

2es



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EFFECTO CITOSTÁTICO DE LA CUMARINA Y LA
7-HIDROXICUMARINA EN DISTINTAS LINEAS
CELULARES DE CÁNCER DE PULMÓN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

P R E S E N T A

VERÓNICA GARCÍA HERRERA



MÉXICO, D. F.



1999

EXÁMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

275762



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente: **Prof. MARÍA DOLORES LASTRA AZPILICUETA**

Vocal: **Prof. JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ**

Secretario: **Prof. JUAN A. MOLINA GUARNEROS**

1er. Suplente: **Prof. ELIA BROSLA NARANJO RODRÍGUEZ**

2do. Suplente: **Prof. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO**

Sitio donde se desarrolló el tema:

LABORATORIO DE CÁNCER PULMONAR DEL DEPARTAMENTO DE ENFERMEDADES CRÓNICO DEGENERATIVAS DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS.

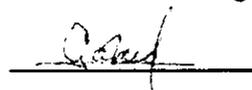
Apoyado parcialmente por:

PROYECTO DGAPA-UNAM IN211396 y PUIS 8687-297-5-V-99.

Asesor: **Dr. JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ**



Sustentante: **VERÓNICA GARCÍA HERRERA**



*Dedico esta tesis con profundo agradecimiento
Aún cuando las palabras son infinitamente pequeñas para expresar los sentimientos*

Por la vida, las bendiciones y oportunidades que me ha brindado, a Dios

*Por que gracias a su ejemplo, honestidad, paciencia, confianza, apoyo y consejo he
llegado a realizar una de mis metas más importantes, la cual constituye la
herencia más valiosa que pudiera recibir. Con admiración, respeto y amor, a mis
padres Cristina y Luis*

*Por los gratos momentos que hemos vivido, y por el cariño, estímulo y comprensión
que siempre me ha ofrecido, a mi hermana Cristina*

Por su amor, paciencia y apoyo incondicional, a David Sánchez Arias

*Por su amistad y los momentos que compartimos, a mis compañeros de la
Facultad de Química: Miriam Galicia, Rivelino Flores, Ulises Morales, Casimiro
Frausto e Italivi Linares; y de manera muy especial como muestra de cariño y
agradecimiento, a Sara M. Ugalde y Yelaviu Martínez*

*Por el interés y ayuda durante la realización de este trabajo, a mis compañeros y
amigos del laboratorio de cáncer pulmonar: Dolores Aguilar, Susana Romero,
Ulises Morales, Alejandro Jiménez y Alejandro Nieto*

*Por su ayuda y asesoría que han sido considerablemente valiosas para mi trabajo
y continuidad de mi desarrollo profesional, al Dr. Juan Molina*

*Con todo respeto, admiración y enorme gratitud por su dedicación, compromiso y
generosidad, al Dr. José Sullivan, quién hizo posible el desarrollo de esta tesis*

*Y a todas las personas que de una u otra forma han colaborado para ver
realizado uno de mis grandes anhelos*

Con toda sinceridad

GRACIAS.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 CÁNCER DE PULMÓN	7
1.1.1 Epidemiología del cáncer pulmonar	7
1.1.2 Biología del cáncer de pulmón	8
1.1.3 Patología del cáncer de pulmón	11
1.1.4 Tratamiento del cáncer pulmonar	14
1.2 CUMARINAS	18
1.2.1 Metabolismo	19
1.2.2 Toxicología	19
1.2.3 Farmacocinética	20
1.2.4 Usos industriales	21
1.2.5 Aplicaciones clínicas	21
2. ANTECEDENTES	23
2.1.1 Usos de los compuestos cumarínicos como antitumorales	23
2.1.2 Efectos inmunomoduladores de los compuestos cumarínicos	25
2.1.3 Efectos antiproliferativos de los compuestos cumarínicos	27
3. JUSTIFICACIÓN	30
4. OBJETIVOS	31
5. HIPÓTESIS	32
6. MATERIALES Y MÉTODOS	33
6.1.1 Compuestos cumarínicos empleados	33
6.1.2 Líneas celulares	33
6.1.3 Determinación del número óptimo de células tumorales para formar una monocapa al 90% de confluencia	34
6.1.4 Obtención de células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos	35
6.1.5 Determinación del efecto citostático de la cumarina y la 7-hidroxycumarina mediante ensayo de incorporación de timidina-tritiada	36
6.1.6 Cálculos y análisis estadístico	37

