO1 con otras proteínas	87
3. Otras quinona reductasas	91
3.1. NRH:quinona oxidoreductasa (NQO2)	91
3.2. La quinona reductasa ζ -cristalina	95
3.3. La quinona reductasa PIG53	96
4. Indicios de la participación de NQO1 en la regulación del ciclo celular	96

OBJETIVOS 101

MATERIALES Y MÉTODOS..... 105

1. Cultivos celulares	107
2. Generación de una línea derivada de HL-60 deficiente en la función mitocondrial (HL-60 ρ^0)	108
3. Tratamientos de la línea celular HL-60	108
4. Condiciones de cultivo y tratamientos de las líneas celulares HeLa, HepG2, Caco-2 y 3T3	109
5. Determinación de la viabilidad celular con azul tripán.....	111
6. Determinación de la síntesis de ADN mediante la incorporación de [metil- 3H]-timidina.....	111

7. Medición <i>in vivo</i> de especies reactivas de oxígeno mediante citometría de flujo	112
8. Medición <i>in vitro</i> del anión superóxido mediante espectrofotometría	113
9. Preparación de fracciones citosólicas de los cultivos celulares.....	113
10. Preparación de fracciones mitocondriales de células HL-60	114
11. Determinación de la cantidad de proteínas en las fracciones citosólicas y mitocondriales.....	114
12. Determinación de la actividad NQO1.....	115
13. Ensayos enzimáticos de los complejos de la cadena respiratorio mitocondrial	115
14. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo	117
15. Inmunodetección de la proteína NQO1	118
16. Inmunodetección de la proteína p21.....	119
17. Medida de los niveles de fosforilación de p38 MAPK.....	119
18. Silenciamiento temporal con ARNi de la expresión de NQO1 en la línea celular HeLa	120
19. Análisis estadístico	121

RESULTADOS DICUMAROL Y HL-60 123

1. Cinética de la generación de superóxido en las células HL-60 tratadas con dicumarol	125
2. La inhibición de NQO1 no es un factor determinante para el incremento del superóxido en las células HL-60 tratadas con dicumarol.....	127
3. El incremento del superóxido en las células HL-60 tratadas con dicumarol tiene un origen mitocondrial	128
4. El dicumarol inhibe los complejos mitocondriales II, III y IV.....	129
5. El dicumarol induce la formación de superóxido por flujo inverso de electrones en el complejo II	131
6. El superóxido no está implicado en el bloque parcial de la células HL-60 en la fase S del ciclo pero participa en la transición G ₁ /s	136

7. El bloqueo parcial que el dicumarol induce en la fase S en células HL-60 se debe a la inhibición de la biosíntesis de pirimidinas 141

DISCUSIÓN DICUMAROL Y HL-60 149

1. Mecanismos implicados en la producción de superóxido por el dicumarol 153
2. Mecanismos implicados en la acumulación de la población celular en la fase S por dicumarol 166

RESULTADOS ES936 Y HeLa 181

1. El tratamiento con ES936 interfiere en la síntesis de ADN y en el crecimiento de la línea celular humana HeLa 183
2. El tratamiento con ES936 no altera la distribución de las células HeLa en las distintas fases del ciclo celular 186
3. La estimulación de la síntesis de ADN por ES936 no está relacionada con la inhibición de NQO1 187
4. La estimulación de la síntesis de ADN por ES936 está relacionada con desajustes en el balance rédox celular 190
5. El tratamiento con ES936 induce la expresión de p21 en células HeLa 192
6. La estimulación de la síntesis de ADN por ES936 implica una ruta de señalización dependiente de EGFR y p38..... 193
7. El efecto de ES936 en la síntesis de ADN depende del contexto celular y de la fase de crecimiento 196

DISCUSIÓN ES936 y HeLa 201

CONCLUSIONES..... 213

BIBLIOGRAFÍA..... 227

Anexos:

Publicaciones de resultados asociados a la tesis	259
--	------------

Proceedings of the Swedish Biochemical Society

Papers read at the meeting in Stockholm, March 8, 1958

Soluble Diaphorase in Animal Tissues

Lars Ernster and
Franco Navazio*

Wenner-Gren Institute, University of Stockholm, Stockholm, Sweden

The soluble fraction obtained upon centrifugation of rat liver homogenates made in 0.25 M sucrose-3 % polyvinylpyrrolidone at 105 000 *g* for 60 min exhibits a high diaphorase activity as revealed by measuring the rate of reduction of 2,6-dichlorophenolindophenol by reduced di- or triphosphopyridine nucleotide (DPNH or TPNH). As emerges from the typical data shown in Table 1, this activity is, in contrast to those found in mitochondria and microsomes, virtually equally high with DPNH and TPNH, and it exceeds, in terms of total protein content, the diaphorase activities of the particulate fractions more than twice in the case of DPNH and about twenty times in the case of TPNH. The soluble diaphorase resembles the particulate one in that it reacts with methylene blue at about half the rate obtained with 2,6-dichlorophenolindophenol, but differs from the latter in being inactive towards cytochrome *c* or ferricyanide; treatment of the enzyme with ferric chloride according to Mahler and Elowe¹ did not alter this state of affairs. The following findings indicate that the soluble DPNH- and TPNH-diaphorase reactions are catalyzed by one common enzyme, as the two activities are not additive when they are measured with various indicators such as methylene blue, azoate, etc. Flavin mononucleotide (FMN) (flavin mononucleotide) is not inactivated; they show no tendency to separate upon ammonium sulphate fractionation of the soluble fraction. Preliminary data indicate that this type of soluble diaphorase is ubiquitous as to

its occurrence among animal tissues, although the highest activity hitherto found is that present in rat liver.

Table 1. Cytoplasmic distribution of diaphorase activities in rat liver.

Homogenates of rat liver were made in 0.25 M sucrose solution containing 3 % polyvinylpyrrolidone (pH adjusted to 7). 100 ml homogenate, containing 10 g wet weight liver, was centrifuged *a*) at 1 600 *g* for 10 min, *b*) at 4 100 *g* for 15 min, and *c*) at 105 000 *g* for 60 min. The denotions, mitochondrial, microsomal and soluble fractions, refer to the pellets obtained in *b* and *c*, and the supernatant obtained in *c*, respectively. The mitochondrial pellet was washed, and the microsomal pellet rinsed, twice with 0.25 M sucrose, and both pellets were suspended in 0.25 M sucrose. The test system contained 0.5 ml 0.3 M tris buffer (pH 7.5), 2.3 ml 0.25 M sucrose (containing, in the case of the soluble fraction, 3 % polyvinylpyrrolidone, pH adjusted to 7), 0.1 ml 3 mM DPNH or TPNH, 0.1 ml 1.7 mM 2,6-dichlorophenolindophenol, and 0.1 ml of the fraction to be tested, containing 5 mg wet weight liver equivalent in the case of mitochondria or microsomes, and 0.5 mg in the case of the soluble fraction. The decolorization of the dye was recorded in a Beckman DK2 spectrophotometer at 600 *mμ*, using glass cuvettes of 1 cm light path. The reaction was started by the addition of the reduced pyridine nucleotides, and followed for 4—6 min at room temperature. The values are expressed in terms of 1 g

	mg	DPNH	TPNH
Mitochondrial	23.3	4.3	1.0
Microsomal	31.1	13.1	1.9
Soluble	29.2	39.0	35.0

* On leave of absence from the Dept. of Biochemistry, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy.

1. Mahler, H. R. and Elowe, D. G. *J. Biol. Chem.* **210** (1954) 165.

Introducción

Imagen de fondo de la página anterior: Primera página del artículo en el que Lars Ernster (en la imagen superior) y Franco Navazio, en 1958, comunican el descubrimiento de una DT-diaforasa en animales, más tarde conocida como NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1 (NQO1).

Primera parte.

ESTADO RÉDOX CELULAR

1. Conceptos básicos.

El estado rédox celular es el resultado del balance entre elementos prooxidantes y antioxidantes/reductores en la célula (Halliwell & Gutteridge, 1999). Este balance juega un papel decisivo para la propia supervivencia de la célula pues determina el estado en que se encuentran muchas de sus moléculas así como las interacciones que podrían darse entre ellas. Cualquier desviación hacia uno de los lados de la balanza, es decir, hacia una situación de más oxidación o de más reducción, desencadena una serie de acontecimientos en cascada cuya resolución no es fácil de predecir. Se utiliza el término “señalización rédox” para referirse a cualquier proceso regulador mediado por los cambios rédox en moléculas señalizadoras que participan en dicho proceso. Los procesos metabólicos que necesariamente realiza la célula generan de manera inevitable modificaciones en el estado rédox, bien de un determinado compartimento o zona de la célula o de toda la célula en sí, que actúan como señales que comunican constantemente si tales procesos se están desarrollando bien o no. A esto se añade que, como resultado de su necesaria interacción con el medio externo, la célula tiene que responder a agentes prooxidantes o antioxidantes exógenos reajustando su propio equilibrio para no comprometer el desarrollo de sus funciones vitales (Figura 1).

Se ha comprobado que los cambios en el estado rédox intracelular acompañan las principales etapas de la vida de una célula como la proliferación o división, la diferenciación, la senescencia y la muerte. Esto es posible porque el balance rédox celular condiciona la expresión génica por medio de diferentes rutas de transducción de señales y por la modulación de los factores de transcripción, así como por la modificación directa de algunas moléculas implicadas en la regulación de los diversos procesos celulares como las quinasas o las fosfatasas (Dröge W, 2001). Pero ¿cómo mantiene la célula una homeostasis rédox que le permita desarrollar en cada momento sus funciones?

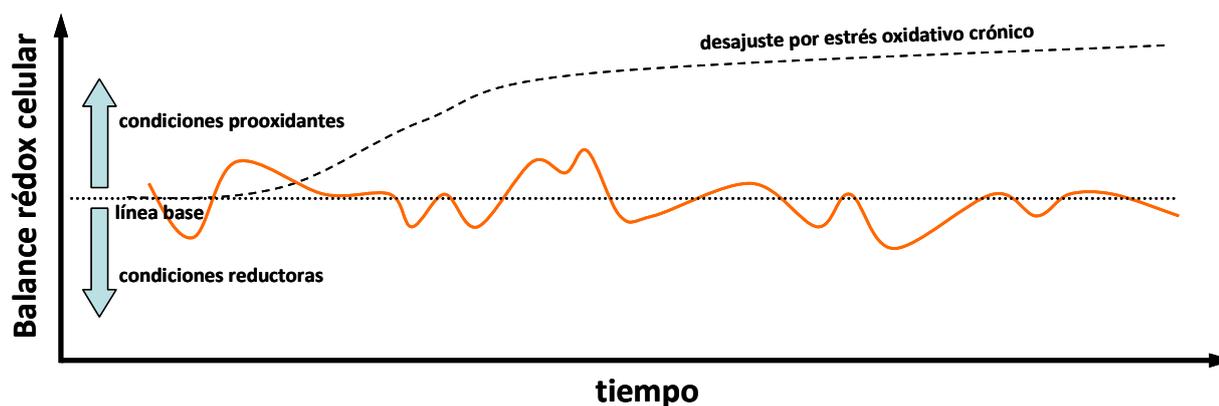


Figura 1. El estado redox celular como proceso dinámico. El estado redox celular es el resultado del continuo ajuste de las condiciones (pro)oxidantes/reductoras (antioxidantes) dentro de la célula (*línea continua naranja*). La magnitud y la duración de los desajustes dependen básicamente de los niveles de ROS/RNS y de la capacidad de reacción antioxidante de la célula (expresión de enzimas antioxidantes, ratio GSH/GSSG, metabolismo mitocondrial...) Los desajustes temporales del nivel redox basal actúan como señales que inician y regulan diversos procesos celulares; al mismo tiempo, esos desajustes desencadenan mecanismos de retroalimentación que determinan la magnitud y la duración de la señal. Sin embargo, la producción de cantidades anómalas de oxidantes, principalmente ROS y RNS, puede generar una situación oxidativa persistente (*línea discontinua*) que condiciona hasta tal punto las señales de transducción y la expresión génica que, normalmente, acaba desembocando en una situación anómala e incluso letal para la célula.

Las células presentan de modo natural componentes muy diversos con propiedades oxidantes, reductoras o antioxidantes. Siguiendo a Halliwell y Gutteridge, podemos afirmar que un oxidante es una especie química que o bien capta electrones o hidrógeno de otra o bien le cede oxígeno. Por el contrario, una especie es reductora si cede electrones o hidrógeno a otra o si capta oxígeno de esta. Normalmente una misma especie presenta una forma oxidada (susceptible de sufrir reducción, por ejemplo NAD(P)^+ o FAD) y otra reducida (que puede volver a ser oxidada, como NAD(P)H y FADH_2). Se denomina antioxidante a cualquier sustancia que, presente a bajas concentraciones respecto a un sustrato oxidable, retrasa significativamente o previene la oxidación de tal sustrato (Halliwell & Gutteridge, 1999). Es más habitual encontrar la palabra antioxidante que la palabra reductor por lo que muchas veces parece que se emplean como sinónimos aunque, en realidad, ambos términos designan compuestos con características distintas. No se puede pasar por alto el concepto de *scavenger*, difícilmente traducible al castellano en el contexto en que nos estamos moviendo (literalmente significaría basurero o carroñero) y empleado frecuentemente en la literatura científica

especializada para referirse a cualquier sustancia capaz de eliminar a una determinada especie reactiva.

Los radicales libres así como otras especies reactivas no radicales están presentes de manera natural en las células y tejidos en concentraciones variables y son los principales agentes oxidantes. Normalmente se habla de especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) para agrupar a cualquier derivado del oxígeno sea o no radical y de especies reactivas de nitrógeno (RNS, *reactive nitrogen species*) para los derivados del nitrógeno. La concentración de las especies reactivas está determinada por el balance entre su producción (bien inducida o bien por el propio metabolismo celular) y su eliminación por los sistemas antioxidantes de la célula (Figura 2). Aunque la composición de las defensas antioxidantes difiere de unos tejidos a otros y de unos tipos celulares a otros, dentro de un mismo tejido podemos señalar al menos las siguientes categorías (Halliwell & Gutteridge, 1999):

- a) Agentes que catalizan la eliminación de radicales libres y otras especies reactivas, como la enzimas SOD, catalasa, peroxidasas y los antioxidantes específicos de tioles.
- b) Proteínas, como las transferrinas, las hemopexinas o las metalotineínas, que minimizan los niveles de prooxidantes como iones de hierro, cobre y grupos hemo. En este grupo se incluyen las proteínas que oxidan el anión ferroso, como la ceruloplasmina.
- c) Proteínas que protegen a las biomoléculas frente a daños, entre los que se incluye el daño oxidativo, por ejemplo, las chaperonas.
- d) Agentes de bajo peso molecular que eliminan ROS y RNS, como la vitamina C, el glutatión, la tiorredoxina o el α -tocoferol, algunos de ellos procedentes de la dieta. Numerosos estudios subrayan la importancia del par GSH/GSSG en el mantenimiento del estado redox celular hasta el punto de considerarlo el principal tampón redox celular. La concentración media de GSH en el citosol se sitúa entre 1-11 mM, muy por encima de cualquier otro sistema redox celular. Por ejemplo, se estima que la concentración intracelular de tiorredoxina es entre 100 y 1000 veces menor que la de glutatión (Ježek &

Hlavatá, 2005). Por este motivo las mediciones de los niveles de GSH y GSSG se usan frecuentemente para determinar el estado rédox de la célula hasta el punto de que se iguala estado rédox a la relación GSH/GSSG (Schafer & Buettner, 2001; Hoffman *et al.*, 2008). Por último hay que señalar el papel que el sistema cisteína/cistina desempeña en el mantenimiento del balance rédox extracelular, como se ha comprobado en plasma de mamíferos. Se ha comprobado que el estado rédox del par cisteína/cistina en los compartimentos extracelulares condiciona la comunicación entre células y tejidos (revisado en Go & Jones, 2008).

- e) Los aminoácidos libres podrían ser considerados como *scavengers* de ROS, no tanto por su eficiencia cuanto por su elevada concentración intracelular (> 0,1 M) (Dröge W, 2001).
- f) Enzimas degradativas de moléculas oxidadas (lipasas, proteasas,...)

Las células y los tejidos se encuentran, en condiciones normales, en un estado de equilibrio en el que los niveles de ROS se mantienen más o menos constantes. La señalización rédox a la que antes hacíamos referencia requiere precisamente la alteración del balance rédox celular; dicho de otro modo, el

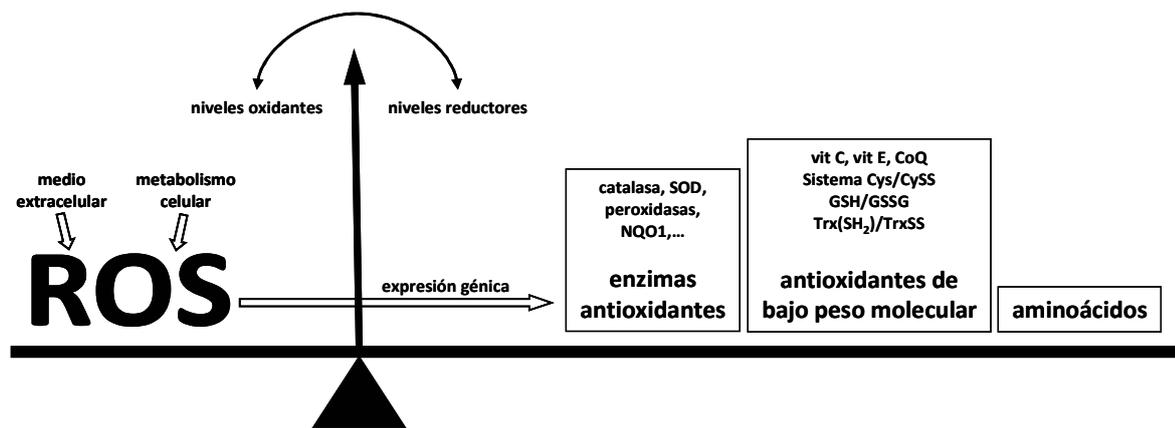


Figura 2. Mecanismos de homeostasis rédox. Los niveles basales de ROS están determinados por la velocidad de producción de ROS y su eliminación mediante diversos mecanismos celulares. Diversas enzimas antioxidantes como SOD, glutatión peroxidasa, catalasa o NQO1 son potentes *scavengers* de ROS pero se encuentran en las células en concentraciones relativamente bajas. Lo mismo puede afirmarse sobre los antioxidantes no enzimáticos, como los aminoácidos y las proteínas. Los aminoácidos son menos efectivos como *scavengers* que los antioxidantes clásicos si bien su concentración intracelular (> 0,1 M) exige considerar su participación en el balance rédox (Figura modificada de Dröge W, 2001).

desajuste del estado redox actúa como factor desencadenante de la señal. En los organismos superiores esta alteración es inducida por la activación de sistemas endógenos de producción/eliminación de especies reactivas que pueden ser regulados por la célula. De este modo la célula controla cuándo se inicia y termina la señal así como su intensidad. En muchas otras ocasiones, los factores externos son los que provocan el desajuste en el estado redox. Si la variación no es excesivamente grande leves ajustes devuelven a la célula a su situación inicial; en otras ocasiones la respuesta antioxidante puede no ser suficiente para reestablecer el equilibrio.

Se habla de **estrés oxidativo** cuando hay un desequilibrio entre la producción de especies reactivas y las defensas antioxidantes, independientemente de su origen. Helmut Sies, que introdujo esta expresión, lo define como una alteración en el balance prooxidante-antioxidante a favor del primero, dando lugar a un daño potencial (Sies & Cadenas, 1985). Dicho daño se designa frecuentemente como daño oxidativo. Esta situación de desajuste en el estado redox podría originarse por una de las siguientes causas:

- a) La disminución de las enzimas antioxidantes (por ejemplo, por mutaciones) o la reducción en el aporte de antioxidantes procedentes de la dieta, como algunas vitaminas.
- b) Una mayor exposición a ROS/RNS endógenas (procedentes, por ejemplo, de alteraciones en la cadena respiratoria mitocondrial o de la NAD(P)H oxidasa) o exógenas (por ejemplo, en situaciones de hiperoxia, contaminación ambiental,...)

Como hemos dicho, en los organismos sanos, la producción de ROS y RNS está prácticamente en equilibrio gracias a los sistemas antioxidantes. Sin embargo, este balance no es perfecto y algunas especies reactivas provocan de manera continua daños en moléculas que deben ser reparadas (pensemos en este sentido en el ADN) o eliminadas (como ocurre con la mayoría de las proteínas oxidadas, que son eliminadas por el proteosoma). La persistencia de un ambiente oxidante se considera un signo asociado a la toxicidad de ciertos compuestos xenobióticos, al

envejecimiento y a determinadas patologías (que no tienen por qué estar relacionadas con tal envejecimiento).

2. Especies reactivas de oxígeno (ROS).

Según Halliwell & Gutteridge (1999), un radical libre es cualquier especie química con existencia independiente que contiene uno o más electrones desapareados. Pueden formarse a partir de una especie no radical por la pérdida de un electrón,



o por la ganancia de un electrón:



La presencia de estos electrones desapareados convierte a los radicales libres en elementos especialmente reactivos. De hecho, es importante señalar que cuando un radical libre interacciona con un no radical el resultado es un nuevo radical, con lo cual se inicia una cadena de reacciones que forman continuamente radicales libres. En principio, los nuevos radicales libres formados podrían ser más, menos o igual de agresivos que el radical que inició la cadena.

La expresión “especies reactivas de oxígeno” (ROS) se usa, como ya hemos señalado anteriormente, para referirse a los derivados del oxígeno, tanto radicales como no radicales (ver Tabla 1 y Figura 3).

Radicales	No radicales
Superóxido, $O_2^{\cdot-}$	Peróxido de hidrógeno, H_2O_2
Hidroxilo, OH^{\cdot}	Ozono, O_3
Peroxilo, RO_2^{\cdot}	Oxígeno singlete, 1O_2
Alcoxilo, RO^{\cdot}	Peroxinitrito, $ONOO^{\cdot}$
Hidroperoxilo, HO_2^{\cdot}	Ácido hipocloroso, $HClO$

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno (según Halliwell & Gutteridge, 1999).

A continuación vamos a comentar brevemente las características más significativas de las principales ROS:

a) Radical hidroxilo (OH[·])

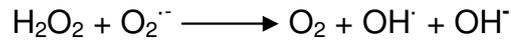
Este radical es la especie más reactiva de todas las derivadas del oxígeno y presenta un potencial de reducción estándar positivo muy alto (E° OH[·], H⁺/H₂O = 2,31 V). Puede originarse en los sistemas biológicos a partir de H₂O₂ mediante la clásica reacción de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^{\cdot} + \text{OH}^{\cdot}$) o por fisión homolítica inducida por la radiación ultravioleta. También pueden producirse a partir de ozono, por la acción de radiaciones ionizantes, en el metabolismo del etanol, en la ultrasonificación de soluciones acuosas y en el proceso de liofilización. El radical OH[·] reacciona muy rápido con prácticamente todas las biomoléculas: azúcares, aminoácidos, fosfolípidos, nucleótidos, ácidos orgánicos,...

b) Radical superóxido (O₂^{·-})

Si el oxígeno molecular se reduce captando un solo electrón se origina la forma aniónica radical denominada superóxido. Algunas enzimas producen O₂^{·-}. La más destacada es la xantina oxidasa, aunque parece que esto no ocurre habitualmente *in vivo*. Se ha descrito la auto-oxidación de diversas moléculas de gran importancia biológica en presencia de O₂ y la consiguiente producción de O₂^{·-}. Entre ellas podemos citar gliceraldehído, FMNH₂, FADH₂, adrenalina, dopamina, cisteína,... Se ha sugerido que para que estas auto-oxidaciones ocurran se necesita la presencia de iones de metales de transición como hierro o cobre.

El radical O₂^{·-} (E° O₂^{·-}, 2H⁺/H₂O₂ = 0,94 V), en comparación con OH[·], es bastante menos reactivo con las especies no radicales en soluciones acuosas pero puede realizar un daño muy importante en el interior de membranas hidrofóbicas. La forma protonada de O₂^{·-}, HO₂[·], es más reactiva que el propio superóxido y puede provocar, por ejemplo, la peroxidación de ácidos grasos. Además de producir daños directos, el superóxido puede ser citotóxico porque genera especies más reactivas que él mismo. Se ha comprobado que el superóxido reacciona rápidamente con NO[·] para formar peroxinitrito (ONOO⁻), que produce a su vez numerosas especies nocivas en condiciones fisiológicas. Por otro lado, la combinación de peróxido de

hidrógeno y superóxido en presencia de iones metálicos genera radical hidroxilo mediante la denominada reacción de Haber-Weiss:



c) Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

Es la especie reactiva de oxígeno no radical más importante desde el punto de vista biológico, como comprobaremos a lo largo de esta introducción. El peróxido de hidrógeno atraviesa fácilmente las membranas celulares y puede provocar daños directos como, por ejemplo, inactivar a la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. En altas concentraciones (10-100 μM) es citotóxico. Pero tal vez su carácter nocivo más importante es que reacciona fácilmente con iones metálicos y produce OH^{\cdot} mediante la reacción de Fenton, como ya hemos señalado anteriormente.

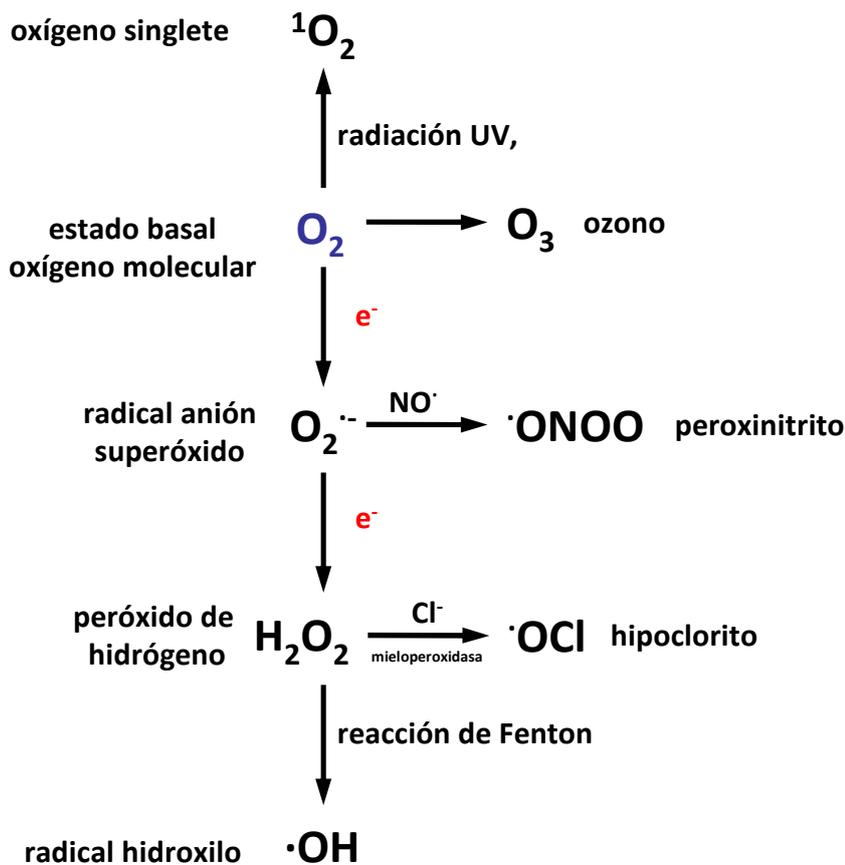


Figura 3. Principales especies reactivas de oxígeno. (Figura modificada de Bartosz G, 2009).

3. Fuentes celulares de ROS. Importancia de la mitocondria.

Las ROS no sólo proceden de fuentes exógenas (radiaciones ultravioleta e ionizantes, contaminantes, compuestos fenólicos presentes en alimentos vegetales, humo del tabaco,...) sino que las células por sí mismas generan ROS tanto activamente como en forma de subproductos derivados de procesos biológicos relevantes (ver Tabla 2) . Por ejemplo, células fagocíticas como neutrófilos y macrófagos presentan un sistema productor de $O_2^{\cdot-}$ que se activa en inflamaciones agudas y crónicas y que está constituido por un complejo NADPH-oxidasa. Esta generación controlada de $O_2^{\cdot-}$ juega un papel fundamental en la defensa frente a microorganismos y células tumorales. En los peroxisomas se produce H_2O_2 como consecuencia del metabolismo oxidativo de los ácidos grasos de cadena larga. Otras fuentes celulares de ROS son las lipoxigenasas, ciclooxigenasas, citocromo *P450* reductasas, mieloperoxidasas,... (Halliwell & Gutteridge, 1999).

	Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
Formación de ROS	Cadena respiratoria mitocondrial Glicerofosfato deshidrogenasa Dihidroorotato deshidrogenasa Nox Otras enzimas (p. e., xantina oxidasa) Microsomas Autoxidación de flavinas, quinonas, metales,... Metaloproteínas, tioles Radiaciones ionizantes Reacciones fotoquímicas Ultrasonidos	Dismutación no enzimática de $O_2^{\cdot-}$ Dismutación de $O_2^{\cdot-}$ por SOD Reducción de $O_2^{\cdot-}$ Peroxidasas Oxidasas peroxisomales Otras enzimas (p. e., monoamino oxidasa)
Eliminación de ROS	Superóxido dismutasa Catalasa Antioxidantes de bajo peso molecular	Catalasa Glutación peroxidasa Peroxirredoxinas

Tabla 2. Principales factores que determinan los niveles de ROS intracelulares.

La mitocondria es considerada la principal fuente celular de superóxido. La formación de este radical aniónico sería un efecto derivado de la interacción de los componentes de la cadena respiratoria con el O_2 . La producción de $O_2^{\cdot-}$ en la mitocondria depende en gran medida de la fuerza protón motriz: cuanto mayor es su valor, más difícil resulta el bombeo de protones fuera de la matriz en contra del gradiente electroquímico, de manera que el transporte de electrones a través de la cadena es más lento, la vida media de los intermediarios reducidos aumenta y la probabilidad de que el oxígeno molecular sea reducido a superóxido es mayor. Debido al fuerte carácter reductor del ambiente intramitocondrial, diversos componentes de la cadena respiratoria, entre los que se incluyen flavoproteínas, centros sulfoférricos y la ubisemiquinona, son termodinámicamente capaces de transferir un electrón al oxígeno. Además hay que tener en cuenta que la mayoría de los pasos de la cadena respiratoria son reacciones en las que se implica a un solo electrón (revisado en Bartosz G, 2009).

Numerosos grupos han investigado los mecanismos que explican la formación de ROS en la mitocondria. Se ha observado producción de $O_2^{\cdot-}$ en la membrana mitocondrial externa, en la matriz y en ambos lados de la membrana mitocondrial interna. La contribución de cada componente de la cadena respiratoria en la producción total de $O_2^{\cdot-}$ varía de unos órganos a otros y depende de si la mitocondria está respirando (lo que se denomina estado 3) o si la cadena respiratoria se encuentra en un importante estado de reducción (estado 4) (Barja G, 1999). Aunque el Complejo III, que libera $O_2^{\cdot-}$ a ambos lados de la membrana mitocondrial interna, es el principal productor en mitocondrias de corazón y pulmón, la fuente más importante en el cerebro es el Complejo I, que parece liberarlo hacia la matriz (Muller *et al.*, 2004; Barja G, 1999; Ježek & Hlavatá, 2005). Numerosos estudios realizados en *C. elegans*, *E. coli* y en mamíferos confirman también la producción de superóxido en el Complejo II en condiciones de hipoxia o cuando este complejo está dañado, así como las consecuencias fisiopatológicas que estas alteraciones conllevan (Ishii *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998; Yankovskaya *et al.*, 2003; Guzy *et al.*, 2008).

El desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, es decir, la disociación entre la respiración mitocondrial y la síntesis de ATP, puede hacer disminuir la formación de $O_2^{\cdot-}$ en la mitocondria de manera considerable. Se ha demostrado que bajas

dosis de desacoplantes incrementan de manera sistemática la tasa respiratoria *in vivo* y previene el daño oxidativo en las biomoléculas. Al incrementar el consumo de O_2 aumenta el transporte de electrones y se previene la formación de ROS porque decrece la tensión de O_2 en la mitocondria. Otro efecto derivado del aumento del transporte de electrones es que se favorecen los niveles de oxidación de los intermediarios de la cadena respiratoria, lo que evita que se ceda electrones al oxígeno molecular (Barja G, 1999). Hay que añadir que, además, se mantienen los niveles de NADH más bajos y se previene la formación de ROS por las flavoproteínas de la matriz mitocondrial. En coherencia con lo expuesto anteriormente, se ha comprobado que los mecanismos mitocondriales que disminuyen la eficiencia de la fosforilación oxidativa y aumentan el flujo de electrones por la cadena respiratoria, como las proteínas desacoplantes, los canales de K^+ sensibles a ATP o las oxidasas alternativas, previenen la liberación de ROS. Es muy interesante el hecho de que las proteínas desacoplantes y los canales mitocondriales de K^+ sean activados por los oxidantes, constituyendo un sistema de retroalimentación negativa que controla la formación de ROS generando una situación de desacoplamiento leve (*mild uncoupling*). Por último, hay que señalar que estos mecanismos disipadores de energía están también regulados por las condiciones metabólicas, de manera que el metabolismo energético mitocondrial y el estado redox celular están íntimamente relacionados. Mientras que el incremento de la tasa respiratoria mitocondrial previene la formación de ROS, las condiciones patológicas que inducen un flujo de electrones más lento se acompañan de un incremento en los niveles de ROS de origen mitocondrial (Kowaltowski *et al.*, 2009).

También se ha comprobado que p66^{Shc}, una proteína centinela que controla las respuestas celulares frente a situaciones de estrés así como la esperanza de vida en los mamíferos, genera ROS en la mitocondria. Los ratones p66^{Shc} *-/-* incrementan su resistencia al estrés oxidativo y un 30% su esperanza de vida. Esta proteína se encuentra inicialmente en el citosol, donde se mantiene reducida e inactiva. En situaciones de estrés se induce su expresión por p53 y se activa gracias a la oxidación de sus grupos tiol. Posteriormente p66^{Shc} se transloca al espacio intermembrana, donde oxida citocromo *c* y produce H_2O_2 como molécula señalizadora de apoptosis (Migliaccio *et al.*, 1999; Giorgio *et al.*, 2005; Gertz *et al.*, 2008).

En la matriz, el $O_2^{\cdot -}$ es eliminado por la enzima MnSOD. Sin embargo, parte del $O_2^{\cdot -}$ producido en el espacio intermembrana puede ser transportado al citoplasma a través de canales de aniones dependientes del voltaje (Han *et al.*, 2003); no obstante, la presencia de la enzima CuZnSOD y de citocromo *c* en el espacio intermembrana, capaces de eliminar $O_2^{\cdot -}$ por distintos mecanismos, plantean algunos interrogantes sobre las implicaciones fisiológicas de la salida de este radical desde la mitocondria al citoplasma. La abundancia de SOD en sus diversas formas en la mitocondria y su presencia tanto en la matriz como en el espacio intermembrana son claros signos de la necesidad de eliminar el superóxido generado en la mitocondria. Por otro lado, el peróxido de hidrógeno generado como producto de la dismutación de $O_2^{\cdot -}$ puede tener diversos destinos. Es más estable que el superóxido y puede difundir libremente a través de las membranas o bien ser transportado por las acuaporinas presentes en la membrana mitocondrial interna (Bienert *et al.*, 2006; 2007), de manera que puede dirigirse hacia el citosol y ser eliminado por los sistemas antioxidantes citosólicos (glutatión peroxidasa y tioredoxina peroxidasa) o por la catalasa presente en los peroxisomas. También puede ser eliminado en la mitocondria. Así, se ha localizado catalasa en mitocondrias de corazón e hígado (Radi *et al.*, 1991; Salvi *et al.*, 2007). Las peroxirredoxinas y los sistemas glutatión peroxidasa/glutatión reductasa y tioredoxina peroxidasa/tiorredoxina reductasa de la mitocondria también reducen la cantidad de H_2O_2 (Kowaltowski *et al.*, 2009). Sorprendentemente los niveles de glutatión mitocondrial tienen capacidad para eliminar aproximadamente sólo el 15% de la producción de H_2O_2 , lo que contribuye a que este derivado del oxígeno difunda fuera de la matriz mitocondrial (Cadenas E, 2004).

Puesto que la mitocondria es la principal fuente de ROS endógenas celulares (se ha estimado que, durante la respiración mitocondrial, en torno al 1-2% del oxígeno deriva hacia la formación de ROS (Chance & Williams, 1956)) no resultaría extraño que condicionara el estado redox de toda la célula (Ježek & Hlavatá, 2005). Así, los niveles de ROS mitocondriales podrían actuar como señales reguladoras de diversos procesos celulares. Se ha señalado, por ejemplo, que el tratamiento de células MCF7 de cáncer de mama con $17\text{-}\beta$ -estradiol induce la producción de ROS en la mitocondria y que tal producción está implicada en la regulación de la fase G_1 temprana y en la transición G_1 -S (Felty *et al.*, 2005).

4. La doble cara de las ROS.

Tradicionalmente las ROS han sido consideradas como productos tóxicos pero inevitables del metabolismo celular aeróbico. En el lenguaje cotidiano, “oxidarse” tiene una clara connotación negativa porque indica una alteración de las condiciones consideradas idóneas, es decir, decadencia y degradación. Este mismo prejuicio se traslada en numerosas ocasiones al lenguaje de la ciencia y, de manera simple, se reduce el papel de las ROS al de agentes nocivos. El uso de la palabra inglesa *scavenger* para referirse a los compuestos capaces de eliminar las ROS da a entender que las ROS son desechos, carroña, es decir, algo molesto e inservible. Numerosos estudios describen con detalle los mecanismos mediante los que las ROS interaccionan con los diversos componentes celulares como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, lo que acaba en la mayoría de los casos con la destrucción de dichos componentes e incluso con la muerte celular. Del mismo modo está más que demostrada su participación en mayor o menor grado en el envejecimiento, en algunas formas de cáncer, en la aterosclerosis, en enfermedades neurodegenerativas o en patologías que implican procesos inflamatorios crónicos como las artritis reumatoides y psoriáticas (Muller *et al.*, 2007; Dröge W, 2001). No se puede negar que esto puede ser así, pero no tiene por qué ser sólo y siempre así, pues de igual modo nos encontramos cada vez con más pruebas de su intervención en diversas rutas de señalización y en el control del ciclo celular. Es posible, incluso, que su participación en enfermedades como las señaladas anteriormente sea consecuencia de una exageración de su papel en la regulación del ciclo celular. Dicho de otro modo, la sobreactuación, digámoslo así, de las especies reactivas tienen consecuencias muy graves en las células. En su convivencia con estas particulares moléculas la célula ha ido desarrollando mecanismos de control que mantienen la concentración de ROS en las condiciones más adecuadas para el buen desarrollo de sus diversas funciones y asegurar su viabilidad.

Sin embargo, cada vez son más numerosos los estudios que sugieren que las ROS pueden ser beneficiosas y funcionar como mensajeros que regulan procesos esenciales para la supervivencia celular. El interés por esta doble cara de las ROS se ve reflejado en los títulos de algunas de las revisiones recientes sobre el tema. Sirvan de ejemplo “*Reactive oxygen species: A breath of life or death?*” (Fruehauf & Meyskens, 2007) o “*Reactive oxygen species: destroyers or messengers?*” (Bartosz

G, 2009). Algunos trabajos van aún más allá y sugieren que todas las células aeróbicas necesitan ineludiblemente la presencia continua de ciertos niveles de ROS para mantenerse vivas. Esto supone un giro de 180° en la concepción de estos agentes al pasar de *indeseables* a *imprescindibles*. Lo que se propone es que las ROS actúan como una especie de señal de vida en función de su concentración intracelular: un determinado nivel o umbral de ROS es necesario para que la célula mantenga su capacidad proliferativa pero valores por debajo o por encima de ese umbral dan lugar a la detención o a la estimulación del crecimiento. Si los niveles son demasiados altos las ROS ya no inducen la división sino que, por el contrario, provocan la detención del crecimiento y, si siguen subiendo, promueven la muerte celular (Banes *et al.*, 1992; Burdon RH, 1995; Del Bello *et al.*, 1999; Bello *et al.*, 2001; Boonstra & Post, 2004). Por ejemplo, se ha descrito que el tratamiento con 0,02-0,13 μM H_2O_2 estimula la proliferación de fibroblastos NIH-3T3 pero valores entre 0,25 y 2 μM H_2O_2 o la adición de miméticos de la SOD, que incrementan los niveles de H_2O_2 , producen la detención del crecimiento y la muerte celular (Laurent *et al.*, 2005; Figura 4) . Nuestro grupo ha comprobado este fenómeno en células HeLa, en las que tratamientos con bajas concentraciones de H_2O_2 tienen un apreciable efecto estimulador del crecimiento mientras que concentraciones más altas incrementan el número de células muertas (Bello *et al.*, 2001). En el caso de las células tumorales se ha verificado que el valor umbral de ROS está por encima del de las células normales (Laurent *et al.*, 2005; Nicco *et al.*, 2005). Dando un paso adelante más se ha propuesto que el estrés oxidativo persistente endógeno o exógeno puede inducir la tumorigénesis (Behrend *et al.*, 2003).

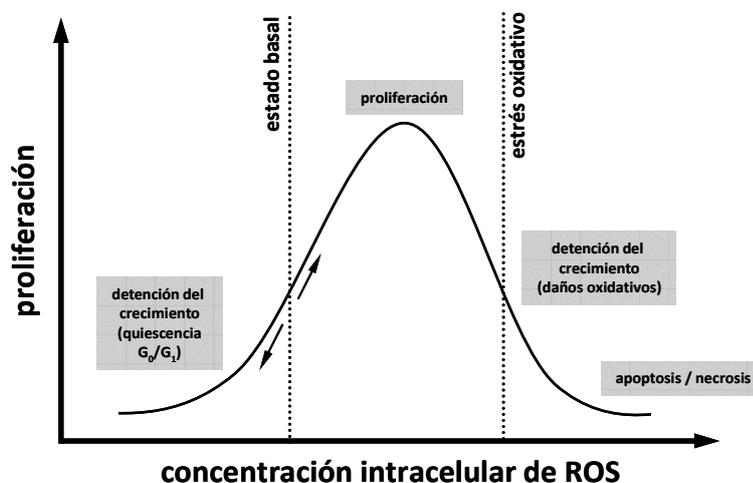


Figura 4. Representación esquemática de la relación entre los niveles intracelulares de ROS y la proliferación celular. (Figura modificada de Nicco *et al.*, 2005).

Por tanto, en este momento no hay duda de la función de las ROS en la regulación de procesos esenciales para la célula. Cualquier molécula señalizadora debe cumplir los siguientes requisitos (Bartosz G, 2009): 1) su concentración puede controlarse tanto a nivel de síntesis como de eliminación; 2) existen receptores específicos y 3) los efectos de su señalización son reversibles. De todas las ROS se señalan al peróxido de hidrógeno y al superóxido como las más idóneas para reunir estas características al estar tanto su producción como su eliminación muy controladas enzimáticamente. El problema es que no es fácil identificar con seguridad cuál de las dos especies está implicada en una determinada señal porque el superóxido tiene una vida muy corta y es rápidamente convertido en H_2O_2 por las distintas isoformas de SOD. Un incremento/descenso en los niveles de $O_2^{\cdot-}$ se acompaña siempre del correspondiente incremento/descenso de H_2O_2 . De ahí que muchos trabajos, como los señalados en el párrafo anterior, se centren en la acción de H_2O_2 . En cualquier caso, el papel de las demás ROS no puede ser desdeñado.

Pero ¿cuál es exactamente el mecanismo de acción de las ROS en la señalización celular? ¿Cómo pueden actuar las ROS como mensajeros intracelulares? Se han propuesto dos ideas, no necesariamente excluyentes entre sí, que pueden responder a estas preguntas (Bartosz G, 2009):

a) Modificación de moléculas por ROS.

Aunque algunas ROS provocan daños irreversibles en las macromoléculas (por ejemplo, OH^{\cdot}), otras como H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$ pueden actuar como oxidantes relativamente moderados (Halliwell & Gutteridge, 1999). En ausencia de iones de metales de transición (que harían posible la reacción de Fenton a la que ya se ha hecho referencia), la principal diana del peróxido de hidrógeno son los grupos tioles de los residuos de cisteína de las proteínas. Esta especie reactiva induce la formación de disulfuros entre residuos de diferentes proteínas o entre una proteína y tioles de bajo peso molecular como glutatión. Entre las proteínas más susceptibles de sufrir la oxidación de sus tioles encontramos a las fosfatasas, las proteínas G, algunos canales iónicos y algunos factores de transcripción. Puesto que el nivel de fosforilación de una determinada proteína es el resultado del balance entre la acción de quinasas y fosfatasas, la inactivación de las fosfatasas por ROS desplaza este equilibrio hacia una mayor fosforilación al favorecerse indirectamente la actividad

quinasa, aunque también se ha sugerido que algunas quinasas son directamente activadas por ROS.

Puesto que las rutas de señalización intracelulares dependen del grado de activación/inactivación (fosforilación/desfosforilación) de sus componentes no cabe la menor duda de que la presencia de ROS condiciona el avance de la señal así como su destino final (qué genes van a ser expresados). Hay que recordar que el origen de las ROS no tiene por qué ser necesariamente exógeno (entiéndase normalmente tóxico) sino que la propia célula podría utilizar sus mecanismos productores de ROS para modular las rutas de señalización. Pensemos, en este sentido, en señales destinadas a modificar el metabolismo mitocondrial y en ROS mitocondriales que regulan dichas señales.

b) Cambios en el estado redox intracelular.

Es obvio que la producción de ROS puede desplazar el estado redox celular hacia una situación más oxidante mientras que su eliminación tendrá el efecto contrario. Es posible que la acción de las ROS esté mediada por cambios en el estado redox de la célula, es decir, por modificaciones en el *pool* de los pares redox responsables de tamponar el balance redox (GSH/GSSG, NAD(P)⁺/NAD(P)H, tiorredoxinas, glutarredoxinas,...). Ya hemos señalado que el estado redox celular depende en gran medida del par GSH/GSSG. Por tanto, cualquier alteración de este balance por la presencia de ROS puede actuar como inicio de diversos procesos celulares.

Segunda parte.

ESTADO RÉDOX y CICLO CELULAR.

1. El ciclo celular.

El ciclo celular se divide clásicamente en cuatro etapas que son la fase de síntesis del ADN (fase S), la fase correspondiente a la división celular (fase M) y los dos periodos de tiempo comprendidos entre ambas: fase G_1 (*gap1*) entre las fases M y S y G_2 (*gap2*) entre S y M (Figura 5). A diferencia de la rápida proliferación de las células embrionarias, algunas células adultas cesan por completo su división o se dividen ocasionalmente.

La progresión del ciclo celular depende de la integración de un gran número de señales tanto extracelulares como intracelulares y de controles genéticos intrínsecos que dan lugar a varios puntos de control o de regulación en las diferentes fases del ciclo celular. Entre estos encontramos los llamados puntos de control de daño del ADN, que son el punto de control S en G_1/S y el punto de control M en G_2/M . La progresión del ciclo celular puede ser detenida en estos puntos para que se lleve a cabo la reparación de posibles daños en el ADN producidos por agentes químicos o por irradiación. Durante la fase M se han identificado otros puntos de regulación que chequean el desarrollo de la mitosis. Por ejemplo, el punto de control Sp controla si todos los cromosomas se han unido al huso mitótico.

Es especialmente interesante el punto de regulación de la fase G_1 denominado punto de restricción, regulado por factores externos como factores de crecimiento y por factores de adhesión celular. En presencia de los factores de crecimiento apropiados, las células atraviesan el punto de restricción y entran en la fase S. Una vez que la célula supera este punto está condicionada a progresar a través de la fase S y del resto del ciclo celular, incluso en ausencia de la estimulación por los factores de crecimiento. Si, por el contrario, los factores de crecimiento adecuados no están disponibles en G_1 la progresión a través del ciclo se detiene en el punto de restricción y la célula entra en un estado de reposo denominado G_0 en el que puede permanecer de manera indefinida sin proliferar. Las

células en G_0 presentan un ritmo metabólico más lento que las que se encuentran en G_1 y permanecen en esta situación hasta que son inducidas a dividirse por las señales apropiadas.

Las ciclinas y las quinasas de serina/treonina dependientes de ciclinas (CDK, *cyclin dependent kinases*) constituyen la base de los mecanismos moleculares que regulan el ciclo celular y su avance a través de las distintas etapas que antes hemos señalado. Las CDKs controlan diversos procesos relacionados con el ciclo celular fosforilando los residuos de treonina y serina de determinadas proteínas. Las ciclinas se unen a las CDKs y controlan su actividad quínasa. El ensamblaje y desensamblaje cíclico de los complejos CDK-ciclina es el proceso central que dirige el ciclo celular (Figura 5). Cada ciclina interacciona con una CDK específica. Los complejos ciclina-CDK más importantes en mamíferos derivan de la unión de las ciclinas D y E con las CDK4/6 y CDK2 en la fase G_1 y las ciclinas A y B con la CDK1 durante la mitosis. El primer complejo ciclina-CDK que se activa durante la fase G_1 está compuesto por una ciclina tipo D y las quinasas CDK4 o CDK6, según el tipo celular. Conforme la célula avanza por esta fase se incrementa la producción de ciclina E, que alcanzará su concentración máxima al final de G_1 . La asociación de la ciclina E y CDK2 determina la superación del punto de restricción mientras que los complejos integrados por ciclina A y CDK2 son responsables del inicio de la fase S en sí, durante la cual se degradará la ciclina E (Sherr CJ, 1993). A continuación, las ciclinas A y las tipo B interaccionan con CDK1 y promueven la entrada en G_2/M . El complejo ciclina A-CDK1 alcanza su máxima actividad en la fase G_2 y luego es degradado de forma inmediata para permitir que la unión ciclina B-CDK1 induzca el paso a mitosis. La eliminación de la ciclina B señala, finalmente, la salida de la fase de mitosis (Peeper *et al.*, 1993)

Una estrategia fundamental empleada en el control del ciclo celular es que una proteína reguladora estimula una fase del ciclo e inhibe al mismo tiempo otra. Así, por ejemplo, las actividades de los complejos ciclina-CDK necesarios para la transición G_1/S inhiben la transición G_2/M . De esta manera el avance del ciclo es irreversible. Además, esta irreversibilidad se refuerza por la proteólisis mediada por ubiquitina de las ciclinas correspondientes una vez que se ha superado un punto de regulación (Hershko A, 1997).

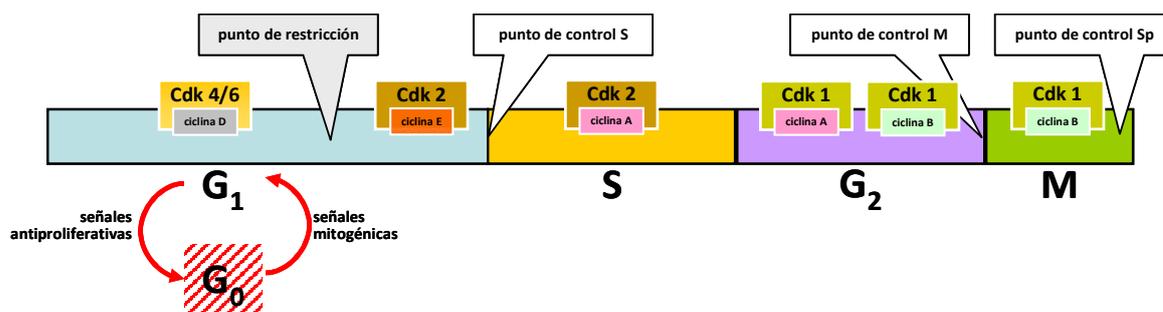


Figura 5. Representación esquemática del ciclo celular de mamíferos. Se han representado los puntos de regulación conocidos así como las principales interacciones ciclina-CDK de cada una de las fases. El ciclo consta básicamente de cuatro fases: G_1 , S, G_2 y M. La transición entre ellas está regulada por complejos ciclina/CDK. Cada fase se caracteriza por las diversas interacciones entre las ciclinas (A, B, D, E) y las CDKs. G_0 es un estado de quiescencia del que las células pueden salir gracias a señales mitogénicas de diversa naturaleza. Una vez superado el punto de restricción de G_1 , las células proliferan sin depender de factores externos, aunque existen otros puntos de control que pueden detener la progresión de forma temporal o definitiva.

Las proteínas CDK no sólo son reguladas por su asociación/disociación con las ciclinas correspondientes. Su activación requiere, además, la fosforilación de un residuo de treonina conservado en todas las CDKs. Esta fosforilación está catalizada por la enzima CAK (*CDK-activating kinase*), que a su vez es un complejo Cdk7/ciclina H (Kaldis P, 1999)

Por otro lado, se ha demostrado que el avance del ciclo celular depende en gran medida de la actividad de proteínas inhibidoras de las CDKs denominadas CKI (*cyclin-kinase inhibitor*). Se distinguen dos familias de CKIs basándose en sus estructuras y afinidades: INK4 y Cip/Kip (*CDK inhibitory protein/kinase inhibitory protein*). La familia INK4 consta de cuatro miembros (p16, p15, p18 y p19) que se unen específicamente e inhiben a CDK4/6. La familia Cip/Kip, formada por p21, p27 y p57, presentan un rango más amplio de afinidades en la inhibición de CDKs (revisado en Vidal & Koff, 2000).

En las células de mamíferos, uno de los sustratos más importantes de los complejos ciclina/CDK de la fase G_1 es la proteína retinoblastoma (pRb), caracterizada como supresora de tumores. La actividad de pRb está determinada por su grado de fosforilación que, a su vez, depende de la fase del ciclo celular. Cuando se encuentra hipofosforilada se une a diversos factores de transcripción, especialmente a miembros de la familia E2F, formada por cinco isoformas diferentes que forman heterodímeros con un segundo grupo de proteínas conocidas como

DP1. pRB aparece hipofosforilada en el comienzo de la fase G_1 y es fosforilada en diversos residuos conforme progresa esta fase. Esta fosforilación provoca la liberación y activación de los factores de transcripción E2F, permitiendo la transcripción de genes que intervienen en el paso a la fase S como el de la ciclina E. Parece que la activación inicial de pRB ocurre al comienzo de la fase G_1 mediante su fosforilación por complejos ciclina D-CDK4/6. A continuación intervienen los complejos ciclina E/CDK2, que completan la fosforilación de pRB al final de G_1 y determinan el inicio de la fase S (Herwig S & Strauss, 1997).

Otra proteína fundamental por su implicación en la regulación del ciclo celular es p53. En condiciones normales, los niveles de p53 son bajos debido a su relativamente corta vida media. Sin embargo, las señales de estrés intracelular y extracelular inducen su estabilización y activación, lo que da lugar a la transcripción de diversos genes cuyos productos condicionan el avance del ciclo celular (por ejemplo, p53 regula la transcripción de p21, una de las proteínas CKI que hemos visto antes). Es especialmente interesante el incremento de la actividad p53 tras producirse daños en el ADN, induciendo la detención del ciclo y la posterior reparación del material genético (Levine AJ, 1997).

El desarrollo del ciclo celular en mamíferos está determinado por un gran número de moléculas señalizadoras extracelulares, como los factores de crecimiento, así como por la interacción con los componentes de la matriz extracelular. Es llamativo el hecho de que estas señales extracelulares actúen fundamentalmente sobre las células durante la fase G_1 del ciclo. Las moléculas interaccionan específicamente con receptores con actividad tirosina quinasa intrínseca o con receptores que transmiten la señal al citoplasma interactúan con proteínas unidas a GTP (proteínas G). La activación de estos receptores inicia complejas redes o cascadas de transducción de señales que, finalmente, acaban provocando la proliferación celular.

2. Alteraciones del balance rédox durante el ciclo celular.

El avance del ciclo celular se regula por factores externos, fundamentalmente nutrientes y los denominados factores de crecimiento. Estos factores llevan a cabo sus efectos gracias a elaboradas redes intracelulares de transducción de señales

que, en último término, inducen el desarrollo del ciclo celular o bien su detención. En las últimas décadas, a la larga lista de reguladores del ciclo celular se ha añadido una serie de elementos que no habían sido previamente considerados y que, por el contrario, están demostrando que juegan un papel esencial en el control de la división celular. Entre ellos ocupan un lugar de privilegio los factores que condicionan el estado redox celular.

La primera referencia a la relación entre el ciclo celular y el estado redox celular se remonta a 1931 cuando Rapkine demuestra que los tioles celulares de huevos de erizo de mar fluctúan cíclicamente (Rapkine L, 1931). Destacan los estudios posteriores de Mauro y colaboradores en 1969 que, estudiando los niveles de grupos sulfhidrilo (-SH) y disulfuro (-SS-) en las fases del ciclo de células sincronizadas, han demostrado que la concentración de -SH no proteico disminuye 10 veces conforme avanza la fase G₁ para luego incrementar 30 veces al final de la fase S. Por el contrario, los grupos -SH unidos a proteínas aumentan durante G₁ y decaen durante S (Mauro *et al.*, 1969).

Hace ya más de una década se midieron directamente los cambios en el potencial redox (E) a partir de las concentraciones de GSH y GSSG y la ecuación de Nernst,

$$E = E_0 + k \log ([GSSG] / [GSH]^2)$$

donde [GSSG] y [GSH] son, respectivamente, las concentraciones de la forma oxidada y reducida del glutatión mientras que E_0 y k son constantes. Se registró de manera continua el potencial redox conforme las células progresaban desde una fase activa de crecimiento hasta la inhibición por el contacto, obteniéndose valores más reductores en las células que estaban dividiéndose (- 220 mV) y más oxidantes en las confluentes (- 188 mV); el tratamiento de las células con un inhibidor de la síntesis de GSH provocó un estado menos reductor y el consiguiente descenso de la proliferación (Hutter *et al.*, 1997). Se ha comprobado, además, que los niveles de GSH son significativamente más altos en la fase G₂/M que en G₁, lo que sugiere que las células en G₂/M presentan un estado más reducido que las que están en G₁; la fase S tendría unos valores intermedios (Conour *et al.*, 2004). Poco después se demostró que la distribución intracelular de GSH variaba a lo largo del crecimiento

de cultivos de fibroblastos 3T3. Así, la mayor parte del GSH se concentra en el núcleo en las fases tempranas del crecimiento del cultivo, cuando la mayoría de las células participan activamente en su división, redistribuyéndose de manera uniforme entre el núcleo y el citoplasma cuando las células alcanzan la confluencia (Markovic *et al.*, 2007; 2009). La adición de NAC, utilizada habitualmente como antioxidante de tioles, inhibe la proliferación en células embrionarias MEFs, células estrelladas hepáticas y células musculares lisas (Kim *et al.*, 2001; Menon *et al.*, 2003; Kyaw *et al.*, 2004) presumiblemente por su acción reductora, si bien un estudio posterior ha apuntado que su efecto sobre el ciclo celular podría estar mediada por la generación de superóxido, que hace disminuir los niveles de la ciclina D1 (Menon *et al.*, 2008). Se ha confirmado que la detención del crecimiento de fibroblastos cuando alcanzan la confluencia (lo que se denomina inhibición por contacto) se debe, al menos en parte, a un descenso de los niveles intracelulares de ROS en equilibrio. De hecho, cuando se tratan cultivos dispersos con el agente reductor ditioneitol (DTT) se detiene la proliferación y cuando se añade H₂O₂ en cultivos confluentes se estimula el crecimiento, a pesar del contacto entre las células (Pani *et al.*, 2000). Resultados idénticos se dan en células precursoras de neuronas, que muestran sus niveles más altos de ROS intracelulares cuando se encuentran a baja densidad, es decir, cuando el cultivo puede crecer (Limoli *et al.*, 2004).

El acúmulo de datos que verifican una estrecha relación entre estado redox celular y ciclo ha llevado incluso a desarrollar un “modelo redox de proliferación celular” (*RMCP, Redox Model of Cell Proliferation*) en el que se enfatiza el papel del cambio en los valores del potencial redox intracelular, medido según la expresión de Nernst señalada anteriormente, en la regulación del ciclo celular (Hoffman *et al.*, 2008). Es muy interesante el hecho de que esta relación entre el estado redox y el crecimiento no sea exclusiva de células de mamíferos. Las levaduras de fisión presentan un ciclo redox metabólico que consta de una fase fermentativa reductora y una fase respiratoria oxidante en cada una de las cuales se expresan de forma diferencial los genes que regulan los distintos procesos metabólicos que las caracterizan. Muchos de los genes que controlan la replicación del ADN y el avance del ciclo celular se expresan durante la fase reductora (Klevecz *et al.*, 2004; Tu *et al.*, 2005), lo que coincide con los resultados obtenidos en mamíferos, que del mismo modo adquieren progresivamente un ambiente reductor durante las fases S y G₂/M del ciclo como ya hemos apuntado antes. También se ha descrito esta conexión en

Dictyostelium discoideum, uno de los organismos más simples con capacidad para formar estructuras pluricelulares. Cuando las condiciones son favorables, *D. discoideum* vive como una simple ameba pero en condiciones desfavorables genera O_2^- y forma agregados celulares (Bloomfield & Pears, 2003). Que uno de los eucariotas más primitivos que se conocen use este radical de oxígeno como mensajero en condiciones adversas sugiere que esta forma de señalización apareció muy temprano en la escala evolutiva, convirtiéndose en un elemento indispensable para el crecimiento y desarrollo de todos los organismos eucariotas.

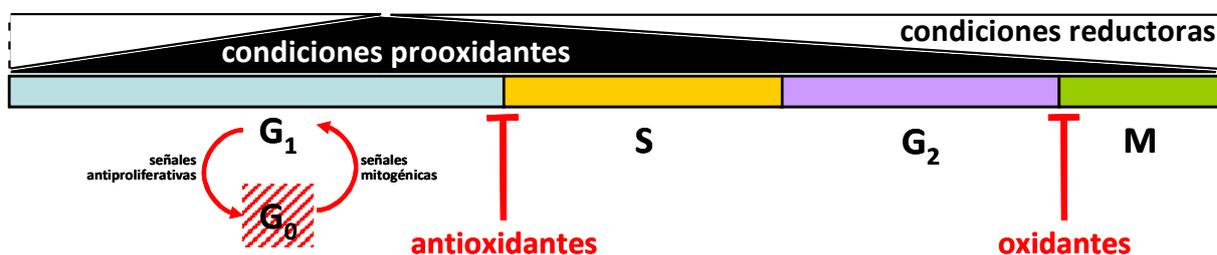


Figura 6. Ilustración esquemática del control redox del ciclo celular. Se ha descrito que a lo largo de la fase G₁ se adquiere un estado prooxidante debido a la generación de ROS por el metabolismo celular, la interacción receptor-ligando de factores de crecimiento y otras fuentes exógenas. Este cambio transitorio del balance redox intracelular hacia un ambiente prooxidativo podría modificar el estado redox de proteínas reguladoras del ciclo celular que determinan el avance G₁/S. De hecho, la presencia de antioxidantes como N-acetilcisteína bloquea a las células en la fase G₁ del ciclo. Conforme se avanza por la fase S, G₂ y M el balance redox tiende hacia condiciones más reductoras. Si esa situación se alterara por la presencia de oxidantes, el cambio en el estado redox induce la detención del ciclo.

Resumiendo, numerosos trabajos demuestran que las células en fase de crecimiento presentan un estado redox más reducido mientras que las que no se dividen o están diferenciadas tienen un estado más oxidante. Además, se observan diferencias entre las distintas fases por las que transcurre la división celular, con niveles más oxidantes en G₁ y más reducidos en G₂/M (Figura 6).

3. Estado rédox celular y proteínas reguladoras del ciclo celular.

La presencia de motivos sensibles al estado rédox en proteínas reguladoras del ciclo celular indica que las oscilaciones periódicas en el balance rédox a las que hemos hecho referencia antes pueden jugar un papel fundamental en el paso por las distintas fases de la división celular. Hay, por tanto, una íntima relación entre los procesos que controlan el estado rédox celular y los procesos que regulan el ciclo celular. Como acertadamente dicen Menon y Goswami (2007), *a redox cycle within the cell cycle*.

Los mecanismos que dirigen la división de la célula son regulados por complejas redes de proteínas. Si una o varias de las proteínas requeridas para alguno de estos, como las del metabolismo de los nucleótidos, fueran sensibles al estado rédox, cualquier fluctuación en el balance rédox intracelular tendría consecuencias inmediatas (en el ejemplo citado podría disminuir la disponibilidad de nucleótidos y reducirse la síntesis de ADN con la consiguiente detención de las células en la fase S del ciclo). Un interesante estudio que combina técnicas *in vitro* y herramientas bioinformáticas ha analizado la presencia de mecanismos rédox en la división de la célula (Conour *et al.*, 2004). Para ello han seleccionado motivos de proteínas que podrían estar regulados por el balance rédox celular (les llaman motivos rédox, *redox motifs*) usando la base de datos de proteínas InterPro (IPR) y el programa Sequence Retrieval System (SRS), disponible en la página web del EBI (European Bioinformatics Institute, <http://www.ebi.ac.uk>). Los motivos rédox elegidos se agruparon en seis categorías basándose en elementos estructurales (secuencias de aminoácidos sensibles a los cambios del balance rédox) o en la capacidad para unirse a cofactores que alternan estados oxidados y reducidos (Figura 7): 1) presencia de cisteínas en el sitio activo; 2) posibilidad de formación de puentes disulfuro; 3) transporte de electrones mediante flavina; 4) presencia de grupo hemo y 5) dominios capaces de unirse a un metal como zinc o hierro. Aplicando estos criterios de búsqueda a la base de datos se encontraron 92 proteínas cuya relación con el ciclo celular ya había sido demostrada (la información complementaria del artículo se encuentra disponible en la página web con libre acceso: <http://physiolgenomics.physiology.org/cgi/content/full/00058.2004/DC1>). De ellas tres

cuartas partes (69 proteínas) estaban implicadas directamente en la transcripción, el metabolismo de nucleótidos y en procesos de fosforilación/desfosforilación o de ubiquitinación/desubiquitinación, todos ellos esenciales para el desarrollo de la división celular. El 20% de las 92 proteínas presentaban una función relacionada con la fase G₁, un 10% con la fase S y el 50% con G₂/M. La abundancia y la diversidad de funciones de las proteínas seleccionadas sugieren que numerosos aspectos del ciclo celular pueden ser sensibles al estado redox de modo que cualquier cambio en este balance afectaría a su evolución de diversas formas. Como los propios autores señalan, hace falta ahora comprobar empíricamente si cada una de las proteínas susceptibles de ser reguladas por el estado redox celular realmente se comporta así. De hecho, un 24% del total (22 de 92 proteínas candidatas) ya habían sido descritas en trabajos anteriores como proteínas sensibles al balance redox implicadas en el ciclo celular (por ejemplo, algunas subunidades de la ribonucleótido reductasa, la ubiquitina ligasas Mdm-2 o las fosfatasas Cdc25B y Cdc25C).

