

Generación de radicales libres y efectos *in vitro* de la Peroxisomicina A1 sobre enzimas microsomales

María Teresa Zanatta C.*, Óscar Torres Alanís*, Lourdes Garza Ocañas*, Alfredo Piñeyro López*

Los seres humanos estamos expuestos diariamente a una gran variedad de sustancias exógenas o xenobióticos, y algunos de estos compuestos pueden ocasionar respuestas biológicas cuyas características dependerán de su biotransformación en el organismo. Los efectos de un compuesto se inician a través de su interacción con macromoléculas de los tejidos, como son proteínas, ácidos nucleicos, etc.¹

En el organismo existen diversos sistemas enzimáticos necesarios para la regulación y función de compuestos endógenos; algunos de estos sistemas intervienen en la biotransformación de compuestos exógenos. En la mayoría de las ocasiones, los productos del metabolismo son más hidrosolubles y, por lo tanto, más rápida y fácilmente excretables a través de la orina.² Generalmente, los productos resultantes del proceso de biotransformación son menos activos o incluso son inactivos. Sin embargo, en ocasiones, los metabolitos pueden tener una mayor actividad que el compuesto original, el proceso es conocido como "bioactivación".³

El metabolismo o biotransformación se lleva a cabo predominantemente en el hígado, seguido de otros órganos como riñón, intestino, pulmón y piel. A nivel celular, la biotransformación se realiza en el retículo endoplásmico y una pequeña parte en las mitocondrias, los lisosomas y en el citoplasma. Las membranas del retículo endoplásmico al ser fragmentadas forman pequeñas vesículas denominadas "microsomas", donde se encuentran la mayor parte de las enzimas que participan en el metabolismo de compuestos, tanto endógenos como exógenos.⁴

Las reacciones de biotransformación se agrupan en dos fases: la fase I, donde se realizan las reac-

ciones de oxidación, reducción e hidrólisis, y en la fase II se efectúa la conjugación, acetilación y acilación. En las reacciones metabólicas de la fase I, las sustancias pueden ser biotransformadas tanto por un mecanismo enzimático, como por un mecanismo no enzimático o por ambos mecanismos.

La biotransformación no enzimática se lleva a cabo con compuestos que tienen estructura polihidroxiaromática, como las hidroxiquinonas, que se autooxidan a radicales semiquinónicos. A consecuencia de este proceso, se ha observado la formación de intermediarios reactivos, lo que conduce a la formación de radicales libres del oxígeno.^{5,6,7,8,9}

Sin embargo, a pesar de la existencia de los mecanismos no enzimáticos, los mecanismos enzimáticos son predominantes y uno de los sistemas más importantes es el sistema de las "monooxigenasas de función mixta".⁴ En los microsomas existen dos sistemas de monooxigenasas ligados al citocromo P-450 (CITP-450). El primero comprende al CITP-450 y a su reductasa y es responsable de la biotransformación de la mayoría de las sustancias, endógenas o exógenas. El segundo comprende al CITb5 y a su reductasa.⁴

Aunque el sistema del CITb5 es capaz de metabolizar diversos compuestos, probablemente, su papel más importante sea actuar sinérgicamente con el CITP-450.⁴

Uno de los resultados de la interacción de algunos compuestos con las monooxigenasas de función mixta, al igual que en los procesos de autooxidación, es la formación de radicales libres del oxígeno, en-

* Departamento de Farmacología y Toxicología, Facultad de Medicina, UANL.



Fig. 1. Planta del género *Karwinskia*.

tre los que se encuentran el anión superóxido, el radical hidroxilo, el ión hidroperóxido, etc.^(5,6,7,8,10). Los radicales libres, además de dañar las funciones celulares, producen mutagénesis, carcinogénesis, envejecimiento, etc.¹¹

La Peroxisomicina A1 o T-514 es una sustancia con estructura diantracénica (figura 1), obtenida del fruto de las plantas del género *Karwinskia*, que pertenece a la familia de las *Rhamnaceae*.^{12,13}

Estudios realizados por Piñeyro y cols.¹⁴ han demostrado que la Peroxisomicina A1 tiene toxicidad selectiva sobre células de origen neoplásico, por lo que esta sustancia actualmente se encuentra en evaluación en la fase clínica I.