7. RESULTADOS	39
7.1.1 Determinación del número óptimo de células tumorales para formar una monocapa al 90% de confluencia	39
7.1.2 Efecto del diluyente sobre las líneas tumorales.	39
7.1.3 Efecto de la cumarina y 7-hidroxicumarina sobre la proliferación de células tumorales	41
7.1.4 Concentración inhibitoria 50 de la cumarina y 7-hidroxicumarina sobre las distintas líneas tumorales	45
7.1.5 Efecto de la cumarina, 7-hidroxicumarina y diluyente sobre la proliferación de células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos	46
7.2 TABLAS	47
7.3 FIGURAS	49
8. DISCUSIÓN	62
9. CONCLUSIONES	67
10. BIBLIOGRAFÍA	68

ABREVIATURAS

CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
CMN	Células mononucleares
cpm	Cuentas por minuto
DNA	Ácido desoxirribonucleico
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
LPS	Lipopolisacárido
NK	Células asesinas naturales
NSCLC	Carcinoma de pulmón de células no pequeñas
PHA	Fitohemaglutinina
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensajero
SCLC	Carcinoma de pulmón de células pequeñas
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SSB	Solución salina balanceada
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CÁNCER DE PULMÓN

1.1.1 *Epidemiología del cáncer pulmonar*

El cáncer pulmonar es en la actualidad, una de las principales causas de muerte en el mundo. En México, la Dirección General de Estadística del INEGI, S.S.A. reportó que los tumores malignos fueron la segunda causa de muerte en el año de 1997, con una tasa de mortalidad del 54.1 por cada 100 000 habitantes. Entre éstos, los principales son los tumores broncogénicos con una tasa del 6.7 por 100 000 habitantes, seguidos por tumores de estómago (5.1) y de cuello uterino (4.8).

Además, se ha reportado^{1,2} que la incidencia y mortalidad del cáncer de pulmón en México, han aumentado en los últimos 15 años y, a pesar de los avances en el diagnóstico y tratamiento, el 80% de los pacientes que lo padecen mueren durante el primer año posterior al diagnóstico y la sobrevivida a 5 años es únicamente del 10%.

En cuanto a las causas que lo producen, el tabaco es el principal agente etiológico, más del 80% de los casos se relacionan al hábito de fumar, por lo que representa un factor de riesgo importante³. Otras sustancias como hidrocarburos policíclicos aromáticos, asbesto, cromo, níquel y compuestos de arsénico inorgánico aumentan el riesgo de cáncer de pulmón⁴. Adicionalmente, se han asociado factores ambientales al aumento en la incidencia del cáncer pulmonar. Lazcano y colaboradores² asociaron el aumento en la incidencia y mortalidad por cáncer de pulmón

con ciudades de la República Mexicana de mayor desarrollo económico e industrial, reflejando la importancia del medio ambiente como factor de riesgo del cáncer pulmonar.

1.1.2 *Biología del cáncer de pulmón*

El cáncer es un trastorno en los mecanismos de proliferación y diferenciación celular⁵. La carcinogénesis se considera un proceso multietapas en las cuales, frecuentemente se presentan alteraciones a nivel genético o en la expresión de genes. Este proceso involucra a) iniciación de daño a DNA, inducido por carcinógenos, que produce cambios hereditarios en el material genético, b) promoción y eventual expansión clonal de las células iniciadas por exposición continua a agentes que inducen la proliferación celular y c) progresión a malignidad a través de la acumulación de mutaciones en el genoma e incremento en la inestabilidad genética^{6,7}. Así, el proceso carcinogénico puede resumirse como se muestra en el diagrama 1:

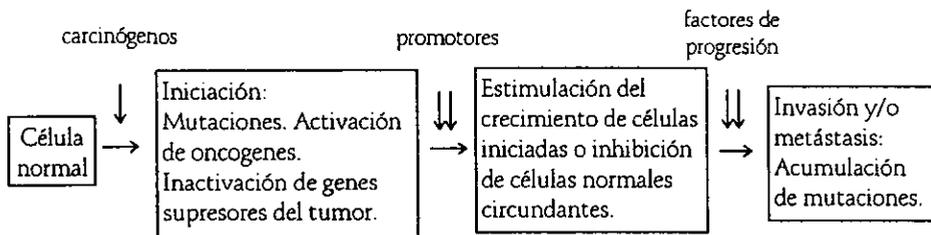


Diagrama 1. Etapas del proceso carcinogénico⁷.