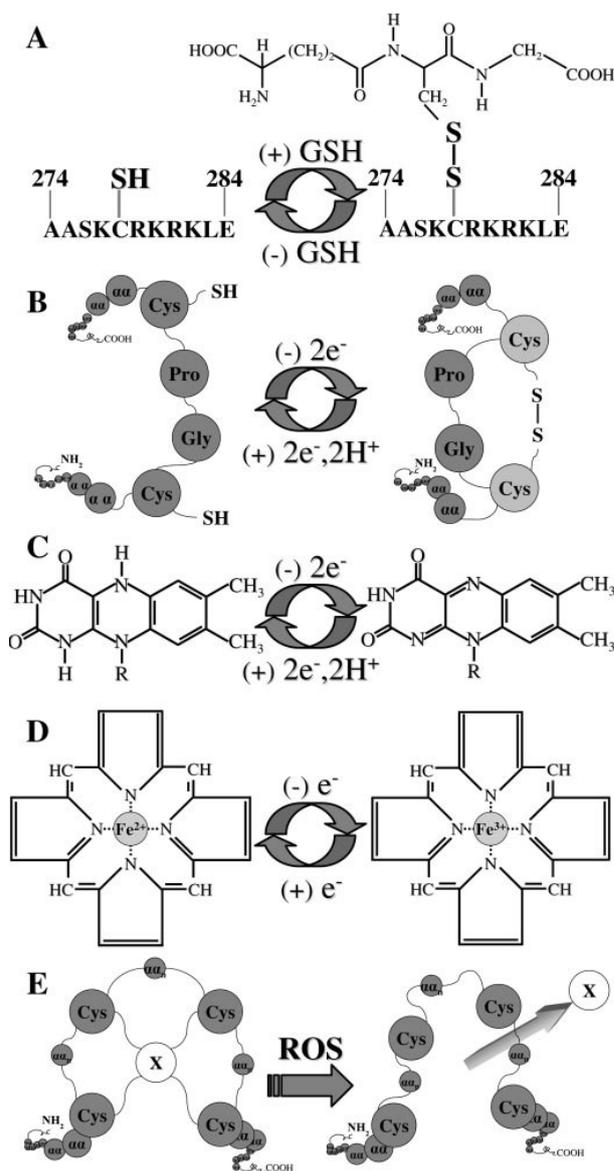


Figura 7. Representación esquemática de los motivos característicos de proteínas reguladas por el estado redox (motivos redox). (A) Sitio activo de unión de la cisteína e implicación del glutatión. (B) Formación de un enlace disulfuro dentro de un dominio tiorredoxina. (C) Sistema de transporte de electrones de una flavina en su forma reducida y oxidada. (D) Formas reducida y oxidada de un hemo. (E) Estructura general de un dominio de unión de metales donde "X" puede ser cualquier metal, incluido Zn²⁺. (Figura tomada de Conour *et al.*, 2004).

Tras la estimulación mitogénica, las primeras ciclinas activadas en G₁ son las de tipo D, que se asocian con CDK4 o CDK6. Se ha demostrado que los niveles de expresión de las ciclinas están condicionados por el estado redox celular. Así, la exposición de cultivos de fibroblastos HER14 a H₂O₂ produce la acumulación de ciclinas tipo D por la inhibición temporal de los procesos de ubiquitinación o de la actividad del proteosoma, ambos encargados de la degradación de las ciclinas (Martínez Muñoz *et al.*, 2001). Por el contrario, niveles subletales (100-500 μM) de H₂O₂ en fibroblastos NIH-3T3 hacen disminuir la expresión de las ciclinas D, aumentan los de p21 y provocan la consiguiente detención del ciclo en G₁ (Barnouin *et al.*, 2002). Se ha descrito que las modificaciones redox de la propia ciclina D1 regulan sus niveles de expresión ya que contiene dos sitios de fosforilación (Thr286 y Trh288) que controlan su degradación por el proteosoma (Diehl *et al.*, 1998; Zou *et al.*, 2004) y que podrían quedar expuestos a las quinasas correspondientes gracias a los cambios conformacionales provocados por la oxidación o reducción de un residuo de cisteína en la posición 285 (Menon *et al.*, 2007). Como las ciclinas regulan positivamente las actividades de las CDKs cabe esperar que los cambios redox de los niveles de la ciclina D1 afecten a CDK4/6. Por último, se sabe que la región promotora del gen de la ciclina D1 presenta sitios de unión para factores de transcripción sensibles al estado redox celular como NF-κB (Linz *et al.*, 1999) o Sp1 (Ammendola *et al.*, 1994).

Una vez ensamblado el complejo formado por la ciclina D y la quinasa CDK4/6 se lleva a cabo la fosforilación de la proteína pRB, lo que permite la transición a la fase S. El tratamiento de fibroblastos con *N*-acetilcisteína induce la hipofosforilación de pRB y la detención en G₁ (Menon *et al.*, 2003). Hoffman y colaboradores asignan un lugar particularmente importante a pRB en su “modelo redox de la proliferación celular” al que ya hemos hecho referencia en un apartado anterior (Hoffman *et al.*, 2008). Según este modelo, habría un valor umbral del potencial redox intracelular, que estiman en 207 ± 11 mV, por encima del cual algunas proteínas reguladoras del ciclo, como pRB, serían desfosforiladas. Las células con un potencial redox superior al umbral estarían en G₀ o G₁ mientras que durante el resto del ciclo tendrían un valor inferior al umbral. Anteriormente habíamos señalado la existencia de unas condiciones más oxidantes en G₁ y más reductoras en G₂/M (Hutter *et al.*, 1997; Menon *et al.*, 2003; Conour *et al.*, 2004). En el ciclo celular existiría, por tanto, una especie de “interruptor redox” (*redox switch*)

que contribuye a su regulación mediante la fosforilación/desfosforilación de proteínas como pRb (Hoffman *et al.*, 2008).

La fosforilación de pRB permite la liberación del factor de transcripción E2F haciendo posible la expresión de genes requeridos para entrar en la fase S del ciclo celular, entre ellos los de la ciclina E. No se ha determinado aún si las ciclinas E, como las D, se afectan por las fluctuaciones en el estado redox intracelular (Menon & Goswami, 2007). La sobreexpresión de E2F produce el incremento de los niveles de ROS, se asocia con la inactivación de NF- κ B y de MnSOD e induce apoptosis (Tanaka *et al.*, 2002). Estos resultados de nuevo sostienen la idea de que existe un umbral en los niveles de ROS que condiciona su función: concentraciones inferiores al umbral son estimulantes del crecimiento mientras que concentraciones superiores son deletéreas. Aún más, estos resultados también sugieren que podría haber un mecanismo de retroalimentación que une estrechamente a las proteínas reguladoras del ciclo y las enzimas con actividad antioxidante y que contribuye al mantenimiento de unas condiciones redox idóneas para la proliferación. Dando un paso adelante más, al ser MnSOD una proteína destoxicante de las ROS de origen mitocondrial, la relación E2F/NF- κ B/MnSOD sugiere que la regulación de los niveles de ROS mitocondriales podría influir en las proteínas que controlan el ciclo celular y viceversa, determinando el avance en las distintas fases del ciclo o la detención inmediata de un proceso tan delicado (Menon & Goswami, 2007).

La proteína supresora de tumores p53 es un factor que regula la transcripción de numerosos genes como respuesta a diversas situaciones de estrés, induciendo a la célula a detener su división, a la senescencia o a la apoptosis. De esta manera, p53 impide que se replique el ADN y desempeña una tarea fundamental en el mantenimiento de la integridad genómica, lo que explica que esta proteína aparezca mutada en la mayoría de los tipos de cáncer. Está claro que la modulación de los niveles intracelulares de ROS en las células es determinante para el control de su desarrollo. No sorprende que p53, por su papel clave como proteína supresora de tumores, mantenga una estrecha relación con el estado redox de la célula. Habitualmente se destaca que p53 estimula la transcripción de genes cuyos productos generan ROS (p. e. prolina oxidasa, BAX, PUMA, p66^{Shc} así como genes que activan la respiración mitocondrial, que es la principal fuente de ROS en la célula) de modo que esta acción contribuye a la ejecución de la muerte celular

mediada por p53. Sin embargo, hay que añadir que otros genes cuya expresión también está controlada por p53 codifican para proteínas con funciones claramente antioxidantes como las sestrinas (una familia de proteínas que contribuyen a eliminar H_2O_2), la glutatión peroxidasa 1 (GPX1), la superóxido dismutasa mitocondrial, o alguna forma de la aldehído deshidrogenasa como la ALDH4A1 (Sablina *et al.*, 2005). Esta función antioxidante de p53 resulta sorprendente pues siempre se ha destacado el potencial prooxidante de este supresor de tumores como su principal arma para desempeñar su función. El papel antioxidante de p53 contribuye a reducir la probabilidad de alteraciones genéticas de modo que, visto de esta manera, no se aparta de su actividad supresora de tumores. Esta dualidad en la acción de p53 parece estar condicionada por sus niveles de expresión y su localización subcelular. En condiciones basales, p53 contribuiría a la prevención de daños genéticos por su acción antioxidante mientras que su sobreexpresión ante distintas formas de estrés conllevaría una acción prooxidante (Liu *et al.*, 2008; Bensaad & Bousden, 2007). Hay que señalar, asimismo, que la expresión de p53 es regulada por los niveles celulares de ROS y que la propia proteína en sí presenta sitios redox activos (por ejemplo, residuos de cisteínas en las posiciones 124, 135, 141, 182, y 277 así como un sitio de unión a Zn^{2+}). Otros parámetros, como el tipo celular, la causa del estrés o la intensidad del estímulo deben ser tenidos en cuenta a la hora de entender el resultado de la interacción entre p53 y las ROS (Liu *et al.*, 2008).

Ya en la fase G_2 del ciclo, la ciclina A entra en acción asociándose a la quinasa CDK1 permitiendo que la célula entre en mitosis. La progresión por la fase M requiere a su vez la actividad de un complejo ciclina B/CDK1 específico de esta fase. Se ha demostrado que CDK1 fosforila e inhibe la actividad de la peroxirredoxina I provocando una acumulación de H_2O_2 que parece ser necesaria para la transición de G_2 a M (Chang *et al.*, 2002). Otra proteína decisiva para el punto de regulación de G_2 y para la reparación del ADN es la topoisomerasa II α (Topo II α). Se ha comprobado que su expresión está regulada en el ciclo celular por medio de la estabilidad de su ARNm. En concreto, una proteína dependiente del estado redox se une de manera específica a una secuencia de la región 3' no traducida del transcrito de la Topo II α (Goswami *et al.*, 2000).

Mientras que los complejos ciclina-CDK actúan como reguladores positivos del ciclo celular, encontramos también una regulación negativa llevada a cabo por

los inhibidores de las CDK o CKI (*CDK inhibitor*). Los CKIs juegan un papel fundamental en la formación y en la actividad de los complejos ciclina-CDK pero no se conoce con profundidad su posible regulación redox. Sin embargo, entre los CKIs encontramos uno que, como demuestran una gran cantidad de estudios, realiza un papel fundamental en la interacción entre el ciclo redox y el ciclo celular. Se trata de p21 (WAF1/Cip1). En células HCT116 de carcinoma de colon humano, las ROS producidas por el metabolismo de aziridinilquinonas induce la expresión de p21 (Qiu *et al.*, 1996). El tratamiento de células HeLa y fibroblastos humanos con dietilmaleato (DEM), un agente que elimina glutatión, induce la expresión de p21 (Russo *et al.*, 1995; Esposito *et al.*, 1997). En NIH-3T3, dosis subletales de H₂O₂ inducen su detención en G₁ asociada con un incremento en la expresión de p21 (Barnouin *et al.*, 2002). La sobreexpresión de p21 provoca senescencia en diversos tipos celulares, si bien este proceso puede inhibirse con antioxidantes (Macip *et al.*, 2002). La sobreexpresión de MnSOD altera los niveles de p21 en fibroblastos humanos (Sarsour *et al.*, 2005). En células HeLa deficientes en la función mitocondrial (HeLa ρ^0) se ha demostrado que la ausencia de la cadena respiratoria, considerada la mayor fuente celular de ROS, ralentiza uniformemente el avance de cada una de las fases del ciclo y, por tanto, de la proliferación en general. Este efecto se debe a la alteración en los niveles de expresión de diversas proteínas implicadas en el ciclo celular, con p21 desempeñando un papel fundamental (Schauen *et al.*, 2006).

En conjunto, todos estos estudios sugieren que la expresión de p21 es sensible tanto a elementos antioxidantes como prooxidantes, lo que indica que el balance redox condiciona el mantenimiento de unos niveles apropiados de p21 durante el ciclo celular. Aunque no se conoce el mecanismo del control redox de los CKIs se piensa que podría estar mediado por una proteína sensible al estado redox que se une a la región 3'-no traducida de los ARNm de los CKIs, regulando su traducción y su vida media, como ya vimos para la Topo II α (Goswami *et al.*, 2000; Menon *et al.*, 2007).

Cdc25 es una familia de fosfatasa que actúan sobre las CDKs y activan los complejos ciclina-CDK. Como todas las tirosín fosfatasa, las Cdc25 presentan residuos de cisteína en sus sitios activos. Estudios *in vitro* con fosfatasa Cdc25 purificadas demuestran que su actividad enzimática requiere la presencia de un agente reductor como DTT (Dunphy & Kumagai, 1991). Dado el carácter reactivo

intrínseco de las cisteínas y el hecho de que su forma oxidada sulfónica Cys-SOH es enzimáticamente inactiva cabría pensar que los miembros de esta familia están regulados por el estado redox intracelular (Sohn & Rudolph, 2003). Se ha comprobado en células HeLa que la exposición a H_2O_2 altera la función de Cdc25C porque provoca la formación de un puente disulfuro en la proteína, induciendo su unión a 14-3-3 y su posterior degradación (Savitsky & Finkel, 2002).

Para terminar este apartado haremos una breve referencia a una proteína esencial para que la célula pueda dividirse: la ribonucleótido reductasa (RNR). Esta enzima es la responsable de la síntesis de los cuatro desoxirribonucleótido trifosfatos (dNTPs) necesarios para la síntesis y reparación del ADN. Para ello sustituye el grupo 2'-OH de un ribonucleósido difosfato o trifosfato por un átomo de hidrógeno. Para realizar su función catalítica la RNR la presenta un aminoácido en forma de radical estable. Así, la RNR de mamíferos tiene un radical tirosilo en la posición 222 junto a dos átomos de hierro (Norlund & Reichard, 2006). Se ha descrito que la ribonucleótido reductasa es muy sensible a las condiciones de estrés oxidativo. Así, los radicales $O_2^{\cdot -}$ destruyen de manera muy eficiente e irreversible el radical tirosilo que la enzima forma para desempeñar su función catalítica. Este dato es muy interesante porque hay muy pocos ejemplos de acciones directas del superóxido sobre una diana biológica lo que podría explicar su toxicidad y la necesidad de la superóxido dismutasa en los organismos aerobios (Fontecave M, 1998).

Durante la fase S del ciclo celular las células precisan de una gran cantidad de dNTPs para replicar su material genético. Los niveles de RNR en las células de mamíferos están, por tanto, estrechamente ligados a los mecanismos de control del ciclo celular. Los niveles de expresión y de actividad de las dos subunidades, R1 y R2, que constituyen la proteína presentan sus niveles máximos en la fase S. En humanos y ratones se ha descubierto un segundo tipo de subunidad R2 denominada p53R2. Como su mismo nombre indica, esta subunidad se induce por p53 por lo que se ha sugerido que p53R2 es fundamental para suministrar los dNTPs durante la reparación del ADN en fases del ciclo en las que la RNR normal no funciona. La vinculación entre el avance del ciclo celular, p53, la expresión de las distintas subunidades de la RNR y la sensibilidad de su función catalítica al superóxido forman un tema muy interesante para el estudio del papel del estado redox celular

en la regulación de la expresión y de la actividad de esta proteína (Kolberg *et al.*, 2004; Norlund & Reichard, 2006).

Tercera parte.

ENZIMAS ANTIOXIDANTES y CICLO CELULAR.

Si existen mecanismos que relacionan el estado redox celular con el avance del ciclo celular habría que considerar que los niveles de los sistemas antioxidantes estén también regulados para permitir las condiciones redox más idóneas para cada una de las fases del ciclo. No debemos olvidar que el estado redox celular es consecuencia del balance entre elementos oxidantes (fundamentalmente ROS) y otros elementos reductores/antioxidantes (como GSH o la enzima catalasa) (Figura 2). El predominio de los componentes de un tipo u otro dará lugar a un estado más oxidante o más reductor, que actúa como señal para iniciar unos procesos y detener otros. En el apartado anterior nos hemos detenido en algunas proteínas que participan en la regulación del ciclo celular y cuya dependencia del balance redox celular ha sido demostrada. Nos vamos a centrar ahora en las defensas antioxidantes por su determinante papel en la regulación de los niveles de ROS celulares y, por tanto, en el balance redox.

1. Superóxido dismutasa.

Sin lugar a dudas, la enzima antioxidante en la que más se ha estudiado su modulación coordinada con las diversas etapas del ciclo celular es la superóxido dismutasa (SOD), que cataliza la conversión de $O_2^{\cdot -}$ a H_2O_2 ; posteriormente el peróxido será eliminado bien por la catalasa bien por enzimas de la familia de la glutatión peroxidasa usando GSH.



Se conocen tres isoformas humanas de SOD: CuZnSOD (SOD1), MnSOD (SOD2) y ECSOD (SOD3). El descubrimiento de estas enzimas dio lugar a la teoría de la toxicidad del oxígeno (*the superoxide theory of oxygen toxicity*) que propone que el superóxido es el principal factor de la toxicidad del oxígeno y que las SODs

son una defensa esencial frente a él que ha permitido la vida aerobia (Fridovich I, 1995). Sin embargo, en contra de esta teoría se encuentra el hecho de que existen organismos anaerobios con SOD y aerobios sin ella (Halliwell & Gutteridge, 1999).

La isoforma MnSOD (SOD2) se localiza en la matriz mitocondrial. La presencia de Mn en el sitio activo es imprescindible para que la enzima funcione y no puede ser sustituido por ningún otro ion. En fibroblastos NIH-3T3 se ha comprobado un descenso en los niveles de actividad MnSOD durante la fase S respecto a G₀; curiosamente esto no ocurre con otras enzimas antioxidantes como la catalasa, la glutatión peroxidasa o la isoforma CuZnSOD. En ese mismo trabajo se observa que dos líneas celulares que tienen la capacidad de inhibir su crecimiento por contacto muestran niveles de SOD más altos cuando la proliferación se detiene mientras que otras dos líneas que carecen de este tipo de inhibición tampoco incrementan los niveles de SOD (Oberley *et al.*, 1995). Investigaciones realizadas con MEFs demuestran que el descenso de la actividad MnSOD (y, por tanto, el incremento en los niveles de ROS de origen mitocondrial) induce la expresión de las ciclinas D1 y B1, favoreciendo el crecimiento de las células; por el contrario, un aumento en la actividad MnSOD hace decrecer los niveles de la ciclina B1 y facilita el paso de los fibroblastos a una situación de quiescencia (Sarsour *et al.*, 2008). Según los autores, estos resultados confirman la hipótesis de que la actividad MnSOD regula cierto “interruptor-ROS” mitocondrial que activa la proliferación regulada por O₂⁻ o la quiescencia regulada por H₂O₂. Puesto que la mitocondria es la principal fuente de ROS celulares y que la MnSOD es una enzima antioxidante localizada en la matriz mitocondrial es posible que los oxidantes de origen mitocondrial funcionen como señales que regulan el ciclo celular, como ya hemos sugerido en un apartado anterior (Sarsour *et al.*, 2008). Es muy interesante, además, que la sobreexpresión de MnSOD inhiba el crecimiento de células tumorales de páncreas y de próstata (Ridnour *et al.*, 2004; Ough *et al.*, 2004; Venakataraman *et al.*, 2005)

Antes hacíamos referencia a la importancia que la actividad SOD podría tener para que la vida aerobia sea posible. Este supuesto se confirma al comprobar que la ausencia total de MnSOD en ratones (Sod2 ^{-/-}) provoca su muerte en los primeros 24 días de vida por neurodegeneración. Estos ratones muestran, además, cuatro veces más daños en el ADN (medidos como 8-OH-guanina, 8-OH-adenina y 5-OH-

citocina) que los ratones normales así como una mayor sensibilidad a la hiperoxia (Lebovitz *et al.*, 1996).

La isoforma CuZnSOD (SOD1) está prácticamente en todas las células eucariotas. En células animales se localiza principalmente en el citosol pero también la encontramos en lisosomas, peroxisomas y en el espacio intermembrana mitocondrial (Okado-Matsumoto & Fridovich, 2001; Sturtz *et al.*, 2001). Esta última localización es de considerable importancia biológica porque la cadena de transporte electrónico mitocondrial puede liberar superóxido a este compartimento (Muller *et al.*, 2004). Se ha descubierto que esta enzima requiere la modificación oxidativa de varios tioles de su estructura para ser activada (Iñarra *et al.*, 2005). Los ratones Sod1 *-/-* tienen niveles muy altos de estrés oxidativo y presentan prematuramente patologías relacionadas con el envejecimiento. Así, los niveles de F₂-isoprostanos en plasma, que indican peroxidación lipídica, son el doble o el triple respecto a los de ratones normales. De hecho, estos niveles en plasma de isoprostanos no inducidos son los más altos que se han registrado en ratones *knockout* para cualquier antioxidante (Muller *et al.*, 2007).

Además de las SODs citosólica y mitocondrial existe una tercera enzima, aunque menos abundante que las primeras, denominada ECSOD (SOD3). Se localiza en el espacio extracelular y aparece en suero y, sobre todo, en pulmón. Los ratones Sod3 *-/-* son viables, fértiles y no muestran una menor esperanza de vida. Sin embargo, se ha observado que son más sensibles a la hiperoxia que los ratones normales (Sentman *et al.*, 2006).

2. Catalasa.

La dismutación de O₂⁻ genera H₂O₂, una especie reactiva de oxígeno que también producen algunas oxidasas. Ya hemos señalado anteriormente que la **catalasa**, junto con las peroxidasas, es la enzima encargada de eliminar H₂O₂ en la célula formando agua y oxígeno molecular:



Se encuentra en todos los tejidos animales aunque la actividad puede variar mucho de unos tipos celulares a otros; los niveles máximos se encuentran en el hígado. Respecto a su localización subcelular, la catalasa aparece siempre en los peroxisomas, donde precisamente encontramos la mayor parte de las enzimas que generan H_2O_2 (como la glicolato oxidasa o las deshidrogenasas implicadas en la β oxidación de los ácidos grasos (Halliwell & Gutteridge, 1999)). De manera excepcional se ha señalado la presencia de catalasa en la matriz mitocondrial de corazón de rata (Radi *et al.*, 1991).

Se sabe que la sobreexpresión de catalasa inhibe la proliferación de las células de la musculatura lisa vascular e induce la apoptosis lo que indica que el H_2O_2 no sólo participa en el crecimiento de estas células sino también en su supervivencia (Brown *et al.*, 1999). Como ocurre en otras enzimas antioxidantes, los niveles de catalasa están relacionados con la densidad del cultivo celular. Así, su expresión es más alta en hepatocitos y en HeLa confluentes que en condiciones de baja densidad (Röhrdanz & Kahl, 1998; Bello *et al.*, 2001).

Los ratones homocigóticos *knockout Cat -/-* muestran un desarrollo normal y son capaces de eliminar H_2O_2 a pesar de la carencia de actividad catalasa, supuestamente gracias a otros sistemas antioxidantes celulares. De hecho, estos ratones no son más sensibles que los normales a los daños oxidativos en hígado, pulmón y cristalino aunque se apreciaron diferencias significativas en la alteración de la función mitocondrial tras lesiones corticales (Ho *et al.*, 2004).

3. Glutación peroxidasa.

La familia de las glutatión peroxidasas (GPX) es un grupo de enzimas que eliminan H_2O_2 reduciéndolo a H_2O y oxidando GSH:

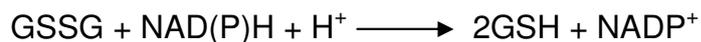


Estas enzimas están constituidas por cuatro subunidades proteicas. En cada una de las subunidades hay un átomo de selenio en el sitio activo en forma de selenocisteína. Las GPXs están distribuidas en todos los tejidos animales y usan específicamente GSH como donador de electrones. Pueden actuar también frente a

hidroperóxidos de ácidos grasos e hidroperóxidos sintéticos; en estos casos el peróxido se reduce siempre a un alcohol:



La relación GSH/GSSG en las células normales es alta por lo que debe existir un mecanismo que reduzca de nuevo GSSG a GSH. Esta conversión la realiza la enzima **glutati6n reductasa**, que cataliza la reacci6n:



La glutati6n peroxidasa 1 (GPX1) es abundante en casi todos los tejidos de mamíferos. Sorprende que su ausencia total en ratones *knockout* *Gpx1*^{-/-} no produzca un cambio radical en el fenotipo. El único signo patol6gico importante descrito es que estos ratones desarrollan cataratas mucho antes que los normales. Adem6s, son m6s sensibles al paraquat y al diquat pero no a la hiperoxia (Muller *et al.*, 2007). Por otra parte, la sobreexpresi6n de la glutati6n peroxidasa 4 inhibe el paso de la fase G₁ a S del ciclo celular lo que sugiere la implicaci6n de la señalizaci6n mediada por peroxidaci6n lipídica en el ciclo celular (Wang *et al.*, 2003).

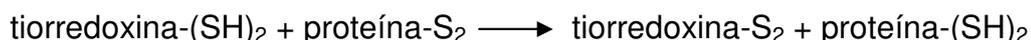
Aunque la atenci6n se centra en las enzimas antioxidantes principales (SOD, catalasa y GPx) nos encontramos cada vez con m6s informaci6n sobre otras enzimas que tambi6n intervienen, aunque en menor medida, en el mantenimiento del balance r6dox celular, lo que demuestra la complejidad y la importancia de este sistema.

4. Otras proteínas antioxidantes.

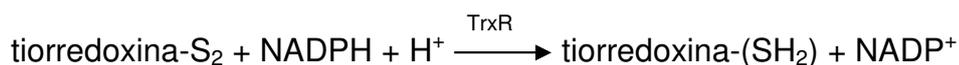
Adem6s de todos los mecanismos descritos anteriormente podemos señalar la existencia de otras defensas antioxidantes igualmente importantes para el equilibrio r6dox celular.

En primer lugar destaca el **sistema tiorredoxina**, que est6 constituido por la tiorredoxina (Trx), la tiorredoxina reductasa (TrxR) y NADPH, juega un papel esencial en el mantenimiento de estado r6dox de los tioles en las proteínas de la

célula (Arnér & Holmgren, 2006). La tioredoxina es un polipéptido de unos 12 KDa que se encuentra tanto en procariontes como en eucariotes. Aparece ampliamente distribuido en células de mamífero concentrándose sobre todo en el retículo endoplasmático, aunque aparece también en menor medida en la superficie celular (Halliwell & Gutteridge, 1999). La tioredoxina tiene dos cisteínas en su sitio activo con sendos grupos –SH en su forma reducida que pasan a formar un disulfuro cuando la tioredoxina se oxida. De esta manera puede reaccionar con numerosas proteínas:



Las tioredoxina reductasas de mamíferos son flavoproteínas con sitio activo que presenta una selenocisteína que interviene en la reducción de la tioredoxina y que posteriormente es reducida, a su vez, por NADPH.



Actualmente hay un gran interés por conocer con profundidad este sistema antioxidante ya que se ha comprobado que tanto la tioredoxina como su reductasa presentan niveles muy altos en diversos tipos de cáncer humanos (Urig & Becker, 2006). Se ha comprobado que la eliminación de Trx2, de localización exclusivamente mitocondrial, en células B de pollo produce un incremento de las ROS, la salida de citocromo *c* al citoplasma y apoptosis (Tanaka *et al.*, 2002). De hecho, los ratones *trx2* *-/-* mueren durante el desarrollo embrionario por apoptosis masiva (Nonn *et al.*, 2003). Del mismo modo, la ausencia genética de las isoformas 1 ó 2 de la tioredoxina reductasa resulta letal en ratones (Conrad *et al.*, 2004; Jakupoglu *et al.*, 2005).

Existen diversos trabajos que, además, relacionan de manera directa o indirecta el sistema de la tioredoxina con el ciclo celular. Así, se sabe que la tioredoxina reducida puede promover la proliferación, inhibir la apoptosis y proteger a la célula frente al estrés oxidativo (Powis & Montfor, 2001). También se ha demostrado que la tioredoxina reductasa es capaz de rescatar embriones detenidos en mitosis en la etapa de dos células. La adición de tioredoxina bajo esas

condiciones incrementa la actividad CDK, lo que sugiere que la tioredoxina podría regular la actividad Cdc25C (Natsuyama *et al.*, 1993; Savitsky & Finkel, 2002).

Además del sistema de las tioredoxinas tenemos que citar por su creciente importancia a las **peroxirredoxinas (Prxs)**, la mayoría de las cuales son tioredoxinas peroxidasa (por tanto, el grupo de las peroxidasa estaría constituido por la catalasa, la glutatión peroxidasa y las peroxirredoxinas). Los sustratos de estas enzimas son H₂O₂, peróxidos orgánicos y peroxinitrito. En el genoma se han localizado seis peroxirredoxinas (Wood *et al.*, 2003). Se han conseguido ratones *knockout* para alguna de las peroxirredoxinas que han permitido estudiar el papel de estas proteínas en la fisiología celular. La peroxirredoxina 1 (PRX1) es una tioredoxina peroxidasa especialmente abundante en eritrocitos aunque se encuentra también en la mayoría de los tejidos. Los ratones que no expresan esta enzima (Prx1 *-/-*) presentan anemia hemolítica y un incremento en la incidencia de cáncer. Además, muestran mayor daño oxidativo tanto en ADN como en proteínas (Neumann *et al.*, 2003). La peroxirredoxina 2 también aparece en casi todos los tejidos estudiados y de nuevo es especialmente abundante en eritrocitos. Los ratones deficientes en la expresión de esta peroxirredoxina (Prx2 *-/-*), además de sufrir anemia hemolítica, envejecen antes que los normales. Los deficientes en la peroxirredoxina 6 (Prx6 *-/-*) son especialmente sensibles a la hiperoxia y a la administración de paraquat. Los ratones deficientes en catalasa o glutatión peroxidasa, consideradas las principales enzimas encargadas de eliminar H₂O₂ en la célula, no desarrollan anemia ni las otras patologías observadas en ratones Prx1 *-/-* y Prx2 *-/-* sugiriendo que las peroxirredoxinas son potencialmente más decisivas en la protección frente al peróxido de lo que inicialmente se pensaba. Quizá su localización celular y su abundancia explique en parte por qué su ausencia es más deletérea que la pérdida de enzimas potencialmente más importantes (Wood *et al.*, 2003; Muller *et al.*, 2007).

Para terminar esta breve reseña sobre las peroxirredoxinas vamos a subrayar algún aspecto sobre la regulación de su actividad que las relaciona con el ciclo celular. Se ha descubierto que la actividad peroxirredoxina es regulada mediante fosforilación. Así, la fosforilación de la PRX1 y PRX2 provoca un descenso de sus actividades en un 80%. Lo interesante es que dicha fosforilación la realizan quinasas dependientes de ciclinas (CDK2, CDK4 y CDK6) (Bartosz G, 2009) por lo que nos

encontramos ante un ejemplo más de la interrelación entre las proteínas que regulan el avance del ciclo celular y proteínas que participan en el balance redox.

La **NADH-citocromo b_5 reductasa** (Cyt b_5 R) es una enzima integral de membrana localizada principalmente en el retículo endoplasmático y en la membrana mitocondrial externa, aunque una pequeña parte está en la membrana plasmática. Se han descrito asimismo formas solubles en eritrocitos. Las funciones clásicas atribuidas a esta enzima son la desaturación y elongación de ácidos grasos, la biosíntesis de colesterol, el metabolismo de drogas y la reducción de metahemoglobina en eritrocitos (Halliwell & Gutteridge, 1999). Otra función nueva pero no menos interesante que se ha descubierto de la Cyt b_5 R es la regeneración de antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos como, por ejemplo, ascorbato o vitamina E (Shirabe *et al.*, 1995; Constantinescu *et al.*, 1994). Además, la Cyt b_5 R de la membrana plasmática puede actuar como una quinona reductasa capaz de reducir ubiquinona *in situ* o en liposomas reconstituidos (Villalba *et al.*, 1997). Realiza, por tanto, un papel antioxidante nada desdeñable protegiendo básicamente a las membranas de la peroxidación lipídica.

Nuestro grupo ha demostrado que los niveles de Cyt b_5 R son significativamente más altos cuando las células HeLa de adenocarcinoma alcanzan la confluencia que cuando están dispersas (Bello *et al.*, 2003a). Este resultado concuerda con otro realizado en células HepG2 de hepatoma (Doostdar *et al.*, 1990). Algunos datos apuntan a la intervención del H₂O₂ endógeno en la regulación de la expresión de Cyt b_5 R en HeLa (Bello *et al.*, 2003a).

La **metionina sulfóxido reductasa** (MsrA), que también forma parte del sistema antioxidante celular, cataliza la reducción de los formas oxidadas de metionina (sulfóxidos de metionina) tanto libres como formando parte de las proteínas a las correspondientes metioninas. Para ello usa la tiorredoxina como donadora de electrones. Distintas isoformas de estas proteínas se han localizado en citoplasma, núcleo, mitocondria y retículo endoplasmático (Hansel *et al.*, 2002; Kim & Gladyshev, 2004). La sobreexpresión de MsrA aumenta la esperanza de vida en moscas y levaduras. En ratones, su delección (*msrA* $-/-$) acorta la duración de la vida en un 40% e incrementa la sensibilidad a la hiperoxia (revisado en Muller & Van Remmen, 2007). Curiosamente esta enzima aparece en la lista de proteínas cuyos

niveles están potencialmente coordinados con el ciclo celular, aunque no hay aún demostración empírica de esta relación (Conour *et al.*, 2004).

Los estudios de organismos *knockouts* para los diversos sistemas de enzimas antioxidantes pueden ser muy útiles para comprobar si un aumento en las condiciones de estrés oxidativo conlleva un descenso en la esperanza de vida. Por otro lado, la sobreexpresión de enzimas antioxidantes debería tener el efecto contrario, lo que demostraría no sólo que el estrés oxidativo limita la esperanza de vida sino que podría ser el principal factor que determina la longevidad. Sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento no son concluyentes porque, aunque en cultivos celulares la sobreexpresión de enzimas antioxidantes protege frente al estrés oxidativo, esta relación no es tan clara cuando se habla de organismos completos (revisado en Muller *et al.*, 2007). Por ejemplo, las comparaciones entre distintas especies de mamíferos revelan que, aunque ciertamente la esperanza de vida y los daños oxidativos guardan entre sí una relación inversa, los niveles de enzimas antioxidantes son inesperadamente más bajos en las especies más longevas (de Grey A, 2000; Barja G, 2002) por lo que no deben sacarse conclusiones *a priori*.

Cuarta parte.

Quinona reductasas y ciclo celular

1. Quinonas y quinona reductasas.

Las quinonas son un grupo de compuestos naturales ampliamente distribuidos en bacterias, hongos, plantas y animales. Aparecen también formando complejos aromáticos policíclicos tras la quema de combustibles fósiles o en el humo del tabaco (revisado en O'Brien PJ, 1991). Las quinonas reductasas pueden ser clasificadas en dos categorías según sus mecanismos de reducción de quinonas (revisado en Deller *et al.*, 2008) (Figura 8):

a) Quinona reductasas de un solo electrón.

Transfieren un electrón a la quinona por lo que se origina una especie intermedia radical denominada semiquinona; posteriormente pueden completar la reducción hasta hidroquinona transfiriendo otro electrón. Además de las quinona reductasas mitocondriales, se han descrito dos proteínas integrales de membrana que emplean este mecanismo: la NADH-citocromo b_5 reductasa (Cyt b_5 R, a la que ya hemos referencia anteriormente) y la NADPH-citocromo P450 reductasa.

La inestabilidad del radical semiquinona hace que reaccione fácilmente con oxígeno molecular regenerándose la quinona original pero produciendo superóxido. A continuación la quinona puede ser de nuevo reducida a radical semiquinona y repetirse el ciclo de manera ininterrumpida, lo que se denomina reciclado rédox.

b) Quinona reductasas de dos electrones.

Transfieren directamente dos electrones a la quinona reduciéndola completamente a hidroquinona y evitando la formación de la especie radical intermedia semiquinona y los procesos de reciclado rédox que hemos descrito antes. Además, las hidroquinonas pueden ser conjugadas con glutatión o ácido glucurónico y posteriormente excretadas.

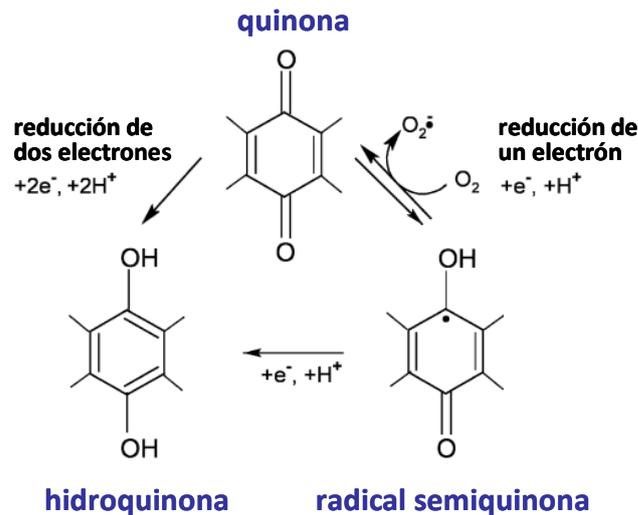


Figura 8. Mecanismos de acción de las quinona reductasas. La transferencia en un solo paso de dos electrones da lugar a la formación de hidroquinonas mientras que si la quinona se reduce con un único electrón se origina una forma intermedia radical denominada semiquinona.

2. Quinona reductasas de dos electrones: NQO1.

Las quinonas reductasas de dos electrones son siempre flavoproteínas y están presentes tanto en organismos eucariotas como procariontas, lo que demuestra la importancia biológica de las funciones que desempeñan. En un principio se les denominó DT-diaforasas para expresar el hecho de que pueden utilizar tanto DPNH (NADH) como TPNH (NADPH) como fuente de electrones (de ahí las letras DT delante de la palabra diaforasa). Con el tiempo, el término diaforasa se usó de manera generalizada para describir a cualquier enzima, principalmente una flavoproteína, capaz de transferir electrones desde piridín nucleótidos reducidos a un aceptor de electrones. La confusión terminológica hizo que dejara de usarse esta terminología. Así, la primera DT-diaforasa, descrita por Ernster y Navazio en 1958 (Ernster & Lavazio, 1958), pasó a llamarse NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1 (NQO tipo 1, NQO1, EC 1.6.99.2).

NQO1 realiza su función catalítica reductora mediante un mecanismo tipo ping-pong (Figura 9). En un primer paso, NAD(P)H se une a NQO1 para formar un complejo NQO1-NAD(P)H. A continuación, la molécula de FAD es reducida por NAD(P)H para formar FADH₂. La salida de NAD(P)⁺ del sitio catalítico permite la

unión del sustrato, la transferencia de electrones del FADH₂ al sustrato y la liberación del producto reducido (Li *et al.*, 1995).

2.1. Características y expresión del gen *NQO1*.

El gen *NQO1* humano, localizado en el cromosoma 16q22.1, tiene una longitud de 20 kb y consta de seis exones y cinco intrones. Diversos experimentos de mutagénesis dirigida han permitido identificar hasta tres elementos *cis* dentro de la región promotora de este gen que son necesarios para su expresión basal e inducción: el elemento de respuesta antioxidante ARE (*antioxidant response element*), el elemento de respuesta a xenobióticos XRE (*xenobiotic responsive element*) y un elemento AP-2 requerido para la inducción por AMPc. El ARE es necesario para la expresión basal de *NQO1* así como para su inducción por diversos tipos de compuestos. Se ha observado inducción de la expresión de *NQO1* mediada por ARE en situaciones de estrés oxidativo, en respuesta a distintos xenobióticos, radiaciones ultravioleta e ionizantes y en hipoxia. Entre los factores de transcripción que se unen al elemento ARE y regulan la expresión de *NQO1* encontramos a c-Jun, Jun-B, Jun-D, c-Fos, Fra1, Nrf1 y Nrf2. El más importante de todos es Nrf2 (*NF-E2-related factor*), cuya ausencia en ratones *knockout* Nrf2 *-/-* hace que la expresión e inducción de *NQO1* descienda significativamente. En condiciones normales, Keap1/Inrf2 retiene a Nrf2 en el citoplasma. La exposición de las células a oxidantes hace que Nrf2 se libere de Keap1/Inrf2 y se dirija al núcleo, donde activa la expresión de genes dependientes de ARE como *NQO1* (revisado en Jaiswal, 2000). Se ha descrito la participación negativa del factor de transcripción nuclear Bach1 en la regulación de los genes dependientes de ARE. Parece que la expresión de *NQO1* está determinada por el balance entre el factor positivo Nrf2 y Bach1, que actuaría como represor, de modo que ambos compiten por regular la expresión génica mediada por ARE (Dhakshinamoorthy *et al.*, 2005).

Se ha señalado la existencia de al menos tres transcritos distintos del ARN mensajero de *NQO1* de 2,7, 1,7 y 1,2 Kb debido a que el gen *nqo1* presenta sitios alternativos de poliadenilación (Jaiswal *et al.*, 1988). En líneas celulares de cáncer humano se ha identificado un cuarto transcrito más pequeño que los anteriores (1,1 kb) producto del *splicing* alternativo. Este transcrito truncado codifica para una proteína que no tendría el exón 4, en el que se encuentra el sitio de unión de la

quinona. Aunque la proteína truncada ha podido ser expresada en *E. coli* no se ha encontrado en humanos por lo que parece el ARN mensajero que sufre el *splicing* alternativo no llega a traducirse (Gasdaska *et al.*, 1995). Estos datos ha llevado a sugerir que el *splicing* alternativo puede ser un mecanismo de control de la expresión de NQO1 en humanos y que la proporción constitutiva entre los transcritos completos y el transcrito corto producto del *splicing* es aproximadamente 90:10 (Pan *et al.*, 2002).

Los niveles de expresión de NQO1 en diferentes líneas celulares, tanto normales como tumorales, están estrechamente relacionados con la densidad celular (ya hemos señalado este aspecto en otras proteínas antioxidantes como la catalasa y la citocromo *b*₅ reductasa). Así, en células 3T3 se ha descrito un aumento en la actividad NQO1 conforme las células alcanzan la confluencia (Schlager *et al.*, 1993). Nuestro grupo ha demostrado que en células HeLa el incremento de la densidad celular también se acompaña de un incremento paralelo en los niveles de NQO1; este aumento en la expresión de la proteína mejora la viabilidad de las células en confluencia y parece depender de la producción endógena de H₂O₂ (Bello *et al.*, 2001). También hemos comprobado que en células HepG2, por el contrario, el aumento en la densidad celular induce una menor expresión de NQO1 (Córdoba-Pedregosa *et al.*, 2006). Otro estudio muestra que el aumento en la densidad de los cultivos de células osteoblásticas se acompaña de una mayor actividad NQO1 sin que se produzca el correspondiente aumento en los niveles de ARNm, lo que sugiere que el aumento en la actividad está regulado por modificaciones post-traduccionales (Collin *et al.*, 2001).

2.2. Características estructurales de la proteína NQO1.

El producto del gen *NQO1* es una enzima de 274 residuos. Se ha determinado la estructura cristalina de la proteína NQO1 de tres mamíferos: rata (PDB 1D4A), humano (PDB 1D4A) y ratón (PDB 1DXQ) así como las estructuras de complejos NQO1-sustrato con distintos agentes quimioterapéuticos como duroquinona (PDB 1DXO, Faig *et al.*, 2000), RH1 (PDB 1H66), EO9 (1GG5) y ARH019 (1H69) (Faig *et al.*, 2001) e inhibidores más o menos específicos de NQO1 como dicumarol (PDB 2F1O, Asher *et al.*, 2006, Figura 10), ES936 (PDB 1KBQ, Winski *et al.*, 2001; Figura 10) o Cibacron Blue (PDB 1QRD, Li *et al.*, 1995).

La unidad fisiológica funcional de NQO1 es un homodímero muy estable gracias a los numerosos contactos entre ambos monómeros (hasta 265 contactos menores de 4 Å). Cada monómero está compuesto por dos dominios: un dominio grande catalítico de 220 residuos tipo flavodoxina y otro pequeño C-terminal de 50 residuos. Cada monómero presenta en su dominio catalítico una molécula de FAD unida no covalentemente (Figura 10). Las interacciones entre el FAD y la proteína se dan fundamentalmente con uno de los dominios catalíticos del dímero y son lo suficientemente fuertes como para evitar que el FAD abandone la proteína en condiciones normales. El sitio catalítico se encuentra en una cavidad situada en la interfase del dímero. Una cara de la isoaloxazina de la molécula de FAD de uno de los monómeros forma un lado del sitio catalítico mientras que el otro lado está constituido por residuos del dominio catalítico del otro monómero. La forma y tamaño del sitio catalítico permiten la acomodación de los compuestos anillados tal y como precisan las enzimas que metabolizan una gran variedad de sustratos. El sitio catalítico es una cavidad de unos 360 Å en cuya base destacan un residuo de triptófano y otro de fenilalanina (Trp 105 y Phe 106). Por encima de la molécula de FAD, dos residuos del lado opuesto del otro dominio catalítico (Tyr 126' y Tyr 128') forman el techo de la cavidad y establecen interacciones polares con los sustratos. El acceso al sitio catalítico está limitado por cuatro residuos (Gly 149, Gly 150, His 194 y Pro 68). Un residuo His 161 desempeña un papel fundamental en el mecanismo catalítico de la enzima. Por último destaca la Tyr 128, que actúa a modo de puerta abriendo y cerrando el acceso al sitio catalítico para proteger el anillo de isoaloxacina del FAD de posibles interacciones con el oxígeno molecular. Se ha propuesto que la reducción obligada de dos electrones llevada a cabo por NQO1 ocurre mediante un mecanismo tipo ping-pong que constaría de dos transferencias directas de hidruro (Figura 9): una desde el donador de electrones NAD(P)H al FAD y la otra del FAD reducido (FADH₂) al sustrato aceptor de electrones. Como se ha comprobado en la estructura cristalina de NQO1, el donador y el aceptor de electrones comparten el mismo sitio en la enzima de modo que la unión del sustrato aceptor no puede tener lugar si no se libera antes la forma oxidada NAD(P)⁺. Estudios realizados mediante mutagénesis dirigida han permitido comprobar la importancia real de los residuos que intervienen en el mecanismo catalítico de NQO1 y en la unión de los cofactores y sustratos. Curiosamente, ninguna de las mutaciones individuales estudiadas tiene grandes efectos sobre la actividad de NQO1. Esto puede explicarse por la transferencia directa de hidruros entre la flavina,

el NAD(P)H y la quinona de modo que, en realidad, la proteína se encarga de que las moléculas que reaccionan estén bien colocadas y de minimizar los efectos negativos de la separación de cargas. Hay muchos residuos en la enzima que cooperan en el desempeño de estas dos funciones. El resultado neto es que la enzima muestra una gran redundancia y que las mutaciones puntuales (salvo las que afectan a la histidina de la posición 161) influyen poco en la actividad catalítica (revisado en Bianchet *et al.*, 2004).

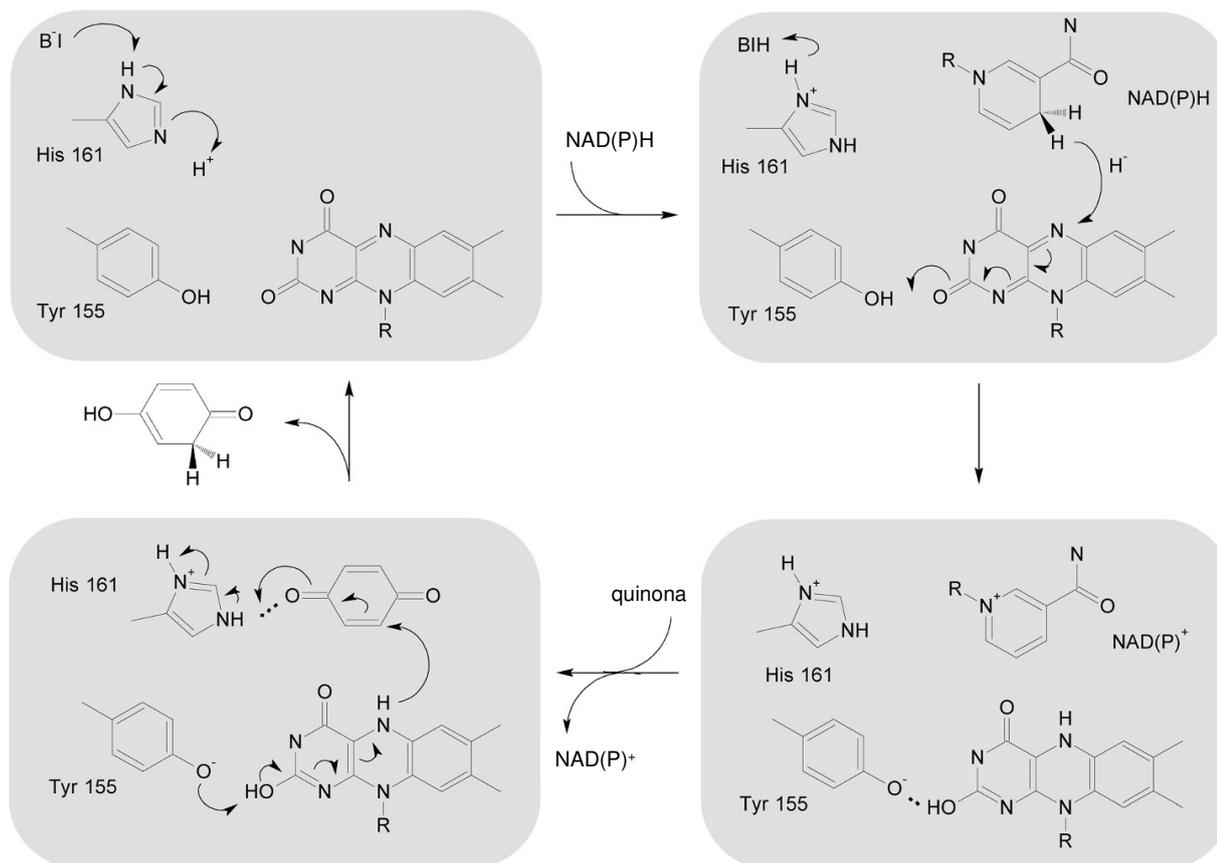


Figura 9. Mecanismo de reacción de NQO1 en humanos. Se ha sugerido que el proceso de reducción del sustrato ocurre mediante la transferencia directa de dos hidruros: uno desde el donador de electrones (un derivado reducido de la nicotinamida, NADH o NADPH) al cofactor flavínico (FAD o FMN) y otro desde la flavina reducida al aceptador de electrones (quinona), para formar la hidroquinona correspondiente. Esta transferencia sigue un mecanismo tipo ping-pong. Figura tomada de Deller *et al.*, 2008).

El estudio de la estructura tridimensional de NQO1 ligada a diversos sustratos ha permitido comprobar que el sitio de unión a la enzima presenta una gran plasticidad y que se modifica para acomodar su interacción con los distintos sustratos: quinonas antitumorales (Faig *et al.*, 2001) o los inhibidores dicumarol y ES936 (Asher *et al.*, 2006). Esta plasticidad, además, permite que NQO1 pueda

interaccionar con una gran variedad de sustratos quinónicos entre los que se incluyen moléculas de diversos tamaños como benzoquinona, menadiona, mitomicina C o estreptonigrina, lo cual es una ventaja a la hora de diseñar compuestos quimioterapéuticos susceptibles de ser bioactivados por NQO1 (Faig *et al.*, 2000).

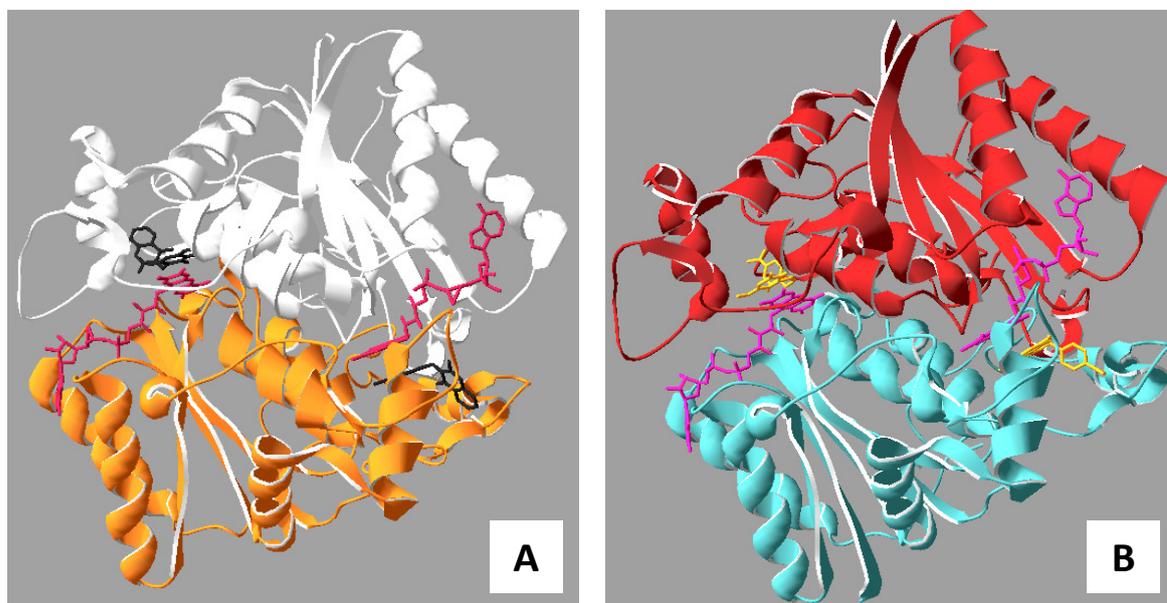


Figura 10. Representación tridimensional de la estructura de NQO1 unida a sus dos inhibidores mejor descritos. (A) NQO1 unida a dicumarol (PDB 2F1O, Asher *et al.*, 2006). Los monómeros presentan color blanco y naranja. Además se distinguen las moléculas de FAD (rosa) y de dicumarol (negro) en el sitio catalítico de la enzima. (B) NQO1 unida a ES936 (PDB 1KBQ, Winski *et al.*, 2001). Monómeros de color rojo y azul, FAD (rosa) y ES936 (amarillo) en el sitio catalítico. Para realizar las figuras se ha utilizado el programa Swiss PDB-Viewer v4.0 (<http://spdbv.vital-it.ch/>).

2.3. Distribución intracelular de NQO1.

Aunque NQO1 es una proteína fundamentalmente citosólica se ha demostrado su presencia en el núcleo de células humanas tumorales HT29 de colon y H661 de pulmón usando microscopía confocal e inmunoelectrónica (Winski *et al.*, 2002) y, mediante *western-blot*, en células MMRU de melanoma humano transfectadas con un plásmido que contiene la proteína NQO1 (Garate *et al.*, 2008). Esta localización es muy interesante, como veremos más adelante, para la bioactivación por NQO1 de quinonas antitumorales diseñadas para inducir daños en el ADN. Sirva de ejemplo el incremento de la toxicidad del antitumoral mitomicina C tras sobreexpresar NQO1 en el núcleo de células de hámster (Seow *et al.*, 2004). Por su tamaño (diámetro de 60-70 nm) y peso molecular (unos 61 KDa en su forma

dimérica), NQO1 no podría atravesar los complejos del poro nucleares por difusión pasiva de modo que debe ser transportada selectivamente. Las proteínas de localización nuclear presentan secuencias de aminoácidos específicas que dirigen su transporte a través del complejo del poro nuclear y que se denominan señales de localización nuclear; sin embargo, NQO1 no presenta estas señales. Los sitios de unión a la chaperona Hsp70 presentes en NQO1 podrían explicar esta localización puesto que se ha descrito que las chaperonas facilitan el paso de las proteínas a los distintos compartimentos celulares, incluido el núcleo (Winski *et al.*, 2002).

La posible presencia de NQO1 en los demás compartimentos celulares es más discutida. Por ejemplo, algunos grupos han detectado NQO1 en la mitocondria (Conover & Ernster, 1962; Segura-Aguilar *et al.*, 1994) pero otros no (Winski *et al.*, 2002), atribuyéndose estas diferencias a los procedimientos empleados para localizar NQO1. Las técnicas que aseguran una mayor integridad de los componentes celulares, como la microscopía confocal y la microscopía inmunoeléctrica, no han detectado NQO1 en la mitocondria. Este aspecto es muy interesante porque la función que desempeña una proteína está íntimamente relacionada con su distribución intracelular y viceversa. De hecho, en los primeros trabajos sobre NQO1 se apuntó que su localización era tanto citosólica como mitocondrial, lo que llevó a considerar su posible participación en la cadena respiratoria incluso por parte de algunos de los descubridores de la proteína (Conover & Ernster, 1962).

2.4. Polimorfismos de NQO1.

El estudio de diversos tumores humanos deficientes en actividad NQO1 llevó al descubrimiento de una mutación en el exón 6 del gen *NQO1*. La sustitución en la posición 609 de una timina en lugar de una citosina (C609T) origina que un residuo de prolina ocupe el sitio de una serina en la posición 187 del polipéptido (Traver *et al.*, 1992). Esta mutación ha sido caracterizada como un polimorfismo genético y se designa *NQO1*2*. Lo más interesante es que las líneas celulares y los tejidos de organismos genotipados como homocigóticos para *NQO1*2* no presentan actividad NQO1. Algunas líneas celulares humanas utilizadas habitualmente en investigación y homocigóticas *NQO1*2* son BE y Caco-2 de carcinoma de colon, MDA-MB-486 y

MDA-MB-231 de cáncer de mama y NCI-H1570 y NCI-H596 de cáncer de pulmón (revisado en Ross & Siegel, 2004).

La mutación no afecta ni a la transcripción ni a la traducción de *NQO1**2 por lo que el déficit de actividad se explicaría a nivel post-traducciona. De hecho, se ha comprobado que el polipéptido *NQO1**2 es degradado rápidamente por el proteosoma previa unión de moléculas de ubiquitina por lo que su vida media es muy corta (en torno a 1,2 horas). Parece que la sustitución de una prolina por una serina en la posición 187 induce importantes cambios conformacionales que podrían explicar esta inestabilidad (Traver *et al.*, 1992). Por otro lado, se ha señalado que la chaperona Hsp70 interacciona con las formas no maduras del polipéptido *NQO1* normal pero no con el polipéptido mutante *NQO1**2, lo que podría conducir a un plegamiento incorrecto y a la consiguiente ubiquitinación y degradación proteosoma (Anwar *et al.*, 2002).

La frecuencia alélica del polimorfismo *NQO1**2 es de 0,49 entre la población china, 0,46 entre los inuits (esquimales), 0,4 entre los indios nativos canadienses y 0,16 en los caucasionos. El genotipo homocigótico *NQO1**2/*2 que, como ya hemos dicho, es nulo en actividad *NQO1*, se da en el 22% de la población de Asia lo que explica sobradamente el interés por conocer con profundidad las consecuencias fisiológicas que la ausencia de *NQO1* tendría sobre esta población y que comentaremos más adelante cuando tratemos las funciones de *NQO1*. Por ejemplo, se ha comprobado que los individuos homocigóticos *NQO1**2 son más sensibles a los efectos hematotóxicos del benceno y muestran un mayor riesgo de padecer cáncer, especialmente leucemia (Rothman *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 2002; Ross & Siegel, 2004).

Por último, se ha caracterizado otro polimorfismo, *NQO1**3, en el que una citosina de la posición 465 es sustituida por timina (C465T) codificando para un residuo de triptófano en lugar de arginina. La proteína mutante, a diferencia de *NQO1**2, es tan estable como la normal pero presenta una actividad enzimática disminuida dependiendo del tipo de sustrato. Por ejemplo, la proteína recombinante *NQO1**3 reduce la menadiona igual que la normal pero su efectividad para metabolizar mitomicina C se reduce en un 60% (Pan *et al.*, 1995; 2002). La

frecuencia alélica del polimorfismo *NQO1**3 es muy baja: 0,05 en caucasianos, 0,04 en chinos y 0,01 en indios nativos canadienses (revisado en Ross & Siegel, 2004).

2.5. Funciones de NQO1.

Clásicamente las investigaciones del papel de NQO1 en la fisiología se han basado en el uso de compuestos descritos como inhibidores de esta proteína. La inhibición farmacológica se basaba, a veces sin tener pruebas definitivas de ello, en la especificidad del inhibidor, de manera que cualquier alteración en el comportamiento celular se ha atribuido directamente a la ausencia de la actividad NQO1. Numerosas sustancias han sido descritas como inhibidores de la actividad de esta proteína, fundamentalmente competidores de NAD(P)H por unirse al sitio activo de la enzima (Figura 11). De todos ellos el más potente es el dicumarol [3,3'-metileno-bis(4-hidroxicumarina)], usado desde los años 50 del pasado siglo como anticoagulante oral, con una K_i de 1-10 nM en ensayos *in vitro*. Otras cumarinas como la warfarina, usada como anticoagulante oral, o la esculetina (Garten & Wosilait, 1971), flavonas como la fenindiona, la crisina o el 7,8-dihydroxiflavona (Chen *et al.*, 1999), el colorante Cibacron Blue (Prochaska HJ, 1988) y la curcumina (Tsvetkov *et al.*, 2005), un compuesto fenólico natural usado como colorante alimenticio en el *curry*, también han sido descritos como inhibidores competitivos de NQO1 pero menos potentes que el dicumarol. En la década pasada se presentó a la indolquinona ES936 (5-metoxi-1,2-dimetil-3-[(4-nitrofenoxi)metil]indol-4,7-diona) como un inhibidor irreversible de NQO1 basado en el mecanismo (Winski *et al.*, 2001). La inhibición de NQO1 por ES936 es dependiente de NAD(P)H y conlleva la formación de un especie reactiva iminio que produce la alquilación de un residuo de tirosina del sitio activo de la proteína. Concentraciones de 100 nM de ES936 son suficientes para inhibir, en los primeros treinta minutos, más del 95% de la actividad NQO1 en diversas líneas celulares mantenidas en medio completo. Se señaló, en principio, que no inhibía a otras reductasas celulares y que no alteraba los niveles celulares de tioles solubles como GSH, aunque las dosis empleadas para inhibir la actividad enzimática fueran suficiente para producir roturas en la cadena de ADN (Dehn *et al.* 2003). Sin embargo, hay que subrayar que estudios más recientes demuestran que ES936 también actúa como inhibidor de la actividad tiorredoxina reductasa por lo que su acción citotóxica observada en células tumorales pancreáticas no puede ser atribuida directamente a la inhibición de NQO1 (Yan *et*

al., 2009). El estudio iniciado con el uso de los diversos inhibidores de NQO1 se ha reforzado y ampliado con el desarrollo de líneas celulares y organismos manipulados genéticamente para anular la expresión de esta proteína, como luego veremos con numerosos ejemplos.