Aunque todavía se desconoce su mecanismo de acción, la Peroxisomicina A1 produce daño irreversible y selectivo en los peroxisomas.¹⁵ Por otra parte, la estructura diantracénica de la Peroxisomicina A1 (figura 2) está estrechamente relacionada con

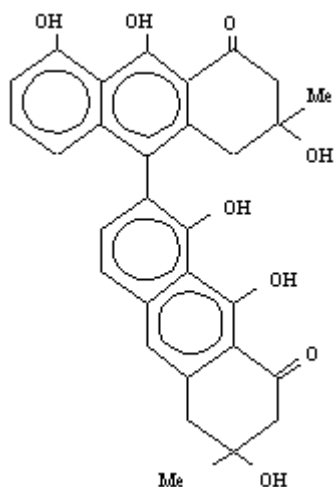


Figura 2. Estructura de la Peroxisomicina A1.

compuestos polihidroxílicos aromáticos, en los que se ha sugerido una acción citotóxica a través de la generación de intermediarios reactivos,¹¹ por lo que pudiera suponerse que esta sustancia sea capaz de generar radicales libres y que este hecho forme parte de su mecanismo de acción.

En el presente trabajo se evaluó la interacción de la Peroxisomicina A1 con algunas enzimas del sistema de las monooxigenasas de función mixta, en presencia de microsomas de mono y de rata, además de su posible autooxidación y generación de radicales libres.

Material y métodos

Los microsomas de mono (*Macaca mulatta*) se obtuvieron del hígado de un macho de dos años, con un peso de 1.758 kg. Los microsomas de rata (Wistar) se obtuvieron del hígado de machos con un peso de 150 ± 20 g. Los hígados fueron perfundidos y homogeneizados. La fracción microsomal fue obtenida por ultracentrifugación diferencial.¹⁶ La determinación de proteínas fue realizada según el método de Lowry.¹⁷

La Peroxisomicina A1 fue extraída y purificada en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina.¹⁸ Las concentraciones de peroxisomicina A1 utilizadas fueron 5, 10, 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$. Se evaluó la interacción de la Peroxisomicina A1 con los siguientes componentes de las monooxigenasas de función mixta: C1P-450,¹⁹ C1Tb5, hemoproteínas totales y NADPH citocromo P-450 reductasa.¹⁶

Para valorar la influencia del tiempo, las determinaciones fueron realizadas inmediatamente después de añadir la Peroxisomicina A1 a los microsomas (microsomas no incubados) y después de incubar los microsomas con la Peroxisomicina A1 a 37 °C durante 1 hora (microsomas incubados).

La posible autooxidación de la Peroxisomicina A1 se evaluó por espectrofotometría con el método descrito por Salvemini y cols.²⁰ y se utilizó al Pirogalol, un compuesto que genera radicales libres, como control positivo. También se evaluó la inhibición de la generación de los radicales libres con la Superóxido dismutasa y la Catalasa.

Los resultados fueron evaluados utilizando la prueba t de Student y se estableció un valor de $p < 0.05$ como nivel de significancia estadística.

Resultados

Los datos de la evaluación de la interacción de la Peroxisomicina A1 con las enzimas microsomales fueron obtenidos del promedio de 50 determinaciones.

Los resultados de las evaluaciones realizadas en los microsomas de mono se muestran en la tabla 1. Como se observa, la actividad enzimática fue variable con respecto a las diferentes dosis de Peroxisomicina A1 presentes en el medio. También hubo diferencias en la actividad enzimática después de incubarlo durante una hora. La tabla 2 muestra resultados similares con los microsomas de rata no incubados e incubados.

Con respecto a la autooxidación y generación de radicales por la Peroxisomicina A1, tanto en ausencia como en presencia de los microsomas de mono y rata, los resultados se presentan en las figuras 3, 4 y 5, en donde se observa que la generación

Tabla 1. Resultados de la interacción de la Peroxisomicina A1 con las enzimas microsomales en presencia de microsomas de mono

Microsomas no incubados					
	Concentración de Peroxisomicina A1				
	Control	5 µg/mL	10 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL
Citocromo P-450	0.627 - 0.729	0.465	0.566	1.222	0.725
Citocromo b5	0.221 - 0.333	0.231	0.343	0.359	0.748
Hemoproteínas totales	3.082 - 3.334	4.289	5.267	4.362	3.254
Citocromo P-450 reductasa	5.561 - 5.849	6.251	6.505	8.602	9.103
Microsomas incubados					
	Concentración de Peroxisomicina A1				
	Control	5 µg/mL	10 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL
Citocromo P-450	0.534 - 0.624	0.607	0.617	1.298	0.615
Citocromo b5	0.184 - 0.278	0.164	0.318	0.427	0.836
Hemoproteínas totales	3.197 - 3.465	4.687	5.887	4.453	3.178
Citocromo P-450 reductasa	6.261 - 6.596	7.118	7.947	9.283	9.153