Se han asociado diversos genes con el proceso carcinogénico, los cuales se han dividido en dos grupos:

- a) Oncogenes: Resultan de la mutación, amplificación o expresión no regulada de los llamados proto-oncogenes, los cuales codifican proteínas que participan en funciones celulares críticas que favorecen la proliferación celular por transducción de señales y transcripción.
- b) Genes supresores del tumor: La mayoría de estos genes controlan la proliferación celular a través de actividades reguladoras del ciclo celular. La pérdida de la función de las proteínas producto de estos genes, resulta en activación no restringida del ciclo celular ⁶.

En los cuadros 1 y 2 se resumen los principales genes involucrados en el desarrollo del cáncer pulmonar, así como su función y frecuencia ⁶⁻¹³.

Cuadro 1. Oncogenes involucrados en el desarrollo del cáncer pulmonar⁶⁻¹³.

Oncogen	Función	Frecuencia
Familia <i>ras</i>	Codifica para una proteína p21 asociada a membrana e involucrada en la transducción de señales.	Se encuentra mutado en 30% de NSCLC tipo adenocarcinoma. No en SCLC.
Familia <i>myc</i>	Fosfoproteínas nucleares involucradas en el control de la proliferación regulando la transcripción.	Está amplificado en 10-40% de SCLC. En NSCLC se encuentra amplificado en aproximadamente 10% de tumores.
<i>c-erb-B1</i>	Codifica para el receptor del factor de crecimiento epidérmico.	Se ha encontrado amplificado en NSCLC, especialmente de tipo epidermoide.
<i>c-erb-B2 (HER2/neu)</i>	Estructura homóloga al receptor del factor de crecimiento epidérmico. Glicoproteína transmembranal con actividad tirosina cinasa en el dominio intracelular.	En NSCLC se ha encontrado aumento en la expresión en 30-60% de los casos. En SCLC es raro.
<i>Bcl-2</i>	Regulador negativo de la apoptosis.	Se ha encontrado en 20% de NSCLC.
<i>c-fos</i> <i>c-jun</i>	Forman un complejo transcripcional.	Se han detectado tanto en SCLC como en NSCLC.
<i>c-kit</i>	Receptor de factores de crecimiento de células progenitoras.	Se presenta en SCLC y NSCLC.
<i>c-met</i>	Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos.	Se encuentra expresión incrementada en 88% de SCLC y 47% de NSCLC.
<i>c-fms</i>	Receptor de factor estimulante de colonias hematopoyéticas tipo 1.	Se ha detectado en NSCLC pero no en SCLC.
<i>c-myb</i>	Oncogen nuclear asociado inversamente con diferenciación. Factor de transcripción.	Se expresa en SCLC pero no en NSCLC.
<i>c-raf</i>	Proteína con actividad serina/treonina cinasa. Involucrado en la transducción de señales.	Frecuentemente mutado en NSCLC y SCLC.
<i>Bcl-1</i>	Codifica para la ciclina D1, la cual activa a cdk4 para fosforilar a la proteína Rb, favoreciendo así la progresión del ciclo celular.	Se encuentra en NSCLC.

Cuadro 2. Genes supresores del tumor involucrados en el desarrollo del cáncer pulmonar⁶⁻¹³.

Gen	Función	Frecuencia
<i>p53</i>	Proteína de unión a DNA. Actúa como factor de transcripción favoreciendo la expresión de proteínas de inhibición de cdk4. Bloquea progresión del ciclo celular en fase G1. Desencadena apoptosis.	Inactivado en el 90% de SCLC y 50% de NSCLC.
<i>rb</i>	Fosfoproteína nuclear de regulación del ciclo celular. Se une a factores de transcripción (E2F) bloqueando la progresión del ciclo celular.	Inactivado en más del 95% de SCLC y 15% NSCLC.
<i>FHIT</i>	La pérdida de este gen resulta en acumulación de diadenosín-tetrafosfato y puede causar síntesis de DNA y proliferación.	No reportado.
<i>MTS-1</i> (<i>INK4A</i>) <i>MTS-2</i> (<i>INK4B</i>) <i>waf-1</i>	Codifican para proteínas que inhiben cdk4, la cual fosforila a la proteína Rb inactivándola.	<i>MTS-1</i> Frecuentemente alterado en NSCLC y ocasionalmente en SCLC. <i>MTS-2</i> Ausente en aproximadamente 60% de NSCLC.