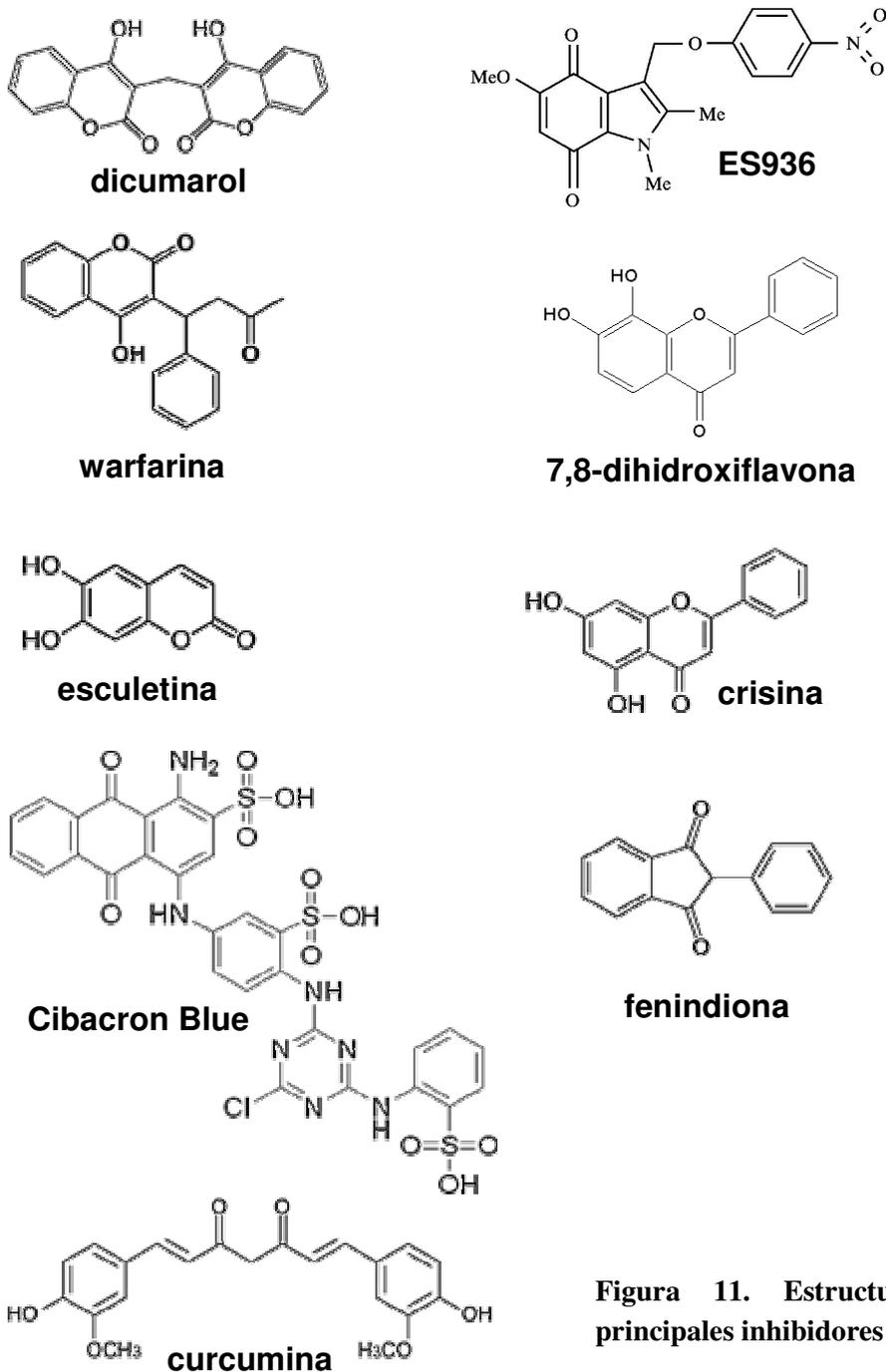


Figura 11. Estructuras de los principales inhibidores de NQO1.

Desde su descubrimiento hace ya medio siglo, NQO1 no ha dejado de sorprender por su versatilidad funcional, constituyendo un auténtico ejemplo de *economía* en la fisiología celular (Ross D, 2004; Dinkova-Kostova & Talalay, 2010). Su estudio es una clara invitación a no acotar *a priori* y de manera reduccionista las

posibilidades de una proteína en el complejo contexto celular. Las funciones descritas hasta el momento para NQO1 son las siguientes:

2.5.1. NQO1 como reductasa de quinonas.

Ya hemos señalado que la función descrita clásicamente para NQO1 es la reducción de quinonas a hidroquinonas mediante la transferencia de dos electrones y usando como cofactores indistintamente NADH o NADPH. De esta manera, NQO1 evita la toxicidad que representaría la generación de una especie semiquinona radical y, simultáneamente, interviene en la ratio $\text{NAD(P)}^+ / \text{NAD(P)H}$ intracelular.

La presencia de NQO1 protege frente al carácter citotóxico, mutagénico y carcinogénico de muchos compuestos quinónicos. Así, los ratones *knockout* NQO1 -/- presentan mayores índices de peroxidación lipídica y daños en el ADN que los ratones normales cuando son expuestos a menadiona (una quinona análoga a la vitamina K), al BPQ (benzo[a]pireno-3,6-quinona, un metabolito del benzo[a]pireno) o a la benzoquinona (un producto metabólico del benceno) (Joseph *et al.*, 2000). Estos ratones también son más propensos a desarrollar tumores de piel inducidos por DMBA (7,12-dimetilbenzantraceno) un mutágeno que se forma por la combustión incompleta de combustibles fósiles y que se usa frecuentemente en investigación como iniciador de carcinogénesis (Long *et al.*, 2001). La distribución tisular de NQO1 es coherente con su función detoxificadora. Así, en ratones, ratas y humanos NQO1 se localiza fundamentalmente en los epitelios y endotelios, lo que facilita que los compuestos que entran en el organismo se encuentren con esta enzima (Siegel & Ross, 2000).

2.5.2. NQO1 como enzima bioactivadora.

La reducción catalítica dirigida por la enzima NQO1 no siempre conlleva la eliminación del carácter nocivo de un determinado sustrato. Por el contrario, en ciertas ocasiones la forma completamente reducida de una quinona (hidroquinona) puede ser más deletérea que su forma oxidada. La detoxificación será realmente eficiente si facilita la excreción de la hidroquinona, bien porque aumenta su solubilidad en agua o porque facilita su conjugación con glucurónido o con sulfato.

Sin embargo, algunas hidroquinonas pueden autooxidarse y generar ROS o reorganizarse para producir especies reactivas arilantes (Cadenas E, 1995).

Se ha comprobado que diversos tumores sólidos humanos expresan elevados niveles de NQO1 por lo que se ha aprovechado la capacidad bioactivadora de esta enzima para probar diversos compuestos (pro-drogas) que se convierten en agentes citotóxicos tras ser reducidos. La sobreexpresión de NQO1 en las células tumorales permite que la acción tóxica del antitumoral se concentre en ellas y no en las células sanas, que expresan NQO1 en menor grado. De este modo se han probado clínicamente las propiedades de compuestos quinónicos potencialmente antitumorales como la mitomicina C, RH1 (una forma soluble en agua homóloga a la dimetilaziridinilbenzoquinona), EO9 y ARH109 (ambas aziridinilindoquinonas) (revisado en Alcaín & Villalba, 2007). La presencia de NQO1 en el núcleo de células cancerígenas añade un punto más de interés a su acción bioactivadora de antitumorales diseñados expresamente para dañar al ADN (Winski *et al.*, 2002).

2.5.3. NQO1 como enzima antioxidante.

Además de la activación y destoxificación de compuestos exógenos se ha descrito la participación de NQO1 en el metabolismo de antioxidantes como la ubiquinona (coenzima Q) o la vitamina E. Ambas moléculas presentan un larga cola hidrofóbica de modo que en su estado reducido protegen a las membranas celulares frente a la peroxidación lipídica. La reducción de la ubiquinona por NQO1 genera ubiquinol, un compuesto con excelentes propiedades antioxidantes. La vitamina E se oxida a su radical tocoferoxilo por la interacción con radicales libres. La forma antioxidante (tocoferol) puede ser regenerada por NQO1 de manera indirecta en un proceso dependiente de ubiquinona (Bello *et al.*, 2003b). Por otra parte se ha demostrado que la α -tocoferilquinona, molécula derivada de la oxidación del α -tocoferol, puede reducirse al compuesto antioxidante α -tocoferilhidroquinona, en una reacción catalizada por NQO1 (Siegel *et al.*, 1997).

2.5.4. NQO1 como *scavenger* de $O_2^{\cdot-}$.

Al estudiar *in vitro* la auto-oxidación de NQO1 se ha comprobado que la relación estequiométrica entre la oxidación de NADH y el consumo de O_2 es

aproximadamente de 1:1 y que esta auto-oxidación puede acelerarse en presencia de $O_2^{\cdot-}$ e inhibirse con la adición de SOD. Se ha propuesto que la auto-oxidación de NQO1 sigue el mismo patrón que la de las flavinas libres (Siegel *et al.*, 2004). Esto es posible porque el cofactor FAD no está unido covalentemente a NQO1 sino que se mantiene mediante puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals en un sitio activo que presenta una gran plasticidad (Faig *et al.*, 2000; Figura 12). En los ensayos *in vitro* se ha comprobado que la actividad *scavenger* de superóxido de NQO1 se detiene al añadir ES936, un inhibidor irreversible de NQO1 basado en el mecanismo, lo que demuestra que la actividad *scavenger* de $O_2^{\cdot-}$ depende de la actividad catalítica de NQO1 (Siegel *et al.*, 2004). Queda por verificar si esta nueva función de NQO1 ocurre *in vivo*. En cualquier caso, los datos cinéticos sugieren que la velocidad con que NQO1 elimina superóxido es poco menos de un orden de magnitud mayor que la dismutación química de $O_2^{\cdot-}$ y cuatro órdenes de magnitud menor que la de SOD (Siegel *et al.*, 2004). Por tanto, la actividad *scavenger* de NQO1 solamente será significativa en el supuesto de que su concentración intracelular sea muy elevada. Como NQO1 se induce en situaciones de estrés oxidativo, es posible que en esas condiciones su actividad como *scavenger* forme parte de la estrategia antioxidante celular.

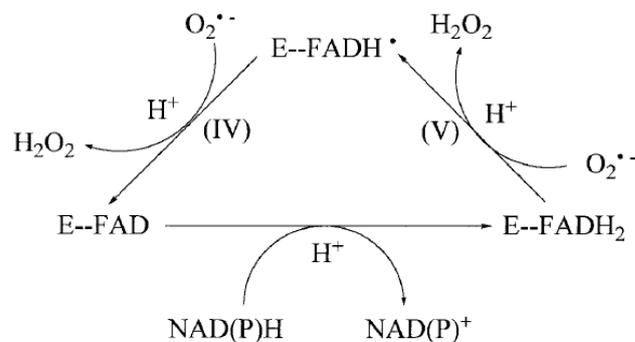


Figura 12. Mecanismo de reacción propuesto para explicar la función de NQO1 como *scavenger* de $O_2^{\cdot-}$. Figura tomada de Siegel *et al.*, 2004.

Aún no hay muchos trabajos sobre la importancia biológica real de este nuevo papel de NQO1. Se ha registrado actividad *scavenger* de NQO1 en extractos citosólicos de células cardiovasculares A10 y H9c2 de rata y HASMCs (*human aortic smooth muscle cells*) de humano tratadas con D3T (3H-1,2-ditiol-3-tiona), un compuesto que en estas células induce la expresión de NQO1 mucho más que la de SOD. Las líneas celulares utilizadas se caracterizan por presentar constitutivamente

niveles de SOD más bajos que otros tipos celulares por lo que la inducción quimioterapéutica de NQO1 puede ser muy interesante en la defensa frente a este radical libre (Zhu *et al.*, 2007).

2.5.5. Interacción de NQO1 con otras proteínas.

Durante los últimos años se han investigado nuevas funciones de NQO1 más allá de su carácter de enzima quinona reductasa. De este modo se ha descubierto que NQO1 se une a la proteína supresora de tumores p53 y la estabiliza. Esta unión se refuerza en presencia de NADH mientras que la adición de inhibidores de NQO1 induce la degradación proteosomal de p53 e inhibe la apoptosis dependiente de p53 (Asher *et al.*, 2001; revisado en Tsvetkov *et al.*, 2010). p53 es una proteína de vida corta y sus niveles celulares están controlados por su degradación en los proteosomas. Esta degradación es fundamentalmente regulada por la asociación de p53 con la ubiquitina ligasa Mdm-2, que permite la ubiquitinación de p53 y determina su eliminación por los proteosomas 26S (compuestos por un núcleo catalítico 20S y dos subunidades reguladoras 19S).

Lo realmente interesante es que NQO1 regula la degradación de p53 por una ruta diferente que no requiere la unión de Mdm-2 y que tiene lugar en los proteosomas 20S (que en realidad son los núcleos de los 26S) (Asher *et al.*, 2002). Experimentos desarrollados en células de carcinoma de colon humano que sobreexpresan NQO1 muestran niveles elevados de p53 respecto a las células parentales. Además, la supresión de NQO1 mediante silenciamiento génico con ARNi específico reduce los niveles basales de p53 (Asher *et al.*, 2002). NQO1 también participa en la acumulación de p53 tras la exposición a radiación γ o a agentes genotóxicos (Asher & Shaul, 2005; Iskander *et al.*, 2005). Del mismo modo, se ha descrito el papel de NQO1 en la acumulación de p53 en situaciones de estrés oxidativo. Así, el tratamiento con H_2O_2 induce más acumulación de p53 en las células que sobreexpresan NQO1 que en las células parentales a partir de las que han sido originadas (Asher *et al.*, 2002). La relación entre NQO1 y p53 sugiere que las reacciones rédox controladas por oxidorreductasas como NQO1 pueden ser un factor determinante en los niveles intracelulares de p53 y, por tanto, en el desarrollo de tumores. De hecho, p53 regula la transcripción del gen *pig3* (*p53-induced gene 3*) cuyo producto es una proteína con función antioxidante homóloga a las

oxidorreductasas, como ya veremos más adelante (Polyak *et al.*, 1997). Es muy interesante que Lot6, la proteína de levadura ortóloga a la NQO1 humana, esté físicamente asociada al proteosoma 20S y regule la estabilización del factor de transcripción Yap4. No se ha demostrado que Yap4 sea el precursor funcional de p53, pues, aunque ambos factores de transcripción están implicados en la respuesta celular frente al estrés oxidativo, presentan secuencias idénticas sólo en un 22,5%. Como las quinonas reductasas se han encontrado en un gran número de organismos eucariotas, desde levaduras hasta mamíferos, es posible que estas proteínas formen parte de un “sensor rédox” que regula la función del proteosoma 20S y la estabilidad de factores de transcripción cruciales para la respuesta celular al estrés oxidativo (Deller *et al.*, 2008; Sollner *et al.*, 2009).

El hecho de que NQO1 participe en la estabilización de p53, una proteína supresora de tumores, puede indicar una estrecha relación entre NQO1 y el desarrollo tumoral. En este sentido, se ha comprobado que los ratones *knockout* NQO1 $-/-$ y las personas que presentan la forma polimórfica no funcional de NQO1 (NQO1*2) son más susceptibles de sufrir tumorigénesis (Long *et al.*, 2000; Lafuente *et al.*, 2000). Es muy interesante el hecho de que las formas polimórficas NQO1*2, además de no realizar ninguna actividad catalítica, sean incapaces de estabilizar p53 (Asher *et al.*, 2002). No se ha determinado claramente si la predisposición a desarrollar cáncer se debe a la ausencia de actividad NQO1, con el consiguiente déficit en la respuesta antioxidante celular, o por la desestabilización de p53. Por ejemplo, se ha comprobado que NQO1*2 es un claro factor predictivo del cáncer de mama y que, dependiendo del tipo de tratamiento, el desarrollo de este cáncer es mucho más grave y letal en los portadores del polimorfismo que en las personas con la forma normal activa de NQO1 (Fagerholm *et al.*, 2008). Lo mismo se ha sugerido para el carcinoma hepatocelular, en el que la sobreexpresión del polimorfismo NQO1*2 puede ser un factor muy valioso para el pronóstico de la evolución de este tipo de cáncer (Chiu *et al.*, 2009). Hay que tener en cuenta, como ya hemos señalado anteriormente, que el 4% de los caucásicos y algo más del 20% de los asiáticos son homocigóticos para NQO1*2 (Ross & Siegel, 2004).

La interacción con p53 no es la única descrita para NQO1. Se sabe que regula exactamente del mismo modo la degradación de otros miembros de la familia p53 como p73 (Asher *et al.*, 2002) y p63 (descrita recientemente por Rokah *et al.*,

2010) y que se une a las proteínas Hsp70 y Hsp40. Hsp70 interacciona con la forma prematura de NQO1 muy probablemente para intervenir en el correcto plegamiento de la proteína. No se ha registrado esta interacción entre Hsp70 y la forma inactiva NQO1*2 por lo que cabría pensar que el inadecuado plegamiento de NQO1*2 da lugar a su rápida ubiquitinación y posterior degradación (Anwar *et al.*, 2002). Además, la interacción con las chaperonas Hsp podría explicar cómo NQO1 es transportada del citoplasma al núcleo (Winski *et al.*, 2002), como ya señalamos en un apartado anterior.

El uso de inhibidores de NQO1 ha permitido estudiar los detalles de la relación entre p53 y NQO1. El tratamiento con ES936, un inhibidor irreversible que bloquea la función catalítica de NQO1, no tiene ningún efecto sobre la estabilidad de p53 mediada por NQO1. Este resultado contrasta con el obtenido con dicumarol, que sí inhibe la unión de NQO1 a p53. Este contraste entre las acciones de ambos inhibidores se explica porque el dicumarol desplaza al cofactor NAD(P)H lo que provoca no sólo la inhibición de la actividad catalítica sino también su interacción con p53. La curcumina repite los mismos efectos que el dicumarol (Tsvetkov *et al.*, 2005). Por el contrario, ES936 inhibe la actividad NQO1 pero no desplaza a NAD(P)H y no altera la unión NQO1-p53. (Asher *et al.*, 2003). Estos resultados, junto con los obtenidos mediante co-inmunoprecipitación (Anwar *et al.*, 2003), confirman que entre p53 y NQO1 tiene lugar una interacción física que no requiere la actividad catalítica de NQO1 pero sí la presencia de NAD(P)H.

Hay que hacer referencia también al descubrimiento de la interacción de NQO1 con la proteína ornitina descarboxilasa (ODC) y con p33^{ING1b}. ODC es una enzima que cataliza la descarboxilación de la ornitina para formar putrescina, es la primera en la ruta biosintética de las poliaminas. Las poliaminas son esenciales para la proliferación celular y están implicadas también en la regulación de procesos celulares tan importantes como la diferenciación, la apoptosis o la transformación celular. Los niveles intracelulares de ODC así como su actividad están estrictamente controlados porque, aunque las poliaminas son imprescindibles para el crecimiento celular, en exceso producen citotoxicidad. De hecho, niveles elevados de ODC y de poliaminas son normales en células transformadas y tumorales (Pegg AE, 1988; Gerner *et al.*, 2004). Se había descrito la degradación de ODC inducida por antizima en el proteosoma 26S. Al igual que ocurre con p53 y su familia de proteínas, ODC

puede ser también degradada por los proteosomas 20S sin requerir la unión previa de ubiquitina. La interacción con NQO1 estabiliza a ODC y evita su degradación en los proteosomas 20S (Asher *et al.*, Mol Cel, 2005; Asher & Shaul, 2005). Por otro lado, se ha descrito la interacción entre NQO1 y p33^{ING1b}, una proteína presente en el núcleo que forma parte de la familia de supresores de tumores denominada ING (*inhibitor of growth family*). p33^{ING1b} presenta niveles mínimos de expresión en algunos carcinomas mientras que su sobreexpresión induce la detención del ciclo celular. Parece que esta proteína forma parte de la respuesta celular a distintas formas de estrés y que su expresión depende de p53 (Campos *et al.*, 2004). Como en los casos anteriores, NQO1 inhibe la degradación de p33^{ING1b} por el proteosoma 20S (Garate *et al.*, 2008). No puede pasar desapercibido el hecho de que p33^{ING1b} es una proteína estrictamente nuclear. NQO1 siempre ha sido considerada una proteína citosólica aunque algún trabajo anterior a este que estudia la interacción con p33^{ING1b} señala su presencia en el núcleo de células tumorales de colon y de pulmón (Winski *et al.*, 2002).

En conjunto, los estudios sobre las interacciones de NQO1 con otras proteínas han permitido comprender el papel de los proteosomas 20S en la degradación de diferentes proteínas de vida corta, como p53, p63, p73, p33^{ING1b} y ODC. La degradación por este proteosoma parece ser la vía degradativa por defecto de algunas proteínas de vida corta salvo que estén unidas a un agente *estabilizador* como NQO1 -se sabe que p21 también usa esta ruta y que su agente estabilizador es PCNA (Touitou *et al.*, 2001)-. Estos resultados muestran también que una misma proteína puede seguir diferentes procesos de degradación y que NQO1 desempeña funciones biológicas de gran interés más allá de su acción enzimática (Asher & Shaul, 2005).

Vistas en conjunto todas las funciones podemos señalar que NQO1 desempeña, a grandes rasgos, un triple papel en el metabolismo celular:

- 1) Por un lado, NQO1 participa en la defensa antioxidante celular: evita la formación de semiquinonas, regenera los niveles de vitamina E y de coenzima Q reducidos, regula los niveles de p53 (cuyo papel antioxidante hemos destacado más arriba) y actúa como *scavenger* de O₂^{•-}.

- 2) Al mismo tiempo, su capacidad bioactivadora de compuestos susceptibles de generar estrés oxidativo recuerda que no debe descuidarse su condición de enzima prooxidante (Cadenas E, 1995).
- 3) Finalmente la interacción directa de NQO1 con diversas proteínas y con la degradación mediada por los proteosomas 20S ha supuesto toda una revolución en la concepción tradicional de esta enzima, abriendo nuevas puertas que van más allá de su función catalítica.

3. Otras quinona reductasas.

3.1. NRH:quinona oxidoreductasa (NQO2)

Hace dos décadas se descubrió la similitud de la estructura de la NQO1 con la de otra enzima a la que se denominó NQO2 (Jaiswal *et al.*, 1990). Años más tarde se confirmó que la NQO2 había sido descrita ya en 1962 como una NRH:quinona oxidoreductasa (Liao *et al.*, 1962; Zhao *et al.*, 1997). Ambas quinona oxidoreductasas recibían el mismo número EC (1.6.99.2) pero para evitar confusiones se ha asignado a NQO2 el número EC 1.10.99.2, manteniéndose el anterior para NQO1. Del mismo modo, se ha sugerido nombrarla NRH:quinona oxidoreductasa o simplemente QR2 porque NQO2 es el nombre utilizado para una subunidad del Complejo I mitocondrial (Vella *et al.*, 2005).

El gen que codifica esta proteína se encuentra en el cromosoma 6p25 y es muy polimórfico. Sin embargo, la mayoría de los polimorfismos detectados se encuentran en los intrones o son mutaciones sin sentido que no alteran la secuencia de aminoácidos (Iskander *et al.*, 2007). Consta de siete exones, frente a los seis del gen *NQO1*, aunque el primero no es codificante. La proteína NQO2, que tiene 213 aminoácidos, es 43 residuos más corta que NQO1 en su extremo carboxilo, siendo sus secuencias de bases idénticas en un 54% mientras que las proteínas son similares en un 49%. El alineamiento de NQO1 y NQO2 tanto de humano como de ratón también ha revelado cuatro secuencias conservadas que se cree juegan un papel fundamental en la estructura y función de ambas proteínas. Este mismo

estudio ha revelado que NQO2 presenta sitios para glucosilación y miristilación además de sitios de reconocimiento de la proteína kinasa C y de la caseína kinasa II que no se encuentran en la secuencia de NQO1. (Long & Jaiswal, 2000). La estructura cristalina de NQO2 muestra que esta enzima tiene un sitio de unión de metales que no se encuentra en NQO1 aunque no se ha demostrado *in vivo* la presencia ni la función que dichos metales tendrían (Zhao *et al.*, 1997).

NQO1 y NQO2 presentan también diferencias en cuanto al uso de cofactores a pesar de que ambas llevan a cabo la reducción obligada de dos electrones fundamentalmente de compuestos quinónicos. Así, NQO2 utiliza preferentemente como donadores de electrones los derivados *N*-ribosil y *N*-metil de dihidronicotinamida reducida (NRH y NMH respectivamente) antes que NAD(P)H. NRH es un producto derivado de la degradación celular de NAD(P)H del que se desconocen otras funciones aparte de servir como donador de electrones exclusivamente para NQO2 (Zhao *et al.*, 1997; Iskander *et al.*, 2007). Otra diferencia entre ambas es que NQO2 no se afecta por inhibidores típicos de NQO1 como dicumarol, Cibacron blue o fenindiona. Las flavonas, como la quercetina o el crisoeriol, el benzo[*a*]pireno y el resveratrol sí actúan como inhibidores de NQO2. Curiosamente algunos antipalúdicos como la quinacrina y la cloroquina también inhiben la actividad NQO2 pero dependen notablemente del sustrato que se use para el ensayo enzimático. Aunque NQO1 y NQO2 presentan igual especificidad por algunos sustratos existen notables diferencias en cuanto a las afinidades. Por ejemplo, NQO2 es 11 veces más efectiva que NQO1 en la reducción de cuatro electrones del rojo de metilo y 3000 veces más rápida en la reducción de la nitrobenzamida citotóxica CB1954, que se usa como antitumoral. Se ha estudiado la expresión de NQO2 en diferentes órganos y tejidos humanos comprobándose grandes diferencias. Los niveles más altos de expresión se han encontrado en el músculo esquelético seguido del riñón, hígado, pulmón y corazón. Tanto el páncreas como el cerebro presentan valores mínimos (revisado en Long & Jaiswal, 2000). Es llamativo que NQO2 aparezca en eritrocitos y NQO1 no (Graves *et al.*, 2002). También se ha demostrado que NQO2, al igual que NQO1, interacciona con p53 y evita su degradación por el proteosoma 26S previa unión de ubiquitina (Gong *et al.*, 2007).

A diferencia de NQO1, hay muy pocos estudios sobre la inducción de la expresión de NQO2 lo que no permite aún sacar conclusiones bien fundamentadas. Como el gen *NQO2* tiene en su promotor una secuencia ARE, que ya vimos también presente en NQO1, se ha sugerido que NQO2 se induce de manera coordinada con el resto de enzimas detoxificantes de fase 2. Sin embargo, en células de hepatoblastoma humano el tratamiento con TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina) incrementó los niveles de transcritos de NQO1 pero no de NQO2 lo que pone en duda su inclusión en este grupo de enzimas (Jaiswal *et al.*, 1990).

El papel *in vivo* de NQO2 se va dilucidando poco a poco gracias a las investigaciones realizadas con ratones *knockout* NQO2 *-/-*. La pérdida de NQO2 no afectó ni a su desarrollo ni a su viabilidad. De hecho, no se distinguen de los normales ni de los heterocigotos NQO2 *-/+*. Es muy interesante que los niveles de NQO1 no se alteren en los ratones NQO2 *-/-* respecto a los normales lo que indica que la expresión de NQO1 no aumenta para compensar la falta de NQO2. Cuando se estudió la posible interacción entre NQO2 y p53 se comprobó que seguía los mismos patrones observados para NQO1, es decir, ambas NQO estabilizan p53 evitando su degradación por el proteosoma 20S, como ya se ha señalado antes. Tanto los ratones NQO1 *-/-* como los NQO2 *-/-* muestran niveles de p53 inferiores a los normales lo que demuestra que la ausencia de una de las dos quinona reductasas no induce una sobreexpresión compensatoria de la otra. Podría ocurrir que ambas formen heterodímeros en la unión con p53 o que interaccionen separadas pero simultáneamente. En cualquier caso, las dos son necesarias y su falta no puede suplirse (Gong *et al.*, 2007).

Los ratones NQO2 *-/-* muestran muchas características similares a las encontradas en los NQO1 *-/-*. Así, en ambos se observa hiperplasia mieloide en la médula ósea (Long *et al.*, 2002) y una mayor susceptibilidad a los efectos carcinogénicos del benzo[*a*]pireno y del 7,12-dimetilbenzoantraceno (DBMA) en la piel (Iskander *et al.*, 2004). La falta de inducción de p53, p21 y Bax en los dos tipos de *knockouts* podría explicar la mayor sensibilidad a estos carcinógenos. Por el contrario, el tratamiento con menadiona tiene efectos opuestos en los ratones NQO2 *-/-* y en los NQO1 *-/-*. Los ratones NQO2 *-/-* sufren menos la toxicidad de la menadiona que los NQO1 *-/-*, que presentan daño hepático por esta quinona, lo que

indica que NQO2 juega un papel decisivo en la activación metabólica de la menadiona y NQO1 en su detoxificación (Long *et al.*, 2002).

Se había comprobado que la delección del gen *NQO1* potencia la apoptosis inducida por el factor de necrosis tumoral (TNF, *tumor necrosis factor*) mediante un descenso en los niveles de los genes dependientes de NF- κ B. Al eliminar la expresión de NQO2 se observa exactamente el mismo resultado (Ahn *et al.*, 2007). La falta de NQO1 o de NQO2 en ratones produce alteraciones en la respuesta inmune humoral y una mayor susceptibilidad a las enfermedades autoinmunes. Se cree que las alteraciones del estado redox intracelular que conlleva la acumulación de NADH en los ratones NQO1 *-/-* y de NRH en los NQO2 *-/-* puede inducir cambios en algunos factores de transcripción sensibles como NF- κ B, en las quimioquinas y en los receptores de quimioquinas. Estas alteraciones modifican el comportamiento de las células B comprometiendo la respuesta inmune y la autoinmunidad (Iskander *et al.*, 2006). Estudios más recientes han demostrado la asociación de un polimorfismo en la región promotora del gen *NQO2* con una mayor susceptibilidad a sufrir cáncer de mama (Yu *et al.*, 2009) y que los ratones NQO2 *-/-* sometidos a radiación γ no aumentan sus niveles de p53 y Bax, manifestando un mayor riesgo de sufrir linfomas de células B que los ratones normales sometidos al mismo tratamiento (Iskander *et al.*, 2009).

Aunque cada vez son más numerosos los estudios sobre NQO2 quedan muchos interrogantes por resolver, especialmente sobre la función *in vivo* de esta proteína. Tal vez su estrecha relación con NQO1 ha orientado excesivamente la investigación de las funciones de NQO2. Actualmente hay varios frentes abiertos en el estudio de esta curiosa proteína que sugieren un papel múltiple en la fisiología celular, como ya vimos antes para NQO1. Destacamos tres funciones (revisadas en Vella *et al.*, 2005):

- 1) En primer lugar, en un estudio sistemático de los posibles sustratos quinónicos de NQO2 se ha descubierto su gran afinidad por el coenzima Q₀ y otros miembros de la familia de la ubiquinona por lo que se está analizando su intervención en la regulación de los niveles de estos compuestos.

- 2) Por otro lado, y de manera sorprendente, NQO2 consta de dos sitios diferentes de unión a la melatonina, una neurohormona producida de noche por la glándula pineal e implicada, entre otras cosas, en la regulación del ritmo circadiano. Se conocían con detalle dos receptores de esta neurohormona denominados MT1 y MT2 y, aunque se sospechaba la existencia de un tercero MT3, su identidad no había sido revelada. Diversos estudios han demostrado que MT3 es NQO2, de modo que se ha sugerido que la interacción de la melatonina con NQO2 podría explicar las propiedades antioxidantes atribuidas a esta hormona (Nosjean *et al.*, 2000).
- 3) Por último, NQO2 es una importante diana de diversas quinolinas usadas contra la malaria por lo que se está profundizando en el papel de esta proteína en el parásito *Plasmodium falciparum*.

3.2. La quinona reductasa ζ-cristalina

La proteína ζ-cristalina se clasifica como una quinona oxidorreductasa perteneciente a la superfamilia deshidrogenasa/reductasa de cadena media (MDR, *medium-chain dehydrogenase/reductase*), en la que no se incluyen ni a NQO1 ni a NQO2. Esta proteína presenta homología con una quinona oxidorreductasa de levadura denominada Ztap1, con la que comparte un 25% de identidad en su secuencia total de aminoácidos y un 80% de identidad en los residuos del sitio activo. Mediante inmunotinción se ha detectado la ζ-cristalina en el ojo, hígado y riñón de mamíferos. Hay diferentes estudios que resaltan diversas funciones para esta proteína -de nuevo la polivalencia funcional en una oxidorreductasa (revisado en Porté *et al.*, 2009)-. En el cristalino de los mamíferos desempeña una función estructural, de modo que su deficiencia se asocia con el desarrollo congénito de cataratas. Por otro lado, se ha demostrado *in vitro* que la ζ-cristalina reduce *orto*-quinonas usando como cofactor exclusivamente NADPH por lo que se ha sugerido tanto su papel como enzima detoxificadora como su carácter regulador de los niveles de NADPH en la célula. Finalmente se ha podido comprobar que la ζ-cristalina actúa como factor trans-activador al regular la estabilidad de algunos ARN mensajeros. Esto es posible porque la proteína es capaz de unirse a secuencias

ricas en adenina y uracilo presentes en el ARN (que se denominan ARE, de la expresión inglesa *adenine-uracil-rich elements*, pero no hay que confundirlas con las secuencias ARE de las regiones promotoras de los genes que codifican las enzimas de respuesta antioxidante). Por último podemos señalar que es la única quinona reductasa incluida en la lista de proteínas con motivos sensibles a los cambios redox (Conour *et al.*, 2004).

3.3. La quinona reductasa PIG3.

El supresor de tumores p53 regula la expresión de otra proteína perteneciente a la superfamilia MDR denominada PIG3 (*p53-inducible gene 3*) o TP53I3 (*tumor protein p53-inducible protein 3*). PIG3 es, sin lugar a dudas, un marcador proapoptótico, aunque no se conoce exactamente qué función desempeña en los procesos apoptóticos. También se ha verificado su capacidad reductasa de *orto*-quinonas dependiente de NADPH, lo que es coherente con la clasificación de PIG3 en la familia de las quinona oxidoreductasas dentro de la superfamilia MDR, aunque su actividad es menor que la de la ζ -cristalina. Uniendo ambas características funcionales se ha propuesto que la contribución de PIG3 a la apoptosis podría estar mediada por la generación de estrés oxidativo; de hecho se ha comprobado tanto *in vivo* como *in vitro* que la sobreexpresión de la proteína provoca el incremento en los niveles de ROS (Porté *et al.*, 2009).

4. Indicios de la participación de NQO1 en la regulación del ciclo celular.

La estrecha relación entre el balance redox y la proliferación celular apunta a la participación de las defensas antioxidantes en los complejos mecanismos que de manera directa o indirecta intervienen en el control del ciclo celular. En este sentido, la mayoría de los estudios se han centrado principalmente en las enzimas SOD, catalasa y glutatión peroxidasa (Li & Oberley, 1998; Teoh *et al.*, 2007).

Por el contrario, la implicación de las diversas quinona reductasas en el ciclo celular apenas se ha investigado. Sólo podemos señalar algunos datos indirectos

que sugieren cierta relación entre la expresión de las quinona reductasas y el ciclo celular. Centrándonos en la más importante de ellas, NQO1, diversos datos apuntan a una posible relación con el control de la proliferación celular:

1) NQO1 interacciona físicamente con las proteínas supresoras de tumores p33^{ING1b}, p53, p63 y p73, que están relacionadas directamente con el ciclo celular. La ausencia de esta unión por inhibición farmacológica de NQO1 con dicumarol, por la presencia de polimorfismos no funcionales o por la ausencia del gen *NQO1* afecta a los niveles intracelulares de p33^{ING1b}, p53, p63 y p73 y puede, por consiguiente, alterar el control de la proliferación celular e inducir tumorigénesis (Asher & Shaul, 2005; Garate *et al.*, 2008; Rokah *et al.*, 2010). Es el único aspecto de NQO1 que la relaciona directamente con una proteína implicada en la regulación del ciclo celular. Otra posible participación de NQO1 en el ciclo dependería de su función como enzima antioxidante/prooxidante que, al afectar al balance rédox celular, puede influir en la evolución de las diversas etapas del ciclo celular.

2) Del mismo modo que para p33^{ING1b}, p53, p63 y p73, se ha demostrado que NQO1 interacciona con la proteína ODC. Aunque esta última no interviene directamente en la regulación del ciclo celular, su actividad catalítica es imprescindible para que la célula reúna las condiciones óptimas para su división (Pegg, 1988; Gerner *et al.*, 2004).

3) Los polimorfismos no funcionales de NQO1 (NQO1*2 y NQO1*3), que conllevan la ausencia de actividad catalítica NQO1, se han relacionado con una mayor susceptibilidad al desarrollo de tumores (revisado en Ross & Siegel, 2004).

4) Completando el punto anterior, se ha descrito que la inducción de NQO1 previene la formación de tumores (revisado en Talalaly & Dinkova-Kostova, 2004). Sin embargo, este dato contrasta con el hecho de que NQO1 aparece sobreexpresada en algunos tumores, tal vez como medida protectora frente a un incremento en los niveles intracelulares de ROS (Siegel & Ross, 2000).

5) Se ha señalado también la estrecha relación entre los niveles de expresión de NQO1 y la densidad del cultivo en células HeLa, HepG2, NIH-3T3 y

osteoblásticas (Bello *et al.*, 2001; Córdoba-Pedregosa *et al.*, 2006; Collin *et al.*, 2001).

6) Aunque NQO1 es una proteína principalmente citosólica, su presencia en el núcleo de la célula (Winski *et al.*, 2002; Garate *et al.*, 2008) apunta a su implicación indirecta en el control de la replicación genómica, bien por su interacción con las proteínas supresoras de tumores mencionadas anteriormente (Garate *et al.*, 2008; 2010), bien porque contribuye al mantenimiento de un estado rédox óptimo para el desarrollo de las funciones nucleares.

Nuestro grupo ha comprobado que el tratamiento con 5 μ M dicumarol, el inhibidor más clásico y usado de NQO1, provoca la detención del crecimiento y el aumento de la apoptosis en la línea promielocítica humana HL-60 cuando es cultivada en ausencia de suero. En ese mismo trabajo se observa que la viabilidad mejora notablemente si las células son mantenidas sin suero al menos 24 horas antes de la adición de dicumarol, posiblemente por la inducción del equipamiento enzimático antioxidante celular (Forthoffer *et al.*, 2002; Gómez-Díaz *et al.*, 2003). Posteriormente se ha demostrado mediante citometría de flujo que la detención del crecimiento en HL-60 por dicumarol se debe a la acumulación de células en la fase S del ciclo. Además, junto a la alteración del ciclo celular se produce un significativo aumento de los niveles intracelulares de O_2^- en HL-60 (Bello *et al.*, 2005). Sin embargo, aún no se ha establecido el mecanismo que explique el origen de ambos fenómenos así como la posible conexión entre ambos.

Para verificar si ambos efectos se debían a la alteración de la actividad NQO1 por la presencia de dicumarol se trataron cultivos de HL-60 con ES936, una indolquinona sintética descrita como inhibidor irreversible y muy específico de NQO1 (Dehn *et al.*, 2003). Curiosamente la adición de ES936 no genera los mismos efectos en HL-60 que el dicumarol; es más, el dicumarol sigue provocándolos incluso en presencia de ES936, lo que sugiere que las acciones del primero en la línea celular HL-60 no dependen de la inhibición de NQO1 sino de una acción inespecífica (Bello *et al.*, 2005) tal y como se ha señalado también en otros trabajos (Du *et al.*, 2006; Notan *et al.*, 2007).

La indolquinona ES936 se ha presentado como un potente inhibidor de NQO1 basado en el mecanismo y, por tanto, como una clara alternativa al dicumarol para el estudio de las funciones de esta proteína en los sistemas celulares (Dehn *et al.*, 2003; Figura 11). La observación inicial de que ES936 inhibía significativamente el crecimiento de células tumorales pancreáticas humanas (que sobreexpresan NQO1) se interpretó como una consecuencia de la inhibición de NQO1 (Dehn *et al.*, 2006) lo que convertía a ES936 en un potencial agente antitumoral. Sin embargo, investigaciones más recientes han revelado que ES936 podría ejercer sus acciones por otros mecanismos independientes de la inhibición de NQO1. En este sentido se han diseñado una serie de indolquinonas derivadas de ES936 para evaluar si hay o no alguna relación entre la inhibición de NQO1 y la actividad antiproliferativa en las líneas celulares tumorales pancreáticas BxPC-3 y MIA PaCa-2. Así, se han encontrado algunas indolquinonas que inhiben NQO1 pero que no afectan al crecimiento celular y, por el contrario, otras que actúan como potentes inhibidores de la proliferación pero sin afectar a NQO1 (Reigan *et al.*, 2007). Por tanto, la actividad inhibidora de NQO1 que realizan indolquinonas como ES936 puede ser claramente disociada de la actividad inhibidora del crecimiento celular. Más aún, algunos de estos compuestos intervienen como inhibidores de la actividad tiorredoxina reductasa, lo que podría explicar su toxicidad en células de cáncer de páncreas (Yan *et al.*, 2009). Estos datos invitan a la prudencia a la hora de interpretar los mecanismos que subyacen a los efectos de la indolquinona ES936 sobre la proliferación puesto que el contexto celular (línea celular estudiada, condiciones de cultivo,...) podría jugar un papel crucial.

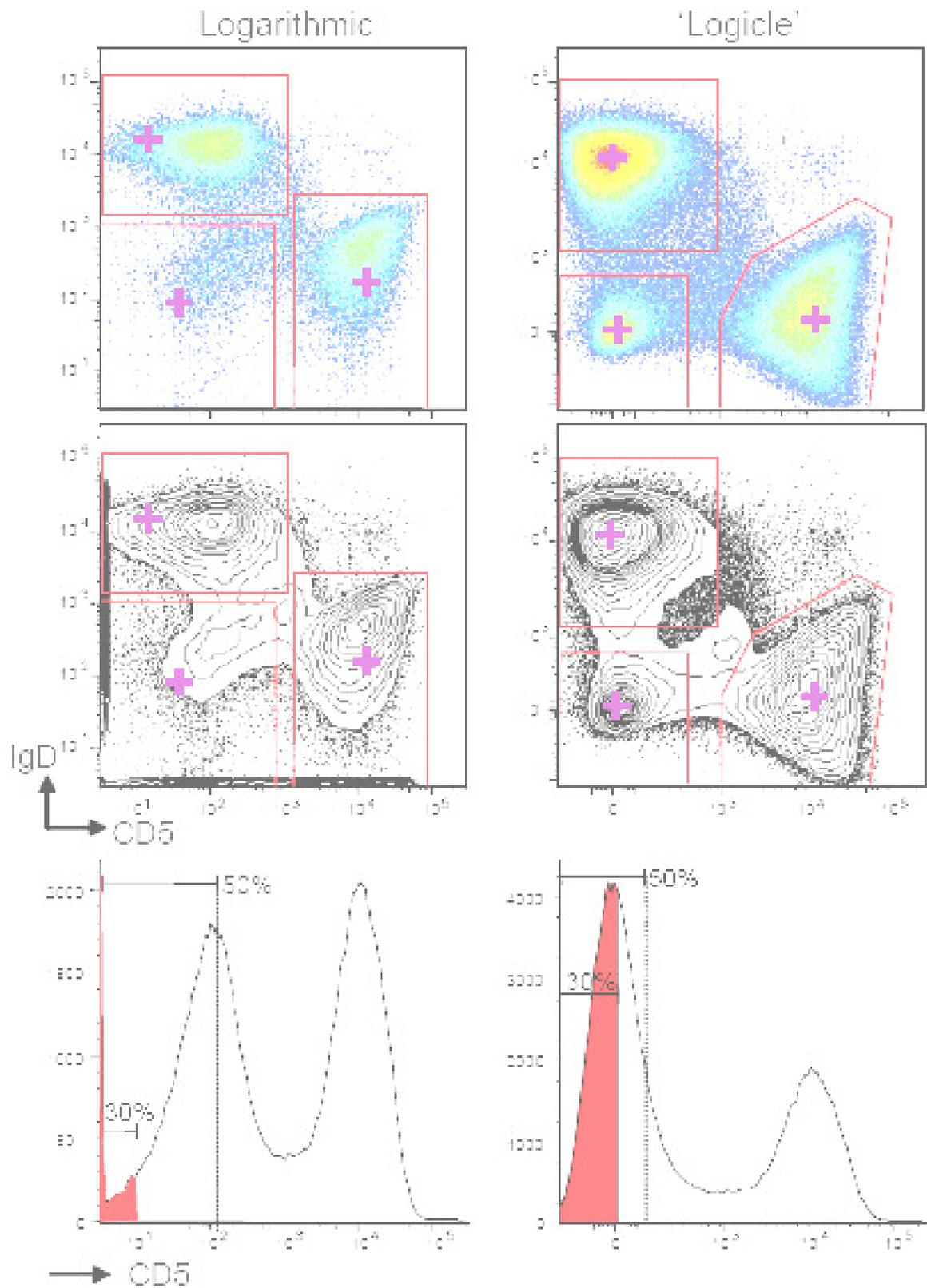
objetivos

OBJETIVO GENERAL

Analizar la interrelación entre cambios en la concentración de especies reactivas de oxígeno y la inhibición de las quinonas reductasas, especialmente NQO1, en diferentes líneas celulares, así como sus efectos sobre el ciclo celular.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1. Establecer el mecanismo por el que el tratamiento con dicumarol, descrito clásicamente como inhibidor de la proteína NQO1, estimula la producción de superóxido en la línea celular promielocítica humana HL-60.**
- 2. Investigar la posible interrelación entre el incremento del superóxido intracelular y la acumulación de células HL-60 en la fase S del ciclo celular observada tras el tratamiento con dicumarol.**
- 3. Estudiar los efectos de la inhibición farmacológica de NQO1 con la indolquinona ES936 en la proliferación de la línea celular HeLa de adenocarcinoma humano.**
- 4. Analizar las consecuencias del silenciamiento génico de NQO1 con ARNi en la proliferación de la línea celular HeLa.**



**materiales
y métodos**

Imagen de fondo de la página anterior: Figura de un artículo de Leonore A. Herzenberg y Leonard A. Herzenberg en el que sientan las bases de una nueva forma de analizar e interpretar los histogramas que puede marcar un antes y un después en el desarrollo de la citometría de flujo^[1]. Leonard A. Herzenberg, que trabaja actualmente en el Departamento de Genética del Stanford University Medical School, es considerado el padre de la citometría de flujo. En este sentido recibió en 2006 el premio Kyoto, conocido como el “Nobel japonés”. En un artículo autobiográfico^[2], Herzenberg narra cómo se llegó a la fabricación del primer FACS (*fluorescent-activated cell sorting*):

“As I became more deeply involved in immunology, I became increasingly aware of the need to characterize and isolate the different kinds of lymphocytes that were beginning to be visualized with fluorescent-labeled antibodies under the microscope and studied functionally by sensitivity to complement-mediated depletion after treatment with antibodies (in conventional antisera). [...] So I started asking around to see whether anyone had solved this problem. I soon found out that a group at Los Alamos (led by M. Fulwyler and M. V. Dilla) had developed a machine that could examine and sort large numbers of cell-sized particles on the basis of particle volume. I immediately planned a trip to see whether I could convince them to add a fluorescence-detection system so I could use their machine to measure the amount of fluorescence associated with individual cells and to sort cells according to this measure in addition to volume. They demurred, saying that this “was not part of their mission.” [They were funded to build a machine to count and size particles, not cells, obtained from the lungs of mice and rats sent up in balloons to inhale debris generated by atomic-bomb testing.] I persisted, and they finally agreed to give me a set of engineering drawings and the permission to use them as the basis of a machine designed to distinguish cells labeled with fluorescent antibodies. Little did I know when I brought these plans back to Stanford that I was starting on a lifework that continues today as a major activity in our laboratory.

Back at Stanford, I took advantage of my close proximity to the instrumentation research laboratory set up by Joshua Lederberg to look for life in outer space (on Mars or on the Moon). I asked the engineer I knew best to look at the plans and estimate the cost to replicate the Los Alamos machine. He came to me a few days later and said [...], “Well, I think the machine can be built here and I’ve completed a list of parts to be ordered.” I asked what it would cost, and he answered, “Something like \$14,000.” That was a lot for those days, but it could probably be managed. [...] I went to Henry Kaplan, who was head of the Radiology Department and was working on thymic function and development (I. Weissman worked with him). I told him how I thought a fluorescence based cell-analysis and -sorting machine could be used to study the thymus and asked him to join me in funding the development of this machine. He agreed. I put up \$7,000 from my somatic-cell genetics grant, he put up the remaining \$7,000 needed to meet the estimate, and the project got under way.

I didn’t do any of the engineering on this project. However, I was deeply involved in the daily development. I was essentially the head of the design team and took responsibility for assuring that the machine would be usable by scientists doing immunological or genetic studies. [...] At first there was some discussion about “repealing the laws of physics,” but eventually an engineer came up with a solution and we were off and running again. I was also responsible for getting new capabilities designed and tested. I loved this role because it encouraged me to think broadly about potential applications for the nascent FACS and to develop collaborations within and outside our laboratory to generate and test these kinds of ideas.

[...]Our first cell-sorting paper was published in *Science* in 1969^[3]. The instrument we used for this study had a xenon light source, which we replaced with a laser shortly thereafter. By 1972, we had developed a much improved instrument and decided to call it the Fluorescence-Activated Cell Sorter (FACS). The engineering team was also much improved because I was able to recruit Richard Sweet, inventor of the ink-jet printer, to head the team. In essence, I pointed out to Dick that the sorting module in the FACS was based on his invention and asked him to join our group. He responded, “There’s nothing I’d like to do more. I’d like to see biological applications of my inventions.” And see he did, as he applied himself to the development of several of the core features still with us in the modern FACS instrument. Dick’s initial work generated a paper that was really the first one describing the modern FACS^[4]. He also joined us as an author of a 1976 *Scientific American* article in which we introduced the FACS and the idea of using this novel instrument to track the expression of genes encoding surface molecules that distinguish various kinds of lymphocytes and other cells^[5].”

[1] **Herzenberg et al., (2006)** Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. *Nat Immunol* 7:681-685.

[2] **Herzenberg LA & Herzenberg LA (2004)** Genetics, FACS, immunology, and redox: A Tale of Two Lives Intertwined. *Annu Rev Immunol* 22:1–31

[3] **Hulett HR, Bonner WA, Barrett J, Herzenberg LA (1969)** Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. *Science* 166:747–749.

[4] **Bonner WA, Hulett HR, Sweet RG, Herzenberg LA (1972)** Fluorescence activated cell sorting. *Rev. Sci. Instrum.* 43: 404–409.

[5] **Herzenberg LA, Sweet RG (1976)** Fluorescence-activated cell sorting. *Sci Am* 234: 108–117.

1. Cultivos celulares.

Todas las líneas celulares fueron mantenidas en una atmósfera húmeda a 37 °C, con 5% de CO₂ y 95% de aire. Excepto HL-60, que es una línea que se mantiene en suspensión, las demás líneas celulares crecen adheridas al sustrato.

La línea celular promielocítica humana **HL-60** se cultivó en medio RPMI-1640 (BioWhittaker) complementado con 2 mM de L-glutamina (Sigma), 100 uds./mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina, 250 ng/mL de anfotericina B (Sigma) y un 10% v/v de suero fetal bovino (PAA Laboratories). Antes de la realización de los experimentos, las células HL-60 se recogieron de los cultivos de mantenimiento, se centrifugaron a 500 x *g* durante 5 minutos (centrífuga), se lavaron dos veces en medio RPMI-1640 sin suero y se cultivaron durante 24 horas en el mismo medio sin suero.

La línea celular **HeLa** de adenocarcinoma humano de cuello de útero se cultivó en medio DMEM (Dulbecco's MEM, BioWhittaker) complementado con 4 mM de L-glutamina (Sigma), 100 uds./ml de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina, 250 ng/mL de anfotericina B (Sigma) y un 10% v/v de suero fetal bovino (PAA Laboratories).

La línea celular **HepG2** de hepatoblastoma humano se cultivó en medio RPMI-1640 complementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina y el resto de componentes señalados para el cultivo de HeLa.

La línea celular humana **Caco-2** de carcinoma de colon, que expresa el polimorfismo *NQO1*2* (Siegel *et al.*, 2001), se mantuvo en medio MEM (BioWhittaker) suplementado con suero fetal bovino al 20% v/v (PAA Laboratories), 1% de aminoácidos no esenciales (Sigma), 2 mM glutamina y el resto de complementos indicados para el cultivo de las células HeLa.

La línea celular inmortalizada **3T3** de fibroblastos de ratón se cultivó en medio DMEM suplementado como la línea celular HeLa.

2. Generación de una línea derivada de HL-60 deficiente en la función mitocondrial (HL-60 ρ^0).

Las líneas genéticamente deficientes en el transporte electrónico mitocondrial (denominadas líneas ρ^0) se pueden obtener mediante el cultivo prolongado en presencia de bromuro de etidio (bromuro de 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridina). Este compuesto impide específicamente la replicación del ADN mitocondrial, que codifica, entre otros elementos, trece polipéptidos que forman parte de los Complejos enzimáticos I, III, IV y V (ATP sintasa) responsables de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y de la fosforilación oxidativa (Chandel & Schumacker, 1999). Durante el crecimiento de las células en presencia de bromuro de etidio el número inicial de moléculas de ADN mitocondrial decrece progresivamente con cada división celular. Tras un número suficiente de generaciones podemos obtener una línea celular deficiente en la función mitocondrial aunque capaz de sobrevivir si se complementa conveniente su medio de cultivo para suplir las deficiencias derivadas de este desajuste fisiológico. (King & Attardi, 1989). La obtención de una línea HL-60 deficiente en la función mitocondrial (HL-60 ρ^0) fue posible por el cultivo prolongado de HL-60 en presencia de 40 ng/ml de bromuro de etidio. El medio de cultivo se completó además con 50 μ g/ml uridina (como fuente de nucleótidos de pirimidinas alternativa puesto que la ruta normal de biosíntesis de pirimidinas depende por completo del funcionamiento del transporte electrónico mitocondrial (Löffler *et al.*, 1997), 1 mM piruvato (que al reducirse a lactato evita la acumulación de NADH citosólico y reestablece los valores de NAD^+/NADH , alterados al no haber respiración) y 4,5 g/L glucosa (puesto que la principal ruta energética de la célula será ahora la glicolisis) (King & Attardi, 1996).

3. Tratamientos de la línea celular HL-60

Si no se indica lo contrario, los productos utilizados son de Sigma. El dicumarol (3,3'-metileno-bis[4-hidroxicumarina], Figura 11) se preparó a una concentración 2 mM con NaOH 6 mM, añadiéndose a los cultivos con una concentración final comprendida entre 5 y 50 μ M. El inhibidor ES936 fue suministrado amablemente por el profesor Christopher J. Moody (Universidad de Nottingham, Reino Unido). Las soluciones stock se prepararon a 10 mM en DMSO y

se añadieron a los cultivos con una concentración final de 100 nM. La tenoiltrifluoroacetona (TTFA) se disolvió en etanol a 100 mM y se usó finalmente a 25 y 50 μ M. El componente activo de la leflunomida (A77 1726) se diluyó en DMSO (15 mM). La uridina y el ambroxol se prepararon en agua a 10 mM y 20 mM respectivamente. El dihidroorotato y el orotato a 30 mM en NaOH 6 mM. Las concentraciones finales de cada uno de los compuestos señalados anteriormente empleadas en el tratamiento de las células se optimizaron realizando una curva dosis-respuesta a fin de usar dosis que no afectaran significativamente a la viabilidad celular. En todos los casos se añadió en los controles la cantidad correspondiente del vehículo en que se había preparado cada sustancia.

Todos los tratamientos se llevaron a cabo en medio sin suero, tal y como se indica en el apartado de Cultivos celulares, porque el dicumarol, principal compuesto estudiado en el trabajo con la línea HL-60, se une a la seroalbúmina (Garten & Wosilait, 1971), como se comentará con más detalle en las secciones de Resultados y Discusión; además, la retirada de suero favorece la viabilidad de las células HL-60 frente al tratamiento con dicumarol e induce la expresión de NQO1 (Forthoffer *et al.*, 2002; Bello *et al.*, 2005).

4. Condiciones de cultivo y tratamientos de las líneas celulares HeLa, HepG2, Caco-2 y 3T3.

Puesto que la densidad celular condiciona la expresión de NQO1 (Bello *et al.*, 2001), las células fueron cultivadas en dos condiciones diferentes para alcanzar la densidad apropiada para los experimentos: 3000 células/cm² (baja densidad) o 25000 células/cm² (alta densidad, confluencia al 80%) (Figura 13). La mayoría de los experimentos se desarrollaron en placas de 6 pocillos (9,6 cm²/pocillo) y con un volumen final de 1,5 ml.

Para determinar la densidad, se realizaron fotografías de células HeLa sin teñir mediante microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC) Nomarski, a 200 aumentos, con un microscopio Leica DM 5000 B equipado con una cámara digital Leica DC 500. El porcentaje de superficie ocupada por las células se determinó usando el programa ImageJ (disponible en <http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Transcurridas 24 horas desde la siembra, y con unas densidades respectivas de 8000 células/cm² y 90000 células/cm², se llevó a cabo una pre-incubación de otras 24 horas en el medio correspondiente a cada línea celular pero sin suero, condición que se mantuvo durante los tratamientos que se indican más adelante.

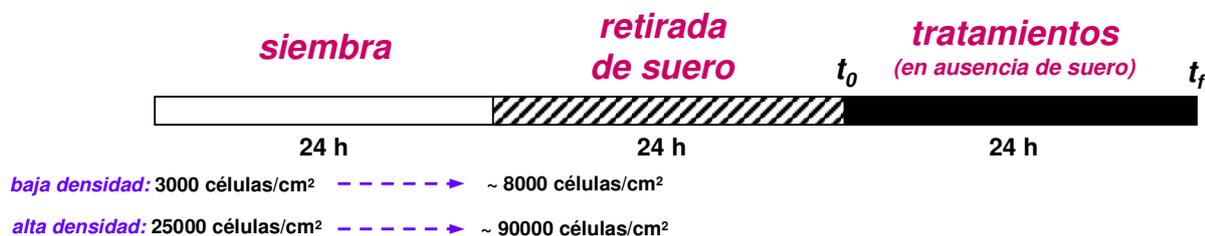


Figura 13. Esquema del procedimiento experimental empleado en los tratamientos con las líneas celulares HeLa, HepG2, Caco-2 y 3T3. Aparecen señaladas las densidades de los cultivos celulares en las dos condiciones empleadas (baja y alta densidad) tanto al inicio de la siembra como antes de la retirada de suero. Los tratamientos se realizaron en ausencia completa de suero (t_0 : tiempo cero o inicial del tratamiento; t_f : tiempo final transcurridas las 24 horas de tratamiento). En algunos experimentos la duración de los tratamientos fue inferior a las 24 horas, como se indicará expresamente en cada uno de los casos.

La indolquinona ES936 (5-metoxi-1,2-dimetil-3-[(4-nitrofenoxi)metil]-indol-4,7-diona, Figura 11), sintetizada como se indica en Beall *et al.*, (1998) fue donada amablemente por el profesor Christopher J. Moody (Universidad de Nottingham, Reino Unido). La solución stock de ES936 se preparó en DMSO y la concentración se determinó por espectrofotometría para una longitud de onda de 292 nm (coeficiente de extinción en DMSO: 22,16 mM⁻¹cm⁻¹, comunicado personalmente por C. J. Moody). Las concentraciones usadas en los tratamientos celulares estuvieron comprendidas entre 30 nM y 2 μM.

La posible implicación de las rutas de señalización dependientes de EGFR y MAPKs en los tratamientos con ES936 se estudió tratando simultáneamente a las células con ES936 y con inhibidores bien establecidos de cada una de las rutas. AG1478 (4-(3-cloroanilin)-6,7-dimetoxiquinazolina, Sigma) se ha descrito como un inhibidor específico del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Osherov & Levitzski, 1994). AG1478 se preparó a 15 mM en DMSO y su concentración final en los tratamientos celulares fue de 0,1-10 μM. Los inhibidores de las MAP quinasa (MAPKs) también se disolvieron en DMSO. Para la ruta de p38 MAPK se prepararon stocks de SB203580 y PD169316 (Calbiochem, Nottingham, Reino Unido) a 10 mM y se emplearon en un rango comprendido entre 0,1 y 20 μM;

para las rutas de ERK1/2 y Jun quinasa (JNK) se prepararon stocks a 20 mM de los inhibidores PD98058 ([2-(2'-amino-3'-metoxifenil)-oxanaftalen-4-ona], Alessi *et al.*, 1995) y SP600125 respectivamente. Las concentraciones de PD98059 usadas en los tratamientos fueron 1-50 μ M y de SP600125 1-10 μ M.

Para estudiar los posibles cambios en el estado redox celular se trataron simultáneamente cultivos celulares de HeLa con ES936 y 100 μ M ambroxol (2-amino-3,5-dibromo-*N*-(*trans*-4-hidroxiciclohexil)benzilamina), un mimético de la enzima superóxido dismutasa (Nowak *et al.*, 1994, Gillissen & Nowak, 1998), o 10 mM piruvato, que ha sido descrito como scavenger de H₂O₂ (Giandomenico *et al.*, 1997; Bello *et al.*, 2001; 2005).

5. Determinación de la viabilidad celular con azul tripán.

La viabilidad celular se determinó por el método de exclusión del colorante vital azul tripán (Sigma), que es expulsado activamente por las células vivas y que permanece en el interior de las células muertas confiriéndoles una característica coloración azul oscura. Para el análisis de la viabilidad, una alícuota del cultivo celular se mezcló a partes iguales con la solución de azul tripán para posteriormente ser cuantificada con un hemocitómetro (Neubauer) en un microscopio invertido (Nikon TMS), distinguiéndose células viables incoloras y células muertas azuladas.

6. Determinación de la síntesis de ADN mediante la incorporación de [metil-³H]-timidina radiactivo de la proliferación celular.

La proliferación se determinó a partir de la capacidad de las células para incorporar timidina marcada con el isótopo radiactivo ³H (tritio). Para ello los cultivos se incubaron en placas de 6 pocillos (9 cm²/pocillo) durante 12-24 horas con 0,25 μ Ci/mL [metil-³H]-timidina (Amershan Pharmacia Biotech). Tras la incubación, se eliminó la sonda no incorporada lavando las células dos veces con una solución de NaCl al 0,9% a 4 °C para a continuación fijarlas durante media hora con ácido tricloroacético al 5% a 4 °C. Transcurrido este tiempo, se eliminó el sobrenadante y se lisaron las células durante una hora a temperatura ambiente con NaOH 1N. Los

lisados se utilizaron para medir la incorporación de timidina tritiada en un contador de centelleo líquido (Beckman LS 6000TA, Palo Alto, CA). La unidad empleada, CPM/pocillo, hace referencia a los centelleos por minuto emitidos por las células de un pocillo.

7. Medición *in vivo* de especies reactivas de oxígeno mediante citometría de flujo.

La cuantificación de los niveles de superóxido intracelular se llevó a cabo usando la sonda hidroetidina (Sigma). Tras atravesar la membrana, la hidroetidina (HEt) es oxidada por el anión superóxido obteniéndose como producto 2-hidroxietidio (2-OH-Et), que al unirse al ADN nuclear emite una intensa señal fluorescente (Zhao *et al.*, 2005). Para la medición de superóxido las células fueron incubadas a 37 °C en oscuridad durante media hora con 4 µM HEt. Tras lavar las muestras para eliminar el exceso de sonda, la señal fluorescente del 2-OH-Et se registró a 620 nm en el detector FL3 de un citómetro de flujo EPICS XL (Beckmann Coulter) equipado con un láser de argón de 488 nm.

Se ha descrito que la sonda HEt puede ser oxidada por otras moléculas distintas al superóxido dando lugar a diversos productos cuyos espectros de emisión y absorción solapan con los del producto específico de la reacción con superóxido que, como ya se ha señalado anteriormente, es el 2-OH-Et (Zhao *et al.*, 2003, 2005). Es, por tanto, fundamental verificar que la señal medida se corresponde realmente a la oxidación de la sonda por superóxido, por lo que se llevaron a cabo controles en los que se incubaron simultáneamente a las células con dicumarol y con miméticos de la superóxido dismutasa (SOD), como ambroxol (2-amino-3,5-dibromo-N-[trans-4-hidroxiciclohexil]benzilamina, preparado en agua y usado a una concentración final de 100 µM) (Gillissen & Nowak, 1998).

La cuantificación de los niveles de peróxido de hidrógeno intracelular se llevó a cabo usando como sonda la diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCDHF-DA, Sigma). Tras atravesar la membrana, las esterasas separan el acetato de modo que la diclorodihidrofluoresceína (DCDHF) queda retenida en el interior celular donde puede reaccionar con el peróxido para generar la forma fluorescente

diclorofluoresceína (DCF). Para la medición de peróxido de hidrógeno las células fueron incubadas a 37 °C en oscuridad durante media hora con 10 μ M DCDHF-DA. Tras lavar las muestras para eliminar el exceso de sonda, la señal fluorescente de la DCF se registró a 525 nm en el detector FL1 del citómetro de flujo.

Para cada medida de superóxido o peróxido se analizaron al menos 20000 células. Los datos obtenidos se representaron en escala logarítmica mediante histogramas usando el programa EXPO32 ADC Analysis (Beckmann-Coulter). Para la cuantificación se empleó la mediana porque este valor es el más recomendado cuando se trabaja en citometría de flujo con escalas logarítmicas (Shapiro, 2003).

8. Medición *in vitro* del anión superóxido mediante espectrofotometría

Estas medidas se realizaron en un espectrofotómetro DU-640 UV-vis (Beckman) usando como muestra fracciones mitocondriales aisladas de las células HL-60 –cuya obtención se describe posteriormente- y se basan en el registro de la reducción de citocromo *c* sensible a la actividad superóxido dismutasa, SOD, lo que permite estimar los niveles de generación del radical superóxido (Messner & Imlay, 2002).

9. Preparación de fracciones citosólicas de los cultivos celulares.

El proceso que a continuación se describe se realizó a 4 °C con el fin de preservar la integridad de los componentes celulares. Para la obtención de las fracciones citosólicas se recogieron las células centrifugándolas a 500 x *g* durante 5 minutos y se lavaron con una solución Tris-HCl 130 mM pH 7,6 que contenía 1 mM EDTA, 0,1 mM DTT y 1 mM PMSF. Tras volver a centrifugar las células se resuspendieron en un volumen adecuado de tampón hipotónico de lisis constituido por 10 mM Tris-HCl pH 7,6, 1 mM EDTA, 0,1 mM DTT, 1 mM PMSF y 20 μ g/mL de cada uno de los siguientes inhibidores de proteasas: quimostatina, leupeptina, antipaína y pepstatina A (CLAP). A continuación, las células se homogeneizaron durante 5 minutos con un *potter* teflón-vidrio y luego, durante 30 segundos, con un

homogeneizador mecánico (Ultraturrax T-25, IKA Labortechnik) e inmediatamente se restableció la concentración inicial 130 mM Tris-HCl añadiendo un volumen de solución 250 mM Tris-HCl pH 7.6 con 1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 1 mM PMSF y CLAP. Las células y restos no homogeneizados se separaron centrifugando a 500 x *g* durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante.