Tabla 2. Resultados de la interacción de la Peroxisomicina A1 con las enzimas microsomales en presencia de microsomas de rata

Microsomas no incubados					
	Concentración de Peroxisomicina A1				
	Control	5 µg/mL	10 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL
Citocromo P-450	0.417 - 0.495	0.447	0.494	0.391	0.217
Citocromo b5	0.148 - 0.216	0.067	0.061	0.068	0.207
Hemoproteínas totales	1.341 - 2.177	3.882	6.031	4.563	3.179
Citocromo P-450 reductasa	2.867 - 3.225	3.017	2.899	3.087	3.179
Microsomas incubados					
	Concentración de Peroxisomicina A1				
	Control	5 µg/mL	10 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL
Citocromo P-450	0.386 - 0.468	0.362	0.319	0.429	0.539
Citocromo b5	0.166 - 0.231	0.048	0.264	0.269	0.351
Hemoproteínas totales	3.086 - 3.431	5.731	7.615	5.331	3.161
Citocromo P-450 reductasa	2.702 - 3.094	2.987	3.074	2.991	3.087

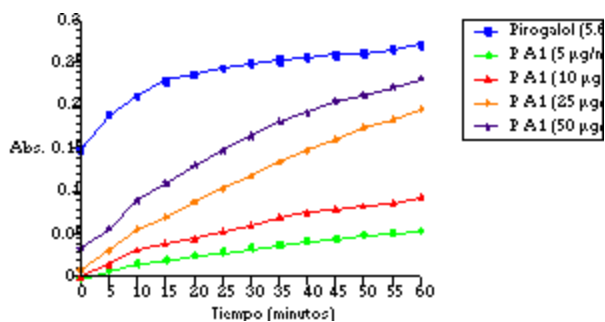


Figura 3. Autooxidación y generación de radicales libres de la Peroxisomicina A1 en ausencia de los sistemas enzimáticos microsomales.

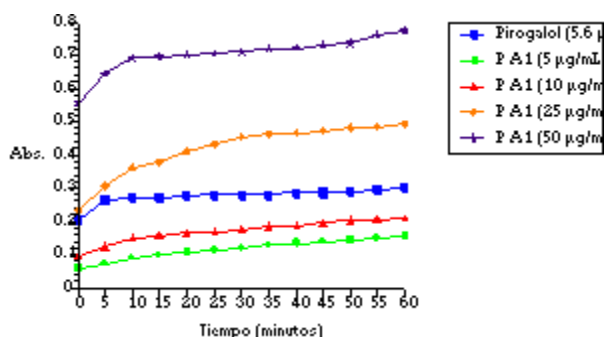


Figura 4. Autooxidación y generación de radicales libres de la Peroxisomicina A1 en presencia de microsomas de mono

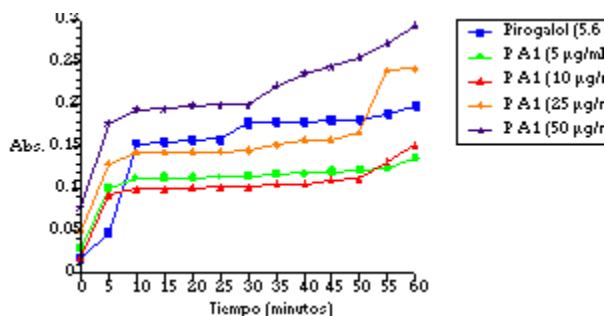


Figura 5. Autooxidación y generación de radicales libres de la Peroxisomicina A1 en presencia de microsomas de rata

de radicales libres fue directamente proporcional a la dosis de Peroxisomicina A1. El Pirogalol fue usado como control positivo.

Con respecto al proceso de inhibición de la generación de radicales libres con la Superóxido dismutasa (SOD) y la Catalasa, se observó que ambas enzimas inhiben el proceso en forma dosis-dependiente, es decir, a mayor cantidad de enzima utilizada, mayor grado de inhibición de la generación de radicales libres.