1.1.3 Patología del cáncer de pulmón

El conocimiento de la patología del cáncer de pulmón, así como la definición de sus formas y tipos histológicos, puede permitir el desarrollo de modalidades terapéuticas específicas. La clasificación histológica más ampliamente aceptada fue propuesta por la Organización Mundial de la Salud en 1981. En ésta, los principales tipos histológicos son: el carcinoma epidermoide, adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y carcinoma de células pequeñas^{14,15}. Sin embargo, las necesidades clínicas dieron lugar a la creación de una clasificación que divide en dos grupos a

los tumores pulmonares reflejando su biología (crecimiento y diseminación) y manejo (respuestas al tratamiento), estos grupos son: carcinoma de células pequeñas (SCLC) y carcinoma de células no pequeñas (NSCLC)^{9,15}.

SCLC.- Constituye aproximadamente un 20-25%¹⁵ de los tumores pulmonares. Se localiza en forma central, pero ocasionalmente puede surgir en la periferia de las vías respiratorias. Clínicamente, este grupo se caracteriza por una alta velocidad de crecimiento, así como diseminación metastásica temprana. No puede ser tratado mediante cirugía, aunque es relativamente sensible a la quimio y radioterapia. Además, puede presentar marcadores neuro-endócrinos⁹.

NSCLC.- Es el grupo que se presenta con mayor frecuencia, tiene un mejor pronóstico, y en estadios tempranos puede ser tratado mediante cirugía. Morfológicamente es muy diverso e incluye al carcinoma epidermoide, adenocarcinoma y carcinoma de células grandes.

- **Adenocarcinoma:** Ha llegado a ser el tipo más frecuente (30-40%) en algunos países, incluyendo Estados Unidos⁹ y México¹. Tiende a surgir en las vías respiratorias periféricas. La apariencia histológica es muy diversa y se subdivide en acinar, papilar, bronqueoalveolar y sólido, existiendo además algunas variantes raras, entre ellas el carcinoma en anillo de sello¹⁴. Algunos de estos tumores secretan mucina. Frecuentemente involucra nódulos linfáticos y pleura.
- **Carcinoma epidermoide** (carcinoma de células escamosas): Es uno de los tipos más comunes, corresponde a aproximadamente el 30% de todos los cánceres de pulmón. En carcinomas bien diferenciados

muestran estratificación ordenada, queratinización y presencia de puentes intercelulares. Tienen tendencia a crecer centralmente alrededor de los principales tallos bronquiales. Generalmente se encuentran localizados y las metástasis son poco frecuentes^{15,16}.

- **Carcinoma de células grandes:** Representan menos del 15% de todos los cánceres de pulmón¹⁵. Es un carcinoma pobremente diferenciado que no tiene características de adenocarcinoma, carcinoma epidermoide o SCLC. Muchos de estos tumores están constituidos por células grandes, con abundante citoplasma, grandes núcleos y prominentes nucleolos. Pueden ser centrales o periféricos¹⁶.

Además de la clasificación histológica, los tumores se agrupan en estadios que indican el grado de avance del tumor y sirven como parámetro predictivo para los pacientes con cáncer de pulmón. Dicha clasificación se basa en el tamaño e invasividad del tumor primario, nódulos linfáticos regionales involucrados y la presencia de metástasis (Sistema TNM). En el cuadro 3, se muestran los estadios del cáncer pulmonar:

Cuadro 3. Estadios del cáncer del pulmón¹⁷.