Las fracciones citosólicas se separaron de las membranas mediante 30 minutos de ultracentrifugación a 100000 x *g*.

10. Preparación de fracciones mitocondriales de células HL-60

Se siguió básicamente el método descrito originalmente por Attardi y Ching (Attardi & Ching, 1979). Se recogieron unas 75-100 x 10⁶ células HL-60 por centrifugación y se lavaron con PBS a 4^o C. Después se resuspendieron en un tampón hipotónico de lisis (10 mM Tris-acetato pH 6,7, 10 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM PMSF y CLAP) y se dejaron durante 5 minutos para facilitar la hinchazón de las células. La homogeneización se efectuó con la ayuda de un émbolo de teflón rotando aproximadamente a 1,500 rpm durante 2-3 minutos. Después de la rotura de las células se añadió tampón de lisis con sacarosa (10 mM Tris-acetato pH 7,4, 0,25 M sacarosa, 10 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM PMSF y CLAP). Las células sin romper y los núcleos se descartaron mediante centrifugación a 500 x *g* durante 5 minutos. El sobrenadante se recogió y se centrifugó durante 15 minutos a 5000 x *g*. La pella, consistente en una fracción membranosa enriquecida en mitocondrias, se resuspendió de nuevo en tampón de lisis con sacarosa (10 mM Tris-acetato pH 7, 0,125 M sacarosa, 10 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM PMSF y CLAP) y se centrifugó a 500 x *g* durante 3 minutos. Finalmente se obtuvo una fracción enriquecida en mitocondrias al centrifugar el sobrenadante a 5000 x *g* durante 15 minutos.

11. Determinación de la cantidad de proteínas en las fracciones citosólicas y mitocondriales

En todos los casos donde fue necesario cuantificar la concentración de proteínas se utilizó el método de Bradford modificado por Stoscheck (Stoscheck,

1990). Para ello se mezclaron 50 μL de NaOH 1N, la alícuota correspondiente de la muestra a determinar y 1 mL del reactivo de Bradford. Tras agitar e incubar durante 10 minutos se midió la densidad óptica a 590 nm en un espectrofotómetro (Beckman DU-640 UV-visible). La cantidad de proteínas se calculó a partir de una recta patrón realizada previamente y usando γ -globulina (Sigma) como estándar.

12. Determinación de la actividad NQO1.

La actividad enzimática NQO1 se midió por espectrofotometría en fracciones citosólicas mediante la reducción de citocromo *c* dependiente de NADH y menadiona e inhibida por dicumarol (Lind *et al.*, 1990). Los ensayos se realizaron a 37 °C en agitación constante y con un volumen final de 1 ml de 50 mM Tris-HCl pH 7,5 que contenía 70 μg de proteínas citosólicas, 0,08% de Tritón X-100, 0,5 mM NADH, 10 μM menadiona y 77 μM citocromo *c*. Los ensayos se llevaron a cabo en un espectrofotómetro DU-640 UV-vis (Beckman) midiendo la reducción del citocromo *c* a 550 nm en presencia o no de 10 μM dicumarol, un inhibidor de la actividad NQO1 que nos permite descartar la reducción por otros mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. El coeficiente de extinción usado para los cálculos de la actividad específica fue 18,5 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

13. Ensayos enzimáticos de los Complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.

Se llevaron a cabo con mitocondrias de las células HL-60. Para la realización de estos ensayos se siguieron básicamente las indicaciones descritas por Trounce *et al.* (1996) excepto para el complejo IV, realizado según Storrie y Madden (1990). Se registraron en un espectrofotómetro termostatzado (DU-640, Beckman) a 30 °C para los Complejos I, II y III y a 37 °C para el complejo IV y en agitación constante. En todos los casos se realizaron mediciones en presencia o no de 50 μM dicumarol.

La actividad del Complejo I (NADH-ubiquinona oxidorreductasa) se midió como la reducción de decilubiquinona (DB) dependiente de NADH y sensible a rotenona (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en un volumen final de 1 mL constituido por 50 mM Tris-HCl pH

7,4, 250 mM sacarosa, 1 mM EDTA, 10 μ M DB, 2 mM KCN y 45 μ g de proteína de fracción mitocondrial obtenida según se describió en un apartado anterior. La reacción se inició añadiendo 50 μ M NADH y la reducción de DB se midió a 272 nm. El coeficiente de extinción utilizado fue 8 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

La actividad del Complejo II (succinato deshidrogenasa o succinato-ubiquinona oxidoreductasa) se analizó midiendo a 600 nm la reducción de 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) dependiente de succinato y decilubiquinona. El medio de reacción contenía 50 mM de fosfato potásico pH 7,4, 20 mM succinato, 2 μ g/mL antimicina A, 2 μ g/ml rotenona, 2 mM KCN, 50 μ M DCPIP y 30 μ g de proteína de fracciones mitocondriales. La activación del complejo II requiere la eliminación de oxalacetato, que puede unirse a este complejo durante la preparación de las mitocondrias e inhibirlo (Guo & Lemire, 2003; Yankovskaya *et al.*, 2003). Con este fin se incubaron previamente las muestras durante 10 minutos a 30 $^{\circ}$ C, iniciándose la reacción con la adición de 50 μ M decilubiquinona. El coeficiente de extinción utilizado fue 19 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

La actividad del Complejo III (ubiquinol-ferricitocromo *c* oxidoreductasa) se midió a partir de la reducción de citocromo *c* dependiente de decilubiquinol y sensible a estigmatelina (5 μ M). El medio de reacción contenía 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 250 mM sacarosa, 1 mM EDTA, 50 μ M citocromo *c*, 2 mM KCN y 30 μ g de proteína de fracciones mitocondriales. Tras iniciar la reacción con 50 μ M de decilubiquinol se registró el incremento de la absorbancia a 550 nm correspondiente con la reducción del citocromo *c*. El decilubiquinol se obtuvo reduciendo decilubiquinona con borohidruro (Trounce *et al.*, 1996). El coeficiente de extinción utilizado fue 19 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

La actividad del Complejo IV (ferrocitocromo *c* oxidasa) se midió siguiendo básicamente el protocolo de Storrie y Madden (Storrie & Madden, 1990) empleando 0,025% Tritón X-100 en lugar de Lubrol-PX. El medio de reacción estaba constituido por 25 μ M de citocromo *c* reducido (obtenido a partir de citocromo *c* y ditionito sódico), 0,025% Tritón X-100 y 50 μ g de proteína de fracción mitocondrial, en un tampón fosfato 40 mM, pH 6,2. La oxidación del citocromo *c* se registró a 550 nm con un coeficiente de extinción de 19 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

14. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

La proporción de la población celular en las distintas fases del ciclo se midió con un citómetro de flujo EPICS XL (Beckman-Coulter). Se recogieron entre $2 \cdot 10^5$ - $5 \cdot 10^5$ células centrifugando a $500 \times g$ durante cinco minutos para posteriormente fijarlas durante al menos 24 horas con etanol al 70% a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Posteriormente se eliminó el etanol lavando dos veces con solución incolora de Hank o PBS a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Las células se resuspendieron en tampón de tinción constituido por PBS pH 7,4, 0,1% Tritón X-100 50 $\mu\text{g/ml}$ ARNasa libre de ADNasa (Sigma) y 50 $\mu\text{g/ml}$ ioduro de propidio (Sigma), que al unirse al ADN emite una señal fluorescente registrada en el citómetro en el detector FL3 (620 nm). Se midieron al menos 20000 células de cada muestra utilizando el programa ExpoTM32 ADC Análisis (Beckman Coulter). La distribución de la población en las fases G_0/G_1 , S o G_2/M del ciclo celular se determinó con el programa informático Cylchred (Universidad de Cardiff). Las células que emitían una señal de fluorescencia correspondiente a valores por debajo de G_0/G_1 (sub $G_{0/1}$) fueron consideradas apoptóticas por lo que se usó este parámetro como un indicador adicional de la citotoxicidad de los distintos tratamientos (Figura 14).

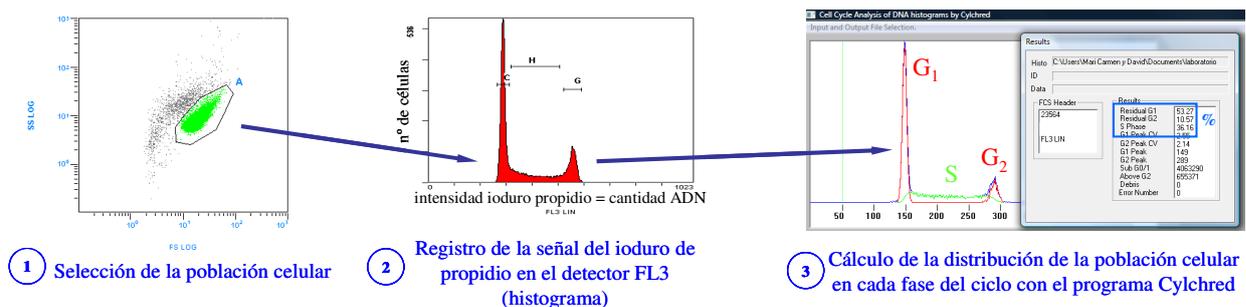


Figura 14. Esquema del procedimiento experimental empleado para analizar el ciclo celular mediante citometría de flujo. Como se detalla en el texto, las células se fijan y se tiñen con ioduro de propidio, que emite una señal fluorescente directamente proporcional a la cantidad de ADN de cada célula. Al introducir las muestras en el citómetro se debe seleccionar primero la población celular (*paso 1*) y luego registrar la señal del ioduro de propidio en el detector FL3; de este modo se obtiene un histograma con la distribución de la población celular en proporción a la cantidad de ADN (*paso 2*). En condiciones normales, el histograma presenta dos picos claramente definidos que se corresponden con las células de las fases G_1 y G_2/M del ciclo. Para cuantificar el tanto por ciento de la población que se encuentra en cada fase se utilizó el programa Cylchred (*paso 3*), que aplica el algoritmo de Watson para determinar la distribución (Watson *et al.*, 1987).

15. Inmunodetección de la proteína NQO1.

Básicamente se ha seguido el protocolo descrito por Bello *et al.*, 2005. Se emplearon fracciones citosólicas obtenidas como ya se ha descrito en un apartado anterior. Se mezclaron 70 µg de proteínas de cada muestra con un tampón de carga SDS/DTT cuya composición final fue 60 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10% sacarosa, 0,4 mM EDTA, 1,5% SDS, 20 mM ditioneitol y 0,1 mg/ml azul de bromofenol. Después de hervirlas durante cinco minutos, las muestras se dispusieron en un gel de poliacrilamida al 12% para separar las proteínas, que posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Para la visualizar y verificar que en cada una de las carreras la carga de proteína era igual se tiñó la membrana con Rojo Ponceau's, eliminándose el exceso de colorante con una solución de desteñido que contenía acético al 1% en agua. La membrana teñida con Rojo Ponceau's se escaneó con un densitómetro (GS-800 Calibrated Densitometer, Bio-Rad) para la posterior normalización de los niveles de expresión de NQO1, como se indicará posteriormente.

A continuación se sometió la membrana a un tratamiento de bloqueo con tampón TTBSL (Tris-HCl 50 mM pH 7,6, 0,85% NaCl, 0,05% Tween 20 y 5% leche en polvo desnatada) durante 2 sesiones de 30 minutos. Posteriormente se incubaron las muestras durante 24 horas a 4 °C y agitación continua con el anticuerpo policlonal anti-NQO1 desarrollado en cabra (Santa Cruz Biotechnology, CA, EEUU) diluido 1:100 en TTBSL. A continuación, el exceso de anticuerpo primario se eliminó con 3 lavados de 5 minutos con tampón TTBS (la misma composición que TTBSL pero sin leche en polvo). Luego se procedió a la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG de cabra desarrollado en conejo y conjugado con peroxidasa de rábano (Transduction Laboratories) diluido 1:5000 en TTBSL. De nuevo se realizó la secuencia de lavados con TTBS y se añadió otro más de 10 minutos con TBS (misma composición que TTBSL pero sin leche ni Tween 20).

Tras la inmunotinción, la membrana se incubó con una solución que incrementa la señal quimiluminiscente de la proteína marcada por los anticuerpos (solución ECL Plus, Amershan Bioscience, Upsala, Suecia) durante 1-5 minutos en una casete (HypercassetteTM, Amershan) para la exposición de placas radiográficas

Kodak X-OMAT. El revelado se llevó a cabo siguiendo técnicas de fotografía convencionales.

Las películas fotográficas se escanearon usando un densitómetro con el fin de obtener imágenes digitales que permitieran cuantificar la intensidad de la reacción con el programa Quantity One (Bio-Rad, EEUU). Los datos obtenidos de la cuantificación de las bandas correspondientes a NQO1 se normalizaron con respecto a la línea de cada carrera teñida con Rojo Ponceau's con el fin de corregir las posibles diferencias de carga entre las muestras.

16. Inmunodetección de la proteína p21.

El procedimiento empleado fue básicamente el mismo que se ha descrito para NQO1 con las siguientes particularidades: el western se realizó en un gel de poliacrilamida al 15%, como anticuerpo primario se empleó una dilución 1:600 de un anti-p21 policlonal desarrollado en conejo (Santa Cruz Biotechnology, CA, EEUU) y como secundario un anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa diluido a 1:2000 (Sigma).

17. Medida de los niveles de fosforilación de p38 MAPK.

Se recogieron en torno a 10^7 células HeLa por muestra, se centrifugaron a $500 \times g$ durante 5 minutos y, tras lavarlas con PBS, se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones. Cada uno de los pellets de células se resuspendió en 250 μ l de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 7,5 con 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0,5% deoxicolato, 1 mM ortovanadato sódico, 1 mM PMSF y CLAP). Tras agitar la mezcla energicamente durante unos segundos se centrifugó a $10000 \times g$ durante 15 minutos a 4 °C a fin de eliminar las células y grandes restos no lisados. Los sobrenadantes se utilizaron para determinar la cantidad total de proteínas y realizar la electroforesis en gel de poliacrilamida seguida del western-blotting en las mismas condiciones que se describieron anteriormente para la inmunodetección de NQO1. Para la detección de la proteína se usó un anticuerpo policlonal (Santa Cruz Biotechnology) contra la forma fosforilada de p38 (dilución 1:500) y, previo *stripping* otro que reconocía la cantidad total de p38 (dilución 1:1000). El objetivo del *stripping* era eliminar los

anticuerpos unidos a la membrana de nitrocelulosa y se llevó a cabo incubando ésta durante 30 minutos en una solución 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,7 con 2% SDS y 100 mM mercaptoetanol calentada a 70 °C y en constante agitación. El revelado se llevó a cabo como se ha descrito para NQO1.

18. Silenciamiento temporal con ARNi de la expresión de NQO1 en la línea celular HeLa.

Salvo que se indique lo contrario, todos los productos utilizados fueron de Ambion (Austin, TX, Estados Unidos). Se siguió básicamente el protocolo propuesto por la casa comercial (<http://www.ambion.es/rnai>), según el cual la transfección se realiza al mismo tiempo que las células se fijan al soporte plástico en el que se van a cultivar. Los experimentos se llevaron a cabo con células HeLa sembradas a baja densidad en placas de 6 pocillos. El volumen final de trabajo fue de 1500 µl/pocillo.

En primer lugar se realizó la incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente del agente lipídico de transfección siPORT NeoFX (2 µl/pocillo) con el medio especial para transfección OPTIMEM I (Gibco, Paisley, Reino Unido) (98 µl/pocillo). Simultáneamente se preparó la cantidad necesaria de ARNi control (control negativo #1) y de ARNi NQO1 (ID #9543) en OPTIMEM hasta tener un volumen final de 100 µL/pocillo para cada uno de los tratamientos. La concentración final de ARNi en los pocillos fue de 20 nM. Los stocks se prepararon en agua destilada libre de ADNasa con una concentración de 50 µM para el control negativo #1 y 4 µM para el ARNi NQO1. La secuencia del ARNi control está diseñada especialmente para no interrumpir la síntesis de ninguna proteína humana de modo que nos sirve para verificar posibles efectos secundarios debidos al propio protocolo de silenciamiento. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó la mezcla del agente de lipotransfección con cada uno de los ARNi, teniendo finalmente un volumen de 200 µl/pocillo (2 µl de agente de lipotransfección, el ARNi correspondiente y OPTIMEM hasta completar los 200 µl). La mezcla se mantuvo durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Finalmente se añadieron 200 µl/pocillo del cóctel de transfección y 1300 µl de medio DMEM con suero con la cantidad de células correspondientes (36000

células/pocillo). Tras agitar repetidamente las placas para asegurar una buena mezcla de todos los componentes, se dejó el cultivo durante un mínimo de 24 horas en el incubador a 37 °C en atmósfera húmeda enriquecida con 5% CO₂.

19. Análisis estadístico

Los datos utilizados son las medianas -en el caso de las medidas logarítmicas registradas por citometría de flujo- o las medias con sus correspondientes valores de desviación estándar de al menos tres experimentos diferentes. Las diferencias significativas entre la medias o las medianas se establecieron con el test *t* de Student. Los efectos de las concentraciones de ES936 y de los diferentes inhibidores farmacológicos empleados fueron estudiados mediante análisis de varianza de un solo factor (*one-way analysis of variance, one-way ANOVA*).

En todos los casos las diferencias se consideraron significativas para un nivel de confianza igual o superior al 95% ($p < 0,05$) y se determinaron con los programas estadísticos Graphpad Prism 4.0 (Graphpad Software Inc.) o con Microcal™ Origin™ 4.10 (Microcal Software Inc., Northampton MA, EEUU).



**resultados
dicumarol y HL-60**

Imagen de fondo de la página anterior: Fotografía de Karl Paul Link (1901-1978). En 1933, cuando era profesor de Química Agrícola en la universidad de Wisconsin, un granjero le llamó la atención sobre una serie de epidemias hemorrágicas que estaban afectando seriamente al ganado y a la economía de la región. Tras cinco años de investigación, un estudiante del laboratorio de Link llamado Harold A. Campbell aisló y cristalizó la sustancia causante de las muertes en una planta llamada trébol dulce (*Melilotus officinalis*), usada tradicionalmente por los granjeros como pasto en épocas de sequía. Campbell descubrió que la fórmula del agente hemorrágico era $C_{19}H_{12}O_6$ y que se trataba de una sustancia natural no descrita hasta entonces producida tras la contaminación del trébol dulce con moho^[1]. Pocos meses después, otros estudiantes del grupo de Link llamados Mark A. Stahmann y Charles F. Huebner caracterizaron el compuesto como 3,3'-metilen-bis-(4-hidroxycumarina), conocido luego simplemente como dicumarol, y desarrollaron un proceso para su síntesis artificial^[2]. Años más tarde, cuando se descubrió la vitamina K, Link relacionó su estructura y función con la del dicumarol y comenzó a investigar el uso de este último como inhibidor de la formación de protrombina. En 1941 el dicumarol comenzó a administrarse clínicamente como anticoagulante oral. Su popularidad creció tras ser usado para tratar al presidente Eisenhower de un ataque al corazón en 1955.

Link y sus colaboradores sintetizaron hasta 106 derivados del dicumarol con actividad anticoagulante pero ninguno más eficaz en humanos que el dicumarol^[3]. Uno de los análogos probado en animales se mostró mucho más potente que el dicumarol, pero Link lo consideró tan tóxico que no quiso patentarlo. Stahman, sin embargo, previó el potencial de esta sustancia y escribió una patente con la ayuda de la Wisconsin Alumni Research Foundation (WARF). El compuesto, llamado warfarina, ha sido posteriormente muy utilizado como veneno para roedores y como anticoagulante oral (desplazando en este uso terapéutico al propio dicumarol).

[1] **Campbell HA & Link KP (1941)** Studies on the Hemorrhagic Sweet Clover Disease. IV. The Isolation and Crystallization of the Hemorrhagic Agent. *J Biol Chem* **138**: 21–33.

[2] **Stahman MA, Huebner CF, Link KP (1941)** Studies on the Hemorrhagic Sweet Clover Disease. V. Identification and Synthesis of the Hemorrhagic Agent. *J Biol Chem* **138**: 513-527.

[3] **Overman RS, Stahman MA, Huebner CF, Sullivan WR, Spero L, Doherty DG, Ikawa M, Graf L, Roseman S, Link KP (1944)** Studies on the Hemorrhagic Sweet Clover Disease. XIII. Anticoagulant Activity and Structure in the 4-Hydroxycoumarin Group. *J Biol Chem* **153**: 5-24.

1. Cinética de la generación de superóxido en las células HL-60 tratadas con dicumarol.

En un trabajo previo publicado por nuestro grupo se muestra que, en ausencia de suero, el tratamiento de las células HL-60 con 5 μ M dicumarol durante 24 horas produce un incremento significativo en la señal fluorescente correspondiente a la oxidación de la hidroetidina (HEt), presuntamente causada por el superóxido intracelular (Bello *et al.*, 2005).

Antes de estudiar los mecanismos celulares implicados en esta generación de superóxido hicimos un estudio cinético en HL-60 en función del tiempo de incubación y de la concentración de dicumarol. Además, quisimos comprobar si la señal fluorescente resultante de la oxidación de la sonda empleada, HEt, se debía realmente a la reacción con superóxido y no a la reacción con otras posibles especies oxidantes (Zhao *et al.*, 2005).

Como se muestra en la Figura 15, la adición de 5 μ M dicumarol a células previamente cultivadas durante 24 horas en ausencia de suero indujo un incremento en la señal fluorescente por la oxidación de HEt que se aprecia ya a las 2 horas de tratamiento. Este efecto alcanza su máxima expresión a las 4-8 horas para posteriormente disminuir de forma progresiva y estabilizarse entre las 12 y las 24 horas de tratamiento. No se apreció ningún cambio significativo en las muestras mantenidas durante esos mismos tiempos en ausencia de suero y sin dicumarol.

Para verificar que el incremento en la señal de fluorescencia se debía exclusivamente a la interacción del superóxido con la sonda sin mediación de otro agente oxidante se llevaron a cabo controles donde las células se incubaron simultáneamente con dicumarol y con sustancias con acción mimética a la superóxido dismutasa, SOD. La señal fluorescente de la HEt oxidada disminuyó de manera significativa cuando las células HL-60 fueron tratadas con dicumarol y con 100 μ M amroxol tanto a las 6 como a las 24 horas de tratamiento. Este mismo resultado se obtuvo con CuDIPS, otro mimético de la SOD, como se muestra en el trabajo previo publicado por nuestro grupo al que nos referimos al comienzo de este apartado; además, en ese mismo trabajo se comprobó que, debido a la dismutación

del superóxido a peróxido de hidrógeno, el descenso de la señal de superóxido por la adición de miméticos de la SOD se acompañaba de la correspondiente subida de los niveles de peróxido, medidos en un citómetro de flujo con la sonda 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (Bello *et al.*, 2005). En conjunto, estos resultados muestran claramente que el incremento de la señal fluorescente correspondiente a la oxidación de HET tras el tratamiento de HL-60 con dicumarol en

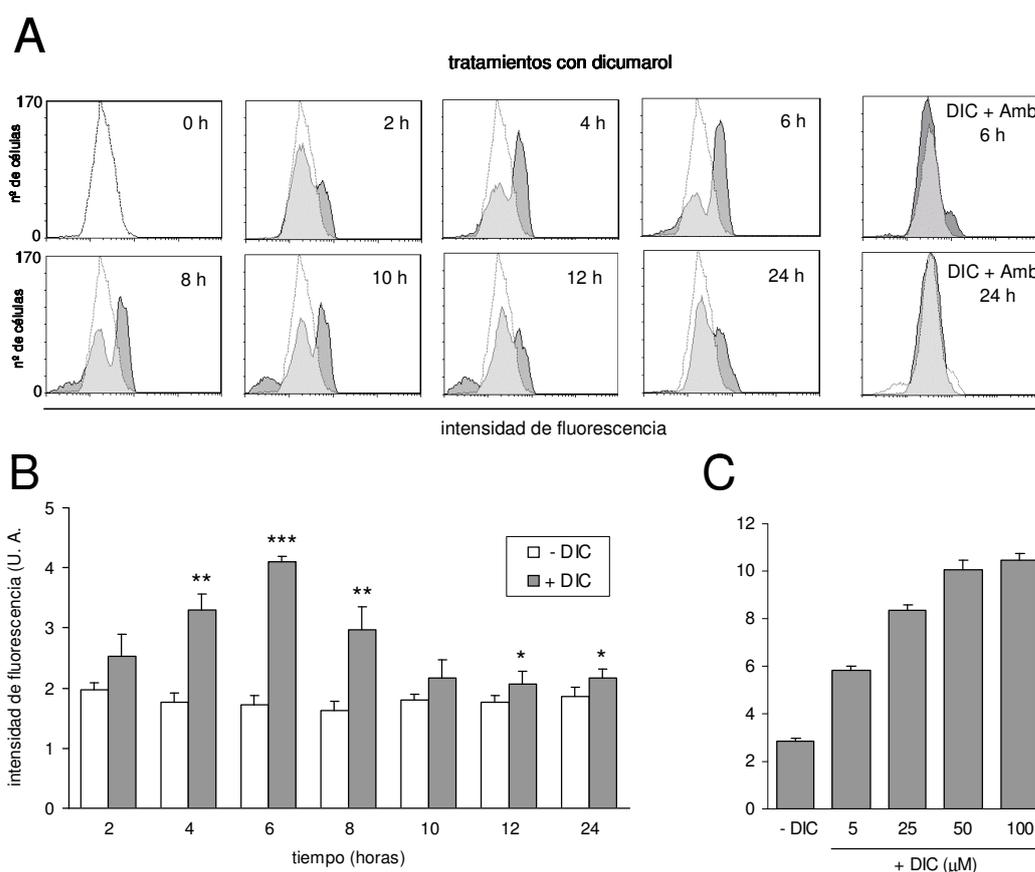


Figura 15: Producción de superóxido en células HL-60 tratadas con dicumarol. (A) *Histogramas de la señal fluorescente correspondiente a la oxidación de HET.* Tras incubar las células en ausencia de suero durante 24 horas se trataron con 5 µM dicumarol durante los tiempos señalados para posteriormente medir los niveles intracelulares de superóxido mediante citometría de flujo y usando como sonda la hidroetidina. El histograma blanco (0 horas) muestra el nivel de referencia de superóxido en ausencia de dicumarol; los histogramas sombreados (2-24 horas), los niveles debidos a los distintos tiempos de tratamiento con dicumarol. Se utilizaron controles (6 y 24 horas) en los que se cultivaron a las células con dicumarol y amroxol, un *scavenger* del superóxido, para verificar que la señal fluorescente registrada se debía específicamente a la oxidación de la sonda por este radical. (B) *Evolución de la producción de superóxido por el dicumarol a lo largo del tiempo.* Se han representado los valores correspondientes a la mediana ± desviación estándar (n=3) de la señal fluorescente, como se explica en el apartado de Materiales y métodos. Las diferencias significativas en cada tiempo respecto al control sin dicumarol se han señalado con asteriscos (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$). (C) *Variación de los niveles de superóxido con la concentración de dicumarol.* Las células fueron tratadas durante 4 horas con los valores de dicumarol señalados en la gráfica. Los niveles de fluorescencia representados son las medianas ± desviación estándar (n=3). El efecto de la concentración fue estadísticamente significativo con $p < 0,001$ (*one-way ANOVA*).

ausencia de suero se debe exclusivamente al superóxido.

A continuación se estudió cómo la concentración del dicumarol afectó a la señal de superóxido. En experimentos de 4 horas de tratamiento, la señal fluorescente correspondiente a los niveles de superóxido se incrementó al pasar de 5 a 25 μM dicumarol para alcanzar un valor máximo estable con 50 y 100 μM (Figura 15C). La concentración utilizada para los experimentos posteriores fue la más baja, es decir, 5 μM , con el fin de minimizar posibles interacciones inespecíficas y porque, además, no produjo un descenso significativo de la viabilidad celular en ausencia de suero –mantenida en torno al 85%. Por otra parte, esa dosis de dicumarol se consideró suficiente para detectar posibles inhibiciones o inducciones en la producción de superóxido intracelular en los posteriores tratamientos que se llevarían a cabo con las células HL-60. Por otra parte, para los experimentos realizados con fracciones mitocondriales (ver posteriormente) se eligió la dosis de 50 μM dicumarol por ser los tiempos de tratamiento mucho más cortos que en los experimentos *in vivo* y porque esa concentración era la mínima que daba la máxima respuesta.

2. La inhibición de NQO1 no es un factor determinante para el incremento del superóxido en las células HL-60 tratadas con dicumarol.

Entre las diversas funciones desempeñadas por la proteína NQO1 se ha propuesto su acción como *scavenger* de superóxido (Siegel *et al.*, 2004), por lo que nos propusimos comprobar si el incremento de este radical aniónico inducido por el tratamiento de las células HL-60 con dicumarol se debe a su acción inhibidora de la actividad NQO1. Para ello estudiamos el efecto de la indolquinona ES936, un inhibidor irreversible de NQO1 basado en el mecanismo y más específico que el dicumarol (Dehn *et al.*, 2003). El tratamiento de extractos citosólicos de células HL-60 con 100 nM ES936 durante 2 horas fue suficiente para eliminar por completo la actividad NQO1 (Bello *et al.*, 2005). Sin embargo, comparado con el dicumarol, este inhibidor sólo produjo un ligero incremento en los niveles de superóxido intracelular (Figura 16). Hay que señalar, además, que el dicumarol seguía induciendo la

producción de este radical incluso cuando NQO1 estaba ya completamente inhibida por ES936. Estos datos indican claramente que la inhibición de la actividad NQO1 no es el principal factor responsable del incremento de superóxido en las células HL-60 sino que el dicumarol podría estar afectando a otras dianas intracelulares.

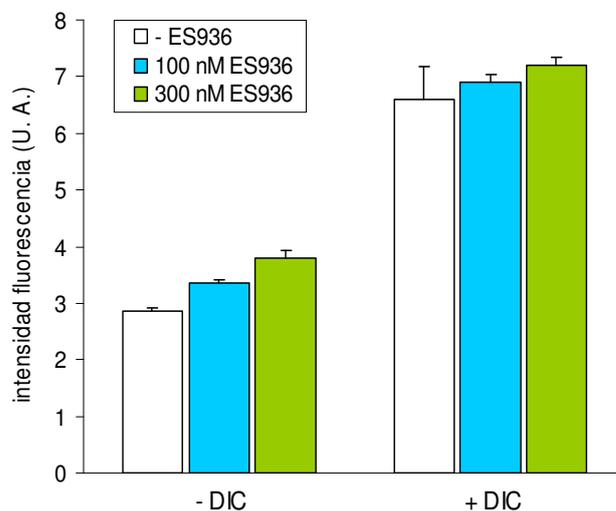


Figura 16: La producción de superóxido en HL-60 por el tratamiento con dicumarol no se debe principalmente a su acción inhibitoria de NQO1. Las células fueron tratadas durante 4 horas con ES936 (100 ó 300 nM) en presencia o no de 5 μ M dicumarol para posteriormente incubarlas con hidroetidina y medir con el citómetro de flujo la oxidación de la sonda por superóxido. Se han representado los valores correspondientes a la mediana \pm desviación estándar ($n=3$) de la fluorescencia. Las diferencias significativas respecto a los controles sin ES936 (barras blancas) se han señalado con asteriscos (*, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$). Las referidas a los controles con la misma concentración de ES936 pero sin dicumarol se indican con letras (a, $p < 0,01$; b, $p < 0,001$).

3. El incremento del superóxido en las células HL-60 tratadas con dicumarol tiene un origen mitocondrial.

En el apartado anterior se ha apuntado que el dicumarol podría inducir la producción de superóxido en células HL-60 porque realiza otras acciones distintas a su ya conocida inhibición de la actividad NQO1. Entre sus otras posibles dianas debemos considerar la mitocondria, el principal generador natural de especies reactivas de oxígeno en las células de mamíferos (Boveris *et al.*, 1972). Se conocen con detalle los mecanismos por los que la inhibición de los complejos mitocondriales por compuestos de diversa naturaleza da lugar a la reducción univalente de oxígeno molecular para generar superóxido (Barja, 1999; Turrens, 2003); a esto se añade el

hecho de que el dicumarol incrementa el consumo de oxígeno en la mitocondria (Collier & Pritsos, 2003).

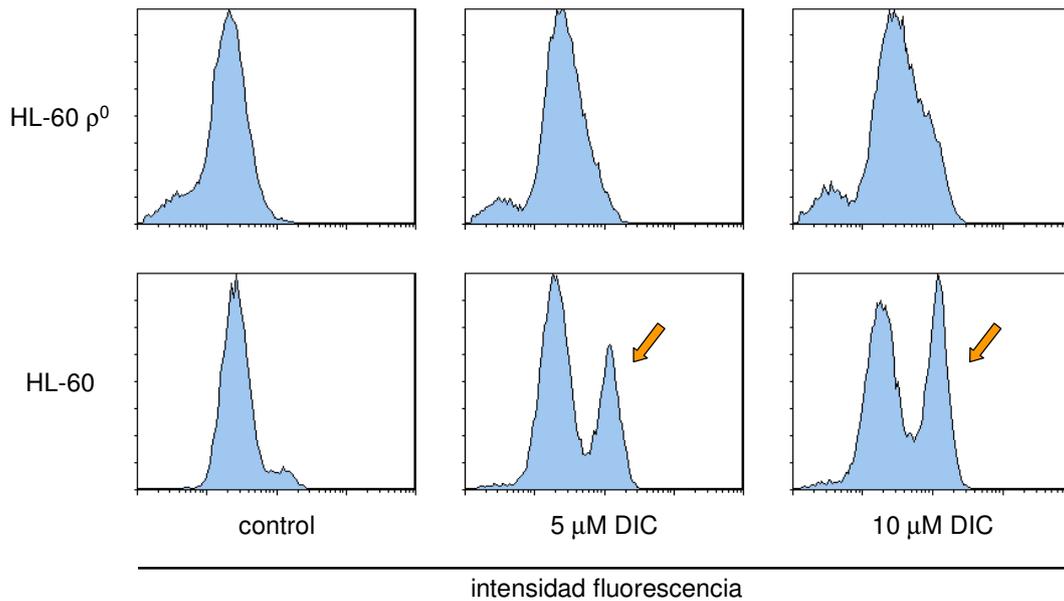


Figura 17: La producción de superóxido en HL-60 por el tratamiento con dicumarol requiere el funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial. La línea HL-60 ρ^0 deficiente en la función mitocondrial no respondió al tratamiento durante 4 horas con 5-10 μM dicumarol incrementando los niveles intracelulares de superóxido. Como podemos observar en los histogramas obtenidos en el citómetro de flujo, en HL-60 ρ^0 no se produjo un aumento significativo en la señal fluorescente correspondiente a la oxidación de HET por el superóxido, efecto que sí pudo observarse claramente en HL-60 tal y como se indica con una flecha amarilla. Estos resultados demuestran que el dicumarol induce la producción de superóxido en la cadena respiratoria mitocondrial.

Con el fin de verificar si el incremento en los niveles de superóxido tiene su origen en la cadena respiratoria probamos el tratamiento con dicumarol en la línea celular HL-60 ρ^0 , una línea derivada de HL-60 deficiente en la función mitocondrial (cf. Materiales y Métodos). El cultivo con 5 ó 10 μM dicumarol durante 4 horas no produjo un incremento significativo en los niveles de superóxido en HL-60 ρ^0 como se observó al registrar mediante citometría de flujo la señal de la oxidación de la sonda hidroetidina (Figura 17), a diferencia del resultado obtenido en HL-60. Este resultado señala que la producción de superóxido inducida por dicumarol requiere la actividad de los componentes de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

4. El dicumarol inhibe los complejos mitocondriales II, III y IV.

Una vez comprobado que el origen de la sobreproducción de superóxido por el dicumarol no se encontraba en la inhibición de NQO1 sino en la alteración de la

cadena respiratoria mitocondrial, el siguiente objetivo fue el estudio de la posible acción del dicumarol en la actividad de cada uno de los Complejos enzimáticos de dicha cadena. Estos estudios se realizaron con mitocondrias aisladas de la línea celular HL-60.

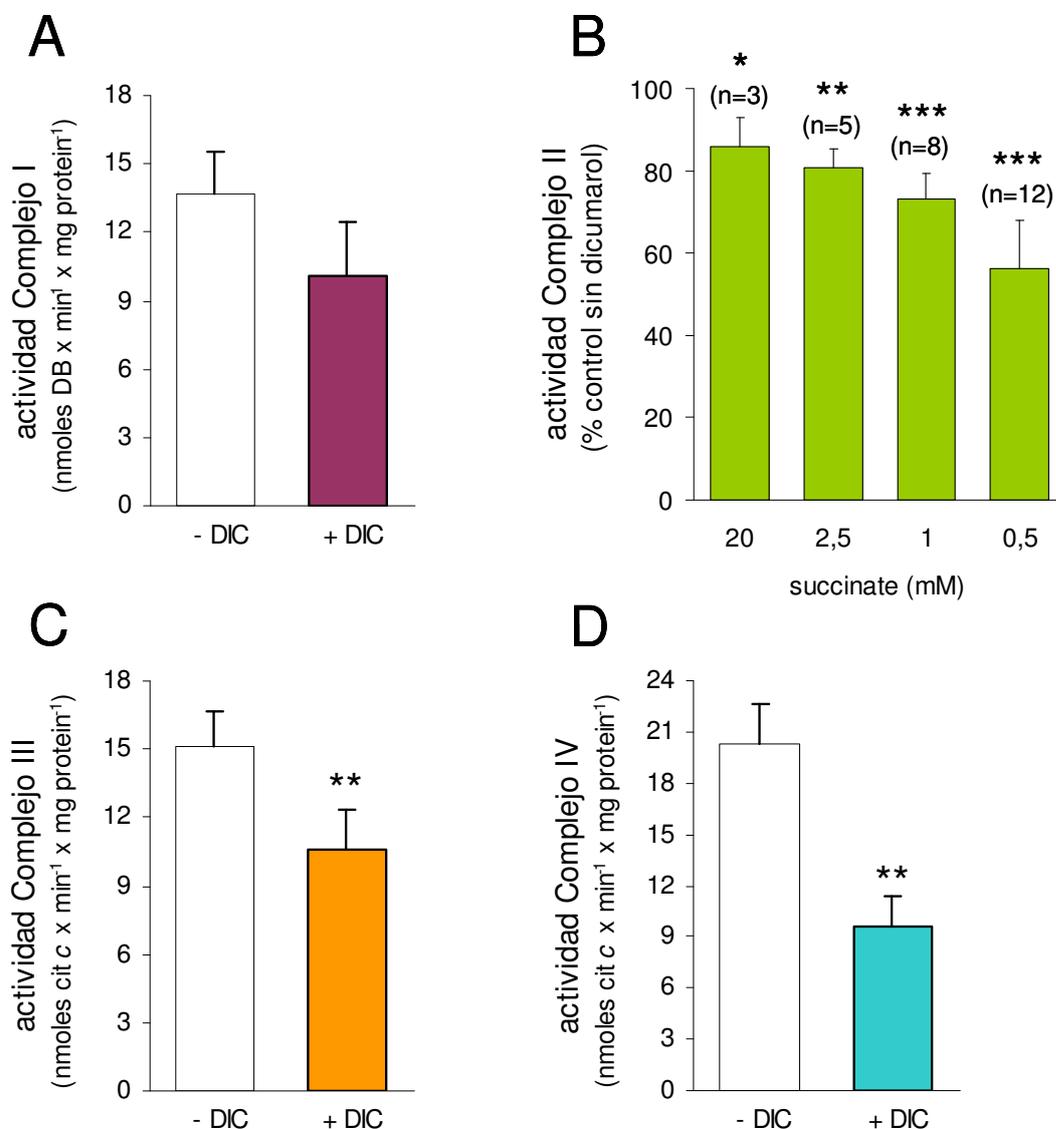


Figura 18: Efecto del dicumarol en la actividad de los complejos mitocondriales. Las medidas se realizaron en fracciones enriquecidas en mitocondrias de HL-60 tratadas o no con 50 μ M dicumarol. (A) *Complejo I*. Su actividad no se vio alterada significativamente por el dicumarol (n=4). (B) *Complejo II*. En la gráfica se representa, para distintas concentraciones de succinato, la actividad del Complejo II en presencia de dicumarol respecto a la actividad sin dicumarol, considerando esta última como el 100%. Como se observa, este complejo sufre un importante descenso en su actividad por la presencia del dicumarol para valores bajos de succinato; sin embargo, el aumento en la concentración de succinato conllevó una disminución de la acción inhibitoria del dicumarol. (C) *Complejo III*. Su actividad fue significativamente inhibida por dicumarol (n=4). (D) *Complejo IV*. Al igual que ocurría en los complejos I y III, la actividad citocromo c oxidasa se afectó de manera importante por el dicumarol (n=5). En todos los casos, los valores representados son medias \pm desviación estándar. Las diferencias significativas respecto a los controles sin dicumarol se han señalado con asteriscos (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

La actividad del Complejo I, medida como la reducción de decilubiquinona dependiente de NADH y sensible a la rotenona –un inhibidor de este complejo- no se alteró significativamente por el dicumarol (Figura 18A). En cambio, la actividad del Complejo II, registrada como la reducción de DCPIP dependiente de succinato y de decilubiquinona, sí se inhibió por dicumarol de manera inversa a la concentración de succinato, sustrato natural de este complejo (Figura 18B). Este dato concuerda con la inhibición competitiva de la actividad del Complejo II por el dicumarol descrita en un trabajo previo (Wilson & Merz, 1969). La actividad del Complejo III, medida como la reducción de citocromo *c* dependiente de decilubiquinol y sensible a un inhibidor de este complejo (como la estigmatelina), fue ligera pero significativamente inhibida por el dicumarol (Figura 18C). Por último, el Complejo IV, estudiado a partir de la oxidación de citocromo *c* reducido sensible a la inhibición con cianuro potásico, también vio significativamente afectada su actividad, que se redujo en torno al 50% por la presencia del dicumarol (Figura 18D).

5. El dicumarol induce la formación de superóxido por flujo inverso de electrones en el complejo II.

La producción de especies reactivas en la mitocondria se ha relacionado normalmente con la inhibición de la cadena respiratoria por encima de la posición de la ubiquinona, es decir, a nivel de los Complejos III y IV, lo que produce un efecto muy similar a la situación de hipoxia. En esas condiciones se genera superóxido en el Complejo III (Guzy *et al.*, 2005), si bien cada vez se le da más importancia a la contribución del Complejo II, que por flujo inverso de electrones –funcionando como fumarato reductasa en lugar de succinato deshidrogenasa- también produce este radical (Paddenberg *et al.*, 2003). La inhibición del complejo III por sí misma es capaz de incrementar los niveles de superóxido de origen mitocondrial (Muller *et al.*, 2004).

Ya que habíamos observado que el dicumarol inhibe la actividad de los Complejos II, III y IV, pero no del Complejo I, nuestro siguiente objetivo fue estudiar el posible papel de los Complejos II y III en la generación de superóxido tras el tratamiento de las células HL-60 con dicumarol. Para ello se analizó el efecto del

succinato sobre mitocondrias aisladas. Por una parte, el succinato inhibe la reacción enzimática inversa del Complejo II, es decir, su función como fumarato reductasa, y, por tanto, la generación de superóxido asociada a esta actividad (Messner & Imlay, 2002; Paddenberg *et al.*, 2003); por otra parte, la entrada de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial por el Complejo II –acción que realiza el succinato– incrementa de manera significativa la producción de este radical en el Complejo III (Lenaz, 2001) y también por flujo inverso en el Complejo I (Muller *et al.*, 2008). Por ello, un incremento por el succinato en la generación de superóxido estimulada por dicumarol indicaría la participación de los Complejos I ó III. Por el contrario, una inhibición por el succinato claramente apuntaría al Complejo II como el principal implicado en la generación de superóxido mitocondrial en presencia de dicumarol.

En primer lugar se comprobó si el dicumarol estimulaba la generación de superóxido en un sistema *in vitro* con mitocondrias aisladas usando succinato como donador de electrones y citocromo *c* como sonda para el superóxido. Para evitar la reducción del citocromo *c* por la actividad del Complejo III en lugar de por el superóxido, estos ensayos se realizaron en presencia de un inhibidor de este Complejo.

Al medir *in vitro* la reducción del citocromo *c* dependiente de decilubiquinol y en presencia de antimicina A, un inhibidor de la actividad del Complejo III, se produjo un incremento en la señal cuando se añadió dicumarol (Figura 19A). El mismo resultado se obtuvo al repetir el experimento en presencia de estigmatelina, que también inhibe el Complejo III (Figura 19B). La adición de SOD disminuyó la señal de espectrofotometría, lo que demostraba claramente la implicación del superóxido en la reducción del citocromo *c*. Si se repetía la medida en las mismas condiciones –citocromo *c*, decilubiquinol, antimicina A/estigmatelina– pero se incluía además succinato el estímulo del dicumarol desaparecía completamente (Figura 19A y 19B).

Estos resultados son coherentes con una participación del flujo inverso de electrones en el Complejo II en la producción de superóxido inducida por el dicumarol, ya que el uso de los inhibidores del Complejo III descarta la participación de este último. El efecto inhibitor del succinato excluye también la posible participación del flujo inverso de electrones en el Complejo I. Puesto que el succinato y el dicumarol compiten por ocupar el sitio activo del Complejo II (Wilson & Merz,

1969) podemos afirmar que el inhibidor debe estimular la generación del radical superóxido por flujo inverso de electrones (actividad fumarato reductasa), situación que se favorece además al encontrarse inhibidos simultáneamente los Complejos III y IV por el propio dicumarol (como ya vimos en el apartado anterior; Figura 18C y 18D). Las figuras 19C, 19D y 19E resumen el procedimiento experimental seguido.

Del mismo modo, mediante citometría de flujo, investigamos *in vivo* en células HL-60 cómo el succinato afectaba a los niveles de superóxido. Por sí solo el succinato produjo una ligera subida de los niveles de superóxido, lo que es coherente con un incremento en la entrada de electrones en la cadena respiratoria y con el mayor estado de reducción de los transportadores que la componen, con la consiguiente generación de especies reactivas a nivel de los Complejos III y I. Sin embargo, en células tratadas con dicumarol el succinato reducía los niveles de superóxido en proporción a la cantidad de succinato empleada, eliminándose por completo el efecto del dicumarol cuando las células fueron tratadas en presencia de 30 mM succinato (Figura 20). De nuevo obtenemos resultados coherentes con la participación del flujo inverso de electrones en el Complejo II en la formación de radical superóxido al tratar *in vivo* a las células HL-60 con dicumarol.

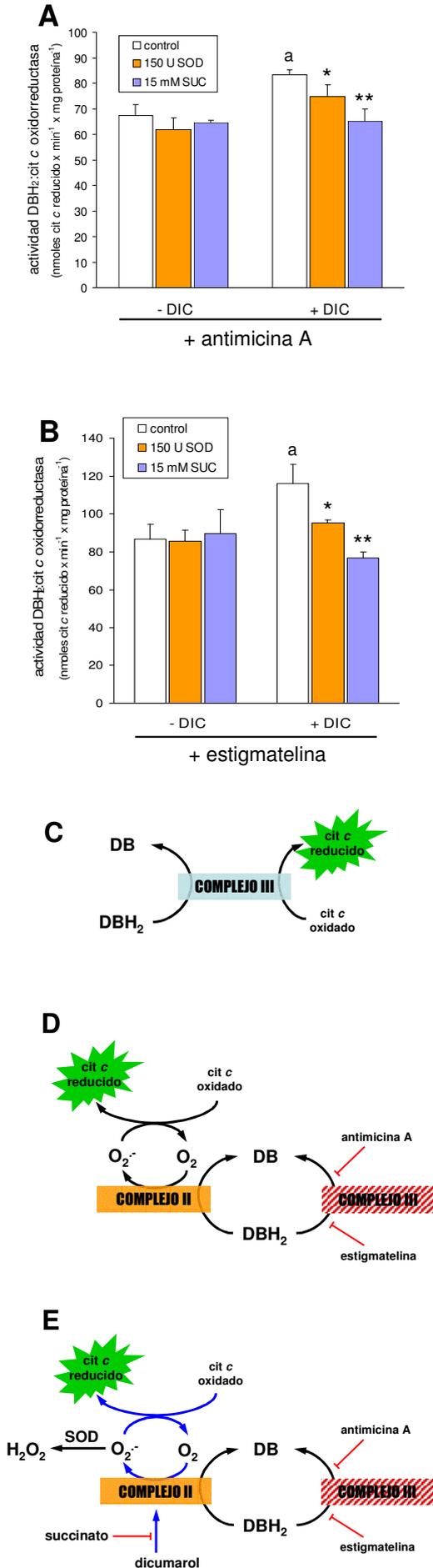


Figura 19: El transporte inverso de electrones en el Complejo II está implicado en la generación de O₂⁻ por dicumarol.

(A y B) Reducción de citocromo c dependiente de decilubiquinol y resistente a antimicina A (5 μM) o a estigmatelina (5 μM). El dicumarol generó un notable incremento en la reducción de citocromo c; este efecto se revirtió tanto con superóxido dismutasa (SOD) como con succinato (SUC). Se muestran valores de media ± desviación estándar (n=3). Las diferencias significativas respecto a los controles sin SOD ni SUC se han señalado con asteriscos (*, p < 0,05; **, p < 0,01). Las diferencias significativas respecto a los controles con SUC o SOD pero sin dicumarol se indican con letras (a, p < 0,05).

(C, D y E) Esquemas explicativos del experimento. Al añadir decilubiquinol a fracciones mitocondriales de células HL-60 podemos registrar la actividad del complejo III midiendo por espectrofotometría (λ=550 nm) la reducción de su aceptor de electrones natural, el citocromo c (C). La adición de antimicina A o estigmatelina inhibe el paso de electrones a través de este complejo, lo que favorece la oxidación del decilubiquinol mediante el flujo de electrones en sentido inverso en el Complejo II; el estado reducido de los transportadores electrónicos del Complejo II favorece su reacción con O₂ para generar O₂⁻ que, a su vez, reduce al citocromo c (D). En estas condiciones, la adición de dicumarol aumenta significativamente la señal. La disminución de citocromo reducido con SOD confirma la implicación del O₂⁻ mientras que la inhibición en la producción de este radical por succinato demuestra que el origen de la señal está en el Complejo II (Paddenberg *et al.*, 2003).

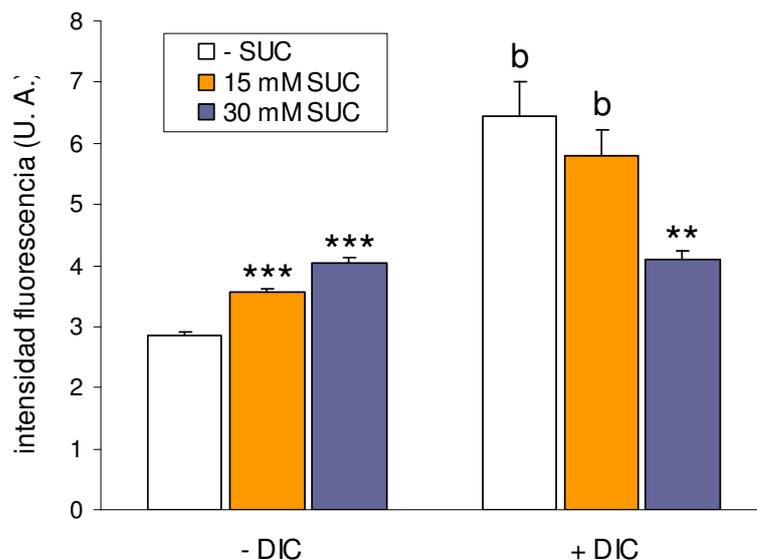


Figura 20: El succinato inhibe la producción de superóxido en células HL-60 tratadas *in vivo* con dicumarol. Las células fueron tratadas durante 4 horas con 5 μ M dicumarol en presencia de 15-30 mM succinato (SUC) para posteriormente incubarlas con hidroetidina y medir con el citómetro de flujo la oxidación de la sonda por superóxido. Se representan los valores correspondientes a la mediana \pm desviación estándar ($n=3$) de la fluorescencia. Las diferencias significativas respecto a los controles sin succinato (barras blancas) se han señalado con asteriscos (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$). Las referidas a los controles con la misma concentración de succinato pero sin dicumarol se indican con letras (b, $p < 0,01$).

Una vez demostrada la participación del Complejo II en la generación de superóxido mitocondrial estimulada por dicumarol, a continuación analizamos el efecto del TTFA, un inhibidor del Complejo II que bloquea la interacción con uno de sus sustratos, la ubiquinona (Barja, 1999; Paddenberg *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2005). Se probaron dos concentraciones de TTFA, 25 y 50 μ M, porque se ha descrito que este complejo presenta dos sitios diferentes de unión con la ubiquinona y que pueden ser bloqueados a esas concentraciones respectivamente (Xu & King, 1992). Estos experimentos se realizaron con tratamientos de 4 horas, cuando el dicumarol provoca la máxima estimulación en la generación de superóxido, y de 24 horas, momento en que ya se observa una estabilización en los niveles del radical (Figuras 15 y 21). El inhibidor TTFA no provocó por sí solo ninguna alteración en la señal de superóxido con ambas concentraciones y para los dos tiempos considerados. La concentración inferior de TTFA (25 μ M) no afectó los niveles de superóxido para 4 y 24 horas de incubación de las células con dicumarol pero se registró un significativo

aumento cuando las células se trataron simultáneamente con dicumarol y 50 μM TTFA, sobre todo a las 24 horas (Figura 21).

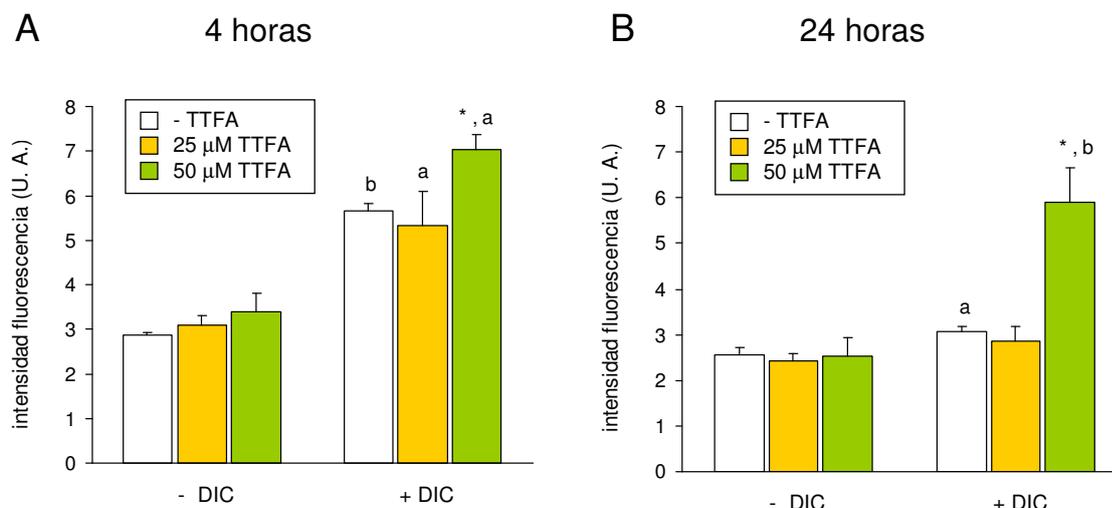


Figura 21: Efecto de la tenoiltrifluoroacetona (TTFA), un inhibidor del Complejo II mitocondrial, en la generación de superóxido estimulada por el dicumarol. Las células fueron tratadas durante 4 ó 24 horas con 5 μM dicumarol en presencia de 25-50 μM TTFA para posteriormente medir los niveles de superóxido registrando por citometría la oxidación de la sonda hidrotidina. Se representan los valores correspondientes a la mediana \pm desviación estándar ($n=3$) de la fluorescencia. Las diferencias significativas respecto a los controles sin succinato (barras blancas) se han señalado con asteriscos (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$). Las referidas a los controles con la misma concentración de succinato pero sin dicumarol se indican con letras (a, $p < 0,05$; b, $p < 0,01$).

6. El superóxido no está implicado en el bloqueo parcial de las células HL-60 en la fase S del ciclo pero estimula la transición G_1/S .

Nuestro grupo ya describió que el tratamiento de las células HL-60 con dicumarol en ausencia de suero, además de provocar un importante aumento de los niveles de superóxido intracelular, también alteraba el ciclo celular induciendo una llamativa acumulación de la población celular en la fase S (Figura 22; Bello *et al.*, 2005). En el presente trabajo se comprobó además que el dicumarol repetía el mismo efecto en el ciclo celular de la línea celular tumoral NB4 así como de los fibroblastos de hámster CHO. En las células NB4 preincubadas durante 24 horas sin suero, una dosis de 2,5 μM dicumarol fue suficiente para acumular el $55,25 \pm 1,34$ % de la población en fase S frente al $36,30 \pm 1,41$ % del control sin dicumarol ($n=3$, $p < 0.01$). El efecto en las CHO no fue tan significativo, requiriendo dosis mayores de

dicumarol; así, un tratamiento de 24 horas con 20 μM dicumarol previa retirada de suero hizo pasar de un control con $26,9 \pm 5,15$ % de las células en fase S a $34,97 \pm 3,49$ %. Estos resultados apuntan a que el dicumarol afecta, aunque en diverso grado, a mecanismos comunes en las distintas líneas celulares.

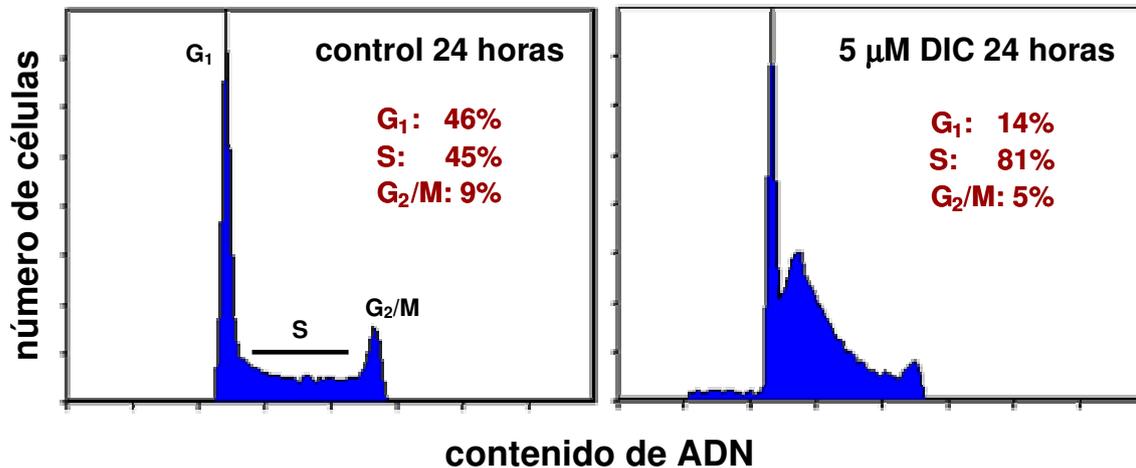


Figura 22: El tratamiento de células HL-60 con dicumarol provoca la acumulación de la mayor parte de la población celular en la fase S del ciclo. Nuestro grupo publicó previamente un trabajo donde se señalaba cómo el tratamiento durante 24 horas con 5 μM dicumarol en células HL-60 cultivadas en ausencia de suero, además de aumentar la producción del radical superóxido, inducía un llamativo incremento del número de células en la fase replicativa del ciclo (fase S) (Bello *et al.*, 2005). En las figuras se comparan los histogramas correspondientes al control sin suero y al resultado del tratamiento con 5 μM dicumarol durante 24 horas. Para estudiar la distribución de la población celular en las distintas fases del ciclo se fijaron las células con etanol al 70% y a 4 °C durante al menos 24 horas y posteriormente se incubaron en una solución de tinción de ADN con yoduro de propidio. Al intercalarse esta sonda en el ADN emite una señal fluorescente proporcional a la cantidad de ADN que contiene la célula y que puede registrarse con el citómetro de flujo.

El siguiente aspecto que quedaba por resolver era si los dos efectos del dicumarol en HL-60, es decir, la inducción de superóxido y la acumulación de células en la fase S del ciclo, estaban relacionados o si eran independientes. Para responder a esta cuestión se cultivaron células con 5 μM dicumarol durante 24 horas en medio sin suero -dando lugar al consiguiente bloqueo de la población en la fase S del ciclo- y a continuación se llevaron a cabo tres tratamientos diferentes durante otras 24 horas: 1) mantener a las células con la misma dosis de dicumarol; 2) retirar el dicumarol y cultivar a las células en ausencia de suero; y 3) tratar simultáneamente a las células con dicumarol y 100 μM amroxol, un mimético de la SOD. Las muestras de los distintos tratamientos se recogieron a diferentes tiempos

a fin de seguir la evolución de cada uno de ellos (7,5 horas, 13 horas y 24 horas). Para cada tiempo se recogieron las células, se fijaron y se tiñeron con yoduro de propidio para analizar por citometría de flujo la distribución de la población en las distintas etapas del ciclo.

Como se esperaba, el dicumarol indujo el bloqueo de las células en la fase S temprana tras 24 horas. El mantenimiento de las células con dicumarol durante otras 24 horas más dio lugar a un lento avance a lo largo de la fase S, lo que indica que el dicumarol no provoca un bloqueo total sino parcial de las células durante esta fase del ciclo (Figura 23, histogramas de la columna izquierda). Por otra parte, las células seguían manteniendo su capacidad proliferativa puesto que al retirárseles el dicumarol avanzaban rápidamente por la fase S del ciclo recuperando aparentemente su ritmo normal, como puede observarse ya a las 7,5 horas de la retirada del dicumarol; a las 13 horas la mayor parte de la población que inicialmente estaba retenida en S ha completado ya su paso por esta fase. Transcurridas las 24 horas adicionales la mayor parte de la población habían completado la mitosis y se encontraban en la fase G₁ del próximo ciclo (Figura 23, histogramas de la columna central). Por último, para comprobar la hipotética conexión entre la producción de superóxido y este bloqueo parcial en la fase S se trataron a las células con dicumarol y con ambroxol, un *scavenger* de superóxido. El avance de las células a lo largo de la fase S no se afectó por la presencia de ambroxol y presentó el mismo perfil que el tratamiento sólo con dicumarol. Sin embargo, la adición de ambroxol hizo disminuir el número de células en la fase S temprana a las 13 horas de tratamiento en comparación con las muestras tratadas exclusivamente con dicumarol (Figura 23, histogramas de la columna derecha), lo que parecía señalar la intervención del superóxido en la transición G₁/S.

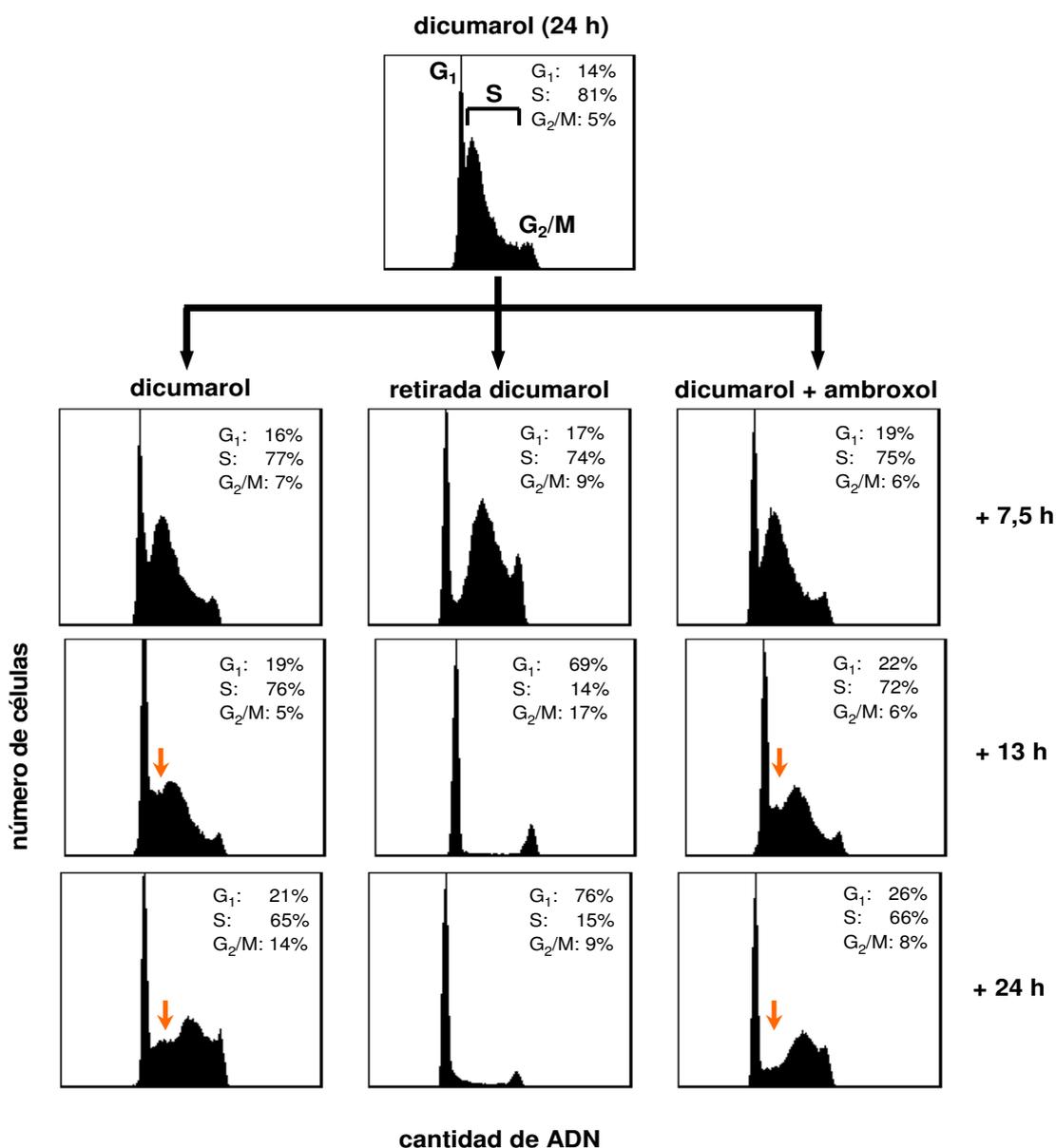


Figura 23: El bloqueo parcial que el dicumarol produce en la fase S del ciclo no se explica por el incremento de los niveles de $O_2^{\cdot -}$. Las células se precultivaron durante 24 horas en medio sin suero para posteriormente añadir en esas mismas condiciones 5 μ M dicumarol durante 24 horas adicionales con el fin de acumular a la mayor parte de la población celular en la fase S del ciclo (*dicumarol 24 h*). A partir de la situación anterior, los cultivos fueron tratados en tres condiciones diferentes: medio sin suero con 5 μ M dicumarol, medio sin suero sin dicumarol, y en presencia de dicumarol y 100 μ M ambroxol (*scavenger* de superóxido). La presencia de dicumarol (*histogramas de la columna izquierda*) mantiene el bloqueo de las células en la fase S aunque no de manera permanente pues no impide el avance de parte de la población desde la fase inicial S hacia posiciones más cercanas a G₂. La adición de ambroxol (*histogramas de la columna derecha*) no revierte el efecto del dicumarol lo cual indica que el superóxido no es, en principio, el causante del bloqueo. Pueden apreciarse, sin embargo, diferencias en la transición G₁/S entre los cultivos con dicumarol y los tratados con dicumarol y ambroxol (*flechas*); en estos últimos, la fase S inicial se vacía lo que parece indicar que la eliminación de superóxido afecta al paso de las células desde G₁. Sólo la retirada del dicumarol libera a las células de la retención (*histogramas de la columna central*).