Discusión

Los resultados obtenidos muestran la existencia de importantes diferencias metabólicas entre las especies usadas. En el caso de los microsomas de mono, se observó que la Peroxisomicina A1 interacciona con la mayoría de las enzimas evaluadas (hay un aumento o disminución de la actividad), mientras que los microsomas de rata mostraron una menor variación en la actividad de las diferentes enzimas evaluadas. Así, probablemente, la Peroxisomicina A1 siga rutas metabólicas diferentes en cada especie.

Por otra parte, la actividad enzimática fue variable con las diferentes concentraciones de Peroxisomicina A1. En algunos casos, se observó que las concentraciones más bajas (5 y 10 µg/mL) disminuyeron la actividad enzimática, y las concentraciones más altas (25 y 50 µg/mL) la aumentaron o no la modificaron. La disminución observada en la actividad pudiera ser debida a un fenómeno de saturación en los sitios de unión y el posterior aumento, quizá se deba a que, por un mecanismo de retroalimentación negativa, dosis más elevadas de Peroxisomicina A1 generen la activación de una mayor cantidad de enzimas. También se observó que el tiempo fue un factor de notable influencia, pues en el caso de los microsomas que fueron incubados durante una hora, la actividad enzimática fue mayor, por lo tanto, probablemente las enzimas requieran de un cierto tiempo para ser activadas en su totalidad.

Al igual que lo reportado en la literatura para otras antracenas y para agentes antineoplásicos de estructura semejante, en las evaluaciones realizadas para determinar la posible autooxidación de la Peroxisomicina A1 y la concomitante generación de radicales libres, se observó que esta substancia genera radicales libres en forma directamente proporcional a la concentración usada. La generación de radicales libres fue observada tanto en ausencia de microsomas, como en presencia de éstos.

Los resultados obtenidos en las evaluaciones de la inhibición de la generación de radicales libres con la Superóxido dismutasa y la Catalasa muestran que ambas enzimas inhibieron la generación de los radicales libres en forma directamente proporcional a la concentración que fue añadida al medio. Se ha observado que la Superóxido dismutasa y la Catalasa inhiben la generación de radicales como el anión superóxido y el radical hidroxilo, lo que indi-

ca que la Peroxisomicina A1 al autooxidarse y biotransformarse produce este tipo de radicales.

Conclusiones

Con los resultados de este trabajo se obtuvieron las siguientes conclusiones:

Si bien la Peroxisomicina A1 es metabolizada por el sistema enzimático microsomal, tanto en el mono como en la rata, presenta importantes diferencias interespecie, por lo que estos resultados no deberían ser extrapolados al humano. La Peroxisomicina A1 además es capaz de autooxidarse y a consecuencia de esto, generar radicales libres. La generación de radicales libres se presenta tanto en ausencia de las enzimas microsomales, como en presencia de éstas y puede ser inhibida por enzimas como la Superóxido dismutasa y la Catalasa, lo que indica que el anión superóxido y el radical hidroxilo forman parte de los radicales generados. Debido a que existen agentes antineoplásicos cuyo mecanismo de acción consiste en la generación de radicales libres, probablemente, este proceso forme parte del mecanismo de acción de la Peroxisomicina A1.

Resumen

La Peroxisomicina A1 es una antracena dimérica que actualmente es evaluada como agente antineoplásico. En algunos antineoplásicos se ha sugerido para su actividad un mecanismo redox que involucra al sistema enzimático microsomal. En este trabajo se evaluó la interacción de la Peroxisomicina A1 con algunas de las enzimas microsomales y la posible generación de radicales libres. Los resultados obtenidos mostraron que la Peroxisomicina A1 interaccionó con las enzimas evaluadas y que esta interacción tiene diferencias interespecie. También se observó que la Peroxisomicina A1 genera radicales libres como el anión superóxido y el radical hidroxilo en presencia o en ausencia de las enzimas microsomales.

Palabras clave: Peroxisomicina A1, Biotransformación, Radicales libres, Enzimas microsomales

Abstract

Peroxisomicine A1 is a dimeric anthracenone which is presently being assessed as an antineoplastic drug. A redox cycling mechanism that involves to microsomal

enzyme systems has been suggested for anticancer activity of some antineoplastic drugs.

The present study was undertaken to assess the interaction of Peroxisomicine A1 with some microsomal enzymes and the possible free-radical generation. The results showed that Peroxisomicine A1 interacted with the microsomal enzymes and this interaction shows interspecie differences. Also, free radicals such as superoxide and hydroxyl radicals were generated by Peroxisomicine A1 with or without microsomal enzymes.