Con el fin de comprobar este resultado se cultivaron células HL-60 en medio sin suero para posteriormente mantenerlas durante 24 horas en medio completo con suero y en presencia o no de 100 μ M ambroxol. Al medir en esas condiciones la síntesis de ADN mediante la incorporación de metiltimidina tritiada se observó que el tratamiento con ambroxol disminuyó de manera significativa la señal tanto en las células tratadas con suero como en las mantenidas sin suero (Figura 24). Este resultado indica que el superóxido participa en la entrada de las células en la fase replicativa del ciclo en las células HL-60. Se ha descrito que las condiciones prooxidantes son necesarias para la transición desde la fase G₁ a la fase S del ciclo de manera que el tratamiento con antioxidantes como la *N*-acetilcisteína inhibe la transición G₁/S al afectar a proteínas reguladoras del ciclo como D1 y p27 (Menon SG et al., 2003; Menon & Goswami, 2007; Menon SG et al., 2007; Figura 6). Sin embargo, los resultados obtenidos al añadir ambroxol a células previamente detenidas en la fase S por el tratamiento con dicumarol mostraron que en esas condiciones el superóxido no juega un papel tan importante en la progresión a lo largo de la fase S, ya que su eliminación con el *scavenger* no afecta de ningún modo a la velocidad con que las células llevan a cabo la replicación de su material hereditario.

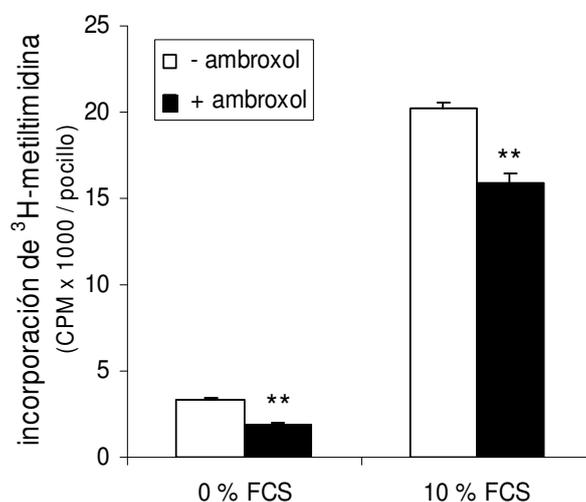


Figura 24: Efecto del ambroxol sobre la síntesis de ADN en células HL-60. Las células fueron incubadas durante 24 horas en medio sin suero y posteriormente estimuladas durante 24 horas adicionales con suero al 10 %, registrándose la síntesis de ADN mediante la incorporación de ³H-metiltimidina en un contador de centelleos. Como puede observarse, la retirada del superóxido con ambroxol disminuye de manera significativa la incorporación de ³H-metiltimidina tanto en las células tratadas con suero como en los controles mantenidos en medio sin suero, lo que significa que se produce un descenso en el número de células que están replicando su material genético. Se representan los valores correspondientes a la media \pm desviación estándar (n=3). Las diferencias significativas respecto a los controles respectivos sin ambroxol (barras blancas) se han señalado con asteriscos (**, $p < 0,01$).

Concluyendo, los datos obtenidos indican que el incremento en los niveles de superóxido observado en las células HL-60 cultivadas con dicumarol no está relacionado con el bloqueo parcial en la fase S y que la eliminación de esta especie reactiva disminuye la proporción de población celular que transita de G₁ a S.

7. El bloqueo parcial que el dicumarol induce en la fase S en células HL-60 se debe a la inhibición de la biosíntesis de pirimidinas.

Una vez demostrado que el superóxido no interviene en la retención en la fase S de una gran parte de la población celular de HL-60 al tratar con dicumarol nos propusimos localizar cuál podría ser la diana que explicara este efecto. Cuando se incubaron las células durante 24 horas y en ausencia de suero con ES936, el inhibidor de la actividad NQO1, comprobamos que no se inducía la sobreproducción de superóxido (Figura 16). Al analizar el ciclo celular en esas muestras con un citómetro de flujo y usando el yoduro de propidio como marcador de ADN se observó

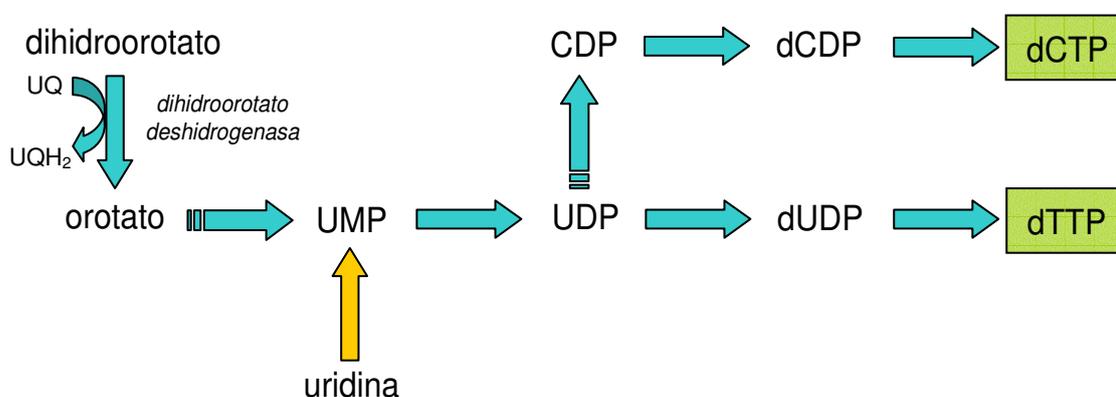


Figura 25: Rutas celulares biosintéticas de trifosfatos de nucleótidos de pirimidina. La síntesis de los nucleótidos de pirimidinas presenta algunos precursores comunes entre los que destaca el uridín monofosfato (UMP) a partir del cual la célula forma los desoxidifosfatos y desoxitriposfatos de citosina y timina. Las flechas azules señalan la ruta correspondiente a la síntesis *de novo* de pirimidinas, en la encontramos a la dihidroorotato deshidrogenasa, una enzima de la membrana interna mitocondrial; las flechas discontinuas indican la presencia de varios pasos en la ruta. Además de esta síntesis *de novo* las células presentan una segunda ruta (*salvage route*, flecha amarilla) que comienza con la uridina, sintetizada por la propia célula o captada del exterior, en la que no participa el metabolismo mitocondrial. UQ: ubiquinona; UQH₂: ubiquinol; UDP: uridín difosfato; dUDP: desoxiuridín difosfato; dTTP: desoxitimidín trifosfato; CDP: citidín difosfato; dCDP: desoxicitidín difosfato; dCTP: desoxicitidín trifosfato.

además que tampoco se repetía el otro efecto del dicumarol, es decir, el bloqueo parcial en la fase S, lo que de nuevo indica que NQO1 no está implicada en la alteración del ciclo celular debida al dicumarol. El siguiente punto era, por tanto, encontrar otra diana que explicara la acción sobre la proliferación celular.

Hemos señalado anteriormente que el dicumarol afectaba a la cadena respiratoria mitocondrial inhibiendo en mayor o menor grado las actividades de los Complejos II, III y IV e induciendo, consecuentemente, la producción de especies reactivas por flujo inverso de electrones en el Complejo II. Se ha descrito que la inhibición de la cadena por encima de la posición de la ubiquinona, esto es, en los Complejos III y IV, afecta de forma indirecta a la actividad de la dihidroorotato deshidrogenasa, una enzima de la membrana interna mitocondrial necesaria para la biosíntesis de pirimidinas que utiliza a la ubiquinona de la cadena respiratoria como aceptor natural de electrones y al dihidroorotato como donador, para producir respectivamente ubiquinol y orotato, el precursor del UMP y, a partir de él, de las pirimidinas necesarias para la síntesis de ARN y ADN (Figura 25; Evans *et al.*, 2004; Gatterman *et al.*, 2004; Beuneu *et al.*, 2000). De esta manera están íntimamente

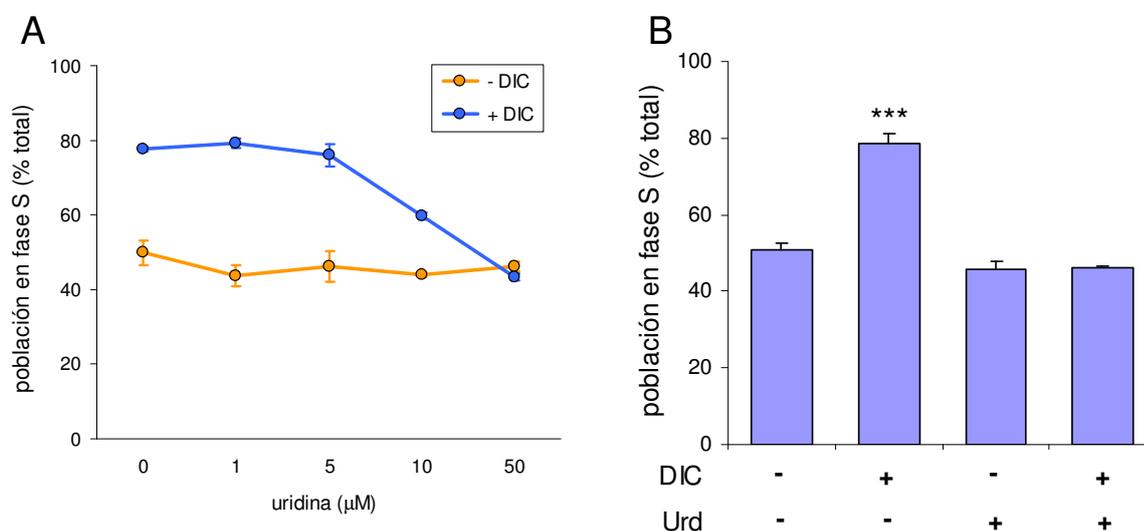


Figura 26: La uridina evita el bloqueo de la población celular en la fase S provocado por el dicumarol. (A) Al tratar las células simultáneamente con dicumarol y uridina durante 24 horas, previa retirada de suero, se observó un desbloqueo de la población retenida en la fase S proporcional a la dosis de uridina administrada, alcanzándose los valores de los controles sin dicumarol con 50 μM uridina. (B) El tratamiento de las células con 50 μM uridina en ausencia de suero y 24 horas antes de la adición de dicumarol previene la retención de la población en la fase S del ciclo. Estos datos apuntan a que el dicumarol afecta la biosíntesis de los nucleótidos de pirimidinas, impidiendo de este modo la replicación del ADN en la fase S del ciclo por la carencia de dCTP y dTTP. El suministro de uridina suple la carencia debida al dicumarol. En ambos casos se representa la media ± desviación estándar (n = 3; ***, $p < 0,001$)

relacionadas la cadena respiratoria mitocondrial y la biosíntesis de los nucleótidos de pirimidina.

Con estos precedentes en la bibliografía, nuestro objetivo fue estudiar si el bloqueo parcial en la fase S que el dicumarol induce en HL-60 se debía a la inhibición de la síntesis natural de pirimidinas. Para ello analizamos las consecuencias de la adición de uridina en las células tratadas con dicumarol. Como se muestra en la Figura 25, a partir de la uridina pueden ser sintetizados el resto de nucleótidos de pirimidinas necesarios, entre otros aspectos, para la síntesis de ADN, salvando de este modo el paso catalizado por la dihidroorotato deshidrogenasa.

Al preincubar las células en medio sin suero y tratarlas posteriormente durante 24 horas con 5 μM dicumarol y distintas dosis de uridina se pudo comprobar cómo la uridina revertía el efecto del dicumarol liberando a la población celular detenida en la fase S del ciclo a partir de una concentración de 10 μM y anulando por completo el bloqueo con el tratamiento de 50 μM (Figura 26A). Si, además, se añadía 50 μM uridina durante la preincubación sin suero, al añadir posteriormente el dicumarol no se inducía el bloqueo de la población en la fase S (Figura 26B). Estos resultados confirman que el dicumarol afecta a la ruta biosintética de las pirimidinas provocando un descenso en los niveles de nucleótidos dTTP y dCTP necesarios para la replicación del material genético. Este déficit se traduce en una ralentización del avance de la población celular por la fase S del ciclo.

A continuación nos propusimos verificar que la ruta de las pirimidinas estaba siendo afectada por el dicumarol a nivel de la dihidroorotato deshidrogenasa. Para ello investigamos la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular tras añadir dihidroorotato u orotato, sustrato y producto respectivamente de esta enzima (Figura 25), a las células previamente bloqueadas con dicumarol durante 24 horas (siempre bajo condiciones de ausencia de suero). Para estos experimentos fue necesario usar una dosis de orotato y dihidroorotato de 1 mM porque estas dos sustancias no son eficientemente incorporadas por las células (Wolhueter *et al.*, 1980). El efecto del orotato fue similar al de 25 μM uridina, liberando ambos a las células de su detención en la fase S incluso a las 9,5 horas de tratamiento. Sin embargo, el tratamiento con dihidroorotato no logró revertir el bloqueo (Figura 27), lo que demuestra que el dicumarol afecta a la ruta de biosíntesis de nucleótidos de

pirimidina a nivel de la dihidroorotato deshidrogenasa y genera un déficit en los niveles de desoxinucleótidos de pirimidina.

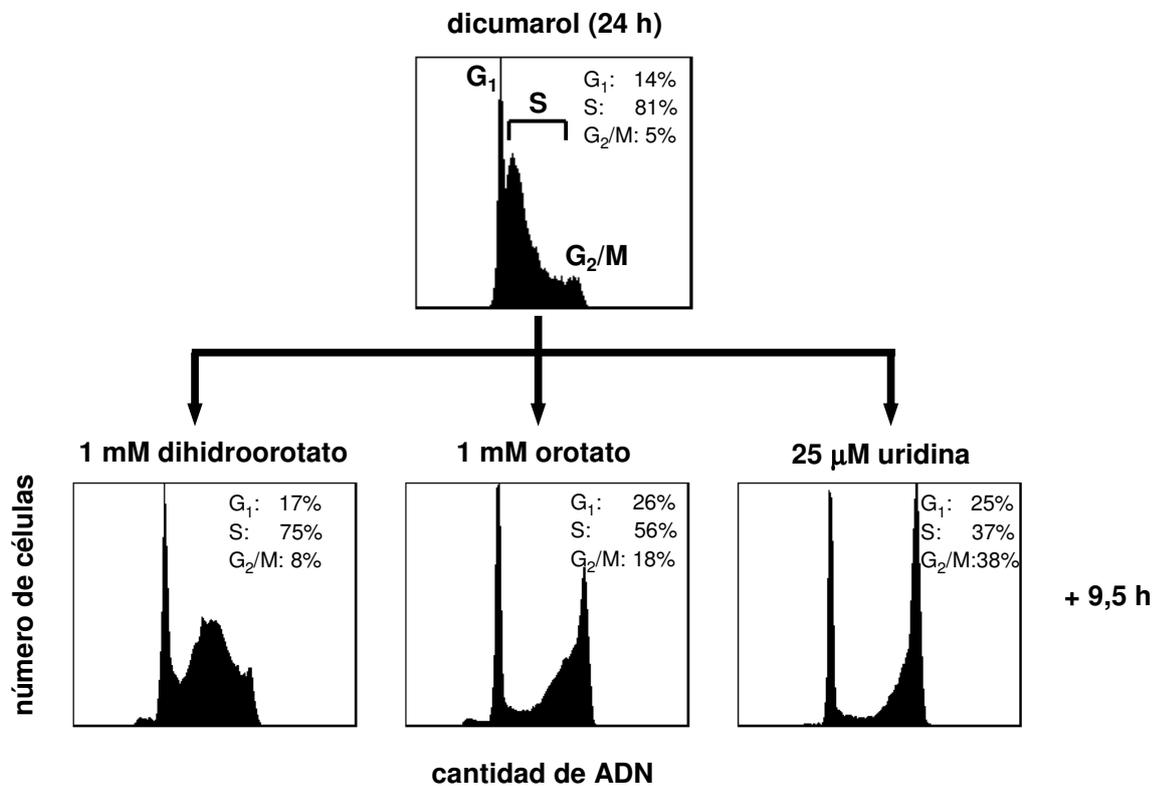


Figura 27: El dicumarol induce un bloqueo parcial en la fase S del ciclo celular de HL-60 porque afecta a la biosíntesis de los nucleótidos de pirimidina a nivel de la dihidroorotato deshidrogenasa. Las células fueron incubadas durante 24 horas en medio sin suero y posteriormente tratadas durante 24 horas adicionales con 5 μM dicumarol para concentrar la mayor parte de la población en la fase S del ciclo (*histograma dicumarol 24 h*). A continuación se aplicaron los tratamientos con 1 mM dihidroorotato, 1 mM orotato o 25 μM uridina para investigar el papel de la dihidroorotato deshidrogenasa. Transcurridas 9 horas, las células se recogieron y se midió la distribución en las distintas fases del ciclo con el citómetro de flujo usando como sonda el yoduro de propidio. Como puede observarse, el orotato y la uridina desbloquean de manera más o menos similar a las células detenidas en la fase S por el dicumarol; el dihidroorotato, por el contrario, no logró revertir el bloqueo, lo cual indica que la actividad dihidroorotato deshidrogenasa de la biosíntesis de las pirimidinas se afecta por el tratamiento con dicumarol, ocasionando un déficit de nucleótidos dCTP y dTTP que conlleva la retención de la población celular en la fase S del ciclo.

Con el objetivo de verificar que la dihidroorotato deshidrogenasa era realmente necesaria para que las células HL-60 completen la fase S del ciclo celular se llevó a cabo la incubación, en ausencia de suero, con diversas dosis de A77 1726 (2-ciano-3-hidroxi-*N*-(4-trifluorometilfenil)-butenamida), el principio activo de un inhibidor específico de la dihidroorotato deshidrogenasa llamado leflunomida, y se analizó la distribución de la población celular por citometría de flujo (Figura 28; Rückemann *et al.*, 1998; Breedveld *et al.*, 2000).

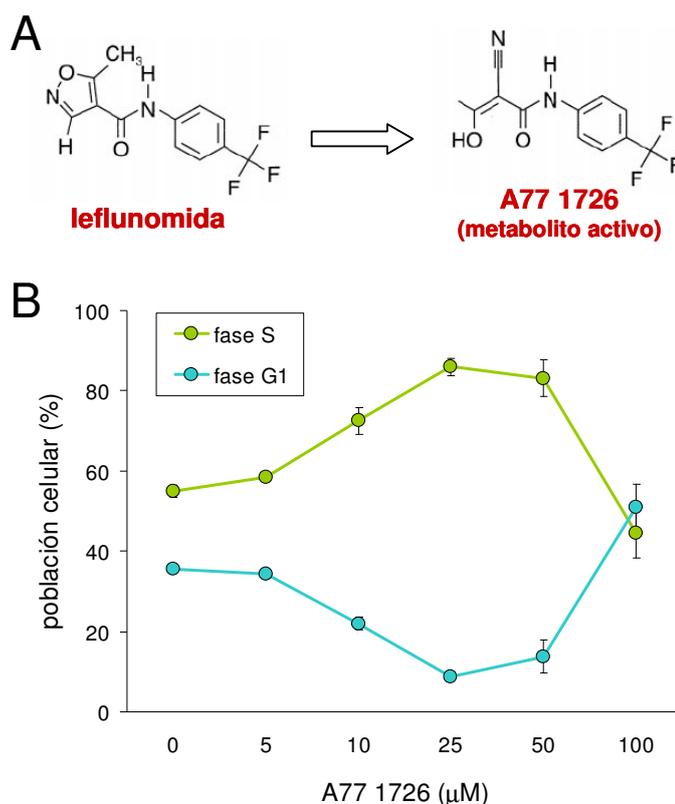


Figura 28: La inhibición de la actividad dihidroorotato deshidrogenasa con leflunomida induce la acumulación de la población celular en la fase S del ciclo. (A) Estructura química de la leflunomida y su metabolito activo, A77 1726. La leflunomida es una prodroga que se modifica en el tracto gastrointestinal y en el plasma para formar su metabolito activo A77 1726 (2-ciano-3-hidroxi-*N*-(4-trifluorometilfenil)-butenamida). Se ha demostrado que A77 1726 inhibe la actividad dihidroorotato deshidrogenasa porque actúa a dos niveles: como un inhibidor competitivo del sitio de unión de la ubiquinona y como inhibidor no competitivo del sitio de unión del dihidroorotato, sustrato natural de la enzima (Breedveld & Dayer, 2000). (B) Dosis-respuesta del A77 1726 sobre la fase S en HL-60. Al tratar durante 24 horas las células HL-60 con diversas dosis de A77 1726, previa retirada de suero, se observó un aumento de la población en la fase S proporcional a la concentración utilizada, indicando que la inhibición progresiva de la actividad dihidroorotato deshidrogenasa provoca un déficit de nucleótidos de pirimidina necesarios para la síntesis de ADN. Con 100 μM A77 1726 las células ven dificultada la transición G₁/S. Se ha representado la media ± desviación estándar (n = 3).

El resultado obtenido dependió de la dosis de A77 1726 empleada: a más concentración, mayor proporción de población celular en fase S con el consiguiente descenso de la población en G₁. Se alcanzó un máximo de retención con 25-50 μM, de modo que dosis superiores producían tal déficit en los niveles de pirimidinas que las células no pasaban de G₁ a S sino que quedaban retenidas a las puertas de la fase S sin llegar a entrar en ella. Así, de 50 μM a 100 μM A77 1726 se produjo un descenso de la población en S desde el 83,2% al 44,5%, mientras que en G₁ se pasó del 13,75% al 51%. Este efecto es el mismo que se observó para el dicumarol, si bien no tenemos datos suficientes para señalar que la inhibición causada por el dicumarol tenga lugar directamente sobre la dihidroorotato deshidrogenasa, como ocurre con el metabolito activo de la leflunomida. Cabe la posibilidad de que la acción del dicumarol sobre la cadena respiratoria electrónica, especialmente por la inhibición de los Complejos III y IV, afecte de manera indirecta a la síntesis de pirimidinas porque la actividad dihidroorotato deshidrogenasa depende del correcto funcionamiento del flujo de electrones por los complejos respiratorios (Evans *et al.*, 2004; Gatterman *et al.*, 2004; Beuneu *et al.*, 2000).

Para comprobar que la inhibición de la cadena de transporte electrónico mitocondrial aguas arriba de la ubiquinona produce el bloqueo de las células HL-60 en la fase S del ciclo celular, cultivamos las células en las mismas condiciones utilizadas para la realización de los experimentos con dicumarol y las tratamos con antimicina A y estigmatelina, inhibidores de cada uno de los sitios de unión de la ubiquinona al Complejo III (Q_i y Q_o respectivamente). A las 24 horas de tratamiento, las células se recogieron, se fijaron con etanol y se tiñeron con yoduro de propidio para analizar la distribución en las fases del ciclo. Ambos inhibidores dieron lugar a una significativa acumulación de la población en la fase S del ciclo (Figura 29). Se obtuvo el 77,05 ± 3,04 % en fase S con 50 nM antimicina A y el 89,35 ± 3,61 % con 3 nM estigmatelina respecto al 35,7 ± 1,84 % en el control (n=3, p < 0,001 para ambos casos), sin compromiso de la viabilidad celular como demostró la práctica ausencia de células que emitieran señal de yoduro de propidio por debajo de G₁.

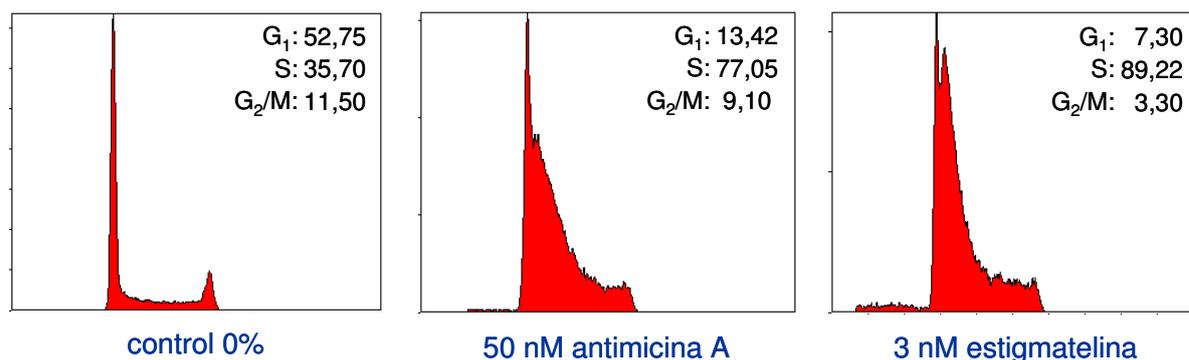
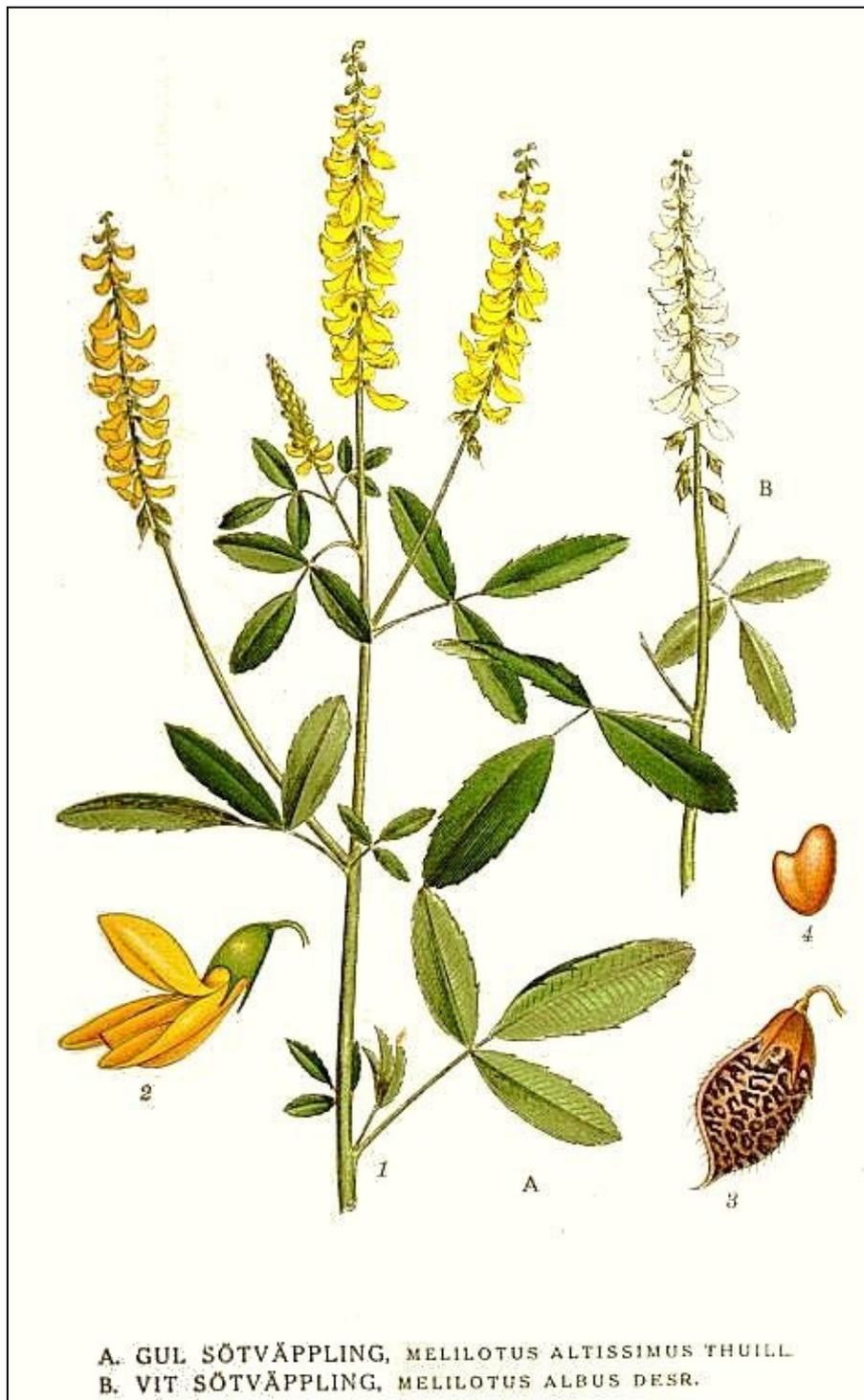


Figura 29: El tratamiento de HL-60 con inhibidores del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial provoca la acumulación de la mayor parte de la población celular en la fase S del ciclo por el desajuste de la biosíntesis de nucleótidos de pirimidina. Los inhibidores del complejo III antimicina A y estigmatelina, que bloquean respectivamente la unión de la ubiquinona a los sitios Q_i y Q_o del complejo, modifican la distribución normal de la población celular en las distintas fases del ciclo. El tratamiento de 24 horas en ausencia de suero con cada uno de estos inhibidores induce significativamente la acumulación de las células en la fase S. Este fenómeno, observado también con dicumarol, se explica porque la alteración del flujo electrónico de la cadena respiratoria mitocondrial repercute directamente en la dihidroorotato deshidrogenasa, una enzima de la ruta biosintética de los nucleótidos de pirimidina que utiliza el *pool* de ubiquinona/ubiquinol de la membrana interna mitocondrial. La detención de la actividad dihidroorotato deshidrogenasa impide la formación de los monómeros necesarios para la replicación del ADN en la fase S, dando lugar a la retención de las células.

En resumen, nuestros datos demuestran que la interferencia del dicumarol en la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial afecta a la biosíntesis de los nucleótidos de pirimidina con la consiguiente detención de la replicación del ADN y la acumulación de la mayor parte de la población celular en la fase S del ciclo.



A. GUL SÖTVÄPPLING, MELILOTUS ALTISSIMUS THUILL.
B. VIT SÖTVÄPPLING, MELILOTUS ALBUS DESR.

discusión

dicumarol y HL-60

Imagen de fondo de la página anterior: Dibujo del trébol dulce (*Melilotus sp.*), planta en la que se descubrió el dicumarol.

El tratamiento de células de cáncer de páncreas (Cullen *et al.*, 2003; Lewis *et al.*, 2004) y de células mieloides HL-60 (Bello *et al.*, 2005) con el anticoagulante dicumarol produce un notable incremento en la producción de superóxido intracelular. Esta propiedad del dicumarol ha dado lugar al estudio de su potencial antitumoral puesto que el exceso de especies reactivas de oxígeno en las células es un factor que induce su muerte (Dröge W, 2001), de modo que la inhibición del crecimiento observada en algunas líneas tumorales tratadas con dicumarol se ha atribuido a la sobreproducción de especies reactivas. Sin embargo aún no se ha descrito con claridad el mecanismo por el cual esta sustancia estimula la generación del radical superóxido y se obvia que se debe a su conocida acción inhibidora de la actividad de la NQO1 (Cullen *et al.*, 2003; Lewis *et al.*, 2004), una enzima implicada en el mantenimiento del balance redox celular que utiliza indistintamente NADH o NAD(P)H para reducir sustratos quinónicos (Lind *et al.*, 1990). Esta idea se refuerza con una investigación reciente que señala el papel de la NQO1 como *scavenger* de superóxido con las consiguientes implicaciones que esta nueva función tendría en el contexto celular (Siegel *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2007). De esa manera, además, se justificaría por qué las células cancerosas que sobreexpresan NQO1, como las pancreáticas, son tan sensibles al dicumarol.

A pesar de estos resultados, las consecuencias del tratamiento con dicumarol no pueden interpretarse a la ligera porque se han descrito otras dianas de esta sustancia que podrían explicar de forma parcial o total los efectos atribuidos inicialmente a la inhibición de la actividad NQO1:

- 1) En los años 60 del siglo pasado se publicaron numerosos estudios sobre el dicumarol como desacoplante de la actividad mitocondrial (Howland, 1968; Wilson & Merz, 1969) (los desacoplantes son sustancias de diversa naturaleza que disipan el gradiente de protones generado durante el transporte electrónico mitocondrial e impiden la síntesis de ATP). Esta característica del dicumarol pasó poco a poco a un segundo plano cuando se descubrió su carácter inhibidor de la actividad NQO1 (Ernster *et al.*, 1960) de modo que hasta hace un par de años prácticamente ningún trabajo sobre el dicumarol hace referencia a su acción en la mitocondria. Luego volveremos a este aspecto.

2) Se ha descrito la inhibición *in vitro* de la UDP-glucuronosiltransferasa por dicumarol (Segura-Aguilar *et al.*, 1986).

3) El dicumarol afecta a las enzimas glutatión transferasa y glutatión peroxidasa II en el rango de concentraciones usadas normalmente para inhibir NQO1 (Mays & Benson 1992).

4) También modula la actividad de la xantina deshidrogenasa y de la xantina oxidasa en el metabolismo de algunos antitumorales como mitomicina C (Gustafson & Pritsos, 1992).

5) Algunos derivados de la cumarina, entre ellos el dicumarol, afectan a la ruta mediada por SAPK/JNK y NF- κ B, potenciando la apoptosis celular (Cross *et al.*, 1999).

6) Se ha comprobado que el dicumarol induce de manera específica la fragmentación de las zonas tubulares no compactas del aparato de Golgi formando vesículas, sin afectar al resto de endomembranas. Este efecto se debe a la inhibición de la ADP-ribosilación de la proteína CtBP3/BARS (Mironov *et al.*, 2004).

7) El tratamiento con dicumarol bloquea completamente las uniones comunicantes (*gap junctions*) dependientes de la conexina 43 sin que se haya observado implicación de la NQO1 (Abdelmohsen *et al.*, 2005).

8) Aunque se describió que el dicumarol contribuye a la estabilización de los microtúbulos (Madari *et al.*, 2003), este efecto se ha puesto más tarde en entredicho (Buey *et al.*, 2005).

9) Como ya se señaló en la introducción, se ha confirmado con numerosos estudios que el dicumarol desestabiliza la unión de NQO1 con proteínas de vida corta como los supresores tumorales p53 y p73, y con la ornitina decarboxilasa, e induce su degradación proteasomal (Anwar *et al.*, 2003; Asher *et al.*, 2000; 2002; 2003; 2005; Gong *et al.*, 2007; Kahana *et al.*, 2005). Este efecto se debe a la modificación conformacional de NQO1 al ser ocupado el sitio de unión del NAD(P)H

por el dicumarol (Asher *et al.*, 2006), lo que desestabiliza su interacción física con las proteínas antes mencionadas.

10) Recientemente se ha descrito que el dicumarol provoca la disminución de la expresión de la securina, una proteína implicada en la unión de las cromátidas hermanas. Dicha acción está mediada por la chaperona Hsp90, a la que el dicumarol inhibe (Hernández *et al.*, 2008).

Estos precedentes invitan a estudiar con profundidad y prudencia los efectos provocados por el dicumarol y no atribuirlos simplemente a su carácter de inhibidor de NQO1. Nuestro grupo había descrito que el tratamiento de las células leucémicas humanas HL-60 con dicumarol produce dos efectos llamativos: el incremento en los niveles del radical superóxido y la acumulación de la mayor parte de la población celular en la fase S del ciclo (Bello *et al.*, 2005). El objetivo de este trabajo fue precisamente elucidar en la línea HL-60 los mecanismos celulares que explicaran la relación entre la generación de radical superóxido, las alteraciones en la proliferación celular y el tratamiento con dicumarol.

1. Mecanismos implicados en la producción de superóxido por el dicumarol.

El tratamiento de las células HL-60 con dicumarol induce una clara sobreproducción del radical aniónico superóxido que varía con la concentración y el tiempo. Como el dicumarol debe administrarse sin suero porque se une a la seroalbúmina, se llevó a cabo una preincubación previa a los tratamientos de 24 horas en medio sin suero con el fin de adaptar el cultivo a las nuevas condiciones y mejorar su viabilidad (Bello RI *et al.*, 2001). Los niveles máximos de superóxido se alcanzan entre las 4 y las 6 horas de tratamiento para posteriormente reducirse de manera progresiva en las incubaciones más largas (Figura 15), descenso que puede explicarse por la inducción de una respuesta antioxidante descrita en células HL-60 cultivadas durante 32 horas en medio sin suero (Gómez-Díaz *et al.*, 2003).

Dada la relativamente baja especificidad del dicumarol y los numerosos efectos que se le atribuyen era importante clarificar si el más característico de ellos,

la inhibición de NQO1, explicaría el incremento de los niveles de superóxido. El uso de la indolquinona ES936, un nuevo inhibidor de la NQO1 irreversible y más selectivo que el dicumarol (Dehn *et al.*, 2003), nos ha permitido demostrar que, aunque los niveles de superóxido incrementan ligeramente en las células HL-60 cuando NQO1 es completamente inhibida por el ES936, el dicumarol sigue produciendo en esas condiciones un importante aumento de esta especie reactiva que, lógicamente, no puede ser explicado por la inactivación de NQO1 (Figura 16). Este resultado contrasta con estudios realizados con dicumarol (Cullen *et al.*, 2003; Lewis *et al.*, 2004) y ES936 (Dehn *et al.*, 2006) en células pancreáticas tumorales, en las que se observan efectos citotóxicos que se atribuyen a un incremento de los niveles de superóxido causado por la inhibición de NQO1.

Al comienzo de la discusión se han señalado otras acciones descritas para el dicumarol entre las que vamos a destacar sus efectos en la fisiología mitocondrial. En numerosos trabajos se utiliza el dicumarol como desacoplante (Howland, 1968; Wilson & Merz, 1969; Herst *et al.*, 2004). Los desacoplantes son compuestos que disipan por diversos mecanismos el gradiente energético originado por la cadena respiratoria mitocondrial (fuerza protón-motriz) afectando, entre otros aspectos, a la producción de ATP. El desacoplamiento de la función mitocondrial da lugar a la pérdida de la energía debida al transporte de electrones en forma de calor y a un aumento en el consumo de oxígeno. El dicumarol pertenece a un grupo de ácidos débiles lipofílicos que actúan como transportadores de H⁺ desde el espacio intermembrana hacia la matriz atravesando la membrana interna mitocondrial (Wallace & Starkov, 2000). Su acción como desacoplante estimula el consumo mitocondrial de oxígeno en células HL-60 (Herst *et al.*, 2004) y en mitocondrias aisladas de las líneas celulares EMT6 y CHO, además de incrementar los niveles totales de especies reactivas de oxígeno (Collier & Pritsos, 2003). Por otra parte, mediante estudios de fraccionamiento subcelular se han encontrado pequeñas cantidades de NQO1 en fracciones mitocondriales de diversas especies (Edlund *et al.*, 1982). De hecho, cuando NQO1 fue descubierta se supuso que esta enzima podía participar directamente en la cadena respiratoria mitocondrial (Conover *et al.*, 1962). Más aún, en un trabajo reciente se apuntó esta posibilidad para justificar la producción de superóxido tras el tratamiento con dicumarol, aunque no se presentó ninguna prueba directa que lo demostrara (Lewis *et al.*, 2004). Los estudios de inmunolocalización apuntan, sin embargo, que la presencia de NQO1 en la

mitocondria podría ser un artefacto del fraccionamiento subcelular (Winski *et al.*, 2002).

Puesto en duda el papel fisiológico de una posible NQO1 mitocondrial y apoyándonos en la acción del dicumarol en este orgánulo centramos ahora nuestra atención en la cadena respiratoria, considerada precisamente la principal fuente celular de especies reactivas de oxígeno (Boveris *et al.*, 1972). Al enfocar nuestras investigaciones en la posible acción del dicumarol en las mitocondrias de HL-60 hemos obtenidos tres resultados:

1) En primer lugar, el tratamiento con dicumarol de una línea celular derivada de HL-60 y deficiente en el funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial (HL-60 ρ^0) no produjo un incremento significativo de los niveles de superóxido intracelular (Figura 17), lo cual indica que el origen en la producción de este radical depende de los componentes de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

2) Por otro lado, al medir en fracciones mitocondriales la actividad de los distintos complejos enzimáticos de la cadena respiratoria se observó una notable inhibición de los Complejos II y IV; la actividad del Complejo III también se vio alterada aunque en menor grado. En el caso del Complejo II, la inhibición era inversamente proporcional a la concentración de succinato, donador natural de electrones del complejo. A medida que aumentó la concentración de succinato disminuía el grado de inhibición por dicumarol, lo que está de acuerdo con el carácter de inhibidor competitivo de la actividad succinato deshidrogenasa descrito para el dicumarol (Wilson & Merz, 1969). Trabajos previos han hecho referencia a la acción de otros derivados de la cumarina en la mitocondria. Es llamativo el caso de la surangina B, usada como insecticida, que inhibe *in vitro* los Complejos mitocondriales II, III y IV en mitocondrias de corazón de bovino sin afectar, por el contrario, al Complejo I (Deng & Nicholson, 2005), lo que coincide plenamente con nuestros resultados obtenidos con dicumarol.

3) Finalmente se estudió el incremento de superóxido tras el tratamiento con dicumarol tanto en fracciones mitocondriales por espectrofotometría (reducción de citocromo *c* sensible a SOD) como en células enteras por citometría de flujo

(oxidación de la sonda HET). En ambos casos, el efecto del dicumarol fue revertido significativamente por la adición de succinato (Figuras 19 y 20).

Normalmente se ha señalado a los Complejos I y III como los principales responsables de la generación de especies reactivas en la mitocondria (Barja, 1999; Lenaz, 2001; Turrens, 2003; Muller *et al.*, 2004). Sin embargo, nuestros resultados apuntan al Complejo II como origen del incremento de superóxido debido al dicumarol:

a) Si la fuente de superóxido fuera el Complejo III, la producción se favorecería al añadir succinato pues se ha descrito que la entrada de electrones a la cadena respiratoria por el Complejo II genera más superóxido en el Complejo III que cuando dicha entrada tiene lugar por el Complejo I (Lenaz, 2001).

b) Otra posibilidad sería que el superóxido se generara por flujo inverso de electrones en el Complejo I. Se ha señalado, precisamente, que los mayores índices de formación de este radical en la mitocondria se obtienen cuando el Complejo I funciona en sentido contrario, por ejemplo, en condiciones en que se acumula ubiquinol; en esa situación, los electrones procedentes del succinato se utilizan para reducir NAD^+ a NADH fluyendo en sentido contrario a través del Complejo I (Muller *et al.*, 2008). Nuestros resultados, sin embargo, no sostendrían esta hipótesis pues la producción de superóxido por flujo contrario de electrones en el Complejo I es directamente proporcional a la cantidad de succinato (Muller *et al.*, 2008). Por el contrario, hemos podido comprobar que la producción de superóxido tras el tratamiento con dicumarol se inhibe por succinato lo que descarta el flujo inverso de electrones en el Complejo I como la fuente de este radical libre.

Los datos obtenidos con el succinato apuntan, por tanto, a la participación del Complejo II. Aunque por detrás de los Complejos I y III, cada vez más estudios destacan la importancia de este componente de la cadena respiratoria mitocondrial en la producción de especies reactivas de oxígeno. El Complejo II mitocondrial (124 KDa) está integrado por cuatro subunidades codificadas por genes nucleares (SdhA, SdhB, SHCD y SdhD). Se encuentra integrado en la membrana interna mitocondrial y participa en el ciclo de Krebs oxidando el succinato a fumarato en la matriz (actividad succinato deshidrogenasa). Al mismo tiempo la oxidación del

succinato está acoplada a la reducción de la ubiquinona para generar ubiquinol (actividad succinato:ubiquinona oxidorreductasa) participando de este modo en la cadena de transporte electrónico de la mitocondria (Cecchini, 2003; Sun *et al.*, 2005). Aunque se conocían con detalle los componentes del complejo, el primer estudio cristalográfico en mamíferos se ha realizado recientemente con proteínas de corazón de cerdo (Sun *et al.*, 2005). En él se confirmó que este complejo consta de cuatro proteínas: una flavoproteína con una molécula de FAD, una proteína sulfoférrica (con tres grupos sulfoférricos: [2Fe-2S], [4Fe-4S] y [3Fe-4S]) y dos proteínas de anclaje a la membrana mitocondrial interna (CybL y CybS), que contienen un grupo hemo (citocromo b_{560}). Se comprobó, además, la existencia de dos sitios de unión de la ubiquinona: el sitio Qp (proximal, orientado hacia el lado de la matriz) y Qd (distal, más cercano al espacio intermembrana). En un estudio posterior realizado con la succinato deshidrogenasa de pollo se señala la existencia de un único sitio de unión de la ubiquinona que equivaldría al sitio Qd (Huang *et al.*, 2006). El recorrido teórico que seguirían los electrones procedentes de la oxidación del succinato sería FAD-[2Fe-2S]-[4Fe-4S]-[3Fe-4S]-hemo b para finalmente llegar a los sitios de unión de la ubiquinona y formar ubiquinol. Luego volveremos a este aspecto.

Hay que señalar que, en determinadas situaciones –hipoxia (Paddenberg *et al.*, 2003), anaerobiosis, membrana mitocondrial muy energizada como, por ejemplo, en el estado 4, en el que hay flujo de electrones pero no se produce fosforilación oxidativa, (Yu *et al.*, 1987)- se ha descrito que el flujo de electrones puede ir en sentido inverso al habitual y el Complejo II actuar como fumarato reductasa: reduce el fumarato a succinato y oxida el ubiquinol a ubiquinona (Hägerhäll, 1997). En bacterias, las actividades succinato deshidrogenasa y fumarato reductasa se localizan en enzimas diferentes y se activan en condiciones de aerobiosis o anaerobiosis respectivamente a pesar de que ambas pueden catalizar las mismas reacciones tanto *in vivo* como *in vitro* (Yankovskaya *et al.*, 2003; Cecchini, 2003). A esto se añade que, en presencia de oxígeno, ambas enzimas producen superóxido aunque la fumarato reductasa genera 25 veces más que la succinato deshidrogenasa. Parece que la formación del radical se debe a la autooxidación de una flavina, como ocurre en otras flavoenzimas, de modo que el exceso de succinato inhibe la autooxidación porque ocupa el sitio activo y obstruye el acceso del oxígeno a la flavina reducida (Messner & Imlay, 2002). En *Saccharomyces cerevisiae*

también se ha descrito la producción de superóxido en formas mutantes de la succinato:ubiquinona oxidorreductasa, si bien, a diferencia de bacterias, la generación de radicales libres se debe a su acción succinato deshidrogenasa (no fumarato reductasa) y aumenta con la concentración de sustrato, por lo que se propone que la generación de superóxido se localiza en los sitios de unión de la ubiquinona y a la liberación de ubisemiquinonas intermediarias (Guo & Lemire, 2003). Algunos eucariotas que desarrollan parte de su ciclo vital en condiciones de anaerobiosis, como los helmintos, presentan una importante actividad fumarato reductasa gracias, en parte, a la presencia de rodoquinona en su membrana mitocondrial, un transportador de electrones que sustituye a la ubiquinona de eucariotas superiores (Kita *et al.*, 1988; Hägerhäll, 1997; Tielens & Van Hellemond, 1998). Estudios voltimétricos realizados con la succinato deshidrogenasa bovina en disolución, no unida a membrana, han demostrado que si la enzima dispone tanto de succinato como de fumarato puede realizar una catálisis bidireccional, de modo que la dirección predominante depende exclusivamente del potencial aplicado. La actividad fumarato reductasa en estos experimentos es muy significativa pero sólo en un estrecho rango de valores de potencial (Sucheta *et al.*, 1992; Pershad *et al.*, 1999).

Los resultados que hemos obtenido sobre la actividad del Complejo II en presencia de dicumarol y con distintas concentraciones de succinato mostraron que ambos compuestos competían por el sitio activo del Complejo (Figuras 19 y 20), como ya se publicó en los primeros estudios sobre el dicumarol como desacoplante mitocondrial (Wilson & Merz, 1969). Se observó, además, una disminución significativa para concentraciones situadas dentro del rango fisiológico descrito para el succinato en la matriz mitocondrial (1-3 mM, Williamson & Corkey, 1969). Si el dicumarol está desplazando al succinato del sitio activo del Complejo II podría provocar la generación de especies reactivas al perderse uno de los eslabones de la cadena de transporte electrónico. Esta producción además se favorecería por la acción inhibitoria del dicumarol sobre los Complejos III y IV. Hay un claro consenso en que la velocidad de producción de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria aumenta en función del grado de reducción de los transportadores electrónicos autooxidables (Boveris & Chance 1973; Barja, 1999). Cuando se bloquea la cadena respiratoria con un inhibidor se incrementa el estado de reducción de los transportadores de electrones hacia el lado del sustrato del inhibidor mientras

que los que se sitúan al otro lado, hacia el oxígeno, cambian a un estado más oxidado (Barja 1999). La inhibición simultánea de los Complejo III y IV llevan a los transportadores anteriores –Complejos I y II- a un estado de mayor reducción. De esta manera podría explicarse en parte el incremento del consumo mitocondrial de oxígeno en las células tratadas con dicumarol (Herst *et al.*, 2004), que se estaría empleando en la formación de radicales libres. Por otro lado, la interrupción de la cadena respiratoria a nivel de los Complejos III y IV genera una situación similar a la hipoxia alterando gravemente la fisiología mitocondrial. Precisamente se ha descrito que en tal situación el Complejo II actúa en sentido inverso y genera superóxido (Paddenberg *et al.*, 2003).

Fisiológicamente, esta generación de radicales libres resulta muy interesante. Numerosos trabajos señalan la implicación de diversas alteraciones del Complejo II como causa de estrés oxidativo y tumorigénesis. Estudios realizados con *Caenorhabditis elegans* que presentan una mutación en el gen que codifica para el citocromo *b* presente en la succinato deshidrogenasa (*mev-1*) demuestran que dicha alteración reduce la actividad del complejo en un 80% e induce la producción de superóxido, provocando hipersensibilidad al oxígeno y el envejecimiento prematuro del animal (Ishii *et al.*, 1998). La misma mutación en una línea celular de ratón reduce la actividad del Complejo II al 40% y provoca la producción de superóxido, apoptosis, envejecimiento prematuro, degeneración neuronal y tumorigénesis (Ishii *et al.*, 2005). Otra investigación realizada en una línea celular CHO mutante para uno de los genes del Complejo II (gen *sdhC*) demuestra la sobreproducción de superóxido y la aparición de aneuploidías (Slane *et al.*, 2006). En el ser humano, las mutaciones de los genes que codifican para la succinato deshidrogenasa se relacionan con un tipo de encefalopatía denominada síndrome de Leigh y con el desarrollo de paragangliomas (tumores del cuerpo carotídeo) y feocromocitomas (tumores de la médula adrenal) (Rustin *et al.*, 2002). Es posible que haya una estrecha relación entre la producción de especies reactivas de oxígeno asociada a las alteraciones del Complejo II y las patologías señaladas.

Aunque se ha avanzado mucho en el conocimiento de la generación de superóxido por flujo inverso en el Complejo II en mamíferos, todavía no se tiene claro cuál es la fuente de electrones para esta producción. En nuestros experimentos con mitocondrias aisladas hemos observado, por una parte, que el dicumarol

estimulaba la formación de superóxido en presencia de decilubiquinol e inhibidores del Complejo III; por otra parte, confirmamos *in vivo* que el succinato inhibía completamente esta reacción, de modo que el *pool* de ubiquinol podría ser la fuente de electrones que hace posible el transporte inverso en el Complejo II. Al encontrarse inhibido el Complejo III por el dicumarol, una salida para el ubiquinol es el Complejo II, que utilizaría su poder reductor para convertir el fumarato a succinato. Parece que esta reacción no es completamente eficiente y parte de los electrones se derivan hacia la formación de superóxido (Figura 19). En presencia de un exceso de succinato, la reacción inversa se detiene y con ella la producción de radicales. Este efecto inhibitor del succinato se explicaría si la succinato deshidrogenasa está actuando en realidad como fumarato reductasa, es decir, haciendo circular los electrones en sentido contrario al habitual. El transporte se detendría por el exceso del metabolito de la reacción, el succinato. Si el succinato es reemplazado por dicumarol en el sitio activo los electrones del ubiquinol no se orientan hacia la reducción del fumarato, favoreciéndose la reacción de algunos de los intermediarios del Complejo II que están en estado reducido con el oxígeno molecular y generando, finalmente, superóxido. El estudio de la producción de superóxido tras la inhibición del Complejo II con ácido 3-nitropropiónico (3-NPA) ha llevado a una hipótesis basada también en la detención del flujo inverso de electrones, esto es, de la actividad fumarato reductasa; según los autores, esta situación da lugar a un incremento de los niveles del radical ubisemiquinona en los sitios de unión del coenzima Q, que cede un electrón al oxígeno generando superóxido (Bacsi *et al.*, 2006).

Sin embargo, atribuir la producción de superóxido al flujo inverso de electrones en el Complejo II presenta una dificultad importante. Para la oxidación de succinato a fumarato ($E^{o'} = + 30$ mV), la succinato deshidrogenasa de mamíferos utiliza la ubiquinona, un aceptor de electrones con un relativamente alto potencial electrónico ($E^{o'} = + 113$ mV). La fumarato reductasa, por otro lado, cataliza la reacción contraria: un donador cede dos electrones para que sean transferidos al fumarato, reduciéndose a succinato. Para ello interacciona con quinonas con un potencial electrónico más bajo que el de las quinonas utilizadas por la succinato deshidrogenasa. Se sabe que la mayoría de los procariotas usan la menaquinona ($E^{o'} = - 80$ mV) como donador para la reducción del fumarato. En algunos eucariotas –helmintos, *C. elegans*, mejillones, ostras o algunos caracoles de agua dulce- la

rodoquinona cumple esta misma función ($E^{\circ} = -63 \text{ mV}$), aunque, curiosamente, la estructura de la rodoquinona es más similar a la de la ubiquinona (ambas son benzoquinonas) que a la de la menaquinona (que es una naftoquinona). Los organismos con rodoquinona se caracterizan porque realizan todo o parte de su ciclo vital en condiciones de anaerobiosis (excepto *C. elegans*) y porque llevan a cabo la dismutación del malato, un proceso fermentativo por el que se produce acetato y succinato a partir de glucosa. Posteriormente tendría lugar la oxidación del succinato a fumarato, que se acopla al transporte electrónico mitocondrial (Tielens & Van Hellemond, 1998; Takayima *et al.*, 1999; Van Hellemond *et al.*, 2002). En mamíferos, como hemos señalado anteriormente, se acepta que la succinato deshidrogenasa funciona en ciertas condiciones como fumarato reductasa, pero hay mucha controversia sobre si esto ocurre realmente *in vivo*. Algunos trabajos así lo sugieren (Paddenberg *et al.*, 2003; Bacsí *et al.*, 2006). Nuestros resultados también apuntan a la inducción del flujo contrario de electrones en el Complejo II –aunque no hemos medido directamente la actividad fumarato reductasa- y a la consiguiente formación de especies reactivas, pero no podríamos indicar cuál es la fuente de electrones para este proceso ante la ausencia de rodoquinona en el ser humano.

Para estudiar el posible papel como donador de electrones del par ubiquinona/ubiquinol en la producción de superóxido por dicumarol hicimos uso de la 2-tenoiltrifluoroacetona (TTFA), un conocido inhibidor que impide la interacción de la ubiquinona con el Complejo II. El estudio de la estructura cristalina de este complejo ha permitido la identificación de dos sitios de unión de la ubiquinona separados físicamente llamados sitio proximal (Qp) y sitio distal (Qd), en los que la TTFA se une, respectivamente, con alta o baja afinidad (Sun *et al.*, 2005). Este dato es coherente con el de una publicación anterior que ya apuntaba la existencia en el Complejo II de dos sitios de inhibición por TTFA: uno de ellos se ocuparía a una concentración en torno a 20 μM (sitio Qp) y el otro a dosis más altas (sitio Qd) (Xu & King, 1992). En los experimentos que hemos llevado a cabo con HL-60 probamos el efecto de la TTFA a 25 y 50 μM . Para cualquiera de estas no se registraron alteraciones en los niveles de superóxido en ausencia de dicumarol tanto en los tratamientos de 4 horas como en los de 24 horas (Figura 21). La concentración de 25 μM TTFA, que se uniría al sitio de alta afinidad Qp, no afectó significativamente a los valores de radical superóxido en las células tratadas con dicumarol lo que nos lleva a descartar el papel del exceso de ubiquinol –por la inhibición del Complejo III-

en la producción de superóxido *in vivo*. Los resultados del tratamiento con dicumarol y 50 μM TTFA, que bloquea tanto Qp como Qd, fueron llamativamente diferentes a los de 25 μM pues se potenció notablemente la generación de radical superóxido a las 4 y a las 24 horas. Esta estimulación señala que el flujo inverso de electrones está funcionando y que, por tanto, el ubiquinol no participa en la producción de superóxido porque sus dos sitios de unión al Complejo II están bloqueados por sendas moléculas de TTFA; si interviniera el ubiquinol el resultado debería ser el contrario, es decir, un descenso en la señal inducida por el dicumarol. Pero si esto es así, ¿de dónde proceden los electrones que fluyen por el Complejo II en sentido contrario y permiten la generación de superóxido?

Los datos obtenidos del estudio estructural del Complejo II de mamíferos confieren gran importancia a un elemento que hasta ahora no había sido prácticamente considerado: el citocromo b_{560} . Aún no ha podido ser determinado con claridad su papel en el Complejo II tanto de bacterias como de mamíferos. Se ha señalado su importancia para la estabilidad de la enzima en procariotas que presentan tanto uno como dos hemo; sin embargo, su papel en el transporte electrónico plantea muchos interrogantes. El grupo hemo de *E. coli* ($E^{\circ'} = + 35 \text{ mV}$) es completamente reducido por el succinato mientras que el bajo potencial del hemo de mamíferos ($E^{\circ'} = - 185 \text{ mV}$) impide su reducción por succinato incluso en anaerobiosis, por lo que se considera que no participa en la oxidación del succinato (Yu *et al.*, 1987; Hägerhäll, 1997; Yankovskaya *et al.*, 2003). Sin embargo, una vez reducido, el hemo *b* de mamífero es rápidamente oxidado por el fumarato, sugiriendo su posible implicación en la actividad fumarato reductasa, es decir, en el flujo inverso de electrones en el Complejo II. (Yu *et al.*, 1987; Cecchini, 2003). La estructura de rayos X de *E. coli* sugería que el hemo *b* podría funcionar como “sumidero de electrones” (*electron sink*) previniendo la formación de especies reactivas de oxígeno en la enzima (Yankovskaya *et al.*, 2003). Un estudio más reciente en *E. coli* demuestra la participación real del hemo en la transferencia de electrones desde los centros sulfoférricos hacia la quinona (Anderson *et al.*, 2005). El menor potencial redox del hemo de mamífero lo haría menos efectivo para este fin a pesar de que al superponer las estructuras de ambas proteínas se observa una disposición muy similar de las quinonas, los centros sulfoférricos y el hemo (Yankovskaya *et al.*, 2003). Por otra parte, la reducción del hemo *b* se afecta significativamente por la concentración de ubiquinona/ubiquinol: la reducción es más lenta a bajas

concentraciones y se acelera en condiciones anaeróbicas y a niveles saturantes de ubiquinona. Una interpretación de estos datos es que el grupo [3Fe-4S] reduce directamente a la quinona sin mediación del hemo, pero en el flujo inverso de electrones, debido a la proximidad espacial, la ubiquinona cedería electrones al hemo (Cecchini, 2003; Sun *et al.*, 2005). Es decir, este grupo hemo aparentemente funciona como entrada de electrones para la reducción del fumarato pero no como salida de electrones en la oxidación de succinato (Hatefi & Galante, 1980; Yu *et al.*, 1987).

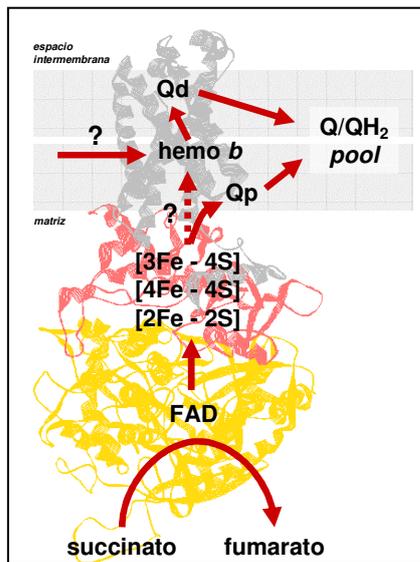
La cuestión es que si este citocromo no interviene habitualmente en la ruta electrónica a través del Complejo II de mamíferos, que va desde el succinato hasta la ubiquinona, quizá se reduzca mediante un mecanismo aún desconocido, lo que implicaría una entrada de electrones alternativa al succinato. Se ha señalado que en anaerobiosis el hemo *b* es reducido por NADH en presencia de NADH deshidrogenasa de tipo II (Yu *et al.*, 1987), de modo que el NADH aporta los electrones necesarios para la reducción final del fumarato a succinato. La NADH deshidrogenasa II es una enzima de la membrana mitocondrial interna que oxida NADH procedente del citosol o de la matriz mitocondrial y reduce la ubiquinona a ubiquinol, constituyendo una fuente de electrones secundaria de la cadena respiratoria mitocondrial. Se caracteriza, además, porque no bombea H⁺ al espacio intermembrana y por su resistencia a la inhibición con rotenona, lo que la distingue de la NADH deshidrogenasa o Complejo I mitocondrial. Aunque se ha señalado su existencia en procariontes y mitocondrias de hongos y plantas, por el momento no se ha demostrado su existencia en humanos (Lenaz *et al.*, 2007).

El estudio cristalográfico del Complejo II de cerdo ha aportado algo de luz a estas cuestiones. Como se ha señalado, las características del hemo *b* no favorecen su participación en el transporte de electrones originado por la oxidación del succinato, tanto por su bajo potencial como por su distancia al centro sulfoférrico más próximo, [3Fe-4S], lo que supone que los electrones llegan a la ubiquinona sin pasar por el hemo. Pero esto valdría para uno de los sitios de unión de la ubiquinona, el Qp, de mayor afinidad y orientado hacia la matriz mitocondrial. Se apunta la hipótesis de que los electrones lleguen a la ubiquinona del sitio de menor afinidad, Qd, orientado hacia el espacio intermembrana mitocondrial, pasando por los centros sulfoférricos y el hemo, de modo que la transferencia de electrones se

divide en dos para dirigirse a cada una de las ubiquinonas: la del sitio Qp sería reducida en primer lugar porque su posición es más favorable (sin intervención del hemo); la del sitio Qd recibiría los electrones, pasando por el hemo, en caso de que el sitio Qp esté saturado (Sun *et al.*, 2005). Un estudio bioinformático posterior confirma este mismo resultado y señala de nuevo la posibilidad de que el hemo intervenga en la reacción inversa recibiendo electrones de la ubiquinona del sitio Qd para reducir el fumarato (Moser *et al.*, 2006).

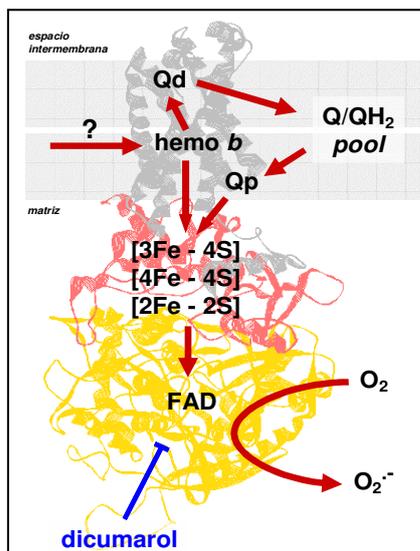
Teniendo presentes todos estos datos, una explicación de nuestros resultados es que, al bloquear los sitios de unión de la ubiquinona -Qd y Qp- con 50 μ M TTFA, se evita la salida de electrones desde el citocromo b_{560} reducido hacia el *pool* de ubiquinona, lo que fuerza a los electrones a seguir un camino inverso al habitual para reducir el fumarato a succinato. En presencia de este último se evita el flujo contrario de electrones y no se produce superóxido incluso bloqueando con TTFA. El dicumarol, sin embargo, desplaza al succinato y dirige la corriente inversa de electrones iniciada por el hemo *b* hacia la producción de superóxido, lo cual se favorece tapando las posibles salidas de este poder reductor hacia los sitios de unión de las ubiquinona con TTFA (Figura 30).