Keywords: Peroxisomicine A1, Biotransformation, Free radicals, Microsomal enzymes.

Bibliografía

- Katzung, B.G. (1999) "Farmacología Básica y clínica." 7a. edición, Manual Moderno (Ed.), 61.
- Smith, C.M. and Reynard, A.M. (1993) "Farmacología." Médica Panamericana (Ed.), 22.
- Velázquez, L. (1987) "Farmacología y su proyección a la clínica." 15a. edición, Oteo (Ed.), 25-31.
- Mannering, G.J. (1981) "Hepatic Cytochrome P-450-linked Drug-metabolizing Systems." En "Concepts in Drug Metabolism." Jenner, P. and Testa, B., (Ed.) Marcel Dekker Inc 53-57.
- Kappus, H. (1986) "Overview of Enzyme Systems Involved in Bioreduction of Drugs and Redox Cycling." *Biochem, Pharmacol.* 35, 1-6.
- Bus, J.S. and Gibson, J. E. (1984) "Role of Activated Oxygen In Chemical Toxicity." En "Drug Metabolism and Drug Toxicity." Mitchell, J.R. and Horning, M.G.(ed.) Raven Press, New York, 21-32.
- Gutiérrez, P. (2000) "The metabolism of Quinone-containing alkylating agents: free radical production and measurement." *Frontiers of Bioscience* 5 629-638.
- Li, B.; Gutiérrez, P.L.; Amstad, P. and Blough, N.V. (1999) "Hydroxyl radical production by mouse epidermal cell lines in the presence of quinone anticancer compounds." *Chem. Res. Toxicol* 12, 1042-1049.
- Tarasiuk, J.; Tkaczyk-Gobis, K.; Stefaniska, B.; Dzieduszycka, M.; Priebe, W.; Martelli, S. and Borowski, E. (1998) "The role of structural factors of anthraquinone compounds an their quinone-modified analogues in NADH dehydrogenase-catalysed oxygen free radical formation." *Anticancer Drug Design* 13, 923-939.
- Mason, R.P. and Chignell, C.F. (1982) "Free Radicals in Pharmacology and Toxicology Selected Topics." *Pharmacological Reviews* 32 (4), 189-210.
- Trush, M.A.; Mimnaugh, E.G. and Gram, T.E. (1982) "Activation of Pharmacologic Agents to Radical Intermediates. Implications for the Role of Free Radicals in Drug Actions and Toxicity." *Biochem. Pharmacol.* 31 (21), 3335-3346.
- Clavijero, F.X. (1920) "Introducción a la historia de la antigua Baja California." México, D.F., Porrúa S.A., 31-32.
- Dreyer, D.; Arai, I.; Bashman, C.; Anderson, W.; Amith, R. and Daves, D. (1975) "Toxins Causing non Inflammatory Paralytic Neuropathy. Isolation and Estructure Elucidation." *J. Am. Chem. Soc.* 97, 4985-4990.
- Piñeyro, A.; Martínez, L. and González, R. (1994) "In vitro selective toxicity of toxin T-514 from *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) plant on various human tumor cell lines." *Toxicology* 92, 217-227.
- Sepúlveda, J.; Van der Klei, I.; Keizer, I.; Piñeyro, A.; Harder, W. and Veenhuis, M. (1992) "Studies on the effect of toxin T-514 on the integrity of peroxisomes in methylotrophic yeast." *FEMS Microbiology Letter* 91, 207-212.
- Lake, B.G. (1987) "Preparations and Characterization of Microsomal Fractions for Studies on Xenobiotics Metabolism." En "Biochemical toxicology, a practical approach." Snell, K. and Mullock, B. (Ed.) IRL Press, Oxford, Washington, D.C. 183-215.
- Lowry, O.H.; Rosebroug, H.J.; Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) "Protein measurement with the Folin reagent." *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Guerrero, M.; Piñeyro, A. and Waksman, N. (1987) "Extractions and Quantifications of Toxins from *Karwinskia humboldtiana* (Tullidora)." *Toxicon* 25 565-568.
- Omura, T. and Sato, R. (1964) "The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes. I.- Evidence for its hemoprotein nature" *J. Biol. Chem.* 239 (7), 2370-2385.
- Salvemini, D.; de Nucci, G.; Sneddon, J.M. and Vane, J.R. (1989) "Superoxide anions enhance platelet adhesion and aggregation." *Br. J. Pharmacol.* 97, 1145-1150.