Fig. 30- Modelo propuesto para explicar la producción de superóxido por el Complejo II mitocondrial en células HL-60 tratadas con dicumarol.



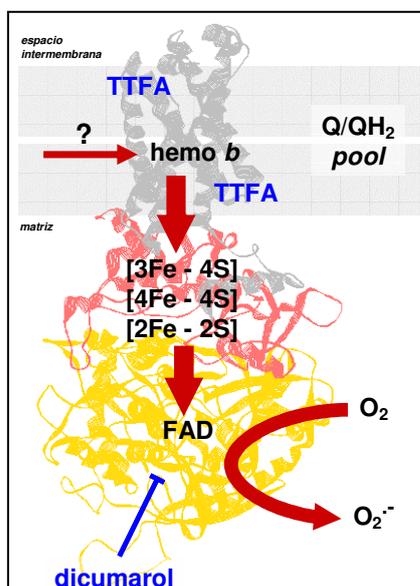
A) Flujo normal de electrones en el Complejo II.

Los electrones procedentes de la oxidación del succinato se transfieren a un FAD reduciéndolo a FADH₂ para continuar a través de la cadena de centros sulfoférricos [2Fe-2S], [4Fe-4S] y [3Fe-4S]. A partir de este punto hay mucha controversia sobre el papel del hemo *b*. Algunos estudios señalan que los electrones se bifurcan a este nivel. En principio se dirigen directamente a la ubiquinona que se sitúa en el sitio proximal Qp sin pasar por el hemo. La ubiquinona del sitio Qd se encuentra situada demasiado lejos para que puedan transferirse los electrones desde los centros sulfoférricos. El hemo podría orientarlos hacia Qd pero su bajo potencial ($E^{o'} = -185$ mV) y la distancia respecto al grupo [3Fe-4S] no favorecen el transporte electrónico. Es posible que exista un donador aún no identificado que le ceda sus electrones y permita su interacción con la ubiquinona del Qd.



B) El dicumarol estimula la producción de O₂⁻.

En presencia del dicumarol, la inhibición de los Complejos III y IV favorece el flujo inverso de electrones en el Complejo II porque se incrementa el nivel de reducción del Complejo II, se crea una situación similar a la hipoxia y se incrementa el *pool* de ubiquinol. En estas condiciones el Complejo II puede actuar como fumarato reductasa, permitiendo el transporte de electrones en sentido contrario al habitual. El dicumarol desplaza al succinato de su sitio activo, localizado en la subunidad flavoproteínica, lo que impide la reducción del fumarato. Al mismo tiempo se favorece la auto-oxidación del FAD y la reacción con el oxígeno molecular para formar O₂⁻. No se ha determinado si los electrones proceden inicialmente de la ubiquinona del sitio Qd, del Qp o de ambos simultáneamente. Como se señaló anteriormente, parece que el hemo *b* participaría únicamente como transportador de electrones cuando fluyen en sentido contrario al habitual.



C) El bloqueo de los sitios de unión de la ubiquinona con TTFA incrementa la producción de O₂⁻ debida al dicumarol.

El inhibidor TTFA bloquea específicamente los sitios de unión de la ubiquinona, impidiendo el intercambio de electrones entre el *pool* de ubiquinona/ubiquinol y el Complejo II. El tratamiento conjunto con dicumarol y una dosis suficiente para bloquear los sitios de la ubiquinona (50 μM TTFA) incrementaron notablemente la señal lo cual indica que están fluyendo electrones aportados por un donador no determinado. Posiblemente este donador reduzca el hemo *b* e inicia el flujo inverso hacia los grupos sulfoférricos, sin que puedan derivarse hacia la ubiquinona. El dicumarol ocupa el sitio del succinato y favorece que el FAD se auto-oxide formando O₂⁻.

Para realizar las figuras se ha utilizado la estructura descrita por Sun *et al.*, 2005 (código PDB: 1Z0Y) y el programa Swiss PDB-Viewer v4.0 (<http://spdbv.vital-it.ch/>). Cada subunidad del complejo se distingue con un color: flavoproteína (FAD, amarillo), proteína sulfoférrica (rosa), subunidad transmembranas (, citocromo b₅₆₀, hemo b, gris).

2. Mecanismos implicados en la acumulación de la población celular en la fase S por el dicumarol.

En la introducción hemos subrayado la importancia de las especies reactivas de oxígeno en el ciclo celular y en su correcto desarrollo. Numerosos estudios han demostrado cómo las especies reactivas de oxígeno pueden interferir el curso normal del ciclo celular porque producen alteraciones el material genético e inducen mecanismos de defensa en la célula como el bloqueo en los puntos de restricción (Menon & Goswami, 2007). Se ha descrito cómo el superóxido puede provocar lesiones en el ADN que llevan a un retraso transitorio en la progresión de la fase S o fase de replicación (Iliakis, 2003). Puesto que el tratamiento con dicumarol produce tanto la producción de superóxido como un bloqueo parcial en la fase S del ciclo de las células HL-60 nos propusimos estudiar si había alguna relación entre ambos fenómenos.

Al añadir un *scavenger* de superóxido, ambroxol, a cultivos de células HL-60 detenidas parcialmente en la fase S por el tratamiento con dicumarol pudimos comprobar que el bloqueo persistía (Figura 23). Este resultado indicaba claramente que la acumulación de la población celular en la fase proliferativa del ciclo no se debe al incremento en los niveles de superóxido de origen mitocondrial. La retirada del superóxido provocaba sólo un descenso en la transición G₁-S y el consiguiente descenso en el número de células en la fase S temprana. Este fenómeno ha sido ampliamente estudiado. Como hemos señalado al hablar de la interacción entre balance rédox y ciclo celular, es necesario cierto nivel pro-oxidante para inducir la replicación del material genético. El tratamiento con agentes reductores o antioxidantes, como ambroxol o *N*-acetilcisteína, detiene a la población celular en G₁ (Menon *et al.*, 2003; 2007). En un trabajo previo publicado por nuestro grupo ya se destacó el papel de superóxido y del dicumarol en la transición G₁-S en células HL-60 (Bello *et al.*, 2005).

Puesto que la alteración de la distribución de la población celular no guarda relación con la generación de superóxido cabría considerar que este efecto estuviera mediado por la inhibición de NQO1. Se ha descrito el papel de las enzimas antioxidantes en los mecanismos que controlan el ciclo por su acción reguladora del

estado de oxidación-reducción celular. La mayoría de los trabajos, como señalamos en la introducción, se refieren a las superóxido dismutasas y a la catalasa (Menon *et al.*, 2007). Cabe, por tanto, la posibilidad de que NQO1 esté implicada en el control del ciclo celular, de modo que su inhibición con dicumarol conduzca a una situación anómala como la que observamos, no sólo porque la actividad NQO1 regula los niveles de NAD(P)/NAD(P)H en la célula, sino también por sus otras acciones recientemente descritas:

a) NQO1 realiza una acción *scavenger* de superóxido que se inhibe por ES936; no se ha comprobado si el dicumarol también impide esta actividad (Siegel *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2007). Es posible que la inhibición de NQO1 suponga un incremento en los niveles de superóxido y de lugar a una alteración del estado redox celular que induzca el bloqueo en la fase S. Sin embargo, esta hipótesis queda descartada porque ya hemos señalado que la eliminación del superóxido con ambroxol – independientemente de la procedencia de esa especie reactiva- no permite a las células seguir progresando con la replicación de su material genético. Además, al tratar las células con ES936 no se repite la acumulación en fase S (Bello *et al.*, 2005).

b) NQO1 se une a p53 y la estabiliza, evitando su degradación independiente de ubiquitinación por proteasomas 20S. (Asher *et al.*, 2000, 2002, 2003, 2005; Anwar *et al.*, 2002). El dicumarol, a diferencia del inhibidor ES936, dificulta la interacción de ambas proteínas y favorece la degradación de p53 porque induce cambios conformacionales en la proteína mayores que los provocados por ES936 (Asher *et al.*, 2006). No obstante, se ha descrito que la línea celular HL-60 no expresa la proteína p53, lo que explica en buena parte su fenotipo tumoral (Wolf & Rotter, 1985), de modo que descartamos el papel de p53 en los efectos del dicumarol sobre el ciclo celular en esta línea.

Desechado, en principio, el papel de NQO1 nuestro objetivo fue buscar una diana que explicara la significativa acumulación de células en la fase S del ciclo. A diferencia de los resultados obtenidos por otros grupos utilizando células de cáncer de páncreas (Cullen *et al.*, 2003; Lewis *et al.*, 2004), el tratamiento con dicumarol en la línea HL-60 no tenía efectos propiamente citotóxicos sino citoestáticos. En las condiciones estudiadas no hay indicios de apoptosis, al menos en las 48 horas de

tratamiento con dicumarol (Figura 23), donde no se observan células con una intensidad de fluorescencia de yoduro de propidio correspondiente a valores por debajo de G₀/G₁ sino una ralentización durante la fase de la replicación del material genético. Además, tampoco coincidimos con los trabajos antes señalados en identificar al superóxido como el agente tóxico ni a la inhibición de NQO1 como la fuente del superóxido. Es importante tener en cuenta que no podemos comparar a la ligera los resultados obtenidos en la línea mieloide humana HL-60 con los de otra línea, en este caso MIA PaCa-2 de células pancreáticas tumorales humanas, por las diferencias que podemos encontrar entre ambos tipos celulares en cuanto a expresión de NQO1, incorporación de dicumarol, rutas de señalización,... De todos modos, la conclusión de otro grupo que ha analizado recientemente los efectos de la inhibición de NQO1 con ES936 en células MIA PaCa-2 es que, efectivamente, hay un detención en el crecimiento, atribuido a la inhibición de la actividad NQO1 pero, a diferencia de los tratamientos con dicumarol, no se observa un incremento en los niveles de superóxido (Dehn *et al.*, 2006). Más aún, el desarrollo de nuevas indolquinonas que actúan como inhibidores de NQO1 basados en el mecanismo (similares a ES936), llevado a cabo más recientemente (Reigan *et al.*, 2007), ha permitido disociar completamente el efecto citotóxico de estas indolquinonas sobre las células de cáncer de páncreas y la inhibición de NQO1, lo que de nuevo cuestiona el papel de esta enzima como diana en la citotoxicidad de los inhibidores de quinona reductasas sobre las células tumorales pancreáticas.

Era necesario, por tanto, encontrar alguna pista que nos orientara en la localización de la diana del dicumarol responsable de la ralentización de la población celular en su paso por la fase S del ciclo. La clave la aportaron las células HL-60 ρ^0 , deficientes en la función mitocondrial como ya describimos en la sección de Materiales y Métodos. El carácter especial de estas células hace necesario el suplemento del medio en que se cultivan a fin de asegurar su viabilidad. Entre las sustancias añadidas encontramos la uridina. La ausencia de actividad en la mitocondria no sólo supone un importante desajuste energético para la célula sino también la reducción drástica de los niveles de nucleótidos derivados de la pirimidina porque una enzima de la ruta biosintética de las pirimidinas, la dihidroorotato deshidrogenasa, requiere el correcto funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial (King & Attardi, 1989). Sin la actividad dihidroorotato deshidrogenasa la síntesis *de novo* de pirimidinas se detiene (*de novo route*); en esas condiciones la

célula puede captar uridina del exterior y usarla como precursora del resto de pirimidinas mediante la denominada ruta de reciclaje o recuperación (*salvage route*) (Figuras 25 y 31).

Posteriormente, los nucleótidos de pirimidina en sus diversas formas se utilizan para la síntesis de ADN (dTTP, dCTP), ARN (UTP, CTP) y de las membranas celulares (intermediarios lipídicos unidos a CDP y UDP necesarios, por ejemplo, para formar fosfolípidos), así como para la glicosilación de proteínas (GDP-azúcares, UDP-azúcares) y la síntesis de glucógeno (Huang & Graves, 2002).

Es incuestionable la importancia de la disponibilidad de nucleótidos de pirimidina para la proliferación celular, especialmente para la replicación del ADN durante la fase S. La contribución relativa de cada una de las rutas de síntesis de las pirimidinas depende del tipo celular y de su situación. Por lo general, la actividad de la ruta *de novo* es baja en células en G₀ y en células completamente diferenciadas porque las necesidades de pirimidinas están cubiertas por la ruta de reciclaje (Fairbanks *et al.*, 2005). En el caso de células que están proliferando se pone en marcha la ruta *de novo* con el fin de satisfacer la demanda de precursores necesarios para la síntesis de ADN y membrana. Curiosamente, en condiciones normales el *pool* de ATP y GTP es mucho mayor que el de UTP, CTP y TTP, pero se ha señalado para linfocitos T humanos que, cuando son estimulados por PHA, el *pool* de pirimidinas se incrementa hasta ocho veces frente al de purinas, que sólo se duplica (Fairbanks *et al.*, 1995). No extraña, por tanto, que en células tumorales y en enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide, las rutas biosintéticas de nucleótidos presenten una intensa actividad (Evans & Guy, 2004); de hecho, las células tumorales tienen de seis a once veces más cantidad de dNTPs que las normales (Traut, 1994; Huang & Graves, 2002).

RUTA BIOSÍNTESIS PIRIMIDINAS

Complejo CAD:

- ① Carbamil-fosfato sintetasa
- ② Aspartato transcarbamilasa
- ③ Dihidroorotasa

④ Dihidroorotato deshidrogenasa

Complejo UMP sintasa:

- ⑤ Orotato fosforibosiltransferasa
- ⑥ Orotidín-5'-fosfato descarboxilasa

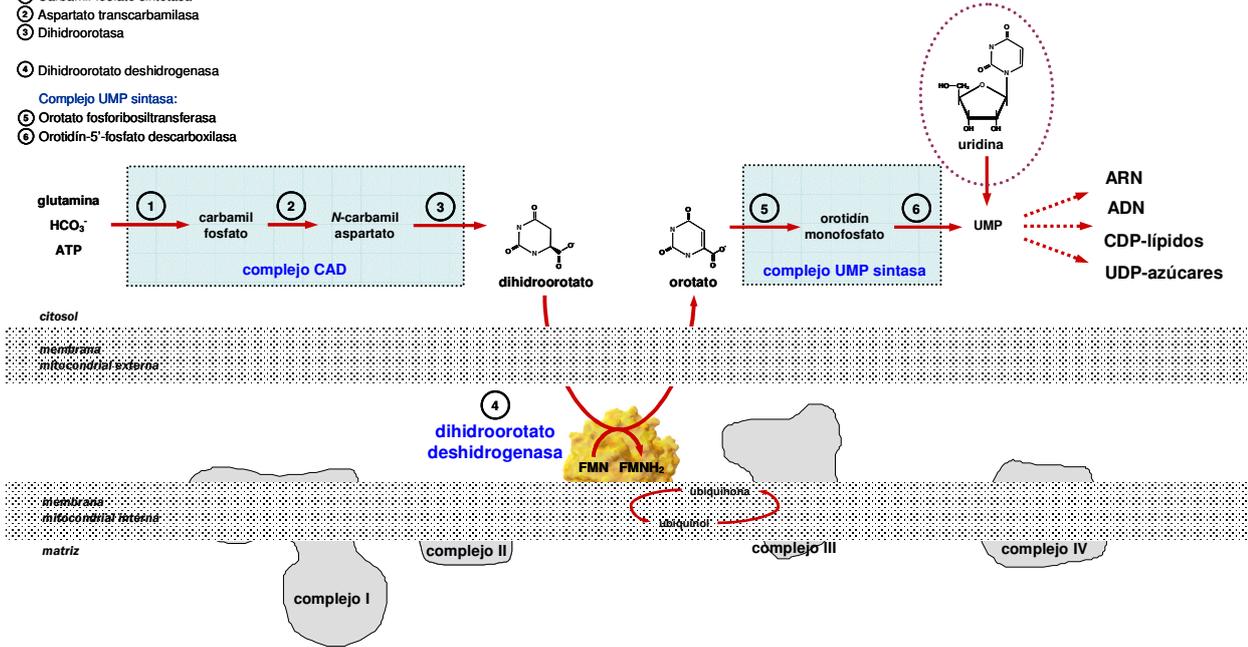


Figura 31.- Esquema de las rutas de biosíntesis de los nucleótidos de pirimidina. La síntesis *de novo* de los nucleótidos de pirimidina comienza con ATP, glutamina y bicarbonato. La formación de uridín monofosfato, precursor del resto de nucleótidos de pirimidina, a partir de estos sustratos requiere seis enzimas codificadas sólo por tres genes nucleares. Los tres primeros de la ruta son catalizados por una única cadena polipeptídica citosólica trifuncional denominada CAD, acrónimo de los nombres de las tres actividades enzimáticas que realiza: carbamil fosfato sintetasa, aspartato transcarbamilasa y dihidroorotasa (*señalados en la figura respectivamente con los números 1, 2 y 3*). El producto de la proteína multifuncional CAD, dihidroorotato, difunde al interior de la mitocondria, donde es convertida a orotato por la dihidroorotato deshidrogenasa (*en la figura, 4*), la cuarta enzima de la ruta y la única que no se sitúa en el citosol. A diferencia del resto, la flavoproteína dihidroorotato deshidrogenasa se encuentra parcialmente integrada en la membrana mitocondrial interna y orienta su sitio activo hacia el espacio intermembrana. La oxidación del dihidroorotato está acoplada a la reducción de la ubiquinona de la membrana mitocondrial interna a ubiquinol de modo que la biosíntesis de las pirimidinas y la respiración mitocondrial están íntimamente relacionadas. Los dos últimos pasos de la ruta tienen lugar en el citoplasma y son llevados a cabo por otro complejo bifuncional codificada por un único gen, la UMP sintetasa, que realiza las actividades orotato fosforibosiltransferasa y orotidín-5'-monofosfato decarboxilasa (*en la figura, 5 y 6*) para culminar con la síntesis de UMP, precursor de todos los otros nucleótidos de pirimidina que, en sus diversas formas serán empleados para la síntesis de ácidos nucleicos, de UDP-azúcares y de los precursores de los lípidos que forman las membranas celulares (Evans & Guy, 2004). Por otro lado, las células son capaces de realizar, en determinadas circunstancias, la síntesis de nucleótidos de pirimidina a partir de precursores tomados del exterior. Esta ruta alternativa, denominada ruta de recuperación o de reciclaje (*salvage pathway*) se inicia siempre con intermediarios situados aguas abajo de la posición de la dihidroorotato deshidrogenasa. Como la incorporación de orotato o de orotidín monofosfato no resulta fácil para la célula (Wolhueter *et al.*, 1980), normalmente comienza esta ruta con uridina, que se fosforila directamente a UMP por la uridina kinasa (Huang & Graves, 2002).

Para realizar la figura de la enzima dihidroorotato deshidrogenasa se ha utilizado la estructura descrita por Liu S *et al.*, 2000 (código PDB: 1D3H) y el programa Swiss PDB-Viewer v4.0 (<http://spdbv.vital-it.ch/>).

En las células con actividad mitocondrial nula o deficiente (líneas ρ^0) la síntesis de pirimidinas depende por completo de la captación y modificación de uridina por la ruta de recuperación. Se ha descrito que las alteraciones en la cadena respiratoria mitocondrial provocan la interrupción de la ruta biosintética *de novo* de las pirimidinas a nivel de la enzima dihidroorotato deshidrogenasa (Grégoire *et al.*, 1984; Gatterman *et al.*, 2004). En mamíferos, esta flavoproteína, a diferencia del resto de enzimas de la ruta que se encuentran en el citosol, está integrada en la membrana mitocondrial interna aunque su sitio activo está orientado hacia el espacio intermembrana, donde lleva a cabo la oxidación del dihidroorotato a orotato. Esta reacción está acoplada a la reducción de la ubiquinona presente en la membrana mitocondrial interna para producir ubiquinol (Figura 31; Löffler *et al.*, 1997; Evans & Guy, 2004). Se trata, por tanto, de una vía secundaria de entrada de electrones a la cadena respiratoria –como la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y la ETF-ubiquinona oxidoreductasa- que completa la acción de los Complejos I y II (Lenaz *et al.*, 2007).

Como se ha señalado anteriormente, existe una estrecha relación entre la actividad de la dihidroorotato deshidrogenasa y la respiración mitocondrial. Así lo indica la localización de la enzima y su contribución en la regulación de los niveles de ubiquinona/ubiquinol. Es muy interesante, además, el hecho de que los organismos anaerobios tanto procariotas como eucariotas presentan una dihidroorotato deshidrogenasa de localización citosólica (Löffler *et al.*, 1997; Gojkovic *et al.*, 2004). Al fin y al cabo, la dihidroorotato deshidrogenasa mitocondrial, a diferencia de la citosólica, requiere indirectamente la presencia de oxígeno para su funcionamiento de modo que es completamente lógico que, en condiciones de hipoxia más o menos severa, el crecimiento de las células aerobias se detenga o se ralentice, dependiendo del grado con que se afecte la cadena electrónica mitocondrial por la falta total o parcial de oxígeno (Åmellen *et al.*, 1994). Estos datos son muy llamativos, pues en nuestra investigación con células HL-60 hemos observado que el dicumarol afecta seriamente al funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial inhibiendo con diversa consideración a los Complejos II, III y IV. No es de extrañar, por tanto, que el tratamiento con dicumarol induzca una detención en la proliferación de las células HL-60 si tenemos en cuenta que la alteración de la respiración afecta a la biosíntesis de pirimidinas. Para nuestro conocimiento, ningún grupo había señalado hasta entonces esta acción del dicumarol y sus implicaciones en la proliferación celular. Nuestra hipótesis quedó

confirmada cuando al añadir orotato –producto de la dihidroorotato deshidrogenasa- o uridina –precursora de todos los nucleótidos de pirimidina a través de la ruta de recuperación- comprobamos que se revertía o se prevenía el bloqueo inducido por el tratamiento con dicumarol. La implicación de la dihidroorotato deshidrogenasa fue aún más clara cuando finalmente observamos que el dihidroorotato –sustrato de esta enzima- no lograba desbloquear a las células detenidas en fase S por el dicumarol (Figura 27).

En una publicación reciente que utiliza dihidroorotato deshidrogenasa recombinante purificada se demuestra que el dicumarol inhibe esta actividad con un valor IC_{50} de 6,6 μ M (Fritzson *et al.*, 2010). Se deduce, a raíz de este resultado, que en nuestro trabajo con la línea celular HL-60 podríamos estar observando una inhibición directa de la dihidroorotato deshidrogenasa con 5 μ M dicumarol, con el consecuente efecto sobre la síntesis de pirimidinas y el ciclo celular. Nuestra hipótesis recibe, de este modo, un importante apoyo porque queda demostrado mediante un ensayo *in vitro* lo que habíamos observado *in vivo* en células HL-60.

Se había descrito también que los inhibidores de la cadena electrónica mitocondrial que tienen como diana a los complejos posteriores a la posición de la ubiquinona, es decir, a los Complejos III y IV, al alterar el balance entre ubiquinona/ubiquinol, afectan a la síntesis de pirimidinas a nivel de la dihidroorotato deshidrogenasa, que requiere el *pool* de ubiquinona como aceptor de electrones (Grégoire *et al.*, 1984; Löffler *et al.*, 1997; Beuneu *et al.*, 2000; Gatterman *et al.*, 2004). Así, la inhibición de la actividad del Complejo III en HL-60 con antimicina A o estigmatelina, que impiden la unión del ubiquinol a los sitios Q_i y Q_o del Complejo III respectivamente, indujo un bloqueo de la población en la fase S del ciclo, obteniéndose un perfil del ciclo celular muy parecido al generado por el dicumarol (Figura 29). Por otra parte, quisimos comprobar que, en las mismas condiciones experimentales utilizadas para el tratamiento con dicumarol, la inhibición de la actividad dihidroorotato deshidrogenasa era suficiente para bloquear a las células en la fase S. Con este fin analizamos el efecto del A77 1726, el principio activo de la leflunomida, un inhibidor específico de la dihidroorotato deshidrogenasa (Greene *et al.*, 1995; Rückemann *et al.*, 1998). El tratamiento con distintas concentraciones de A77 1726 dio lugar al descenso de la población en fase G_1 y a la consiguiente acumulación en la fase S del ciclo en proporción a la dosis utilizada lo que

demuestra que la actividad dihidroorotato deshidrogenasa es estrictamente necesaria para la proliferación celular en las condiciones estudiadas (Figura 28). Actualmente el metabolito activo de la leflunomida, denominado A77 1726 o teriflunomida, se comercializa como Arava® y es un fármaco en fase 3 utilizado para el tratamiento de la artritis reumatoide por sus propiedades inmunomoduladoras (dificulta específicamente la proliferación de linfocitos, que requieren un incremento del *pool* de pirimidinas de hasta ocho veces durante la replicación de su ADN) y antiinflamatorias (Breedveld *et al.*, 2000).

Podría pensarse que la detención del crecimiento de células que presentan una respiración deficiente por el tratamiento con inhibidores o por falta de oxígeno se debe al descenso en la producción de ATP, es decir, a una caída de los niveles energéticos necesarios para que se lleve a cabo un proceso tan complejo como la división celular. Aunque es lógico este razonamiento, se sabe que el cese total o parcial de la generación de ATP por la mitocondria no es el principal responsable de la detención del ciclo. Las células con una alta capacidad proliferativa y las células tumorales presentan una gran actividad glicolítica que les suministra el ATP necesario para desarrollar sus funciones vitales. El sistema de intercambio que permite la salida de ATP desde la mitocondria hacia el resto de la célula puede funcionar también en sentido contrario y suministrar ATP de origen extramitocondrial para aquellas reacciones de la mitocondria que requieran esta fuente de energía (Smeitink *et al.*, 2006). En células NHIK 3025 de carcinoma cervical humano cultivadas en condiciones de hipoxia se ha comprobado que la detención en el ciclo celular se debe específicamente a la disminución en los niveles de nucleótidos, especialmente los derivados de la pirimidina (Åmelle *et al.*, 1994). Lo mismo ocurre con fibroblastos de pollo tratados con cloranfenicol (un inhibidor de la biosíntesis de proteínas mitocondriales), en los que el bloqueo del crecimiento celular se revierte con precursores de los nucleótidos de pirimidinas, aunque persistan las alteraciones en la respiración mitocondrial (Grégoire *et al.*, 1984). Del mismo modo, se ha observado que la uridina estimula el crecimiento de fibroblastos humanos obtenidos de pacientes con una enfermedad mitocondrial producida por una mutación en el gen *COQ2*, que codifica una enzima clave en la biosíntesis de la ubiquinona, indicando que la alteración en la síntesis de pirimidinas contribuye de forma importante a los defectos del crecimiento de estas células, de manera adicional a sus alteraciones bioenergéticas (López-Martín *et al.*, 2007).

Así, aunque el dicumarol afecta a la producción de ATP mitocondrial por la alteración de los Complejos III y IV, el efecto sobre el ciclo se podría explicar por el descenso de dCTP y dTTP. Por ello, cuando superamos el paso por la dihidroorotato deshidrogenasa con orotato o con uridina, que funcionan como precursores del resto de pirimidinas, la población celular logra salir del bloqueo de la fase S, a pesar de que la cadena respiratoria siga afectada por el dicumarol. Se ha descrito que si las condiciones de falta de oxígeno son extremas la proliferación celular se detiene bruscamente, no sólo porque se desajusta la biosíntesis de pirimidinas sino también porque la ribonucleótido reductasa, responsable de la formación de desoxirribonucleótidos, requiere oxígeno para su actividad catalítica (Åmellem *et al.*, 1994; Graff *et al.*, 1996). En este caso la ruta de recuperación o reciclaje aún podría salvar la situación pues se sabe que la adición de desoxicitidina permite la síntesis del resto de desoxirribonucleótidos fosforilados de pirimidinas, lo que evita la necesidad de la actividad ribonucleótido reductasa (Åmellem *et al.*, 1994). En nuestra investigación, la uridina fue suficiente para permitir la proliferación celular de modo que podemos deducir que la ribonucleótido reductasa no se afectó por el tratamiento con dicumarol o, al menos, no tanto como para impedir la recuperación de unos niveles de desoxirribonucleótidos suficientes para que prosiga la síntesis de ADN y desbloquear a las células retenidas en fase S.

Por otra parte, el bloqueo exclusivo en fase S parece ser característico de la ausencia de nucleótidos de pirimidinas. En linfocitos T, el déficit de nucleótidos de purinas evita tanto la progresión de G₁ a S como el avance a través de la fase S. Sin embargo, la inhibición de la síntesis de nucleótidos de pirimidinas bloquea exclusivamente en fase S (Quéméneur *et al.*, 2003). Los histogramas obtenidos con el citómetro de flujo muestran claramente una acumulación de la población de HL-60 en la fase proliferativa del ciclo celular tras el tratamiento con dicumarol durante 24 horas. La prolongación del tratamiento durante otras 24 horas sólo permitió un ligero avance de las células en la fase S (Figura 23). El mismo resultado obtenemos si se tratan a las células con concentraciones no citotóxicas de inhibidores del Complejo III (Figura 29) o si inhibimos específicamente a la dihidroorotato deshidrogenasa con A77 1726, el principio activo de la leflunomida (Figura 28). En todos estos casos observamos el mismo efecto citoestático en la línea celular HL-60 por la alteración directa (con leflunomida) o indirecta (con inhibidores de la cadena respiratoria

mitocondrial) de la ruta biosintética de nucleótidos de pirimidina a nivel de la dihidroorotato deshidrogenasa.

Debemos comentar un aspecto de nuestros experimentos que ha de tenerse en cuenta para interpretar correctamente los resultados. Como señalamos en la sección de Materiales y Métodos, los tratamientos de las células se realizaron en ausencia completa de suero. Sabemos que esta situación no es fisiológica pero se ha descrito que algunas proteínas del plasma sanguíneo, como la seroalbúmina, interaccionan con el dicumarol y bloquean su captación por las células (Garten & Wosilait, 1971; Perrin *et al.*, 1975; Bello *et al.*, 2001). Se requerirían concentraciones muy altas de dicumarol (mayores de 100 μM) si se administra el inhibidor en presencia de suero, lo que podría dar lugar a resultados más difíciles de interpretar. Además, el tratamiento simultáneo con otras sustancias que también presenten afinidad por la albúmina puede provocar el desplazamiento del dicumarol y su liberación masiva, provocando efectos inesperados (Garten & Wosilait, 1971). En los estudios realizados con células pancreáticas tumorales a los que hemos hecho referencia en varias ocasiones los tratamientos con dicumarol se llevan a cabo en presencia de suero, por lo que se emplean dosis de dicumarol de 50-250 μM (Cullen *et al.*, 2003) observándose efectos citotóxicos. La acción sobre la securina en células HCT116 de carcinoma de colon también se ha observado en presencia de suero y con dosis iguales o superiores a 50 μM . Otros estudios, como el nuestro, también se han llevado a cabo en medio libre de suero. Así, la acción del dicumarol en las uniones comunicantes (*gap junctions*) en células epiteliales de hígado de rata se ha estudiado en medio sin suero y con dosis de 10-25 μM (Abdelmohsen *et al.*, 2005).

Por otra parte, trabajos realizados por nuestro grupo han comprobado que la incubación de las células HL-60 durante 24 horas en medio sin suero antes del tratamiento con dicumarol mejora notablemente la viabilidad celular y evita la apoptosis (Forthoffer *et al.*, 2002; Gómez-Díaz *et al.*, 2003). Además, la retirada de suero induce la expresión de NQO1 en HL-60 (Forthoffer *et al.*, 2002; Bello *et al.*, 2005), que presenta niveles basales prácticamente nulos de esta proteína (Li *et al.*, 2003). Por tanto, según nuestros resultados, el dicumarol realiza sus efectos en la línea celular HL-60 independientemente de NQO1 incluso en condiciones en las que se induce la sobreexpresión de esta proteína.

Suponemos que el efecto citoestático del dicumarol en HL-60 posiblemente no ocurriría en presencia de suero pues diversos estudios apuntan a que la concentración de uridina presente en el plasma humano, estimada por algunos autores entre 1-10 μM (Karle *et al.*, 1984) y por otros en un rango más estrecho de 3-5 μM (Pizzorno *et al.*, 2002), es suficiente para satisfacer los requerimientos de nucleótidos de pirimidinas de las células. Esto significa que la ruta de síntesis *de novo* estaría prácticamente inhibida en beneficio de la ruta de recuperación o reciclaje (*salvage route*), que se iniciaría a partir de la incorporación de la uridina presente en el plasma. Así se ha demostrado en células L1210 de leucemia de ratón, en las que una dosis de 12 μM uridina logra una inhibición por encima del 95% de la biosíntesis *de novo* (Karle *et al.*, 1984). Tejidos altamente diferenciados también dan preferencia a la ruta de recuperación frente a la *de novo* (Huang & Graves, 2002). Sin embargo, estudios realizados en linfocitos humanos demuestran la importancia de la síntesis *de novo* para la proliferación celular, lo que hace posible el uso terapéutico de inhibidores de esta ruta (como leflunomida o brequinar) para el tratamiento de enfermedades como la artritis reumatoide (Bredveld *et al.*, 2000). En cualquier caso, ya hemos señalado que la importancia de cada una de las rutas depende en gran medida del tipo celular o del tejido en cuestión por lo que no deben generalizarse los resultados obtenidos con una línea celular concreta. En nuestros estudios, concentraciones de uridina superiores a 10 μM revirtieron de manera progresiva la detención en fase S provocada por el dicumarol. No hemos comprobado la acción de este inhibidor en presencia de suero principalmente porque requeriría una dosis muy alta a fin de superar el bloqueo con la seroalbúmina, lo que podría dar lugar a efectos secundarios difíciles de explicar y que se minimizan con concentraciones bajas como la que aquí empleamos (5 μM dicumarol).

El dicumarol no es el único derivado conocido de la cumarina que influye en la fisiología celular. El interés por esta familia de sustancias naturales, caracterizada por presentar una benzo- α -pirona, surgió a partir de su descubrimiento en plantas usadas tradicionalmente por sus propiedades medicinales. Sin embargo, desde muy antiguo se conocían también sus efectos tóxicos tanto en humanos como en el ganado, fundamentalmente en forma de severas hemorragias. El estudio sistemático comenzó en 1820 cuando se aisló, por primera vez, un compuesto presente en la leguminosa *Coumarouna odorata Aube (Dipterix odorata)* al que se llamó cumarina (Lake, 1999; Borges *et al.*, 2005). Estudios farmacocinéticos han demostrado que la

cumarina es completamente absorbida por el tracto gastrointestinal para posteriormente ser metabolizada por el hígado, donde la isoforma CYP2A6 del citocromo P450 produce 7-hidroxycumarina, su principal forma de excreción (Lake, 1999). El avance científico y tecnológico ha permitido la purificación en diversas familias de plantas de otros componentes de esta familia, de la que se conocen más de 1300 miembros, y el análisis tanto *in vitro* como *in vivo* de las distintas acciones ejercidas por las cumarinas a fin de aprovechar su potencial farmacoterapéutico. Así, se han descrito cumarinas con propiedades bactericidas, antivirales y antipalúdicas, antiinflamatorias, anticoagulantes, inhibidoras y estimuladoras de la respuesta inmune, antioxidantes, citoestáticas, citotóxicas y antitumorales. Sin embargo, hasta ahora las investigaciones se han centrado fundamentalmente en su uso como anticoagulantes orales (especialmente el dicumarol y otros derivados sintéticos como la warfarina, comercializada como Aldocumar®, o el acenocumarol, comercializado como Sintrom®) y en la enumeración de los efectos que producen sin que se conozcan aún con detalle en la mayoría de los casos los mecanismos moleculares subyacentes.

Muchas cumarinas presentan una acción citoestática, bloqueando a las distintas líneas celulares estudiadas en la fase G_0/G_1 del ciclo celular. Este efecto es dependiente del tiempo y de la concentración, pues un incremento en cualquier de esas variables provoca efectos propiamente citotóxicos y apoptosis. Por el contrario, un descenso en el tiempo de tratamiento o en la concentración genera normalmente un bloqueo en la fase proliferativa del ciclo, en la fase S. Así ocurre, a modo de ilustración, con la dafnetina. Dosis entre 10-100 μM de dafnetina acumulan a las células A-498 de carcinoma renal humano en la fase S en tratamientos de 48-72 horas, con el consiguiente descenso de la porción de células en G_1 . Tratamientos de 250 y 500 μM durante 96 horas causan el bloqueo en G_1 tardío y los inicios de S pero sin que se observe aún citotoxicidad. La ruta de la MAP kinasa p38 media los efectos de la dafnetina (Finn *et al.*, 2004). Otros estudios con cumarinas describen exclusivamente la acumulación en la fase G_0/G_1 . Por ejemplo, tratamientos de 24 horas con 100-250 μM de 5,7-dimetoxicumarina ejerce una acción citostática, no citotóxica, en las líneas celulares de melanoma de ratón B16 y de humano A374, acumulando a la población en G_0/G_1 (Alesiani *et al.*, 2008). La esculetina tiene un efecto idéntico en células HL-60; tratamientos de 24 horas con 100 μM inhiben la fosforilación de pRb y acumulan a la mayor parte de la población en G_1 (Wang *et al.*,

2002). Nuestro grupo también señaló en la misma línea celular, HL-60, la mediación de pRb en el efecto del dicumarol; en nuestro caso, la acumulación en fase S se acompaña de una inducción de fosforilación de pRb (Bello *et al.*, 2005). La propia cumarina y su principal forma metabolizada, la 7-hidroxycumarina, detienen el ciclo en G₁ en siete líneas diferentes de carcinoma de pulmón (López-González *et al.*, 2004). En todos estos estudios posiblemente el descenso en los tiempos y dosis utilizados producirían el bloqueo preferentemente en fase S y no en G₀/G₁. En nuestro trabajo con el dicumarol empleamos dosis de 5 µM, pero hay que tener en cuenta que los ejemplos que hemos señalado, a diferencia de los tratamientos con dicumarol, están realizados en medio complementado con suero, lo que exige aumentar las concentraciones de las cumarinas empleadas para superar el bloqueo con la seroalbúmina.

Para este trabajo resulta muy interesante que se haya señalado también la interferencia de algunas cumarinas en la fisiología mitocondrial. Por ejemplo, el ferulenol inhibe el consumo de oxígeno y, consiguientemente, la oxidación fosforilativa en mitocondrias aisladas de hígado de rata. El análisis detallado de cada una de las actividades de los complejos respiratorios demuestra que una dosis de 100 µM bloquea los sitios de unión de la ubiquinona y detiene la actividad del Complejo II (Lahouel *et al.*, 2007), precisamente una de las dianas del dicumarol. Recordamos de nuevo el llamativo caso de la surangina B, usada como insecticida, que inhibe los Complejos mitocondriales II, III y IV. Parece que a nivel del Complejo II interfiere tanto en la unión del succinato como de la ubiquinona (Deng & Nicholson, 2005). Por su similitud con las acciones del dicumarol, resultaría muy interesante estudiar con estas dos últimas cumarinas la producción de especies reactivas de oxígeno y la posible interferencia en el ciclo celular. En cualquier caso, nuestros datos podrían aportar algo de luz sobre los mecanismos subyacentes a los efectos tóxicos que acompañan al uso terapéutico del dicumarol como anticoagulante oral.

Resumiendo, en este trabajo se demuestra que el dicumarol interfiere de manera significativa en la fisiología mitocondrial, incrementando la producción de O₂⁻ y bloqueando la síntesis endógena de pirimidinas independientemente de su acción inhibitoria sobre la enzima NQO1. Estos datos invitan a interpretar con cautela los resultados obtenidos del tratamiento con dicumarol en las distintas líneas celulares.

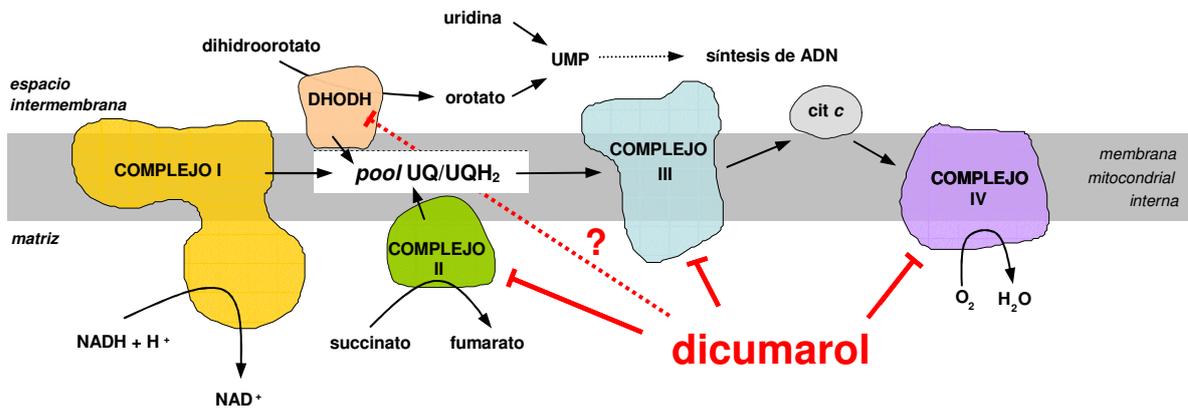
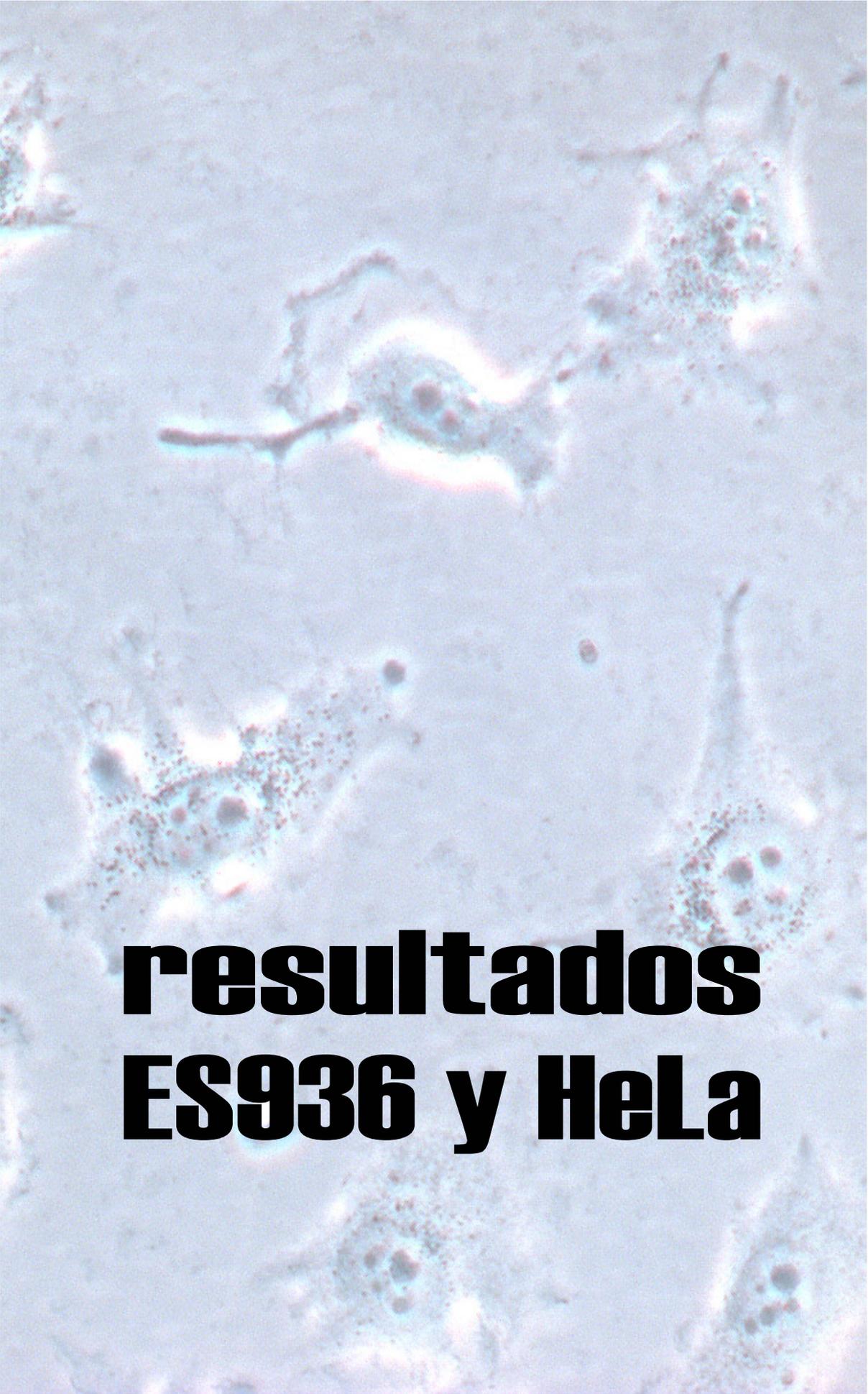


Figura 32: Modelo que resume los efectos del dicumarol en la fisiología mitocondrial descritos en este trabajo. Como se ha señalado, el dicumarol inhibe los Complejos mitocondriales II, III y IV, alterando el trasiego normal de electrones a lo largo de la cadena respiratoria. La interrupción del flujo de electrones tiene dos consecuencias inmediatas en la fisiología de la mitocondria de HL-60: por un lado, favorece la formación de superóxido en el Complejo II, tal y como se explica en la Figura 30; por otro lado, se produce un importante desajuste en el balance ubiquinona/ubiquinol (UQ/UQH₂), afectando de este modo a la formación de orotato por la dihidroorotato deshidrogenasa, que utiliza UQ como aceptador de electrones. Sólo el aporte exógeno de uridina podría sustituir al orotato para que continúe la síntesis de desoxirribonucleótidos pirimidínicos (dCTP y dTTP) a partir de UMP. Teniendo presentes los datos publicados recientemente (Fritzson *et al.*, 2010), no podemos descartar la posible acción inhibitoria directa del dicumarol sobre la dihidroorotato deshidrogenasa. En cualquier caso, la interrupción de biosíntesis de pirimidinas conlleva, entre otros efectos, la imposibilidad de duplicar con normalidad el material genético por lo que la célula ralentiza su paso por la fase S del ciclo celular.

A fluorescence micrograph showing several cells with bright red fluorescent spots distributed throughout their cytoplasm and nuclei. The cells are stained with a blue dye, likely DAPI, which highlights the nuclei. The overall image has a grainy, high-magnification appearance typical of a microscope slide.

**resultados
ES936 y HeLa**

Imagen de fondo de la página anterior: Fotografía de células de la línea HeLa de adenocarcinoma de cuello de útero humano. Esta línea fue creada en 1951 por el Dr. George Gey (1899-1970) a partir de una muestra de paciente llamada Henrietta Lacks, convirtiéndose en la primera línea de células tumorales cultivadas sistemáticamente en un laboratorio. Actualmente, la línea celular HeLa sigue siendo la más empleada en investigación.

Los siguientes párrafos son un extracto de una revisión histórica^[1] que detalla las circunstancias que rodearon al establecimiento de esta línea celular y su desarrollo posterior:

“George Gey was a brilliant and highly respected scientist. By 1951, he had been growing cells for nearly 30 years, and until 1937 had worked with Warren Lewis. He was the first to show *in vitro* transformation; he also made some of the first phase-contrast time-lapse films of living cells and developed roller tubes for culturing cells. His goal was to cure cancer, and he did not take time out to write papers. Crucially — for the success of HeLa cells — his wife Margaret was the chief technician and ‘the meticulous director of day-to-day operations in the laboratory’.

The cancer sample came from the cervix of a young black lady called Henrietta Lacks, a 30-year-old mother of five living on New Pittsburgh Avenue in Baltimore. Cervical cancer is normally slow growing, and most patients survive for at least five years after diagnosis. But this was not an ordinary cancer, according to the gynaecologist Howard Jones. It was purple and soft, and he had never seen anything like it before (or since, according to a television interview screened in the United Kingdom in 1997). It did not respond to radiotherapy and was subsequently shown ‘without a doubt’ to be a glandular cancer — a rare adenocarcinoma — and not the usual epidermoid cancer of the cervix, as the original publication on HeLa incorrectly described it. On 4 October 1951, eight months after her cancer was diagnosed, Henrietta Lacks died, leaving her husband, David, a widower, and her children motherless. The autopsy report stated that her abdomen was filled with cancer deposits and her bladder was almost entirely replaced with the tumour. By this time, her cancer was also growing like wildfire in the laboratory.

The cell line was called HeLa, taken from the first two letters of Henrietta Lacks’ names. The failure to preserve complete anonymity was regrettable, but, to give a measure of confidentiality, the donor was said to be Helen Lane or Helen Larson. It was not customary then to ask for written permission to obtain such samples for research purposes, and there is no record that Henrietta Lacks consented to the use of her cells. Attitudes were different then — prison inmates were shown on television being injected with HeLa cells, proud that they were repaying some of their debt to society (*The Way of All Flesh*, BBC TV documentary screened on 19 March 1997 in the United Kingdom).

When Mrs Lacks’ children eventually discovered — more than 20 years later — what had happened to her tissue, they were shocked that cells from their mother had been distributed worldwide and no one had ever sought their views or permission. The requirement today for documented patient consent for research samples is, in part, a consequence of the HeLa cell story.

To cancer research, HeLa is the equivalent of the goose that laid the golden egg — a constant supply of a precious and essential resource. Within a few years, HeLa cells had been distributed worldwide and became the laboratory model of the cancer cell that would be used for much of cancer research. But they are not just used for cancer research — HeLa cells are used throughout biomedical research to study the biochemical pathways of normal and diseased tissue in human cells. Although thousands of continuous cell lines from almost every type of human cancer have since been established — mainly in the 1970s and 1980s— HeLa is still the most widely used human cancer cell line.”

[1] **Masters JR (2002)** HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nat Rev Cancer* 2: 315-319.

1. El tratamiento con ES936 interfiere en la síntesis de ADN y en el crecimiento de la línea celular humana HeLa.

Se ha descrito que el tratamiento con ES936, un inhibidor irreversible de la actividad NQO1 (Figura 11), inhibe el crecimiento de línea celular MIA-PaCa de cáncer de páncreas (Dehn *et al.*, 2006). Inicialmente nuestro objetivo fue estudiar si ese mismo efecto se repetía en otra línea tumoral humana, HeLa, de adenocarcinoma de cuello de útero. Para ello se estudió la incorporación de timidina tritiada en cultivos de HeLa sembradas en condiciones de baja y alta densidad y tratadas con ES936 durante 24 horas en un rango de 30-1000 nM. Previamente los cultivos se mantuvieron durante 24 horas en medio sin suero con el fin de inducir la expresión de NQO1 (ver Materiales y métodos, Figura 13, para más detalles sobre las condiciones de cultivos; Bello *et al.*, 2001; 2004).

Las condiciones de cultivo utilizadas son fundamentales porque determinan la expresión de la proteína NQO1 en la línea celular HeLa. Así, se ha señalado que

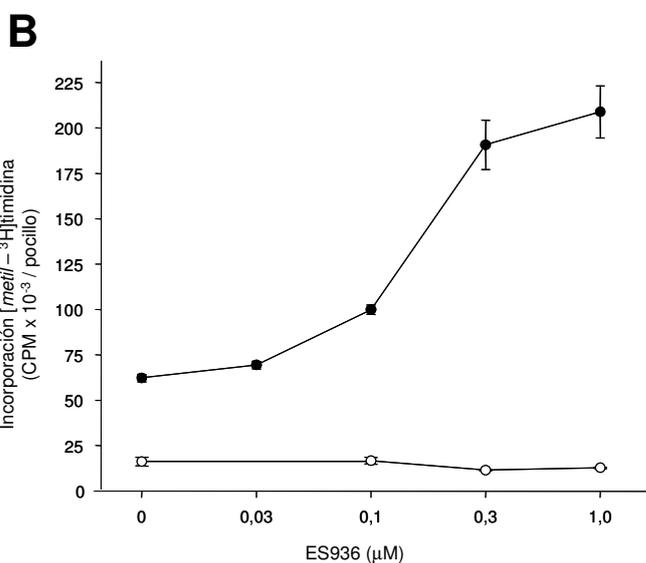
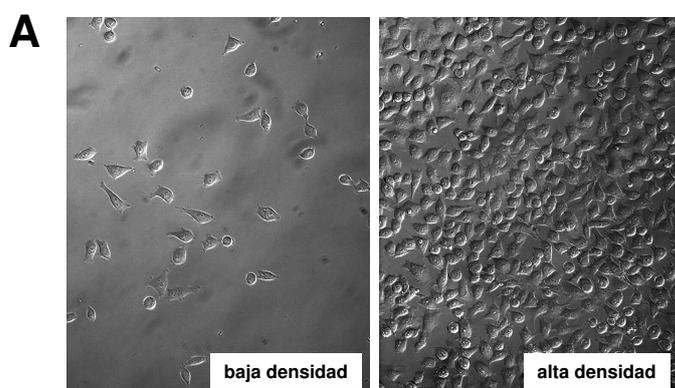


Figura 33: (A) Microfotografías representativas de los cultivos de HeLa en condiciones de baja y alta densidad. Las imágenes fueron realizadas tal y como se ha detallado en Materiales y métodos con un aumento original de 200x. **(B) Efectos de la indolquina ES936 en la síntesis de ADN en la línea celular HeLa.** El tratamiento con ES936 produjo la inhibición en la incorporación de timidina tritiada en los cultivos de alta densidad ($p < 0,001$). Por el contrario, en condiciones de baja densidad se observó una llamativa estimulación en la síntesis de ADN a partir de 100 nM ES936, alcanzando un *plateau* a 300 nM y 1 μM. En todos los casos los datos presentados son la media \pm desviación estándar ($n = 3$).

tanto el aumento de la densidad celular como la retirada de suero durante 24 horas inducen una subida considerable (10-15 veces) de los niveles de NQO1 (Bello *et al.*, 2001; 2004).

Como se puede apreciar en la Figura 33B, la síntesis de ADN en los cultivos confluentes de HeLa, con altos niveles de NQO1, disminuyó para los valores de 300 nM y 1 μ M de ES936. En los cultivos de células tumorales pancreáticas, que sobreexpresan NQO1, una dosis de 100 nM de ES936 es suficiente para inhibir por completo la actividad de la proteína y detener la proliferación (Dehn *et al.*, 2003; 2006). Sin embargo, como acabamos de señalar, ese efecto se manifestó en la línea celular HeLa en concentraciones más altas de ES936. El resultado con los cultivos de células HeLa dispersas fue muy distinto al observado en condiciones de confluencia ya que los tratamientos con 300 nM y 1000 nM de ES936 incrementaron la síntesis de ADN unas tres veces respecto al control.

Se ha descrito que ES936 provoca daños en el ADN (Dehn *et al.*, 2003) por lo que sospechamos que la inducción en la incorporación de timidina observada en HeLa dispersas podría estar relacionada con la reparación del material genético. Para comprobar esta hipótesis se midió la incorporación de timidina en células HeLa tratadas con una quinona antitumoral bien caracterizada como agente genotóxico.

Algunos agentes quinónicos alquilantes, como la 2,5-bis-[1-aziridinil]-1,4-benzoquinona (DZQ), provocan entrecruzamientos y roturas en la cadena ADN tras ser reducidos por NQO1 (Alcaín & Villalba, 2007). Para comprobar cómo afecta un agente genotóxico a la incorporación de [metil-³H]-timidina se reprodujeron con la benzoquinona DZQ las mismas condiciones de cultivo de HeLa a baja densidad empleadas previamente con ES936; sin embargo, los resultados fueron completamente distintos y la síntesis de ADN no se afectó ni siquiera con concentraciones de DZQ superiores a 500 nM, suficientes para provocar una inhibición significativa del crecimiento en este mismo tipo celular (Córdoba-Pedregosa *et al.*, 2006) (Figura 34). Estos resultados apuntan que la estimulación en la incorporación de timidina tritiada tras el tratamiento de células HeLa dispersas con ES936 no está relacionada con mecanismos de reparación de ADN.

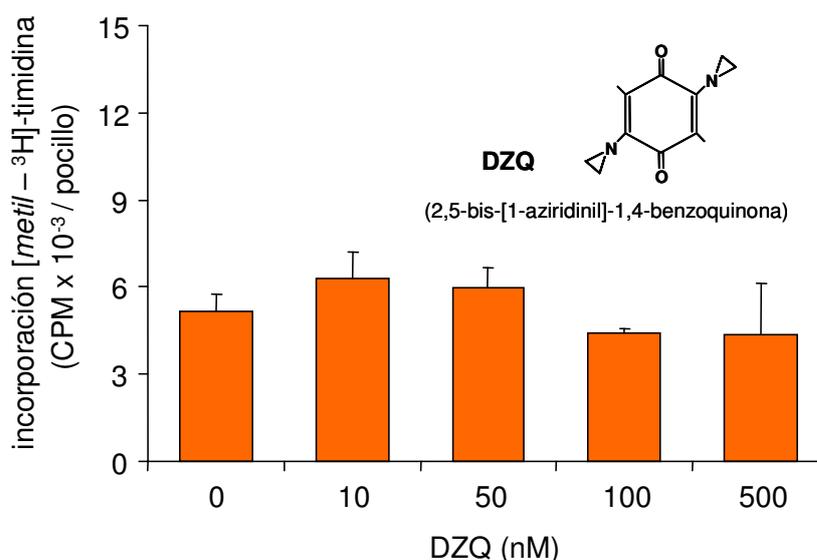


Figura 34: Efecto de la benzoquina DZQ en la síntesis de ADN en la línea celular HeLa. El tratamiento se llevó a cabo con cultivos a baja densidad, en los que se ha observado un efecto estimulante con ES936 (Figura 33B). En el rango de concentraciones probado no se registró un incremento significativo en la incorporación de timidina tritiada a pesar de que se ha descrito que DZQ es un potente agente genotóxico. Los datos representados son la media \pm desviación estándar ($n = 3$).

Descartada la hipótesis de la acción genotóxica de ES936 pasamos a comprobar si el efecto de esta quinona sobre el ADN guardaba alguna relación con la proliferación celular. Un mayor número de células conllevaría una mayor incorporación de timidina tritiada, por lo que se realizaron estudios de recuento y viabilidad celulares con cultivos de HeLa en baja densidad. Las condiciones de cultivo fueron las mismas en que se observó el efecto con ES936. El tratamiento con 1 μ M ES936 durante 24 horas dio lugar a un incremento significativo en el número de células viables respecto al control sin suero, alcanzando aproximadamente la mitad del estímulo generado con 10% de suero (Figura 35A). Respecto a la viabilidad celular, no hubo cambios entre los cultivos tratados con la indolquinona y los controles sin suero (en torno al 85% de células viables); la adición de 10% de suero incrementó la viabilidad por encima del 90% (Figura 35B). Resumiendo, los datos de síntesis de ADN y de recuento celular nos permiten concluir que el tratamiento con ES936 estimula el crecimiento de células HeLa en condiciones de cultivo a baja densidad.

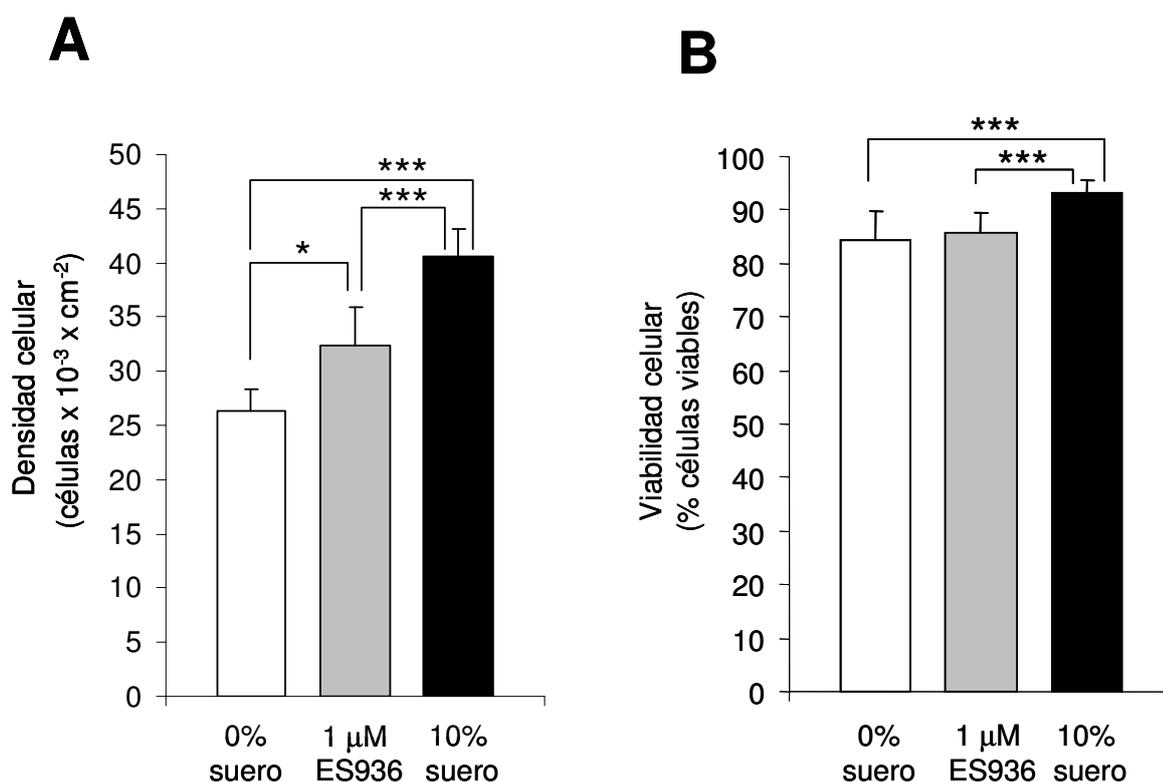


Figura 35: (A) Efecto de ES936 en el número de células HeLa cultivadas a baja densidad. La adición de ES936 incrementó significativamente el número de células respecto al control sin suero. **(B) Efecto de ES936 en la viabilidad celular.** En las mismas condiciones utilizadas para el recuento celular se estudió la viabilidad con azul tripán sin observarse cambios por el tratamiento con ES936 (*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$). Los datos representados son la media \pm desviación estándar ($n = 6$).

2. El tratamiento con ES936 no altera la distribución de las células HeLa en las distintas fases del ciclo celular.

Una vez que se observó que el tratamiento con ES936 inducía el crecimiento de la línea HeLa se pasó a comprobar posibles cambios en el número de células en las distintas fases del ciclo celular. Para ello se cuantificó el número de células en G_0/G_1 , S y G_2/M registrando en un citómetro de flujo la señal de la sonda yoduro de propidio, cuyos niveles de emisión fluorescente son proporcionales a la cantidad de ADN nuclear. Al comparar la proporción de células en cada una de las fases del ciclo después de tratamientos de 12 y 24 horas se observó que no había diferencias entre los cultivos tratados con 1 μ M ES936 (previa retirada de suero) y los controles (Tabla 3).

tiempo	tratamiento	Distribución población celular (%)		
		G ₀ / G ₁	S	G ₂ / M
12 horas	Control	40,1 ± 5,9	44,8 ± 2,3	15,2 ± 3,5
	ES936	40,8 ± 0,6	41,6 ± 4,2	17,7 ± 4,9
24 horas	Control	31,9 ± 3,5	37,4 ± 2,3	30,7 ± 1,3
	ES936	26,3 ± 3,3	39,8 ± 3,0	34,0 ± 0,3

Tabla 3. Distribución de la población de células HeLa en las distintas fases del ciclo celular.

Se cultivaron de células HeLa en condiciones de baja densidad y, previa retirada de suero durante 24 horas, se trataron con 1 μ M ES936 durante 12 ó 24 horas; los controles correspondientes se realizaron con DMSO. Posteriormente las células se fijaron y se tiñeron con yoduro de propidio para registrar en el detector FL3 de un citómetro de flujo la señal emitida por la sonda al unirse al ADN nuclear. Para cada dato se cuantificaron unas 20000 células. En la tabla se representan los valores correspondientes a la media \pm desviación estándar (n=3). Como se puede comprobar, las diferencias entre los cultivos tratados con ES936 y los controles no son significativas para cada una de las fases y de los tiempos.

3. La estimulación de la síntesis de ADN por ES936 no está relacionada con la inhibición de NQO1.

La quinona ES936 se presentó en el año 2003 como un inhibidor muy específico de la enzima NQO1, sin efecto sobre la actividad de otras dos importantes reductasas celulares como la NADPH:citocromo P450 reductasa y la NADH:citocromo *b*₅ reductasa incluso en concentraciones de ES936 superiores a 10 μ M (Dehn *et al.*, 2003). Posteriormente se pudo comprobar que su efecto citotóxico sobre células pancreáticas tumorales humanas no se debía a la inhibición de NQO1 (Dehn *et al.*, 2006; Reigan *et al.*, 2007) y que dicha acción negativa sobre el crecimiento celular de ES936, como el de otras indolquinonas, podía ser explicada por su papel como inhibidor de las tiorredoxina reductasas (Yan *et al.*, 2009).

Con estos precedentes era fundamental comprobar si la estimulación del crecimiento en HeLa por ES936, descrita por primera vez en este trabajo, guardaba alguna relación con la inhibición de NQO1. Al registrar la actividad NQO1 en los cultivos de HeLa en baja densidad tratados con ES936 se observó que sólo había

una inhibición casi completa de NQO1 en la concentración más alta empleada (1 μM ES936); con 300 nM de ES936, dosis con la que se alcanza casi el máximo de estimulación de la síntesis de ADN, sólo se obtuvo un leve descenso en la actividad enzimática en las condiciones de cultivo que hemos empleado (Figura 36).

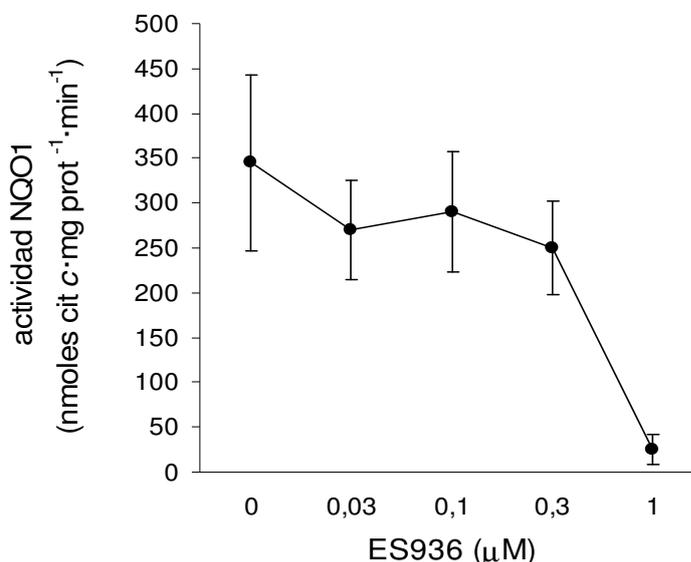


Figura 36: Inhibición de la actividad NQO1 con ES936 en células HeLa cultivadas en baja densidad. Células crecidas en condiciones de baja densidad fueron incubadas durante dos horas con diversas concentraciones de ES936. A continuación se prepararon fracciones citosólicas con las que se llevaron a cabo los ensayos de la actividad enzimática NQO1. Los datos representados son la media \pm desviación estándar ($n = 3$, $p < 0,01$, test ANOVA).

Este resultado apuntaba a la posibilidad de que ambos efectos de ES936, el ejercido sobre el crecimiento celular y la inhibición de NQO1, no estuvieran relacionados. Para asegurar esta hipótesis se llevó a cabo el silenciamiento de la expresión génica de NQO1 en células HeLa con ARN interferente (ARNi). Las células usadas como control se sometieron al mismo procedimiento de transfección pero usando una secuencia inespecífica de ARNi (Ver Materiales y métodos para más detalles). El tratamiento de células HeLa en baja densidad (en las mismas condiciones de cultivo utilizadas en el apartado anterior) con ARNi específico para NQO1 (NQO1 ARNi) provocó un descenso muy significativo de la expresión del polipéptido dos días después de la transfección respecto a las células tratadas con la secuencia inespecífica. La técnica empleada sólo permitía el silenciamiento temporal de la expresión génica. Así, siete días después de la transfección se comenzaron a recuperar los niveles de NQO1, alcanzando la normalidad al noveno día (Figura 37A).

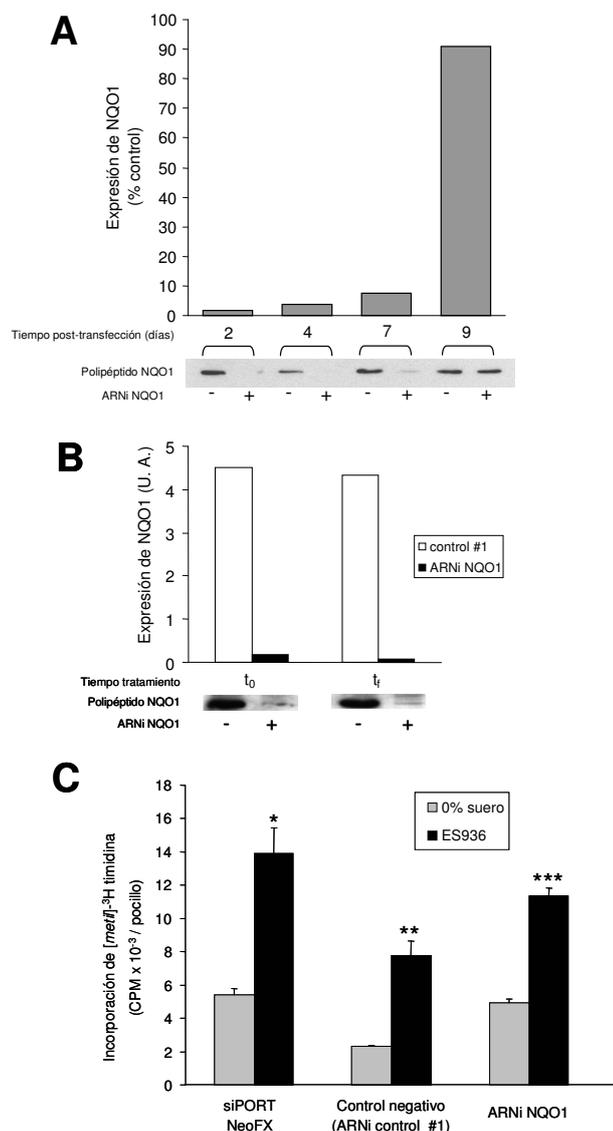


Figura 37: Silenciamiento génico de NQO1 con ARNi y efecto de ES936 en la síntesis de ADN en las células HeLa silenciadas. (A) *Optimización del protocolo de silenciamiento de NQO1.* Las células, sembradas a baja densidad, fueron transfectadas con ARNi específico para NQO1 o bien con una secuencia inespecífica (control negativo #1) y mantenidas durante 2-9 días. Las células tratadas con el ARNi específico para NQO1 presentaron un importante descenso en los niveles de expresión de esta proteína en los cuatro primeros días en comparación con las tratadas con el ARNi control, sin bien transcurridos 9 días desde la transfección los niveles volvieron a la normalidad. (B) *Cuantificación de la expresión del polipéptido NQO1 en células tratadas con ES936.* Dos días después de la transfección las células fueron tratadas con ES936 durante 24 horas, recogiendo muestras para medir los niveles de proteína NQO1 mediante *western blot* antes (t_0) y después del tratamiento (t_t). Como se muestra en la figura, los niveles de NQO1 se mantuvieron extremadamente bajos en las condiciones empleadas para los tratamientos con ES936. (C) *Efecto de ES936 en la síntesis de ADN en células HeLa transfectadas con ARNi.* Se comprobó cómo se afectaba la síntesis de ADN en células HeLa incubadas sólo con el agente de transfección (siPORT NeoFX), con la secuencia inespecífica control (ARNi control #1) o con el ARNi específico para NQO1 (ARNi NQO1). Como se observa en la figura, ES936 estimuló significativamente la síntesis de ADN en todos los casos, lo que indica que este efecto no depende de la expresión de NQO1. Se observa además cierta acción inespecífica tóxica con el ARNi inespecífico, lo que provoca un descenso en los valores de incorporación de timidina tritiada tanto en las células tratadas con ES936 como en los controles. Los datos mostrados en (A) y (B) son representativos de tres determinaciones independientes; los representados en (C) son la media \pm desviación estándar ($n = 3$). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Una vez comprobada la eficacia del silenciamiento de NQO1 con ARNi se probó si la indolquinona ES936 seguía induciendo la síntesis de ADN en las células HeLa transfectadas. La siembra en baja densidad y la transfección con ARNi se llevaron a cabo simultáneamente de modo que 48 horas después, y tras la preincubación en medio sin suero, se iniciaron los tratamientos con ES936. Las condiciones de cultivo, por tanto, fueron las utilizadas en los estudios anteriores, con la novedad de la transfección. En esas condiciones se recogieron muestras para medir la síntesis de ADN y los niveles de expresión de NQO1. Como aparece en la Figura 37B, los niveles del polipéptido al inicio del tratamiento con 300 nM ES936 (tiempo cero del experimento, transcurridos dos días desde la siembra y transfección de las células) presentaban unos niveles tan bajos como los ya indicados en la Figura 37A, sin que la ausencia de suero hubiera afectado para nada al silenciamiento génico con NQO1 ARNi. Transcurridas 24 horas desde la adición de ES936 (tiempo final del experimento, que coincide con el tercer día desde la siembra y transfección), la expresión de NQO1 seguía al mínimo, lo que nos permitió garantizar que todo el tratamiento transcurrió prácticamente en ausencia de la proteína. En esas condiciones, como ya señalamos antes, se registró la señal correspondiente a la incorporación de timidina radiactiva comprobándose que la adición de 300 nM ES936 afectaba por igual a las células transfectadas con NQO1 ARNi y a las que servían de control con la secuencia inespecífica (Figura 37C). Concluyendo, podemos afirmar, como muestran claramente los resultados, que la inhibición de NQO1 no explica el estímulo en la síntesis de ADN por ES936 en células HeLa dispersas.

4. La estimulación de la síntesis de ADN por ES936 está relacionada con desajustes en el balance redox celular.

Descartada la mediación de NQO1 en el efecto de ES936 sobre la síntesis de ADN barajamos la posibilidad de la participación de las especies reactivas de oxígeno como promotoras del crecimiento celular. Se ha descrito que incrementos moderados en los niveles de superóxido o, tras su dismutación espontánea, de peróxido de hidrógeno, pueden inducir la proliferación de células HeLa (Burdon & Gill, 1993; Burdon 1995).

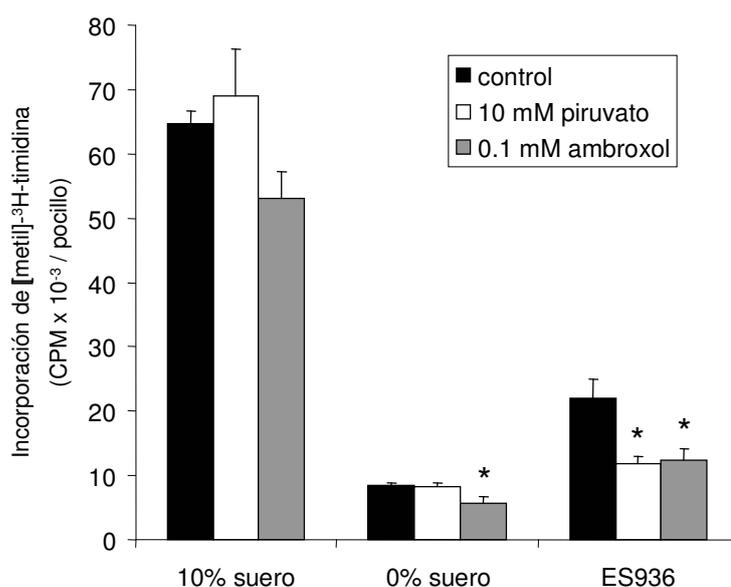


Figura 38: Efecto de la eliminación de ROS sobre la síntesis de ADN estimulada por ES936 en HeLa dispersas. Células crecidas en condiciones de baja densidad y ausencia de suero fueron tratadas con 300 nM ES936 más 10 mM piruvato (que actúa como *scavenger* de H₂O₂) ó 0,1 mM ambroxol (un mimético de la enzima SOD). Del mismo modo se probó el efecto de ambos *scavengers* en los controles sin suero y en células estimuladas con 10% de suero. El ambroxol provocó un descenso en la incorporación de timidina en todas las condiciones de cultivo consideradas. Sin embargo, el tratamiento con piruvato, aunque no ejerció ningún efecto en los cultivos control y en los de 10% de suero, eliminó casi por completo el estímulo en la síntesis de ADN por ES936. Los datos representados son la media \pm desviación estándar. La significatividad de los tratamientos se han determinado respecto a cada control sin *scavenger* (barra negra de cada grupo) y se han indicado con asteriscos (n = 3, *, p < 0,05).

En un trabajo realizado por el grupo del Dr. David Ross se señaló la imposibilidad de detectar un incremento en los niveles intracelulares de superóxido tras la incubación de células pancreáticas con ES936 (Dehn *et al.*, 2006). Usando DCFH-DA y HEt como sondas para peróxido de hidrógeno y superóxido respectivamente tampoco observamos mediante citometría de flujo ningún cambio significativo en la concentración de ambas especies reactivas de oxígeno en células HeLa tratadas con ES936. A continuación se usó una aproximación indirecta para confirmar el resultado del citómetro de flujo midiendo la incorporación de timidina tritiada en células HeLa tratadas al mismo tiempo con ES936 y ambroxol o piruvato, descritos respectivamente como *scavengers* de superóxido y peróxido de hidrógeno (Giandomenico *et al.*, 1997; Bello *et al.*, 2001; 2005). Sorprendentemente, la adición de cualquiera de los *scavengers* anulaba el estímulo de ES936 sobre la síntesis de ADN (Figura 38). El ambroxol, que elimina al radical superóxido, produjo una

inhibición inespecífica del crecimiento, haciendo decrecer la incorporación de timidina en los cultivos sin suero y en los tratados con 10% de suero, si bien su efecto fue mucho más pronunciado en los tratados con ES936. Por su parte, el piruvato no alteró la síntesis de ADN en las células mantenidas sin suero y en las estimuladas con 10% de suero, pero eliminó casi por completo el efecto de ES936, como ya ocurría con el ambroxol (Figura 38). Los resultados obtenidos sugieren que la síntesis de ADN inducida por ES936 en células HeLa está mediada por sutiles cambios en las concentraciones intracelulares de especies reactivas de oxígeno.

5. El tratamiento con ES936 induce la expresión de p21 en células HeLa.

Como se ha señalado en la introducción, los cambios en el estado redox celular afectan a la expresión de diversas proteínas implicadas directamente en la regulación del ciclo celular (revisado en Menon & Goswami, 2007). Con este fin se comprobó la influencia del tratamiento con ES936 en los niveles de p21, una de las proteínas de la familia de las CKI que ha sido descrita como especialmente sensible tanto a condiciones prooxidantes como antioxidantes (Qiu *et al.*, 1996; Barnouin *et al.*, 2002; Sarsour *et al.*, 2005; Schauen *et al.*, 2006).

El análisis cuantitativo de la expresión de la proteína p21 se llevó a cabo en células HeLa cultivadas en las condiciones habituales de baja densidad y retirada de suero y tratadas con 1 μ M ES936 durante 0,5, 3 y 6 horas. Tras obtener los lisados celulares se cuantificaron los niveles de p21. Como se puede comprobar en la Figura 39, las muestras correspondientes al control redujeron progresivamente sus niveles de p21, alcanzando el mínimo a las 6 horas, momento en que ya se registra sólo un 38,6% de los niveles correspondientes al tiempo cero. Por el contrario, la tendencia en las muestras tratadas con ES936 es justo la contraria, observándose un significativo aumento de la expresión de p21 a las 6 horas, justo cuando los controles presentaban sus valores mínimos (el incremento es de 145,8% respecto a los niveles del tiempo cero y de 378,7% si se compara con los niveles de p21 en las muestras de 6 horas no tratadas con ES936). Estos resultados apuntan a la implicación de p21 en los efectos observados en HeLa tras el tratamiento con ES936.

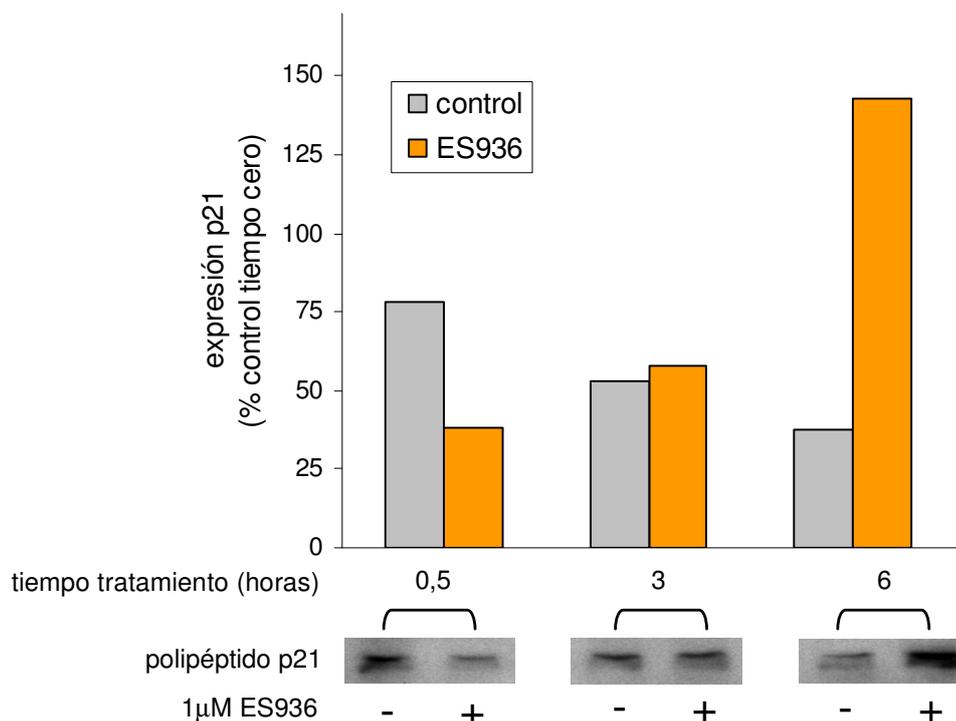


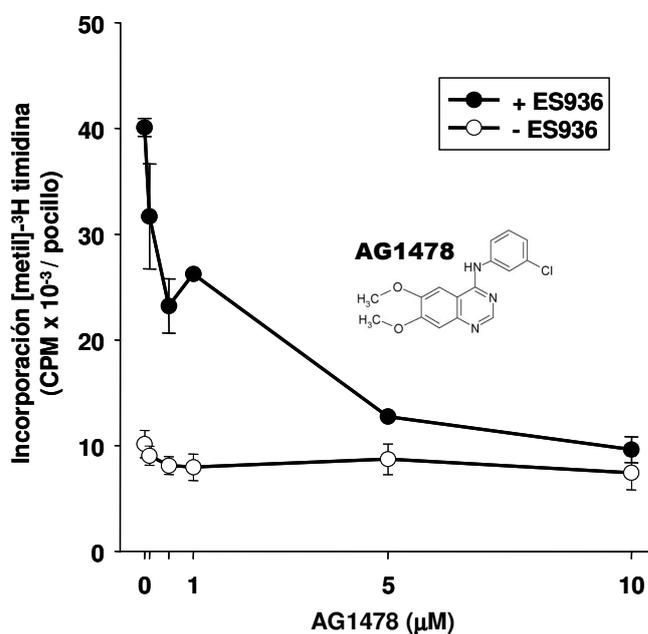
Figura 39: Efecto del tratamiento con ES936 en los niveles de expresión de p21 en HeLa dispersas. Las células fueron tratadas con ES936 durante los tiempos indicados y procesadas para cuantificar mediante *western-blot* los niveles de expresión p21. Los experimentos se repitieron tres veces. En la figura se muestra un resultado representativo. Como se observa, el tratamiento con ES936 induce la expresión de p21 de forma significativa a las 6 horas.

6. La estimulación de la síntesis de ADN por ES936 implica una ruta de señalización dependiente de EGFR y p38 MAPK.

El estudio de las rutas de señalización implicadas en el efecto de ES936 sobre el crecimiento de la línea celular HeLa se realizó con distintos inhibidores químicos cuya efectividad ha sido demostrada en numerosas ocasiones por la literatura científica.

El uso de AG1478, un inhibidor específico de la tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) (Osherov & Levitzski, 1994), apuntó la implicación de este receptor en el estímulo iniciado por ES936. Como se indica en la Figura 40, el inhibidor AG1478 suprimió por completo el efecto de ES936 en la síntesis de ADN en un rango de

concentraciones (0,1 μM -10 μM) que inhibía tanto la fosforilación de EGFR como la proliferación en otras líneas celulares (Zhu *et al.*, 2001; Shushan *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2004).



Para el estudio de las rutas mediadas por las proteínas MAPKs y su posible implicación en la acción estimulante del ES936 sobre la síntesis de ADN en HeLa se emplearon inhibidores específicos de cada una de las kinasas: ERK, JNK y p38. La acción de ES936 no se afectó de manera significativa por la presencia de PD98059, un inhibidor de la ruta ERK (Dudley *et al.*, 1995) (Figura 41A). Fue necesaria una dosis de 50 μM de PD98059 para reducir la estimulación de la síntesis de ADN por ES936 a la mitad, pero una concentración tan alta de PD98059 puede tener efectos secundarios independientes de la inhibición de ERK (Reiners *et al.*, 1998). Se observó una inhibición parcial del efecto de ES936 en las células tratadas con 2,5–10 μM SP600125, un inhibidor de JNK (Bennett *et al.*, 2001) (Figura 41B). Sólo se alcanzó la inhibición completa en las células tratadas con inhibidores de la ruta de p38 MAPK. Concentraciones tan bajas como 100-500 nM del inhibidor SB203580 fueron suficientes para producir un descenso significativo en la síntesis de ADN inducida por ES936, eliminándose por completo este efecto con 10–20 μM

SB203580 (Figura 41C), si bien se ha señalado que este producto puede actuar también sobre JNK con un valor IC_{50} de 3-10 μ M (Clerk & Sugden, 1998). Para confirmar este resultado se probó otro inhibidor de la misma ruta, PD169316, considerado también como muy específico de la ruta p38 MAPK (Gallagher *et al.*, 1997). Al igual que se observó con SB203580, este segundo inhibidor produjo una reducción considerable del estímulo por ES936 con concentraciones comprendidas entre 100 y 500 nM; una dosis de 10 μ M eliminó por completo la síntesis de ADN en las células tratadas con ES936 (Figura 41D). Estos resultados indican que la interrupción de la ruta de señalización intracelular mediada por p38 MAPK anula la síntesis de ADN inducida por ES936 en células HeLa.

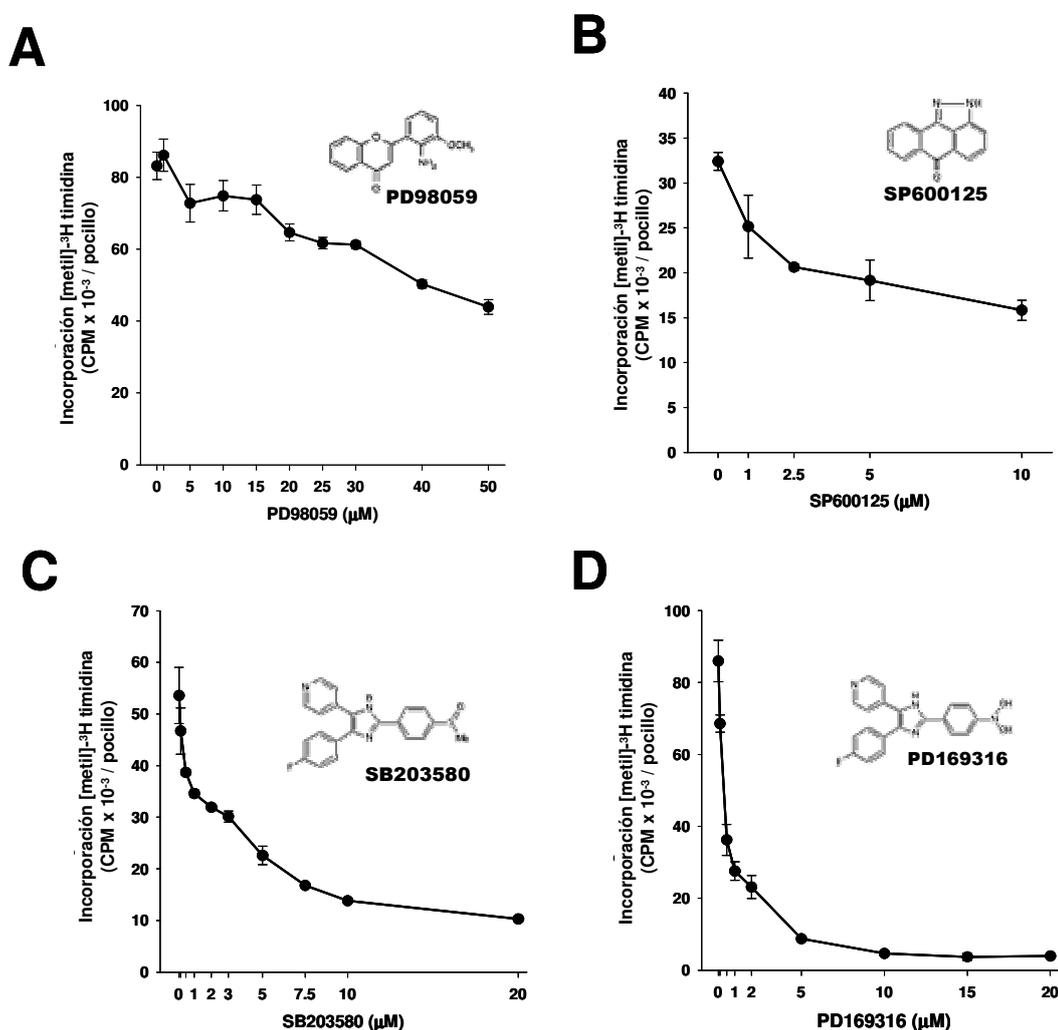


Figura 41: Efecto de la inhibición de MAPKs en la síntesis de ADN estimulada por ES936. Las células HeLa fueron tratadas con ES936 más diversos inhibidores de la señalización mediada por las MAPKs. (A) PD98059, un inhibidor de MEK que impide la activación de ERK1/2, $p < 0,42$; (B) SP600125, inhibidor de JNK, $p < 0,001$; (C) SB203580, inhibidor de p38, $p < 0,001$; (D) PD169316, inhibidor de p38, $p < 0,001$. Los inhibidores de p38 impidieron el estímulo de ES936 en la incorporación de timidina, lo que apunta a la participación de esta ruta en dicho efecto. Se han representado medias \pm desviación estándar ($n = 3$; significatividad indicada según test ANOVA).

A partir de los resultados obtenidos en la síntesis de ADN tras los tratamientos conjuntos con ES936 y los inhibidores de p38 MAPK quisimos comprobar si ES936 inducía la fosforilación de p38. Para ello se prepararon extractos celulares de células HeLa dispersas tratadas con ES936 durante diferentes tiempos (ver Materiales y métodos para más detalles). En la Figura 42 se muestran los niveles de expresión de p38 obtenidos al tratar a las células con 300 nM ES936 durante 5, 10 y 30 minutos. Como puede observarse, los niveles de fosforilación de p38 ya eran muy altos en los controles celulares mantenidos en medio sin suero sin que se aprecie un incremento por la adición de ES936. Resumiendo, la aproximación farmacológica indica que la actividad p38 MAPK es necesaria para estimular la síntesis de ADN por ES936 en células HeLa dispersas, aunque, como indica la inmunocitoquímica, ES936 no activa directamente la fosforilación de p38 MAPK.

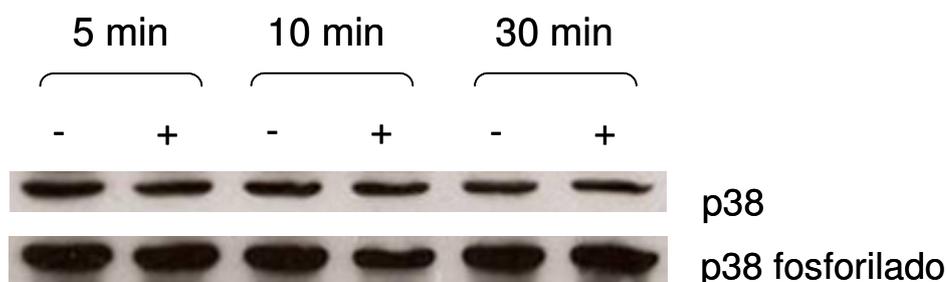


Figura 42: Nivel de fosforilación de p38 MAPK. Las células fueron tratadas con ES936 durante los tiempos indicados y procesadas para cuantificar mediante *western-blot* los niveles de expresión total de p38 y de p38 fosforilado. Los experimentos se repitieron tres veces. En la figura se muestra un resultado representativo.

7. El efecto de ES936 en la síntesis de ADN depende del contexto celular y de la fase de crecimiento.

En varias ocasiones hemos señalado que el tratamiento con ES936 inhibe el crecimiento de células tumorales de páncreas humano posiblemente por su acción inhibidora de la tiorredoxina reductasa más que por la inhibición de NQO1 (Dehn *et al.*, 2006; Reigan *et al.*, 20007; Yan *et al.*, 2009). En este trabajo hemos observado en la línea celular tumoral humana HeLa mantenida en condiciones de ausencia de suero y baja densidad justo el efecto contrario, es decir, la inducción de la síntesis de ADN y el crecimiento celular. El siguiente objetivo fue estudiar cómo responderían otras líneas celulares al tratamiento con ES936 en ausencia de suero y en las dos

condiciones de densidad celular utilizadas en este trabajo. Para este estudio utilizamos fibroblastos 3T3 de ratón, células HepG2 de hepatoblastoma humano y células Caco-2 de carcinoma de colon humano.

En el caso de las células 3T3, una línea transformada no tumoral de fibroblastos de ratón que se caracteriza por detener su crecimiento en G_0/G_1 tras 24 horas de retirada de suero, la adición de ES936 estimuló la síntesis tanto en cultivos con baja densidad celular como en alta, si bien la respuesta no fue idéntica en ambos casos (Figura 43A). En condiciones de baja densidad, la incorporación de timidina radiactiva se duplicó respecto a los controles con dosis de ES936 comprendidas entre 100 nM y 1 μ M; en alta densidad apareció una intensa estimulación entre 600 nM y 1 μ M, alcanzado un máximo superior al registrado con células dispersas.

En la línea tumoral humana HepG2 se observó un patrón completamente distinto al descrito para HeLa. Así, la inducción en la síntesis de ADN apareció en células confluentes, si bien con dosis de 1 μ M ES936 o superiores. Cuando se probó en cultivos de células dispersas se pudo constatar una fuerte inhibición en la síntesis de ADN a partir de 300 nM ES936 (Figura 43B).

Finalmente, en cultivos de células Caco-2 no apareció estímulo en la síntesis de ADN por ES936; por el contrario, esta síntesis se inhibió a partir de 300 nM ES936 (Figura 43C). En condiciones de confluencia no hubo ni activación ni inhibición en la incorporación de timidina para todo el rango de concentraciones de ES936 probadas. Se sabe que la línea Caco-2 no presenta actividad NQO1 debido a que muestra el polimorfismo *NQO1*2* que codifica para una proteína que es inmediatamente degradada por el proteosoma (Siegel *et al.*, 2001). De este modo, la fuerte acción negativa del tratamiento con ES936 en la síntesis de ADN en los cultivos de células Caco-2 dispersas refuerza la idea de que la inhibición del crecimiento tumoral que llevan a cabo indolquinonas como ES936 no guarda relación con la capacidad inhibidora de NQO1 que presentan algunas de ellas (Dehn *et al.*, 2006; Reigan *et al.*, 2007).

En conjunto, nuestros resultados demuestran que el efecto que la indolquinona ES936 ejerce sobre la síntesis de ADN puede ser positivo o negativo dependiendo del contexto celular y de las condiciones de cultivo consideradas.

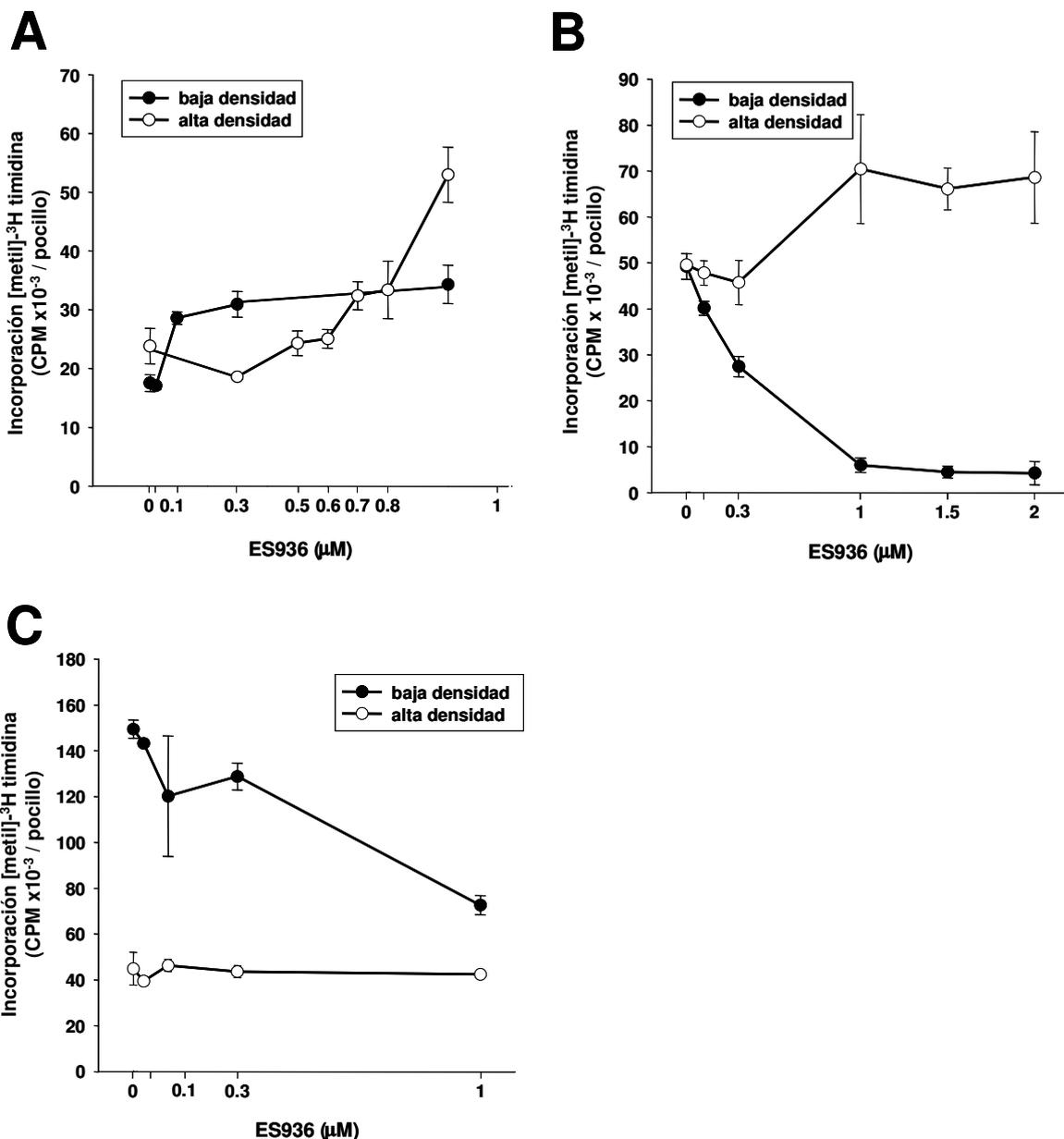
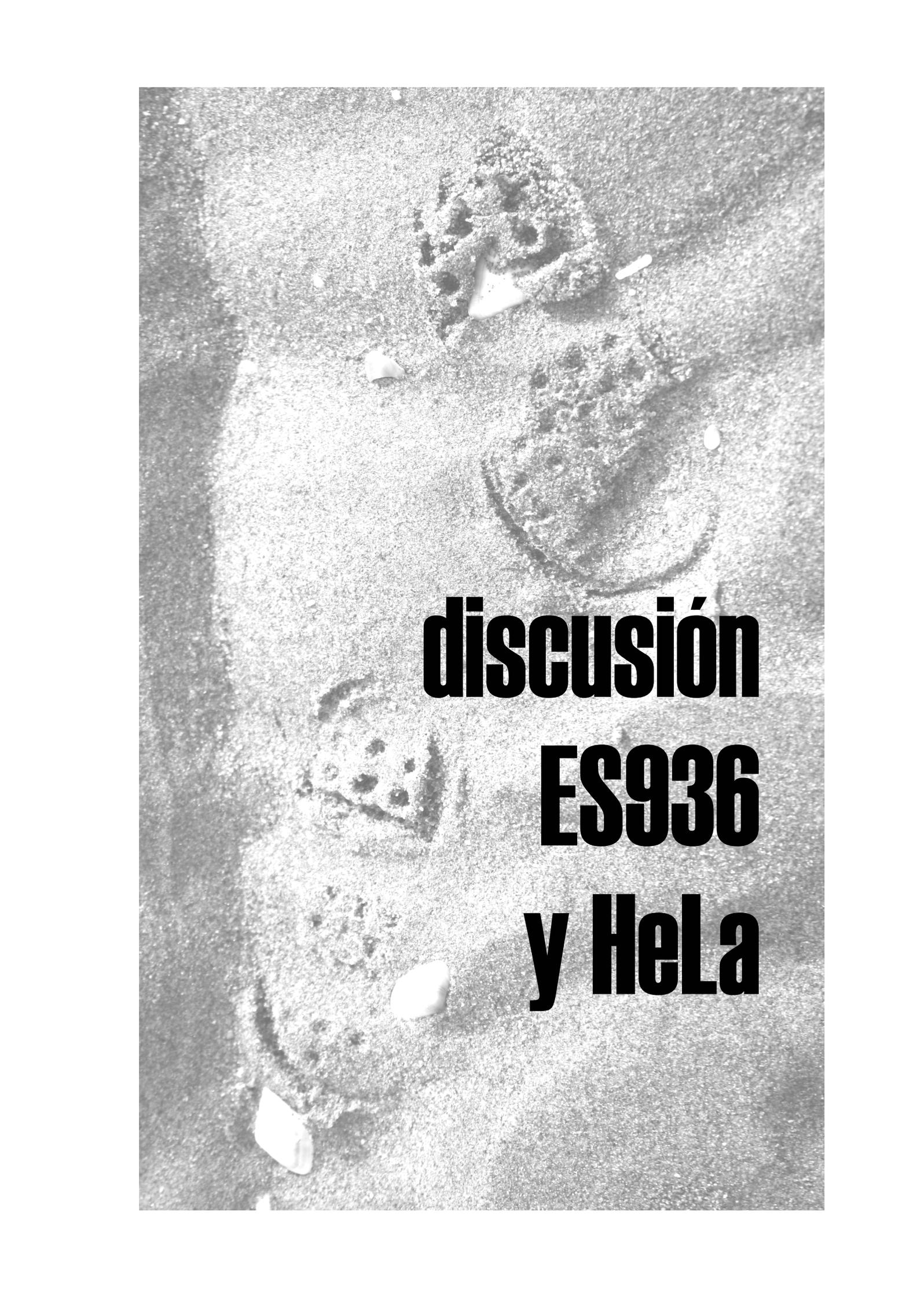


Figura 43: Efecto de ES936 sobre la síntesis de ADN en diferentes líneas celulares. (A) Fibroblastos 3T3 de ratón, células dispersas: $p < 0,001$, células en alta densidad: $p < 0,001$; (B) células HepG2 de hepatoblastoma humano, células dispersas: $p < 0,001$, células en alta densidad: $p < 0,01$; y (C) células Caco-2 de adenocarcinoma de colon humano, células dispersas: $p < 0,001$. El efecto de ES936 en la incorporación de timidina dependía por completo del contexto celular (tipo de célula y condiciones de crecimiento, detalladas en el apartado de Materiales y métodos). Los datos representados son la media \pm desviación estándar ($n = 3$; los valores de significatividad estadística indicados para cada uno de los tipos y densidades celulares se han determinado mediante ANOVA).



discusión
ES936
y HeLa

Imagen de fondo de la página anterior: Las huellas de los zapatos de Mari Carmen en la playa de Isla Canela (Huelva) durante el verano de 2009. No hubo manera de hacerle andar descalza. Los resultados obtenidos con el ES936 también se mostraron igual de tercos y nos llevaron de un lado para otro.

El uso de las indolquinonas como potenciales agentes antitumorales ha dado lugar a la aparición de numerosos trabajos científicos que tratan de dilucidar las bases de su mecanismo de acción sobre el crecimiento de células tumorales (Beall *et al.*, 1998; Faig *et al.*, 2001; Winski *et al.*, 2001; Jaffar *et al.*, 2003; Alcaín & Villalba, 2007). Una de estas indolquinonas, ES936, presentada como un inhibidor específico e irreversible de NQO1 basado en el mecanismo (Dehn *et al.*, 2003), suprime de manera muy efectiva el crecimiento de células cancerosas pancreáticas (Dehn *et al.*, 2006). Estudios posteriores han demostrado que este efecto citotóxico no está mediado por la inactivación de NQO1 (Reigan *et al.*, 2007) sino por una acción secundaria de ES936 como inhibidor de la tioredoxina reductasa (Yan *et al.*, 2009).

En este trabajo se demuestra por primera vez que los efectos de ES936 en el crecimiento de las células tumorales pueden ser más complejo de lo que se supuso inicialmente ya que el tratamiento con esta indolquinona puede inhibir o inducir la síntesis de ADN, es decir, el crecimiento celular, dependiendo de la línea celular y de las condiciones de cultivo consideradas. Así, la síntesis de ADN se estimuló por ES936 en la línea celular HeLa mantenida en baja densidad mientras que los cultivos de alta no se afectaron significativamente (Figura 33). Los fibroblastos de ratón 3T3 fueron estimulados por ES936 tanto en baja como en alta densidad aunque con concentraciones diferentes (Figura 43A). La línea HepG2 de hepatoblastoma humano mostró un comportamiento dual a la adición de ES936: aumentó la síntesis de ADN en condiciones de confluencia y la inhibió significativamente en baja densidad (Figura 43B). Por último, las células Caco-2, que no presentan actividad NQO1 (Siegel *et al.*, 2001), no se afectaron por ES936 en alta densidad pero su crecimiento se inhibió notablemente a partir de 300 nM ES936 (Figura 43C).

Estas diferencias en las respuestas celulares podrían ser explicadas por la generación de especies reactivas de oxígeno y las consiguientes alteraciones en el balance redox de las células tratadas con ES936. Como ya se describió con detalle en la introducción, las especies reactivas de oxígeno pueden provocar distintos comportamientos en las células: estimulación del crecimiento, detención del crecimiento de forma temporal o permanente, senescencia, apoptosis o necrosis. La aparición de una u otra respuesta depende de la intensidad y duración del estímulo,

el sitio donde se generan las especies reactivas y el tipo celular (Allen & Tresini, 2000; Drögue, 2001; Nicco & Bateaux, 2005; Menon & Goswami, 2007).

Es importante subrayar un aspecto a veces descuidado en los trabajos científicos que emplean líneas celulares. Se ha demostrado que algunas respuestas celulares dependen de la densidad del cultivo, es decir, del número de células que están creciendo en un área determinada. Por ejemplo, se ha descrito con detalle la regulación de la expresión de algunas enzimas antioxidantes en función de la densidad celular y de la fase de crecimiento en varios tipos celulares. La citocromo *b*₅ reductasa incrementa su expresión en células HeLa conforme aumenta la densidad del cultivo (Bello, 2003). En células NIH-3T3 se han descrito variaciones en la expresión de las diferentes enzimas tipo SOD en relación con la densidad celular; mientras MnSOD disminuye con la densidad, CuZnSOD se mantiene (Oberley *et al.*, 1995). Respecto a NQO1, diversos trabajos muestran la estrecha relación que mantiene sus niveles de expresión con la densidad en distintas líneas celulares (Schlager *et al.*, 1993; Phillips *et al.*, 1994; Collin *et al.*, 2001; Bello *et al.*, 2001; 2003; 2004). Incluso se ha comprobado que los cambios en la expresión de las proteínas antioxidantes con la densidad pueden ser opuestos en diferentes líneas celulares. Así, en células HeLa los niveles de NQO1 incrementan proporcionalmente con la densidad mientras que en HepG2 disminuyen cuanto mayor es el grado de confluencia del cultivo (Córdoba-Pedregosa *et al.*, 2006). En este trabajo hemos visto que la respuesta de las líneas celulares empleadas al tratamiento con ES936 variaba con la densidad: el estímulo en la síntesis de ADN aparece en células HeLa dispersas y en células HepG2 confluentes, mientras que las respuestas en 3T3 y en Caco-2 a las distintas dosis de ES936 varían con el grado de confluencia del cultivo (Figuras 33 y 43). Por tanto, algún elemento dependiente de la densidad del cultivo subyace en el comportamiento de cada línea celular a la adición de ES936 sin que hayamos podido determinar su naturaleza.

En este trabajo se señala también que los tratamientos con ambroxol y piruvato, conocidos *scavengers* de superóxido y peróxido respectivamente, eliminaron el efecto estimulante de ES936 sobre la síntesis de ADN (Figura 38). Sin embargo, no hemos podido demostrar mediante citometría de flujo un incremento de estas especies reactivas usando HEt y DCFH-DA como sondas. Esta misma incapacidad para registrar con el citómetro de flujo el incremento de las ROS se

señala en un trabajo anterior donde tampoco detectan un aumento en los niveles intracelulares de superóxido tras el tratamiento de células pancreáticas tumorales con ES936, argumentándose la baja sensibilidad de esta técnica como posible explicación (Dehn *et al.*, 2006). Estos resultados sugieren que la estimulación de la síntesis de ADN por ES936 podría estar mediada por cambios sutiles en las concentraciones intracelulares de ROS.

¿Hay alguna relación entre la proteína NQO1 y el efecto de ES936? Hay que partir de que ES936 es un inhibidor de NQO1 (Dehn *et al.*, 2003), lo que lógicamente convierte a esta proteína en la primera candidata a considerar. La supresión de la actividad NQO1 supone una alteración importante en la defensa antioxidante celular, provocando un desajuste en el balance redox. En el párrafo anterior hemos señalado precisamente la variedad de respuestas celulares a este desequilibrio, de modo que no es descabellado suponer que la inhibición de NQO1 con ES936 crea unas condiciones prooxidantes que estimulan el crecimiento de la célula. Además, no debemos dejar pasar por alto un dato: ES936 estimula la síntesis de ADN cuando la línea celular presenta sus niveles de expresión de NQO1 más bajos, es decir, en baja densidad para la línea HeLa (Bello, 2001) y en alta densidad para HepG2 (Córdoba-Pedregosa, 2006). En Caco-2, que carece de actividad NQO1, no hay inducción en la síntesis de ADN independientemente del grado de confluencia celular. En 3T3 la relación entre el efecto de ES936 y los niveles de NQO1 no está tan clara: el estímulo aparece antes en condiciones de baja densidad, justo cuando NQO1 presenta sus niveles más bajos de expresión, pero la respuesta máxima se da en alta densidad, con los niveles más elevados de NQO1 y con la dosis mayor de ES936 (Figuras 33 y 43).

Los resultados obtenidos mediante el uso de herramientas genéticas, como el silenciamiento de la expresión del gen NQO1 mediante ARNi, nos ha permitido demostrar de manera inequívoca que la inhibición de NQO1 no está implicada en el efecto estimulador de la síntesis de ADN por parte de ES936, al menos en células HeLa dispersas (Figura 37). Por tanto, ES936 debe tener otra diana aparte de NQO1. Esa diana, como ya hemos explicado antes, parece estar condicionada por el tipo celular y por la fase de crecimiento del cultivo, es decir, su menor o mayor grado de confluencia, que podría afectar a la expresión de diversas enzimas antioxidantes. La señal que genera estaría mediada por especies reactivas de oxígeno puesto que

el tratamiento con ambroxol y piruvato, *scavengers* de superóxido y peróxido de hidrógeno respectivamente, afectan al estímulo iniciado por ES936 (Figura 38).

Se ha descrito que ES936 y otras indolquinonas derivadas de ella actúan como inhibidoras de la tiorredoxina reductasa (Dehn *et al.*, 2006; Reigan *et al.*, 20007; Yan *et al.*, 2009). En estudios preliminares, nuestro grupo ha comprobado el efecto del 1-cloro-2,4-dinitrobenceno, un inhibidor de la tiorredoxina reductasa (Arnér *et al.*, 1995), en células HeLa cultivadas en las mismas condiciones empleadas con ES936, pero el compuesto resultó tóxico para las células a concentraciones superiores a 10 μ M sin que se observara estimulación en la síntesis de ADN en ninguna de las dosis empleadas (González-Aragón *et al.*, 2010).

Los datos de síntesis de ADN y el recuento celular obtenidos en este trabajo apuntan a la interacción de ES936 con los mecanismos reguladores del ciclo celular por lo que estudiamos mediante *western-blot* las posibles variaciones en los niveles de expresión de la proteína p21. Como ya se dijo en la Introducción, esta CKI es especialmente sensible a las modificaciones del estado redox celular. Sorprendentemente en nuestros experimentos obtuvimos una dinámica completamente opuesta a la esperada: ES936 aumentó de forma progresiva durante las primeras 6 horas de tratamiento los niveles de p21 mientras que los controles mostraban justo la tendencia contraria (Figura 39). Esto significaba que pRb estaría hipofosforilado y que el cultivo celular debía estar detenido en G₁, lo que sería completamente incoherente con los resultados de la síntesis de ADN y del recuento celular. Pero la interpretación de la acción de p21 no puede realizarse tan a la ligera.

El papel de p21 en la detención del ciclo celular mediada por p53 ha sido estudiado con detalle (revisado en Vidal & Koff, 2000). Sin embargo, cuando parecían conocerse todos los entresijos de este regulador negativo de la proliferación nos encontramos con la sorpresa de sus múltiples acciones en la fisiología de la célula. Además de su reconocida acción como inhibidora de las Cdks, la proteína p21 interviene también en la inducción de la supervivencia y la proliferación de la célula. Para entender la multiplicidad funcional de p21 se deben considerar dos aspectos: su localización subcelular y sus diversas posibilidades de fosforilación. Se ha comprobado que p21 favorece la proliferación y la supervivencia de la célula cuando se encuentra en el citosol. Fuera del núcleo, donde actúa como

CKI, p21 facilita la unión de las ciclinas tipo D a Cdk4 y Cdk6 y la posterior traslocación de estos complejos al núcleo (Cheng *et al.*, 1999). Esto da lugar a un aumento de los niveles de complejos activos ciclina D-Cdk4/6, a la fosforilación de pRb y a la superación del punto de restricción de G₁. Del mismo modo, la actividad del complejo ciclina B-Cdk1 en la transición G₂/M depende de p21 (Dulic *et al.*, 1998). Se ha descrito también que p21 se une a la procaspasa 3 y evita su activación, bloqueando de este modo la apoptosis mediada por Fas (Suzuki *et al.*, 1998). Este papel anti-apoptótico se completa con la participación de p21 en la inhibición de la quinasa pro-apoptótica ASK1, que también tiene lugar, como todas las acciones señaladas, en el citosol (Asada *et al.*, 1999). La acción anti-apoptótica de p21 en el citosol, observado también en la CKI p27, ha dado lugar a que se la califique incluso como oncoproteína (Blagosklonny, 2002; Roninson, 2002). Hasta hace relativamente poco resultaba prácticamente imposible reconciliar roles tan incompatibles entre sí en una misma proteína. Sin embargo, el progresivo conocimiento de la fosforilación diferencial de p21 ha dado la clave que explica su multifuncionalidad. Se sabe que determinados residuos de serina (S130, S146, S153, S160) y treonina (T57, T145) presentes en p21 son específicamente fosforilados por distintas quinasas (GSK3 β , JNK/p38, complejos ciclina/Cdk, Akt, Mirk, PKC) (revisado en Child & Mann, 2006). Aún queda mucho para comprender en su globalidad el papel que la fosforilación juega en el control de la biología molecular de p21, pero es evidente que esta modificación covalente puede tener profundas consecuencias en su funcionalidad. Resumiendo, para entender el papel de p21, habría que considerar las consecuencias que las diversas fosforilaciones tienen sobre su estructura, su capacidad para interaccionar con otras proteínas, su localización subcelular y su estabilidad. Por tanto, el aumento que observamos en p21 en las primeras 6 horas de tratamiento con ES936 no tendría por qué llevar irremediablemente a la detención de la población en G₁, aunque habitualmente se simplifique el papel de p21 a su acción como CKI.

Diversos estudios han demostrado que las especies reactivas derivadas del oxígeno pueden provocar la fosforilación y la activación de numerosas proteínas implicadas en las rutas de señalización celular entre las que se incluyen RTK, PKC, PLC γ 1, MAPKs, la proteína quinasa B o los receptores de PDGF y EGF (revisado en Boonstra & Post, 2004). Lo que se sugiere en todos estos casos es que las especies reactivas inician la señalización imitando la acción que realizarían los estímulos

específicos de cada una de las rutas. Se había propuesto que el efecto citotóxico del tratamiento con ES936 en las células MIA-Paca de cáncer de páncreas podría estar mediado por la generación de superóxido, como ya se demostró con el uso del dicumarol (Cullen *et al.*, 2003; Du *et al.*, 2006); sin embargo, esta hipótesis no se ha confirmado (Dehn *et al.*, 2006) sino que parece que la citotoxicidad deriva de la acción de ES936 como inhibidora de la actividad tiorredoxina reductasa (Yan *et al.*, 2009). En cualquier caso, los datos que hemos obtenido al tratar simultáneamente cultivos dispersos de células HeLa con ES936 y piruvato, que actúa como *scavenger* de H₂O₂ (Giandomenico *et al.*, 1997; Bello *et al.*, 2001; 2005), sugieren la participación de esta especie reactiva en la estimulación de la síntesis de ADN (Figura 38). Esta hipótesis se consolida con los datos relativos a las rutas de señalización utilizadas por ES936.

Se ha descrito que diversas moléculas oxidativas pueden inducir, en ausencia de ligando, la fosforilación de receptores transmembrana de tipo tirosina quinasa, como EGFR, y la activación de las rutas MAPKs, induciendo respuestas celulares de adaptación a situaciones de estrés (revisado en Thannickal & Fanburg, 2000 y Drögue W, 2002). Hemos mostrado en los resultados que los inhibidores de EGFR (AG1478) y p38 MAPK (SB203580 y PD169316) bloquean de modo significativo el efecto de ES936, por lo que podemos afirmar que la estimulación de la síntesis de ADN por ES936 implica la activación independiente de ligando de EGFR y la señalización a través de p38 (Figuras 40 y 41). Los dos inhibidores de p38 probados, SB203580 y PD169316, eliminaron claramente la síntesis de ADN estimulada por ES936, observándose este efecto con concentraciones nanomolares en ambos casos (Figuras 41C y 41D). El perfil de inhibición de la síntesis de ADN es coherente con los valores IC₅₀ señalados para SB203580 (70 nM) y PD169316 (90 nM) en ausencia de suero (Clerk & Sugden, 1998; Gallagher *et al.*, 1997). La interrupción de la ruta de JNK con SP600125 también anuló parcialmente la inducción del crecimiento aunque con concentraciones que pueden ser suficientes para afectar a otras quinasas como p38 (Bennet *et al.*, 2001) por lo que esta inhibición parcial podría ser un efecto secundario de SP600125 sobre p38 MAPK, confirmando los resultados obtenidos con los inhibidores específicos de esta última ruta (Figura 41B). El tratamiento con PD98059, un inhibidor de MEK, anulaba la acción de ES936 sólo a concentraciones altas y, muy posiblemente, inespecíficas, lo que nos hace descartar la mediación de ERK1/2 (Figura 41A). Por tanto, la acción de ES936

requiere la presencia activa de p38 de modo que la inhibición farmacológica de esta ruta impide que ES936 realice sus efectos en las células HeLa. Es muy interesante, además, el hecho de que p38 fosforile el residuo S130 de la proteína p21 (Child & Mann, 2006) lo que sugiere que una posible conexión entre ambas proteínas podría explicar las acciones de ES936, si bien en este trabajo no se ha comprobado esta posibilidad. Child y Mann (2006) apuntan que p21 juega un papel fundamentalmente transcripcional cuando es fosforilada por p38 en el residuo S130.

Puesto que los resultados de *western-blot* mostraron una marcada fosforilación de p38 tanto en las células control como en las tratadas con ES936 podemos concluir que, aunque ES936 no modifica la fosforilación de p38, su efecto requiere que esta ruta esté previamente activa (Figura 42). Es posible que ES936 determine la síntesis de una molécula que es modificada, directa o indirectamente, por la ruta de señalización dependiente de p38 para posteriormente estimular la síntesis de ADN.

Clásicamente se ha relacionado la activación de la ruta p38 MAPK con estímulos apoptóticos. Así, p38 actúa como un sensor de especies reactivas de oxígeno que suprime *in vivo* la formación de tumores induciendo la apoptosis (Dolado *et al.*, 2007). Sin embargo, recientemente se ha señalado que esta MAPK puede ejercer un papel dual positivo o negativo sobre el progreso del ciclo celular dependiendo del tipo celular y estímulo considerados. En algunas líneas celulares, p38 MAPK tiene una acción inhibidora sobre el avance del ciclo celular (Ono & Han, 2000; Nebreda & Porras, 2000). Pero, por otro lado, se acumulan las pruebas que muestran que su activación también puede favorecer la proliferación celular. Por ejemplo, esta ruta de señalización estimula el crecimiento de las células FRTL-5 de tiroides incrementando la actividad Cdk2 (Corrèze *et al.*, 2005); también se ha descrito que participa en la inducción de la proliferación por el factor de crecimiento epidérmico-2 en células Swiss 3T3 y en células musculares de las vías respiratorias (Maher, 1999; Fernandes *et al.*, 2004), así como de células hematopoyéticas estimuladas por citoquinas (Rausch & Marshall, 1999; Liu *et al.*, 2000) y de células de páncreas estimuladas por PDGF (Masamune *et al.*, 2003). En células tumorales, la actividad p38 MAPK permite el avance del ciclo celular en líneas celulares de melanoma (Recio & Merlino, 2002), condrosarcoma (Halawani *et al.*, 2004) y cáncer de mama (Neve *et al.*, 2002). Se ha demostrado que p38 MAPK está activa durante

la fase logarítmica del crecimiento de dos líneas celulares procedentes de diferentes fases tumorales y que la inhibición de esta ruta reduce la proliferación y el crecimiento del tumor (Kuma *et al.*, 2009).

Resumiendo: p38 realiza tanto funciones mitogénicas como antimitogénicas. Sin embargo, el progreso de la señalización así como las identidades de los agentes intermediarios que intervienen en las diferentes acciones de la ruta sobre el ciclo celular no han sido aún bien caracterizados, lo que ayudaría a comprender el comportamiento de las líneas celulares tras la activación de p38.

Antes hacíamos referencia al papel de las especies reactivas de oxígeno como activadoras de las distintas rutas de señalización celular, bien induciendo o inhibiendo el crecimiento. Se ha demostrado, por ejemplo, que la incubación con H₂O₂ estimula el crecimiento de fibroblatos V79 de hámster. La adición de inhibidores específicos de p38 MAPK como SB203580 (utilizado en este trabajo) o SB202190 suprimen este efecto pero no PD98059, inhibidor de la ruta de ERK (también utilizado en este trabajo) (Kim *et al.*, 2001). Nuestros resultados con ES936 y HeLa dispersas coinciden con estos datos. Los tratamientos con piruvato apuntan a la presencia de peróxido en la inducción realizada por ES936 y los datos de inhibición farmacológica de las distintas MAPKs señalan a p38 y JNK, especialmente la primera, como vías necesarias para el efecto, descartando a ERK.

Curiosamente, en nuestra investigación hemos comprobado que la estimulación del crecimiento en HeLa y HepG2 se produjo en condiciones en las que la enzima catalasa, que convierte el peróxido en agua, se encuentra en sus niveles más bajos de expresión. Así, en HeLa, la catalasa es dependiente de la densidad del cultivo y sigue el mismo patrón que hemos descrito para NQO1. En confluencia la actividad enzimática de la catalasa incrementa cinco veces respecto a los cultivos dispersos (7,1 nmoles x min⁻¹ x mg prot⁻¹ frente a 1,5 nmoles x min⁻¹ x mg prot⁻¹, respectivamente) (Bello *et al.*, 2001). En células HepG2, los niveles de actividad no se afectaron por la densidad pero, en cualquier caso, siempre presentaron valores similares a los de HeLa dispersas (en torno a 1,5 nmoles x min⁻¹ x mg prot⁻¹) (Córdoba-Pedregosa *et al.*, 2006). Parece, por tanto, que el efecto de ES936 requiere niveles bajos de expresión de catalasa y NQO1, lo que es coherente con la posible intervención de H₂O₂ a la que hemos hecho referencia antes. Estas

condiciones se dan en HeLa dispersas y en HepG2 confluentes, en las que efectivamente hemos observado una inducción del crecimiento celular con ES936.

La incubación con AG1478, un inhibidor específico de EGFR, anulaba el efecto del tratamiento con ES936 en HeLa (Figura 40), lo que apunta también a una relación entre la producción de H_2O_2 y la intervención de la ruta mediada por EGFR. Se ha señalado que el tratamiento de células de la musculatura lisa vascular con H_2O_2 induce la fosforilación de EGFR y que esta activación se revierte por la adición de catalasa (Boonstra & Post, 2004). La acción del peróxido en la fosforilación de EGFR parece ser indirecta porque lo que realmente se ha demostrado es que este radical de oxígeno inhibe la actividad fosfatasa y, por tanto, favorece el estado fosforilado de las tirosinas de EGFR. Hay que señalar que se ha demostrado que la actividad *in vitro* de las fosfatasas es de 10 a 1000 veces superior a las de tirosín quinasa (Fischer *et al.*, 1991) de modo que, en la mayoría de las líneas celulares estudiadas, la fosforilación que activa a los receptores tirosín quinasa como EGFR requiere, además de la unión de un factor de crecimiento (en el caso señalado, EGF), la inhibición simultánea de las fosfatasas, inhibición que podría ser llevada a cabo por H_2O_2 producido intracelularmente (Bae *et al.*, 1997).

Se ha demostrado que la actividad pro-apoptótica de p38 está a menudo desligada de la sensibilidad a las ROS hasta el punto de que algunas líneas de células tumorales que presentan de manera persistente elevados niveles de ROS son capaces de inhibir esa función pro-apoptótica de p38 sin afectar a otra serie de procesos relacionados con la viabilidad y el crecimiento dependientes de p38 (Dolado *et al.*, 2007). En esta misma línea se ha demostrado recientemente que un agonista de PPAR δ incrementa la proliferación celular dependiente de ROS y de p38 (Jeong *et al.*, 2009) y que H_2O_2 induce la fosforilación de EGFR en células madres embriónicas de ratón, lo que puede ser bloqueado por la inhibición de p38 (Lee *et al.*, 2009). Estos datos coinciden con nuestras observaciones sobre la necesidad de la actividad p38 MAPK y la señalización dependiente de EGFR para que ES936 estimule la síntesis de ADN en células HeLa a través de un mecanismo que posiblemente implique alteraciones en el balance redox celular.

En resumen, en este trabajo se demuestra por primera vez que la indolquinona ES936 no sólo puede inducir una inhibición de la proliferación de

células tumorales sino que, dependiendo del contexto celular y de las condiciones de crecimiento, puede dar lugar a una estimulación de la proliferación. Aún quedan por determinar los factores celulares que modulan la acción de ES936 por mediación de p38 MAPK como promotora del crecimiento, particularmente en lo relativo al posible papel desempeñado por p21 en estos procesos.

conclusiones

- 1. Los efectos provocados por el dicumarol en la línea celular humana HL-60 cultivada en ausencia de suero, esto es, el incremento en los niveles de superóxido intracelular y la acumulación de la población en la fase S del ciclo celular, son independientes de su condición de inhibidor de la proteína NQO1.**

- 2. Dichos efectos se deben a la alteración de la fisiología mitocondrial porque:**
 - 2.1. El dicumarol inhibe directamente los Complejos II, III y IV de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.**

 - 2.2. El dicumarol induce la producción de superóxido en el Complejo II mitocondrial favoreciendo el transporte inverso de electrones en este complejo.**

 - 2.3. La alteración de la cadena respiratoria mitocondrial implica la detención de la biosíntesis de pirimidinas a nivel de la enzima dihidroorotato deshidrogenasa, cuya actividad catalítica depende del balance ubiquinona/ubiquinol mitocondrial, con el consiguiente acúmulo de la población celular en la fase S del ciclo.**

- 3. La indolquinona ES936 induce la síntesis de ADN y la proliferación en células HeLa cultivadas en condiciones de baja densidad y ausencia de suero.**

- 4. A pesar de que se ha descrito a ES936 como un inhibidor potente y específico de NQO1, estos efectos no están mediados por dicha proteína.**

- 5. El mecanismo de acción de ES936 en HeLa requiere la actividad de p21, EGFR y p38 MAPK y podría estar mediado por H₂O₂.**

- 6. ES936 induce la síntesis de ADN en otras líneas celulares y en otras condiciones de cultivo distintas a las empleadas para HeLa; por tanto, el tipo celular y la fase de crecimiento deben ser considerados a la hora de interpretar los efectos del tratamiento con ES936.**



JORGE CHAM © 2007



WWW.PHDCOMICS.COM

bibliografía

Imagen de la página anterior: Cómic breve pero directo que José Alberto López Domínguez, becario del grupo, me puso en el armario del despacho allá por el verano de 2008. Por entonces empezaba a pasar algunas noches en vela junto a una cuna...

Abdelmosen K, Stuhlmann D, Daubrawa F, Klotz LO (2005) Dicumarol is a potent reversible inhibitor of gap junctional intercellular communication. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **434**: 241-247.

Ahn KS, Gong X, Sethi G, Chaturvedi MM, Jaiswal AK, Aggarwal BB (2007) Deficiency of NRH:Quinone Oxidoreductase 2 Differentially Regulates TNF Signaling in Keratinocytes: Up-regulation of Apoptosis Correlates with Down-regulation of Cell Survival Kinases. *Cancer Res* **67(20)**: 10004-10011.

Alcaín FJ, Villalba JM (2007) NQO1-directed antitumor quinones. *Expert opin Ther Pat* **17**: 649-665.

Alesiani D, Cicconi R, Mattei M, Montesano C, Bei R, Canini A (2008) Cell cycle arrest and differentiation induction by 5,7-dimethoxycoumarin in melanoma cell lines. *International Journal of Oncology* **32**: 425-434.

Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, and Saltiel AR (1995) PD098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* **270**:27489–27494.

Åmellen Ø, Löffler M, Pettersen EO (1994) Regulation of cell proliferation under extreme and moderate hypoxia: the role of pyrimidine (deoxy)nucleotides. *Br J Cancer* **70**: 857-866.

Ammendola R, Mesuraca M, Russo T, Cimino F (1994) The DNA binding efficiency of Sp1 is affected by redox changes. *Eur J Biochem* **225**: 483-498.

Anderson RF, Hille R, Shinde SS, Cecchini G (2005) Electron transfer within Complex II. Succinate:ubiquinone oxidoreductase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **280 (39)**: 33331-33337.

Anwar A, Dehn D, Siegel D, Kepa JK, Tang LJ, Pietenpol A, Ross D (2003) Interaction of human NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) with the tumor suppressor protein p53 in cells and cell-free systems. *J Biol Chem* **19**: 316-321.

Arnér ESJ, Björnstedt M, Holmgren A (1995) 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene is an irreversible inhibitor of human thioredoxin reductase. *J Biol Chem* **270(8)**: 3479-3482.

Arnér ESJ & Holmgren A (2006) The thioredoxin system in cancer. *Semin Cancer Biol* **16**: 420-426.

Asada M, Yamada T, Ichijo H, Delia D, Miyazono K, Fukumuro K, Mizutani S (1999) Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. *EMBO J* **18**:1223-34.

Asher G, Lotem J, Cohen B, Sachs L, Shaul Y (2000) Regulation of p53 stability and p53-dependent apoptosis by NADH quinone oxidoreductase. *PNAS* **98(3)**: 1188-1193.

Asher G, Lotem J, Kama R, Sachs L, Shaul Y (2002) NQO1 stabilizes p53 throughh a distinct pathway. *PNAS* **99(5)**: 3099-3104.

Asher G, Lotem J, Sachs L, Kahana C, Shaul Y (2002) Mdm-2 and ubiquitin-independent p53 proteasomal degradation regulated by NQO1. *PNAS* **99(20)**: 13125-13130.

Asher G, Lotem J, Tsvetkov P, Reiss V, Sachs L, Shaul Y (2003) p53 hot-spots mutants are resistant to ubiquitin-independent degradation by increased binding to NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1. *PNAS* **100(25)**: 15065-15070.

Asher G, Shaul Y (2005) p53 proteasomal degradation: poly-ubiquitanation is not the whole story. *Cell cycle* **4(8)**: 1015-1018.

Asher G, Tsvetkok P, Kahana C, Shaul Y (2005) A mechanism of ubiquitin-independent proteasonal degradation of the tumor supressors p53 and p73. *Genes Dev* **19**: 316-321.

Asher G, Dym O, Tsvetkov P, Adler J, Shaul Y (2006) The crystal structure of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 in complex with its potent inhibitor dicoumarol. *Biochemistry* **45**: 6372-6378.

Attardi G & Ching E (1979) Biogenesis of mitochondrial protein in HeLa cells. *Methods Enzymol* **56**: 66-79.

Bacsi A, Woodberry M, Widger W, Papaconstantinou J, Mitra S, Peterson JW, Boldogh I (2006) Localization of superoxide anion in production to mitochondrial electron transport chain in 3-NPA-treated cells. *Mitochondrion* **6**: 235-244.

Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB, Rhee SG (1997) Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. *J Biol Chem* **272(1)**:217-221.

Banes B, Hart I, Coles H, Burne J, Voyvodic J, Richardson W, Raft M (1992) Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* **70**: 31-46.

Barja G (1999) Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr* **31**, 347-366.

Barja G (2002) Rate of generation of oxidative stress-related damage and animal longevity. *Free Radic Biol & Med* **33**: 1167–1172.

Barnouin K, Dubuisson ML, Child ES, Fernández S, Glassford J, Medema RH, Mann DJ, Lam E (2002) H₂O₂ induces a transient multi-phase cell cycle arrest in mouse fibroblasts through modulating cyclin D and p21 Cip1 expression. *J Biol Chem* **277(16)**: 13761-13770.

Bartosz G (2009) Reactive oxygen species: Destroyers or messengers? *Biochem Pharmacol* **77**:1303-1315.

Beall HD, Hudnott AR, Winski S, Siegel D, Swann E, Ross D, Moody CJ (1998) Indolquinone antitumor agents: Relationship between quinone structure and rate of metabolism by recombinant human NQO1. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **8**: 545-548.

Behrend L, Henderson GZ, Wacka RM (2003) Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem Soc Trans* **31**: 1441-1444.

Bello RI, Gómez-Díaz C, Navarro F, Alcaín FJ, Villalba JM (2001) Expression on NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 in HeLa cells: role of hydrogen peroxide and growth phase. *J Biol Chem* **276**, 44379-44384.

Bello RI, Alcaín FJ, Gómez-Díaz C, López-Lluch G, Navas P, Villalba JM (2003) Hydrogen Peroxide- and Cell-Density-Regulated Expression of NADH-Cytochrome *b*₅ Reductase in HeLa Cells. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **35(2)**: 169-179.

Bello RI, Kagan VE, Tyurin V, Navarro F, Alcaín FJ, Villalba JM (2003) Regeneration of lipophilic antioxidants by NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1. *Protoplasma* **221**: 129-135.

Bello RI, Gómez-Díaz C, Navas P, Villalba JM (2004) NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 expression, hydrogen peroxide levels and growth phase in HeLa cells. *Methods Enzymol* **382**: 234-243.

Bello RI, Gómez-Díaz C, López-Lluch G, Forthoffer N, Córdoba-Pedregosa MC, Navas P, et al. (2005) Dicoumarol relieves serum withdrawal-induced G₀/G₁ blockade in HL-60 cells through a superoxide-dependent mechanism. *Biochem Pharmacol* **69**: 1613-1625.

Bennet BK, Sasaki DT, Murria BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S et al. (2001) SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:13681–13686.

Bensaad K & Vousden KH (2007) p53: new roles in metabolism. *TRENDS in Cell Biology* **17(6)**: 286-291.

Berardini MD, Souhami RL, Lee CS, Gibson NW, Butler J, Hartley JA (1993) Two structurally related diaziridinylbenzoquinones preferentially cross-link DNA at different sites upon reduction with DT-diaphorase. *Biochemistry* **32**: 3306-3312.

Beuneu C, Auger R, Löffler M, Guissani A, Lemaire G, Lepoivre M (2000) Indirect inhibition of dihydroorotate dehydrogenase activity by nitric oxide. *Free Rad & Med Biol* **28**: 1206-1213.

Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP (2006) Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim et Biophys Acta* **1758**:994–1003.

Bienert GP, Møller ALB, Kristiansen KA, Schulz A, Møller IA, Schjoerring JK, Jahn TP (2007) Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J Biol Chem* **282(2)**:1183-1192.

Blagosklonny MV (2002) Are p27 and p21 cytoplasmic oncoproteins? *Cell Cycle* **1(6)**:391-393.

Boonstra J & Post JA (2004) Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* **337**: 1-13.

Borges F, Roleira F, Milhazes N, Santana L, Uriarte E (2005) Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity. *Current Medicinal Chemistry* **12**: 887-916.

Boveris A, Oshino N, Chance B (1972) The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* **128**, 617-630.

Breedveld FC, Dayer JM (2000) Leflunomide: mode of action in the treatment of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **59**, 841-849.

Brown MR, Miller Jr FJ, Li WG, Ellingson AN, Mozena JD, Chatterjee P et al. (1999) Overexpression of human catalase inhibits proliferation and promotes apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **85**: 524–533

Buey RM, Barasoain I, Jackson E, Meyer A, Giannakakou P, Paterson I, Mooberry S, Andreu JM, Díaz JF (2005) Microtubule interactions with chemically diverse stabilizing agents: thermodynamics of binding to the paclitaxel site predicts cytotoxicity. *Chem & Biol* **12**: 1269-1279.

Burdon RH (1995) Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med* **18**: 775-794.

Burdon RH, Gill V (1993) Cellularly generated active oxygen species and HeLa cell proliferation. *Free Radic Res Commjun* **19**: 203-213.

Cadenas E (1995) Antioxidant and prooxidant functions of DT-Diaphorase in quinone metabolism. *Biochem Pharmacol* **49(2)**: 127-140.

Cadenas E (2004) Mitochondrial free radical production and cell signaling. *Molecular Aspects of Medicine* **25**: 17-26.

Campos EI, Chin MY, Kuo WH, Li G (2004) Biological functions of the ING family tumor suppressors. *Cell Mol Life Sci* **61**:2597–2613.

Cecchini G (2003) Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Annu Rev Biochem* **72**: 77-109.

Chance B & Williams GR (1956) The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Advan Enzymol Relat Subj Biochem* **17**, 65-134.

Chandel NS & Chumacker PT (1999) Cells depleted of mitochondrial DNA (ρ^0) yield insight into physiological mechanisms. *FEBS Letters* **454**: 173-176.

Chang TS, Jeong W, Choi SY, Yu S, Kang SW, Rhee SG (2002) Regulation of peroxiredoxin I activity by Cdc2- mediated phosphorylation. *J Biol Chem* **277**: 25370–25376.

Chen S, Wu K, Zhang D, Sherman M, Knox R, Yang CS (1999) Molecular characterization of binding of substrates and inhibitors to DT-diaphorase: combined approach involving site-directed mutagenesis, inhibitor-binding analysis, and computer modeling. *Mol Pharmacol* **56**, 272-278.

Cheng M, Olivier P, Diehl JA, Fero M, Roussel MF, Roberts JM, Sherr CJ (1999) The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK inhibitors, are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J* **18**:1571-83.

Child ES & Mann DJ (2006) The intricacies of p21 phosphorylation. *Cell Cycle* **5**(12):1313-1319.

Chiu MN, Ko YJ, Tsou AP, Chau GY, Chau TP (2009) Analysis of NQO1 polymorphisms and p53 protein expression in patients with hepatocellular carcinoma. *Histo Histopathol* **24**: 1223-1232.

Clerk A, Sugden PH (1998) The p38-MAPK inhibitor, SB203580, inhibits cardiac stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal kinases (SAPKs/JNKs). *FEBS Lett* **426**: 93-96.

Colliers AB, Pritsos CA (2003) The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT assay. *Biochem Pharmacol* **66**: 281-287.

Collin P, Lomri A, Marie PJ (2001) Expression and activity of NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) in human osteoblastic cells. *Bone* **28**: 9-13.

Conover TE, Ernster L (1962) DT-Diaphorase: relation to respiratory chain of intact mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **58**:189–200.

Conour JE, Graham WV, Gaskins HR (2004) A combined in vitro/bioinformatic investigation of redox regulatory mechanisms governing cell cycle progression. *Physiol Genomics* **18**: 196-205.

Conrad M, Jakupoglu C, Moreno SG, Lippl S, Banjac A, Schneider M, Beck H, Hatzopoulos AK et al., (2004) Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function, *Mol Cell Biol* **24**: 9414–9423.

Constantinescu A, Maguirre JJ, Packer L (1994) Interactions between ubiquinones and vitamins in membranes and cells. *Mol Aspects Med* **15**, s57–s65.

Córdoba-Pedregosa MC, Villalba JM, González-Aragón D, Bello RI, Alcaín FJ (2006) Cellular density and cell type are key factors in growth inhibition induced by 2,5-bis-[1-aziridiny]-1,4-benzoquinone (DZQ). *Anticancer Res* **26**: 3535-3540.

Corrèze C, Blondeau J-P, Pomérance M (2005) p38 mitogen-activated protein kinase contributes to cell cycle regulation by cAMP in FRTL-5 thyroid cells. *Eur J Endocrinol* **153**: 123-133.

Cross JV, Deak JC, Rich EA, Qian Y, Lewis M, Parrot LA, Mochida K, Gustafson D, Vande Pol S, Templeton DJ (1999) Quinone reductase inhibitors block SAPK/JNK and NFκB pathways and potentiate apoptosis. *J Biol Chem* **274(44)**: 31150-31154.

Cullen JJ, Hinkhouse MM, Grady M, Gaut AW, Liu J, Zhang YP, et al. (2003) Dicumarol inhibition of NADPH:quinone oxidoreductase induces growth inhibition of pancreatic cancer via superoxide-mediated mechanism. *Cancer Res* **63**: 5513-5520.

De Grey, A (2000) Non-correlation between maximum life span and antioxidant enzyme levels among homotherms: implications for retarding human aging. *J Antiaging Med* **3**: 25–36.

Dehn DL, Siegel D, Swann E, Moody CJ, Ross D (2003) Biochemical, cytotoxic and genotoxic effects of ES936, a mechanism-based inhibitor of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1, in cellular systems. *Mol Pharmacol* **64**, 714-720.

Dehn DL, Siegel D, Zafar KS, Reigan P, Swann E, Moody CJ, et al. (2006) 5-methoxy-1,2-dimethyl-3-[(4-nitrophenoxy)methyl]indole-5,4-dione, a mechanism-based inhibitor of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1, exhibits activity against human pancreatic cancer *in vitro* and *in vivo*. *Mol Cancer Ther* **5**:1702-1709.

Del Bello B, Paolicchi A, Comporti M, Pompella A, Maellaro E (1999) Hydrogen peroxide produced during γ -glutamyl transpeptidase activity is involved in prevention of apoptosis and maintenance of proliferation in U937 cells. *FASEB J* **13**: 69–79.

Deller S, Macheroux P, Sollner S (2008) Flavin-dependent quinone reductases. *Cell Mol Life Sci* **65**: 141-160.

Deng Y & Nicholson RA (2005) Block of electron transport by surangin B in bovine heart mitochondria. *Pesticide Biochemistry & Physiology* **81**: 39-50.

Dhakshinamoorthy S, Jain AK, Bloom DA, Jaiswal AK (2005) Bach1 competes with Nrf2 leading to negative regulation of the antioxidant response element (ARE)-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene expression and induction in response to antioxidants. *J Biol Chem* **280**: 16891 -16900.

Dinkova-Kostova AT & Talalay P (2010) NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **501(1)**: 116-123.

Dolado I, Swat A, Ajenjo N, De Vita G, Cuadrado A, Nebreda AR (2007) p38a MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Cell* **11**:191-205.

Dong J, Ramachandran S, Tikoo K, Jia Z, Lau SS, Monks TJ (2004) EGFR-independent activation of p38 MAPK and EGFR-dependent activation of ERK1/2 are required for ROS-induced renal cell death. *Am J Renal Physiol* **287**; 1049-1058.

Doostdar H, Demoz A, Burke MD, Melvin WT, Grant MH (1990) Variation in drug-metabolizing enzyme activities during the growth of human HepG2 hepatoma cells. *Xenobiotica* **20**, 435–441.

Dröge W (2001) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82**: 47-95.

Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR (1995) A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:7686–7689.

Dulic V, Stein GH, Far DF, Reed SI (1998) Nuclear accumulation of p21Cip1 at the onset of mitosis: A role at the G2/M-phase transition. *Mol Cell Biol* 1998; 18:546-57.

Dunphy WG, Kumagai A (1991) The Cdc25 protein contains an intrinsic phosphatase activity. *Cell* 67: 189–196.

Edlund C, Elhammer A, Dallner G (1982) Distribution of newly synthesized DT-diaphorase in rat liver. *Biosci Rep* 2:861–865.

Ernster L & Navazio F (1958) Soluble diaphorase in animal tissues. *Acta Chemica Scandinavica* 12: 595-602.

Ernster L, Ljunggren M, Danielson L (1960) Purification and some properties of a highly dicumarol sensitive liver diaphorase. *Biochem Biophys Res Commun* 2:88-92.

Esposito F, Cuccovillo F, Vanoni M, Cimino F, Anderson CW, Appella E, Russo T (1997) Redox-mediated regulation of p21(waf1/cip1) expression involves a posttranscriptional mechanism and activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Eur J Biochem* 245:730–737.

Evans SR, Guy HI (2004) Mammalian pyrimidine biosynthesis: fresh insights into an ancient pathway. *J Biol Chem* 279: 33035-33038.

Fagerholm R, Hofstetter B, Tommiska J, Aaltonen K, Vrtel R et al. (2008) NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 *NQO1*2* genotype (P187S) is a strong prognostic and predictive factor in breast cancer. *Nature Genetics* 40(7): 884-853.

Faig M, Bianchet MA, Talalay P, Chen S, Winski S, Ross D, Amzel LM (2000) Structures of recombinant human and mouse NAD(P)H:quinone oxidoreductases: species comparison and structural changes with substrate binding and release, *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 3177-3182.

Faig M, Bianchet MA, Winski S, Hargreaves R, Moody CJ, Hudnott AR, Ross D, Amzel LM (2001) Structure-based development of anticancer drugs: complexes of

NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 with chemotherapeutic quinones. *Structure* **9**: 659-667.

Fairbanks LD, Bofill M, Ruckemann K, Simmonds HA (1995) Importance of ribonucleotide availability to proliferating T-lymphocytes from healthy humans. *J Biol Chem* **270(50)**: 29682-29689.

Felty Q, Singh KP, Roy D (2005) Estrogen-induced G1/S transition of G0-arrested estrogen-dependent breast cancer cells is regulated by mitochondrial oxidant signaling. *Oncogene* **24**: 4883-4893.

Fernandes DJ, Ravenhall CE, Harris T, Tran T, Vlahos R, Stewart AG (2004) Contribution of the p38MAPK signalling pathway to proliferation in human cultured airway smooth muscle cells is mitogen-specific. *Br J Pharmacol* **142**: 1182-1190.

Finn GJ, Creaven BS, Egan DA (2004) Daphnetin induced differentiation of human renal carcinoma cells and its mediation by p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem Pharmacol* **67**: 1779-1788.

Fischer EH, Charbonneau H, Tonos NK (1991) Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. *Science* **253**: 401-406.

Fontecave M (1998) Ribonucleotide reductases and radical reactions. *Cell Mol Life Sci* **54**: 684-695.

Forthoffer N, Martín SF, Gómez-Díaz C, Bello RI, Burón MI, Rodríguez-Aguilera JC, et al. (2002) A novel plasma membrane quinone reductase and NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 are upregulated by serum withdrawal in human promyelocytic HL-60 cells. *J Bioenerg Biomembr* **34**: 209–219.

Fritzson I, Svensson B, Al-Karadaghi S, Walse B, Wellmar U, Nilsson UJ et al. (2010) Inhibition of human DHODH by 4-Hydroxicoumarins, Fenamic Acids, and N-(Alkylcarbonyl)anthranilic Acids Identified by Structure-Guided Fragment Selection. *ChemMedChem* **5**: 608-617.

Gallagher TF, Seibel GL, Kassis S, Laydon JT, Blumenthal MJ, Lee JC, et al. (1997) Regulation of stress-induced cytokine production by pyridinylimidazoles. Inhibition of CSBP kinase. *Bioorg Med Chem* **5**: 49-64.

Garate M, Wong R, Campos EI, Yemin W, Li G (2008) NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 inhibits the proteasomal degradation of the tumour suppressor p33^{ING1b}. *EMBO Reports* **9(6)**: 576-581.

Garate M, Aijaz AW, Li G (2010) The NAD(P)H:quinone Oxidoreductase 1 induces cell cycle progression and proliferation of melanoma cells. *Free Radic Biol & Med* **48**: 1601–1609,

Garten S & Wosilait WD (1971) Comparative study of the binding of coumarin anticoagulants en serum albumins. *Biochem Pharmacol* **20**: 1661-1668.

Gasdaska PY, Fisher H, Powis G (1995) An alternatively spliced form of NQO1 (DT-diaphorase) messenger RNA lacking the putative quinone substrate binding site is present in human normal and tumor tissues. *Cancer Res.* **55**: 2542–2547.

Gatterman N, Dadak M, Hofhaus G, Wulfert M, Berneburg M, Loeffler ML, et al. (2004) Severe impairment of nucleotide synthesis through inhibition of mitochondrial respiration. *Nucleos Nucleot Nucleic Acids* **23**: 1275-1279.

Gerner EW & Meyskens FL (2004) Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nat Rev Cancer* **4**: 781-792.

Gertz M, Fischer F, Wolters D, Steegborn C (2008) Activation of the lifespan regulator p66^{Shc} through reversible disulfide bond formation. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 5705–5709.

Giandomenico AR, Cerniglia GE, Biaglow JE, Stevens CW, Koch CJ (1997) The importance of sodium pyruvate in assessing damage produced by hydrogen peroxide. *Free Radic Biol & Med* **23**: 426-434.

Gillissen A & Nowak D (1998) Characterization of *N*-acetylcysteine and ambroxol in anti-oxidant therapy. *Respiratory medicine* **92**:609-623.

Giorgio M, Migliaccio E, Orsini F, Paolucci D, Moroni M, Contursi C et al., (2005) Electron transfer between cytochrome *c* and p66^{Shc} generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell* **122**: 221-233.

Go Y-M & Jones DP (2008) Redox compartmentalization in eukaryotic cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1780**: 1273-1290.

Gojkovic Z, Knecht W, Zameitat E, Warneboldt J, Coutelis JB, Pynyaha Y et al. (2004) Horizontal gene transfer promoted evolution of the ability to propagate under anaerobic conditions in yeasts. *Mol Gen Genomics* **271**: 387-393.

Gómez-Díaz C, Bello RI, López-Lluch G, Forthoffer N, Navas P, Villalba JM (2003) Antioxidant response induced by serum withdrawal protects HL-60 cells against inhibition of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1. *Biofactors* **18**: 219–28.

Gong X, Kole L, Iskander K, Jaiswam AK (2007) NRH:quinone oxidoreductase 2 and NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 protect tumor suppressor p53 against 20S proteasomal degradation leading to stabilization and activation of p53. *Cancer Res* **67(11)**: 5380-5388.

Gong X, Labanyamoy K, Iskander K, Jaiswal AK (2007) NRH:quinone oxidoreductase 2 and NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 protect tumor suppressor p53 against 20S proteasomal degradation leading to stabilization and activation of p53. *Cancer Res* **67(11)**: 5380-5388.

Gómez-Díaz C, Bello RI, López-Lluch G, Forthoeffer N, Navas P, Villalba JM (2003) Antioxidant response induced by serum withdrawal protects HL-60 cells against inhibition of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1. *Biofactors* **18**, 219-228.

Goswami PC, Sheren J, Albee LD, Parsian A, Sim JE, Ridnour LA et al. (2000) Cell cycle-coupled variation in topoisomerase II α mRNA is regulated by the 3,-

untranslated region. Possible role of redox-sensitive protein binding in mRNA accumulation. *J Biol Chem* **275**: 38384–38392

Graff P, Seim J, Åmellem Ø, Arakawa H, Nakamura Y, Andersson KK, Stokke T, Pettersen EO (2004) Counteraction of pRb-dependent protection after extreme hypoxia by elevated ribonucleotide reductase. *Cell Prolif* **37**: 367-383.

Graves PR, Kwiek JJ, Fadden P, Ray R, Hardeman K, Coley AM, et al. (2002) Discovery of novel targets of quinoline drugs in the human purine binding proteome. *Mol Pharmacol* **62**:1364–1372.

Greene S, Watanabe K, Braatz-Trulson J, Lou L (1995) Inhibition of dihydroorotate dehydrogenase by the immunosuppressive agent leflunomide. *Biochem Pharmacol* **50(6)**: 861-867.

Grégoire M, Morais R, Quilliam MA, Gravel D (1984) On auxotrophy for pyrimidines of respiration-deficient chick embryo cells.

Gustafson DL & Pritsos CA (1992) Enhancement of xanthine dehydrogenase mediated mitomycin C metabolism by dicumarol. *Cancer Res* **52**: 6936-6939.

Guzy RD, Hoyos B, Robin E, Chen H, Liu L, Mansfiel KD, et al. (2005) Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab* **1**: 401-408.

Guzy RD, Sharma B, Bell E, Chandel NS, Schumacker PT (2008) Loss of the SdhB, but not the SdhA, subunit of Complex II triggers reactive oxygen species-dependent hypoxia-inducible factor activation and tumorigenesis. *Mol Cell Biol* **28(2)**: 718-731.

Hägerhäll C (1997) Succinate:quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme. *BBA* **1320**: 107-141.

Halawani D, Mondeh R, Stanton L-A, Beier F (2004) p38 MAP kinase signalling is necessary for rat chondrosarcoma cell proliferation. *Oncogene* **23**: 3726-3731.

Halliwell B & Gutteridge JMC (1999) Free radicals in biology and medicine, Third edition. Oxford Univ. Press, Oxford.

Hansel A, Kuschel L, Hehl S, Lemke C, Agricola HJ, Hoshi T, Heinemann SH (2002) Mitochondrial targeting of the human peptide methionine sulfoxide reductase (MSRA), an enzyme involved in the repair of oxidized proteins. *FASEB J* **16**: 911–913.

Hatefi Y & Galante YM (1980) Isolation of cytochrome *b*560 from Complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase) and its reconstitution with succinate dehydrogenase. *J Biol Chem* **255(2)**: 5530-5537.

Hernández A, López-Lluch G, Bernal JA, Navas P, Pintor-Toro JA (2008) Dicoumarol down-regulates human *PTTG/Securin* mRNA expresión through inhibition of Hsp990. *Mol Cancer Ther* **7(3)**: 474-482.

Hershko A (1997) Roles of ubiquitin-mediated proteolysis in cell cycle control. *Current Opinion in Cell Biology* **9(6)**: 788-799.

Herst PM, Tan AS, Scarlett DJ, Berridge MV (2004) Cell surface oxygen consumption by mitochondrial gene knockout cell. *Biochem Biophys Acta* **1656**: 79-87.

Herwig S & Strauss M (1997) The retinoblastoma protein: A master regulator of cell cycle, differentiation and apoptosis. *European Journal of Biochemistry* **246(3)**: 581-601.

Hinz M, Krappmann D, Eichten A, Heder A, Scheidereit C, Strauss M (1999) NF- κ B function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G₀/G₁-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol* **19**: 2690-2698.

Ho Y-S, Xiong Y, Ma W, Spector A, Ho DS (2004) Mice Lacking Catalase Develop Normally but Show Differential Sensitivity to Oxidant Tissue Injury. *J Biol Chem* **279(31)**:32804–32812.

Hoffman A, Spettner LM, Burke M (2008) Ramifications of a redox switch within a normal cell: its absence in a cancer cell. *Free Rad Biol & Med* **45**: 265-268.

Howland JL (1968) Uptake of dicoumarol by rat liver mitochondria. *Biochem J* **106**: 317-318.

Huang M & Graves LM (2002) De novo synthesis of pyrimidine nucleotides; emerging interfaces with signal transduction pathways. *Cell Mol Life Sci* **60**: 321-336.

Huang LS, Sun G, Cobessi D, Wang A, Shen JT, Tung EY, et al. (2006) 3-Nitropropionic acid is a suicide inhibitor of mitochondrial respiration that, upon oxidation by complex II, forms a covalent adduct with a catalytic base arginine in the active site of the enzyme. *J Biol Chem* **281**: 5965-5972.

Hutter DE, Till B, Greene JJ (1997) Redox state changes in density-dependent regulation of proliferation. *Experimental Cell Research* **232**:435-438.

Iliakis G, Wang Y, Guan J, Wang H (2003) DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene* **22**: 5834-5847.

Iñarrea P, Moini H, Rettori D, Han D, Martínez J, García I, Fernández-Vizarra E, Iturralde M, Cadenas E (2005) Redox activation of mitochondrial intermembrane space Cu,ZN-superoxide dismutase. *Biochem J* **387**: 203-209.

Ishii N, Fujii M, Hartman PS, Tsuda M, Yasuda K, Senoo-Matsuda N, Yanase S, Ayusawa D, Suzuki S (1998) A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome *b* causes oxidative stress and ageing in nematodes. *Nature* **394**: 694-696.

Ishii T, Yasuda K, Akatsuka A, Hino O, Hartman PS, Ishii N (2005) A mutation in the SHDC gene of complex II increases oxidative stress, resulting in apoptosis and tumorigenesis. *Cancer Res* **65**: 203-209.

Iskander K, Paquet M, Brayton C, Jaiswal AK (2004) Deficiency of NRH:quinone oxidoreductase 2 increases susceptibility to 7,12-dimethylbenz(a)anthracene and benzo(a)pyrene-induced skin carcinogenesis. *Cancer Res* **64**: 5925-5928.

Iskander K, Gaikwad A, Paquet M, Long DJ, Brayton C, Barrios R, Jaiswal AK (2005) Lower induction of p53 and decreased apoptosis in NQO1-null mice lead to increased sensitivity to chemical-induced skin carcinogenesis. *Cancer Res* **65**: 2054-2058.

Iskander K, Li J, Han S, Zheng B, Jaiswal AK (2006) NQO1 and NQO2 regulation of humoral immunity and autoimmunity. *J Biol Chem* **281(41)**: 30917-30924.

Iskander K, Barrios RJ, Jaiswal AK (2009) NRH:Quinone oxidoreductase 2-deficient mice are highly susceptible to radiation-induced B-cell lymphomas. *Clinical Cancer Research* **15(5)**: 1534-1542

Jaffar M, Phillips RM, Williams KJ, Mrema I, Cole C, Wind NS, Ward TH, Stratford IJ, Patterson AV (2003) 3-Substituted-5-aziridinyl-1-methylindole-4,7-diones as NQO1-directed antitumour agents: mechanism of activation and cytotoxicity in vitro. *Biochem Pharmacol* **66**: 1199-1206.

Jaiswal AK, McBride OW, Adesnik M and Nebert DW (1988) Human dioxin-inducible cytosolic NAD(P)H:menadione oxidoreductase. cDNA sequence and localization of gene to chromosome 16. *J Biol Chem* **263**: 13572–13578.

Jaiswal AK, Burnett P, Adesnik M, McBride OW (1990) Nucleotide and deduced amino acid sequence of a human cDNA (NQO2) corresponding to a second member of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene family. Extensive polymorphism at the NQO2 gene locus on chromosome 6. *Biochemistry* **29**:1899–1899

Jaiswal AK (2000) Regulation of genes encoding NAD(P)H:quinone oxidoreductases. *Free Rad Biol & Med* **29(3-4)**: 254-262.

Jakupoglu C, Przemeck GK, Schneider M, Moreno SG, Mayr N, Hatzopoulos AK, de Angelis MH et al., (2005) Cytoplasmic thioredoxin reductase is essential for embryogenesis but dispensable for cardiac development, *Mol Cell Biol* **25**: 1980–1988.

Jeong AY, Lee MY, Park JH, Han JJ (2009) PPAR δ agonist-mediated ROS stimulates mouse embryonic stem cell proliferation through cooperation of p38 MAPK and Wnt/beta-catenin. *Cell Cycle* **8**:611-619.

Ježek P & Hlavatá L (2005) Mitochondria in homeostasis or reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **37**: 2478-2503.

Kahana C, Asher G, Shaul Y (2005) Mechanisms of protein degradation: an odyssey with ODC. *Cell cycle* **4(11)**: 1461-1464.

Kaldis P (1999) The cdk-activating kinase (CAK): From yeast to mammals. *CMLFS* **55(2)**: 284-296.

Karle JM, Anderson LW, Cysyk RL (1984) Effect of plasma concentration of uridine on pyrimidine biosynthesis in cultured L1210 cells. *J Biol Chem* **259**: 67-72.

Kim B-Y, Han M-J, Chung A-S () Effects of reactive oxygen species on proliferation of chinese hamster lung fibroblast (V79) cells. *Free Rad Biol & Med* **30(6)**: 686-698.

Kim HY & Gladyshev VN (2004) Methionine sulfoxide reduction in mammals: characterization of methionine-R-sulfoxide reductases. *Mol Biol Cell* **15**:1055–1064.

King MP & Attardi G (1989) Human cells lacking mtDNA: Repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* **246**: 500-503.

King MP & Attardi G (1996) Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA. *Methods Enzymol* **264**: 304-313.

Kita K, Takamiya S, Furushima R, Ma Y, Suzuki H, Ozawa T, Oya H (1988) Electron-transfer complexes of *Ascaris suum* muscle mitochondria. III. Composition and fumarate reductase activity of Complex II. *BBA* **935**: 130-140.

Kolberg M, Strand KR, Graff P, Andersson KK (2004) Structure, function and mechanism of ribonucleotide reductases. *Biochimica et Biophysica Acta* **1699**: 1-34.

Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castillo RF, Vercesi AE (2009) Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Rad Biol & Med* **47**: 333-343.

Kuma B, Sinclair J, Khandrika L, Koul S, Silson S, Koul HK (2009) Differential effects of MAPKS signalling on the growth of invasive bladder cancer cells. *Int J Oncol* **34**: 1557-1564.

Lafuente MJL, Casterad X, Trias M, Ascaso C, Molina R, Ballesta A, Zheng S, Wiencke JK, Lafuente A (2000) NAD(P)H:quinone oxidoreductase-dependent risk for colorectal cancer and its association with the presence of K-ras mutations in tumors. *Carcinogenesis* **2**: 1813-1819.

Lahouel M, Zini R, Zellagui A, Rhouati S, Carrupt PA, Morin D (2007) Ferulenol specifically inhibits succinate ubiquinone reductase at the level of the ubiquinone cycle. *Biochem Biophys Res Com* **355**: 252-257.

Lake BG (1999) Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. *Food and Chemical Toxicology* **37**: 423-453.

Laurent A, Nicco C, Chereau C, Goulvestre C, Alexandre J, Alves A et al. (2005) Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species. *Cancer Res* **65**: 948–956.

Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J, Dionne L, Lu N, Huang S, Matzuk MM (1996) Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:9782–9787.

Lee SH, Na SI, Heo JS, Kim MH, KIM YH et al. (2009) Arachidonic acid release by H₂O₂ mediated proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of Ca²⁺/PKC and MAPKs-induced EGFR transactivation. *J Cell Biochem* **106**:787-797.

Lenaz G (2001) The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB Life* **52**: 159-164.

Lenaz G, Fato R, Formiggini G, Genova ML (2007) The role of conenzyme Q in mitochondrial electron transport. *Mitochondrion* **7S**: S8-S33.

Levine AJ (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88(3)**: 323-331.

Lewis A, Ough M, Li L, Hinkhouse MM, Ritchie JM, Spitz DR, et al. (2004) Treatmetn of pancreatic cancer cells with dicumarol induces cytotoxicity and oxidative stress. *Clinic Cancer Res* **10**: 4550-4558.

Li N & Oberley TD (1998) Modulation of antioxidant enzymes, reactive oxygen species, and glutathione levels in manganese superoxide dismutase-overexpressing NIH/3T3 fibroblasts during the cell cycle. *J Cell Physiol* **177**, 148-160.

Li R, Bianchet MA, Talalay P, Amzel LM (1995) The three-dimensional structure of NAD(P)H:quinone reductase, a flavoprotein involved in cancer chemoprotection and chemotherapy: mechanism of the two-electron reduction, *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 8846-8850.

Li Y, Sun X, LaMont JT, Pardee AB, Li CJ (2003) Selective killing of cancer cells by β -lapachone: direct checkpoint activation as a strategy against cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 2674–2678.

Liao S, Dulaney JT, Williams-Ashman HG (1962) Purification and properties of a flavoprotein catalyzing the oxidation of reduced ribosyl nicotinamide. *J Biol Chem* **237**: 2981–2987.

Lind C, Cadenas E, Hochstein P, Ernster L (1990) DT-diaphorase: purification, properties and function. *Methods Enzymol* **186**: 287-301.

Liu B, Chen Y, St. Clair DK (2008) ROS and p53: a versatile partnership. *Free Rad Biol & Med* **44**:1529-1535.

Liu RY, Fan C, Liu G, Olashaw NE, Zuckerman KS (2000) Activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for tumor necrosis factor- α -supported proliferation of leukemia and lymphoma cell lines. *J Biol Chem* **275**: 21086-21093.

Liu S, Neidhardt EA, Grossman TH, Ocain T, Clardy J (2000) Structure of human dihydroorotate dehydrogenase in complex with antiproliferative agents. *Structure* **8(1)**: 25-33.

Löffler M, Jöckel J, Schuster G, Becker C (1997) Dihydroorotat-ubiquinone oxidoreductase links mitochondria in the biosynthesis of pyrimidine nucleotides. *Mol Cell Biochem* **174**: 125-129.

Long DJ & Jaiswal AK (2000) NRH:quinone oxidoreductase 2 (NQO2). *Chemical-Biological interactions* **129**: 99-112.

Long DJ, Waikel RL, Wang XJ, Perlaky L, Roop DR, Jaiswal AK (2000) NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 deficiency increases susceptibility to benzo(a)pyrene-induced mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res* **60**: 5913-5915.

Long DJ, Waikel RL, Wang X, Roop DR, Jaiswal AK (2001) NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) deficiency increases susceptibility to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene induced mouse skin carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* **93**:1166–70.

Long DJ, Iskander K, Gaikwad A, Arin M, Roop DR, Know R, Barrios R, Jaiswal AK (2002) Disruption of dihydronicotinamide riboside:quinone oxidoreductase 2 (NQO2) leads to myeloid hyperplasia of bone marrow and decreased sensitivity to menadione toxicity. *J Biol Chem* **277**: 46131–46139.

López-González JS, Prado-García H, Aguilar-Cazares D, Molina-Guarneros JA, Morales-Fuentes J, Mandoki JJ (2004) Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hidroxicoumarin on human lung carcinoma cell lines. *Lung cancer* **43**: 275-283.

López-Martín JM, Salviati L, Trevisson E, Montini G, DiMauro S, Quinzii C, Hirano M, Rodríguez-Hernández A, Cordero MD, Sánchez-Alcázar JA, Santos-Ocaña C, Navas P (2007) Missense mutation of the COQ2 gene causes defects of bioenergetics and de novo pyrimidine synthesis. *Hum Mol Genet* **16**, 1091-1097.

Macip S, Igarashi M, Fang L, Chen A, Pan ZQ, Lee SW, Aaronson SA (2002) Inhibition of p21-mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence. *EMBO J* **21**, 2180–2188.

Madari H, Panda D, Wilson L, Jacobs RS (2003) Dicoumarol: a unique microtubule stabilizing natural product that is synergistic with Taxol. *Cancer Res* **63**: 1214-1220.

Maher P (1999) p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for fibroblast growth factor-2-stimulated cell proliferation but not differentiation. *J Biol Chem* **274**: 17941-17948.

Markovic J, Borrás C, Ortega A, Sastre J, Vina J, et al. (2007) Glutathione is recruited into the nucleus in early phases of cell proliferation. *J Biol Chem* **282**: 20416–20424.

Markovic J, Mora NJ, Broseta AM, Gimeno A, de la Concepción N, Viña J, Pallardó FV (2009) The depletion of nuclear glutathione impairs cell proliferation in 3T3 fibroblasts. *PLOS One* **4(7)**, e6413.

Martínez-Muñoz C, Post JA, Verkleij AJ, Verrips CT, Boonstra J (2001) The effect of hydrogen peroxide on the cyclin D expression in fibroblasts. *Cell Mol Life Sci* **58**: 990-996.

Masamune A, Satoh M, Kikuta K, Sakai Y, Satoh A, Shimosegawa T (2003) Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase blocks activation of rat pancreatic stellate cells. *J Pharmacol Exp Ther* **304**: 8-14.

Mauro F, Grasso A, Tolmach LJ (1969) Variations in sulfhydryl, disulfide, and protein content during synchronous and asynchronous growth of HeLa cells. *Biophys J* **9**: 1377–1397.

Mays JB, Benson AM (1992) Inhibition of mouse glutathione transferases and glutathione peroxidase II by dicoumarol and other ligands. *Biochem Pharmacol* **44**: 921-925.

Menon SG, Sarsour EH, Spitz DR, Higashikubo R, Sturm M, Zhang H, Goswami PC (2003) Redox regulation of the G₁ to S phase transition in the mouse embryo fibroblast cell cycle. *Cancer Research* **63**, 2109-2117.

Menon SG, Goswami PC (2007) A redox cycle within the cell cycle. *Oncogene* **26**, 1101-1109.

Menon SG, Sarsour EH, Kalen AL, Venkataraman S, Hitchler MJ, Domann FE, Oberley LW, Goswami PC (2007) Superoxide signaling mediates *N*-acetyl-L-cysteine-induced G1 arrest: Regulatory role of cyclin D1 and Manganese Superoxide Dismutase. *Cancer Research* **67**, 6392-6399.

Messner KR, Imlay JA (2002) Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide formation by fumarate reductase, succinate dehydrogenase and aspartate oxidase. *J Biol Chem* **277**, 42563-42571.

Migliaccio E, Giorgio M, Mele S, Pelicci G, Reboldi P, Pandolfi PP, Lanfrancone L, Pelicci PG (1999) The p66^{Shc} adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature* **402**: 309-313.

Mironov AA, Colanzi A, Polishchuk RS, Beznoussenko GV, Mironov AA, Fusella A, Di Tullio G et al. (2004) Dicoumarol, an inhibitor of ADP-ribosylation of CtBP3/BARS, fragments Golgi non-compact tubular zones and inhibits intra-Golgi transport. *Eur J Cell Biol* **83**: 263-279.

Moser CC, Farid TA, Chobot SE, Dutton PL (2006) Electron tunneling chains of mitochondria. *Biochim Biohys Acta* **1757**: 1096-1109.

Muller FL, Liu Y, Van Remmen H (2004) Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem* **279**: 49064-49073.

Muller FL, Lustgarten MS, Jan Y, Richardson A, Van Remmen H (2007) Trends in oxidative aging theories. *Free Rad Biol & Med* **43**: 477-503.

Muller FL, Liu Y, Abdul-Ghani MA, Lustgarten MS, Bhattacharya A, Jang YC, Van Remmen H (2008) High rates of superoxide production in skeletal-muscle mitochondria respiring on both complex I- and complex II-linked substrates. *Biochem J* **409**: 491-499.

Natsuyama S, Noda Y, Yamashita M, Nagahama Y, Mori T (1993) Superoxide dismutase and thioredoxin restore defective p34cdc2 kinase activation in mouse two-cell block. *Biochim Biophys Acta* **1176**, 90–94.

Nebreda AR & Porras A (2000) p38 MAPK kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci* **25**: 257-260.

Neumann CA, Krause DS, Carman CV, Das S, Dubey DP, Abraham JL, Bronson RT *et al.*, (2003) Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. *Nature* **424**: 561–565.

Neve RM, Hombro T, Hynes NE (2002) Distinct roles for phosphoinositide 3-kinase, mitogen-activated protein kinase and p38 MAPK in mediating cell cycle progression of breast cancer cells. *Oncogene* **21**: 4567-4576.

Nicco C, Laurent A, Chereau C, Weill B, Bateaux F (2005) Differential modulation of normal and tumor cell proliferation by reactive oxygen species. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **59**: 169-174.

Nolan KA, Zhao H, Faulder PF, Frenkel AD, Timson DJ, Siegel D, *et al.* (2007) Coumarin-based inhibitors of human NAD(P)H:quinone oxidoreductase–1: Identification, structure–activity, off-target effects and in vitro human pancreatic cancer toxicity. *J Med Chem* **50**: 6316–25.

Nonn L, Berggren M, Powis G (2003) Increased expression of mitochondrial peroxiredoxin-3 (thioredoxin peroxidase-2) protects cancer cells against hypoxia and drug-induced hydrogen peroxide-dependent apoptosis. *Mol Cancer Res* **1**: 682–689.

Norlund P & Reichard P (2006) Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem* **75**: 681-706.

Nosjean O, Ferro M, Cogé F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, Fauchère JL, Delagrance P, Canet E, Boutin JA (2000) Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem* **275(40)**: 31311-31317.

Nowak D, Antczak A, Krol M, Bialasiewicz P, Pietras T (1994) Antioxidant properties of ambroxol. *Free Radic Biol Med* **16**:517–522

O'Brien PJ (1991) Molecular mechanisms of quinone toxicity. *Chem Biol Interactions* **80**: 1-41.

Okado-Matsumoto A & Fridovich I (2001) Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem* **276**: 38388–38393.

Ono K & Han J (2000) The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cellular signaling* **12**: 1-13.

Osherov N & Levitzki A (1994) Epidermal-growth-factor-dependent activation of the src-family kinases. *Eur J Biochem* **225**:1047–53.

Ough M, Lewis A, Zhang Y, Hinkhouse MM, Ritchie JM, Oberley LW, Cullen JJ (2004) Inhibition of cell growth by overexpression of manganese superoxide dismutase (MnSOD) in human pancreatic carcinoma. *Free Radic Res* **38**, 1223-1233.

Paddenberg R, Ishaq B, Goldenberg A, Faulhammer P, Rose F, Weissmann N, et al. (2003) Essential role of complex II of the respiratory chain in hypoxia-induced ROS generation in the pulmonary vasculature. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **284**, 710-719.

Pan S-S, Forrest GL, Akman SA and Hu L-T (1995) NAD(P)H:quinone oxidoreductase expression and mitomycin C resistance developed by human colon cancer HCT 116 cells. *Cancer Res* **55**, 330-335.

Pan S-S, Yusheng H, Farabaugh P, Xia H (2002) Implication of alternative splicing for expression of a variant NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 with a single nucleotide polymorphism at 465C>T. *Pharmacogenetics* **12(6)**: 479-488.

Peeper DS, Parker LL, Ewen ME, Toebes M, Hall FL, Xu M, Zantema A et al., (1993) A- and B-type cyclins differentially modulate substrate specificity of cyclin - cdk complexes. *EMBO JI* **12(5)**: 1947-1954.

Pegg AE (1988) Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and a target for chemotherapy. *Cancer Res* **48**: 759-774.

Perrin JH, Vallner JJ, Nelson DA (1975) Some quantitative investigations of the binding to and the displacement of bishydroxicoumarin from human serum albumin. *Biochem Pharmacol* **24**: 769-774.

Pershad HR, hirst J, Cochran B, Ackrell BAC, Armstrong FA (1999) Voltammetric studies of bidirectional catalytic electron transport in *Escherichia coli* succinate dehydrogenase: comparison with the enzyme from beef heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1412**: 262-272.

Phillips RM, de la Cruz A, Traver RD, Gibson NW (1994) Increased activity and expression of NAD(P)H :quinone oxidoreductase in confluent cell cultures and within multicellular spheroids. *Cancer Res.* **54**, 3766–3771.

Pizzorno G, Cao D, Leffert JJ, Russell RL, Zhang D, Handschumacher RE (2002) Homeostatic control of uridine and the role of uridine phosphorylase: a biological and clinical update. *Biochim Biophys Acta* **1587**: 133-144.

Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B (1997) A model for p53-induced apoptosis. *Nature* **389**, 300–305.

Porté S, Crosas E, Yakovtseva E, Biosca JA, Farrés J, Fernández MR, Parés X (2009) MDR quinone oxidoreductases: The human and yeast ζ -crystallins. *Chemico-Biological Interactions* **178**: 288-294.

Porté S, Valencia E, Yakovtseva EA, Borràs E, Shafqat N, Debreczeny JE, Pike ACW, Opperman U, Farrés J, Fita I, Parés X (2009) Three-dimensional structure and enzymatic function of proapoptotic human p53-inducible quinone oxidoreductase PIG3. *J Biol Chem* **284**:17194-17205.

Powis G & Montfort WR (2001) Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**: 261-95.

Preusch PC, Siegel D, Gibson NW, Ross D (1991) A note on the inhibition of DT-diaphorase by dicoumarol. *Free Radic Biol Med* **11**: 77-80.

Prochaska HJ (1988) Purification and crystallization of rat liver NAD(P)H:quinone oxidoreductase by cibacron blue affinity chromatography: identification of a new and potent inhibitor. *Arch Biochem Biophys* **267(2)**: 529-538.

Qiu X, Forman HJ, Schöntal AH, Cadenas E (1996) Induction of p21 mediated by reactive oxygen species formed during the metabolism of azyridinilbenzoquinones by HCT116 cells. *J Biol Chem* **271(50)**: 31915-31921.

Quéméneur L, Gerland LM, Flacher M, Ffrench M, Revillard JP, Genestier L (2003) Differential control of cell cycle, proliferation, and survival of primary T lymphocytes by purine and pyrimidine nucleotides. *J Immunol* **170**: 4986-4995.

Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, Freeman BA (1991) Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem* **266**: 22028–22034.

Rapkine L (1931) Sur les processus chimiques au cours de la division cellulaire. *Ann Physiol Physiochem Biol* **7**:382–418.

Rausch O & Marshall CJ (1999) Cooperation of p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways during granulocyte colony-stimulating factor-induced hemopoietic cell proliferation. *J Biol Chem* **274**: 4096-4105.

Recio JA, Merlino G (2002) Hepatocyte growth factor/scatter factor activates proliferation in melanoma cells through p38 MAPK, ATF-2 and cyclin D1. *Oncogene* **21**:1000-1008.

Reigan P, Colucci MA, Siegel D, Chilloux A, Moody CJ, Ross D (2007) Development of indolquinone mechanism-based inhibitors of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): NQO1 inhibition and growth inhibitory activity in human pancreatic MIA PaCa-2 cancer cells. *Biochemistry* **46**: 5941-5950.

Reiners JJ, Lee J-Y, Clift RE, Dudley DT, Myrand SP (1998) PD98059 is an equipotent antagonist of the aryl hydrocarbon receptor and inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *Mol Pharm* **53**:438-445.

Ridnour LA, Oberley TD, Oberley LW (2004) Tumor suppressive effects of MnSOD overexpression may involve imbalance in peroxide generation versus peroxide removal. *Antioxid Redox Signal* **6**, 501-512.

Röhrdanz E & Kahl R (1998) Alterations of antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* **24**, 27–38

Rokah OS, Shpilberg O, Granot G (2010) NAD(P)H Quinone Oxidoreductase Protects TAp63 γ from Proteasomal Degradation and Regulates TAp63 γ -Dependent Growth Arrest. *PLoS ONE* **5(6)**: e11401.

Roninson IB (2002) Oncogenic functions of tumour suppressor p21 (Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Lett* **179**:1-14.

Ross D & Siegel D (2004) NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 (NQO1, DT-Diaphorase), Functions and Pharmacogenetics. *Methods Enzymol* **382**: 115-144.

Rothman N, Smith MT, Hayes RB, Traver RD, Hoener B, Campleman S, Li G-L et al., (1997) Benzene poisoning, a risk factor for hematological malignancy, is associated with the NQO1 ⁶⁰⁹C-T mutation and rapid fractional excretion of chlorzoxazone. *Cancer Res* **57**, 2839–2842.

Rückemann K, Fairbanks LD, Carrey EA, Hawrylowicz CM, Richards DF, Kirschbaum B, Simmonds HA (1998) Leflunomide inhibits pyrimidine *de novo* synthesis in mitogen-stimulated T-lymphocytes from healthy humans. *J Biol Chem* **273**(34), 21682-21691.

Russo T, Zambrano N, Esposito F, Ammendola R, Cimino F, Fiscella M, Jackman J, O'Connor PM, Anderson CW, Appella E (1995) A p53-independent pathway for activation of WAF1/CIP1 expression following oxidative stress. *J Biol Chem* **270**, 29386–29391.

Rustin P, Munnich A, Rötig A (2002) Succinate dehydrogenase and human diseases: insights into a well-known enzyme. *European Journal of Human Genetics* **10**: 289-291.

Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM (2005) The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med* **11**(12): 1306-1313.

Salvi M, Battaglia V, Brunati AM, La Rocca N, Tibaldi E, Pietrangeli P, Marcocci L, Mondovì B, Rossi CA, Toninello A (2007) Catalase takes part in rat liver mitochondria oxidative stress defense. *J Biol Chem* **282**: 24407–24415.

Sarsour EH, Agarwal M, Pandita TK, Oberley LW, Goswami PC (2005) Manganese superoxide dismutase protects the proliferative capacity of confluent normal human fibroblasts. *J Biol Chem.* **280**, 18033–18041.

Sarsour EH, Venkataraman, Kalen AL, Oberley LW, Goswami PC (2008) Manganese superoxide dismutase activity regulates transitions between quiescent and proliferative growth. *Aging cell* **7**: 405-417.

Savitsky PA, Finkel T (2002) Redox regulation of Cdc25C. *J Biol Chem* **277**: 20535–20540.

Schafer FQ & Buettner GR (2001) Redox environment of the cells as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Rad Biol & Med* **30(11)**: 1191-1212.

Schlager JJ, Hoerl BJ, Riebow J, Scott DP, Gasdaska P, Scott RE, Powis G (1993) Increased NAD(P)H:quinone-acceptor oxidoreductase activity is associated with density-dependent growth inhibition of normal but not transformed cells. *Cancer Res.* **53**, 1338–1342.

Segura-Aguilar JE, Barreiro V, Lind C (1986) Dicoumarol-sensitive glucuronidation of benzo(a)pyrene metabolites in rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* **251**: 266-275.

Segura-Aguilar JE, Cremades A, Llombart-Bosch A, Monsalve E, Ernster L, and Romero FJ (1994) Activity and immunohistochemistry of DT-diaphorase in hamster and human kidney tumours. *Carcinogenesis* **15**: 1631–1636.

Sentman ML, Granstrom M, Jakobson H, Reaume A, Basu S, Marklund SL (2006) Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *J Biol Chem* **281**: 6904–6909.

Shapiro HM (2003) Practical flow cytometry. New York. John Wiley & Sons Inc. 4th edition.

Sherr CJ (1993) Mammalian G1 cyclins. *Cell* **73(6)**: 1059-1065

Shirabe K, Landi MT, Takeshita M, Uziel G, Fedrizzi E, Borgese N (1995) A novel point mutation in a 3' splice site of the NADH-cytochrome b5 reductase gene results in immunologically undetectable enzyme and impaired NADH-dependent ascorbate regeneration in cultured fibroblasts of a patient with type II hereditary methemoglobinemia. *Am J Hum Genet* **57**, 302–310.

Shushan A, Rojansky N, Laufer N, Klein BY, Shlomai Z, Levitzki R, et al. (2004) The AG1478 tyrosine kinase inhibitor is an effective suppressor of leiomyoma cell growth. *Hum Reprod* **19**: 1957-1967.

Siegel D, Bolton EM, Burr JA, Liebler DC, Ross D (1997) The reduction of α -tocopherolquinone by human NAD(P)H:quinone oxidoreductase: the role of α -tocopherolhydroquinone as a cellular antioxidant. *Mol Pharm* **52**:300-305.

Siegel D, Anwar A, Winski SL, Kepa JK, Zolman KL, Ross D (2001) Rapid polyubiquitination and proteasomal degradation of a mutant form of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1. *Mol Pharm* **59**:263-268.

Siegel D, Gustafson DL, Dehn DL, Han JY, Boonchoong P, Berliner LJ, et al. (2004) NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1: role as superoxide scavenger. *Mol Pharmacol* **65**: 1238-1247.

Sies H & Cadenas E (1985) Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **311**: 617–631.

Slane BG, Aykin-Burns N, Smith BJ, Kalen AL, Goswami PC, Domann FE, Spitz DR (2006) Mutation of succinate dehydrogenase subunit C results in increased o_2^- , oxidative stress and genomic instability. *Cancer Res* **66(15)**: 7615-7620.

Smeitink JA, Zeviani M, Turnbull DM, Jacobs HT (2006) Mitochondrial medicine: a metabolic perspective on the pathology of oxidative phosphorylation disorders. *Cell Metabolism* **3**: 9-13.

Smith MT et al. (2002) Low NAD(P)H:quinone oxidoreductase activity is associated with increased risk of leukemia with MLL translocations in infants and children. *Blood* **100**, 4590–4593-

Sohn J & Rudolph J (2003) Catalytic and chemical competence of regulation of Cdc25 phosphatase by oxidation/reduction. *Biochemistry* **42**: 10060–10070.

Sollner S, Schober M, Wagner A, Prem A, Lorkova L, Palfey BA, Groll M, Macheroux P (2009) Quinone reductase acts as a redox switch of the 20S yeast proteasome. *EMBO Reports* **10(1)**: 65-70.

Storrie B, Madden EA (1990) Isolation of subcellular organelles. *Methods Enzymol* **182**, 203-225.

Stoscheck CM (1990) Quantitation of protein. *Methods Enzymol* **182**: 50-68.

Sturtz LA, Diekert K, Jensen LT, Lill R, Culotta VC (2001) A fraction of yeast Cu/Zn superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria: a physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J Biol Chem* **276**: 38084–38089.

Sucheta A, Ackrell BAC, Cochran B, Armstrong FA (1992) Diode-like behaviour of a mitochondrial electron-transport enzyme. *Nature* **356**: 361-362.

Sun F, Huo X, Zhai Y, Wang A, Xu J, Su D, et al. (2005) Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell* **121**: 1043-1057.

Suzuki A, Tsutomi Y, Akahane K, Araki T, Miura M (1998) Resistance to Fas-mediated apoptosis: Activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator *p21WAF1* and *IAP* gene family ILP. *Oncogene* **17**:931-939.

Takamiya S, Matsui T, Taka H, Murayama K, Matsuda M, Aoki T (1999) Free-living nematodes *Caenorhabditis elegans* possess in their mitochondria an additional rhodoquinone, an essential component of the eukaryotic fumarate reductase system. *Archives of Biochemistry & Biophysics* **371(2)**: 284-289.

Tanaka T, Nakamura H, Nishiyama A, Hosoi F, Masutani H, Wada H et al. (2000) Redox regulation by thioredoxin superfamily; protection against oxidative stress and aging. *Free Radical Res* **33**: 851–855.

Tanaka T, Hosoi F, Yamaguchi-Iwai Y, Nakamura H, Masutani H, Ueda S, Nishiyama A et al., (2002) Thioredoxin-2 (TRX-2) is an essential gene regulating mitochondria-dependent apoptosis. *EMBO J* **21**: 1695–1703.

Teoh ML, Sun W, Smith BJ, Oberley LW, Cullen JJ (2007) Modulation of reactive oxygen species in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* **13**:7441-7450.

Tielens AGM & Van Hellemond JJ (1998) The electron transport chain in anaerobically functioning eukaryotes. *BBA* **1365**: 71-78.

Touitou R, Richardson J, Bose S, Nakanishi M, Rivett J, Allday MJ (2001) A degradation signal located in the C-terminus of p21^{WAF/CIP1} is a binding site for the C8 α -subunit of the 20S proteasome. *EMBO J* **20**: 2367-2375.

Traut TW (1994) Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol Cell Biochem* **140(1)**: 1-22.

Traver RD, Horikoshi T, Danenberg KD, Stadlbauer TH, Danenberg PV, Ross D, Gibson NW (1992) NAD(P):quinone oxidoreductase gene expression in human colon carcinoma cells: characterization of a mutation which modulates DT-diaphorase activity and mitomycin sensitivity. *Cancer Res* **52**: 797–802.

Trounce IA, Kim YL, Jun AS, Wallace DC (1996) Assessment of mitochondrial oxidative phosphorylation in patient muscle biopsies, lymphoblasts and transmittochondrial cell lines. *Methods Enzymol* **264**: 484-509.

Tsvetkov P, Asher G, Reiss V, Shaul Y, Sachs L, Lotem J (2005) Inhibition of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 activity and induction of p53 degradation by the natural phenolic compound curcumin, *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 5535-5540.

Tsvetkov P, Reuven N, Shaul Y (2010) Ubiquitin-independent p53 proteasomal degradation. *Cell Death and Differentiation* **17**, 103-108.

Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* **552.2**: 335-344.

Urig S, Becker K (2006) On the potential of thioredoxin reductase inhibitors for cancer therapy. *Semin Cancer Biol* **16**: 452-65.

Van Hellemond JJ, Van der Klei A, Van Weelden SWH, Tielens AGM (2003) Biochemical and evolutionary aspects of anaerobically functioning mitochondria. *Phil Trans R Soc Lond B* **358**: 205-215.

Vella F, Ferry G, Delagrance P, Boutin JA (2005) NRH:quinone reductase 2: An enzyme of surprises and mysteries. *Biochem Pharmacol* **71**: 1-12.

Venkataraman S, Jiang X, Weydert C, Zhang Y, Zhang HJ, Goswami PC, Ritchie JM, Oberley LW, Buettner GR (2005) Manganese superoxide dismutase overexpression inhibits the growth of androgen-independent prostate cancer cells. *Oncogene* **24**, 77-89.

Vidal A & Koff A (2000) Cell-cycle inhibitors: Three families united by a common cause. *Gene* **247**:1-15

Villalba JM, Navarro F, Cordoba F, Serrano A, Arroyo A, Crane FL, Navas P (1995) Coenzyme Q reductase from liver plasma membrane: Purification and role in trans-plasma-membrane electron transport. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 4887–4891.

Wallace KB & Starkov AA (2000) Mitochondrial targets of drug toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**:353-388.

Wang CJ, Hsieh YJ, Chu CY, Lin YL, Tseng TH (2002) Inhibition of cell cycle progression in human leukemia HL-60 cells by esculetin. *Cancer Letters* **183**: 163-168.

Wang HP, Schafer FQ, Goswami PC, Oberley LW, Buettner GR (2003) Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase induces a delay in G1 of the cell cycle. *Free Radical Res* **37**: 621–630.

Watanabe J, Nishiyama H, Matsui Y, Ito M, Kawanishi H, Kamoto T, et al. (2006) Dicoumarol potentiates cisplatin-induced apoptosis mediated by c-Jun N-terminal kinase in p53 wild-type urogenital cancer cell lines. *Oncogene* **25**: 2500-2508.

Watson JV, Chambers SH, Smith PJ (1987) A pragmatic approach to the analysis of DNA histogram with a definible G₁ peak. *Cytometry* **8**: 1-8.

Williamson JR, Corkey BE (1969) Assays of intermediates of the citric acid cycle and related compounds by fluorometric enzyme methods. *Methods Enzymol* **13**: 434-513.

Wilson DH, Merz R (1969) Inhibition of mitochondrial respiration by uncouplers of oxidative phosphorylation. II. The site of inhibition of succinate oxidation by the uncouplers. *Arch Biochem Biophys* **129**: 79-85.

Winski SL, Faig M, Bianchet MA, Siegel D, Swann E, Fung K, Duncan MW, Moody CJ, Amzel LM, Ross D (2001) Characterization of a mechanism-based inhibitor of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 by biochemical, X-ray crystallographic, and mass spectrometric approaches. *Biochemistry* **40**, 15135-15142.

Winski SL, Koutalos Y, Bentley DL, Ross D (2002) Subcellular localization of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 in human cancer cells. *Cancer Res* **62**: 1420-1424.

Wolf D, Rotter A (1985) Major deletions in the gene encoding the p53 tumor antigen cause lack of p53 expression in HL-60 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 790–794.

Wolhueter RM, McIvor RS, Plagemann PG (1980) Facilitated transport of uracil and 5-fluorouracil, and permeation of orotic acid into cultured mammalian cells. *J Cell Physiol* **104**: 309-319.

Wood ZA, Schroder E, Harris JR, Poole LB (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* **28**: 32–40.

Xu JX, King TE (1992) Two-site property of thenoyltrifluoroacetone inhibiting succinate-ubiquinone reductase. *Sci Chin B* **35**: 162-168.

Yan C, Shieh B, Reigan P, Zhang Z, Colucci MA, Chilloux A, et al. (2009) Potent activity of indolequinones against human pancreatic cancer: Identification of thioredoxin reductase as a potential target. *Mol Pharmacol* **76**: 163-172.

Yankovskaya V, Horsefield R, Törnroth S, Luna-Chávez C, Miyoshi H, Léger C, et al (2003) Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science* **299**:700-704.

Yu KD, Di GH, Yuan WT, Fan L, Wu J, Hu Z, et al. (2009) Functional polymorphisms, altered gene expression and genetic association link NRH:quinone oxidoreductase 2 to breast cancer with wild-type p53. *Human Molecular Genetics* **18(13)**: 2502-2517.

Yu L, Xu JX, Haley PE, Yu PA (1987) Properties of bovine heart mitochondrial cytochrome *b*₅₆₀. *J Biol Chem* **262**: 1137-1143.

Zhang L, Yu L, Yu CA (1998) Generation of superoxide anion by succinate-cytochrome *c* reductase from bovine heart mitochondria. *J Biol Chem* **273(51)**: 33972-33976.

Zhao H, Kalivendi S, Zhang H, Joseph J, Nithipatikom K, Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B (2003) Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Rad Biol & Med* **34 (11)**: 1359-1368.

Zhao H, Joseph J, Fales HM, Sokoloski EA, Levine RL, Vasquez-Vivar J, et al. (2005) Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations on fluorescence. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 5727-5732.

Zhao Q, Yang XL, Holtzclaw WD, Talalay P (1997) Unexpected genetic and structural relationships of a long-forgotten flavoenzyme to NAD(P)H:quinone reductase (DT-diaphorase). *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 1669–1674.

Zhu H, Jia Z, Mahaney JE, Ross D, Misra HP, Trush MA, Li Y (2007) The highly expressed and inducible endogenous NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 in cardiovascular cells acts a potential superoxide scavenger. *Cardiovasc Toxicol* **7**: 202-211.

Zhu XF, Liu ZC, Xie BF, Li ZM, Feng GK, Yan D, et al. (2001) EGFR tyrosine kinase inhibitor AG1478 inhibits cell proliferation and arrests cell cycle in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Lett* **169**: 27-32.



anexos

Publicaciones de resultados asociados a la tesis.

González-Aragón D, Ariza J, Villalba JM (2006) Dicoumarol impairs mitochondrial electron transport and pyrimidine biosynthesis in human myeloid leukemia HL-60 cells. *Biochem Pharmacol* **73**: 427-439.

González-Aragón D, Alcaín FJ, Ariza J, Jódar L, Barbarroja N, López-Pedrerera C, Villalba JM (2010) ES936 stimulates DNA síntesis in HeLa cells independently on NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 inhibition, through a mechanism involving p38 MAPK. *Chemico-Biological Interactions* **186**: 174-183.

Villalba Montoro JM, González Aragón D, Santos González M, Parrado Fernández C, Jódar Montilla L, López Domínguez JA et al., (2010) La ubiquinona y la actividad quinona reductasa en la regulación del crecimiento, muerte y senescencia celular. En Dorado G, Jorrín JV, Tena-Aldave M, Fernández-Reyes E, (coord.) *Bioteconología*. Universidad de Córdoba; 2010. p.72-75.

González Aragón D, Alcaín FJ, Jódar L, Ariza J, López-Domínguez JA, Burón I et al., (2010) *A pharmacological approach to the study of the role of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 activity in the control of cell growth. Are NQO1 inhibitors reliable in cellular systems?*, En: International Conference on Free Radicals & Oxidative Stress in Biology and Medicine – Center for Integrative Mediterranean Studies, Messina (Italia) 2008.