Estadio	Sistema TNM			Características
0	Tis	N0	M0	Carcinoma <i>in situ</i> .
I	T1-2	N0	M0	Tumor localizado de alrededor de 3 cm que no involucra nódulos linfáticos.
II	T1-2	N1	M0	Tumor que se ha diseminado a nódulos cercanos.
IIIA	T1-3	N1-2	M0	Tumores de mayor tamaño, con mayor número de nódulos linfáticos involucrados.
IIIB	T4	N1-2	M0	
IV	T1-4	N0-4	M1	Tumor que presenta metástasis.

1.1.4 Tratamiento del cáncer pulmonar

El tratamiento del cáncer pulmonar depende del tipo histológico, así como del estadio del tumor.

SCLC: Como se mencionó anteriormente el SCLC difiere del NSCLC en su rápido curso clínico y alto potencial para desarrollar metástasis. Presenta mayor sensibilidad a la quimioterapia, por lo que ésta es el tratamiento de elección, ya sea sola o en combinación con radioterapia. Los esquemas terapéuticos más aceptados consisten en la combinación de varios fármacos, los más comunes son ciclofosfamida/doxorubicina/vincristina y etopósido/cisplatino. La respuesta inicial a la quimioterapia frecuentemente es alta; sin embargo, rápidamente desarrollan resistencia. A pesar de su alta sensibilidad inicial al tratamiento, la supervivencia de estos pacientes es muy baja¹⁸.

NSCLC: El control local con cirugía o radioterapia, es el principal tratamiento en estadios tempranos (I, II y IIIA). La cirugía es el principal tratamiento con potencial curativo; sin embargo, sólo es útil en estadios muy tempranos. La radioterapia tiene un potencial curativo bajo y además tiene riesgo de toxicidad y efectos colaterales sobre tejido sano como la inducción de mutagénesis y el desarrollo de tumores secundarios¹⁸.

Por otro lado, los tratamientos locales presentan el problema de no eliminar las posibles metástasis ocultas. En este sentido, se emplean terapias quimioterapéuticas neoadyuvantes (previa a cirugía) que

eliminan micrometástasis y reducen el tamaño del tumor primario o terapias adyuvantes (posteriores a cirugía) que permiten erradicar metástasis. De la misma forma, el empleo de quimioterapia combinada con radioterapia presenta ventajas en la sobrevida, con respecto al uso exclusivo de radioterapia.

En estadios avanzados, pacientes con tumores no operables (IIIB) o con enfermedad metastásica (IV) requieren el empleo de terapias sistémicas. Fármacos como el paclitaxel, docetaxel, vinorelbina, irinotecan y gemcitabina, han mostrado actividad con índices de respuesta de aproximadamente 25%¹⁹. Éstos y otros fármacos quimioterapéuticos actúan inhibiendo la progresión del ciclo celular, por lo cual afectan principalmente a las células en proceso de división, dentro de las cuales se encuentran las células tumorales.

En el cuadro 4, se presentan los principales fármacos empleados en el tratamiento del cáncer pulmonar, así como sus mecanismos de acción, respuesta y toxicidad.

Cuadro 4. Fármacos utilizados en el tratamiento de cáncer pulmonar. Mecanismo de acción, respuesta y toxicidad¹⁹⁻²⁴.

Fármaco	Mecanismo de acción	Dosis	Respuesta	Toxicidad
Ifosfamida	Agente alquilante.	500 mg / 5 días cada 4 semanas.	Respuestas parciales entre 15 y 20%.	Mielosupresión y toxicidad gastrointestinal.
Etopósido	Alcaloide. Inhibidor de topoisomerasa II.	50 mg/m ² diariamente.	Sobrevida a 1 año 4-43%.	Mielosupresión, broncoespasmos, hipotensión.
Cisplatino (CDDP)	Análogo del platino. Agente alquilante de unión a DNA.	60-120 mg/m ² .	Respuesta 35-55%. Sobrevida a un año 40 %.	Nefrotóxico y neuropático.
Carboplatino	Análogo de platino Agente alquilante.	300-400 mg/m ² i.v.	Sobrevida a 1 año 10-20%.	Nefrotóxico, neurotóxico y ototóxico
Paclitaxel (taxol)	Altera la red de microtúbulos, estimulando su polimerización.	250 mg /m ² infusión 24h cada 3 semanas.	Actividad 21-24%. Sobrevida 1 año 30-40%.	Reacciones de hipersensibilidad, neutropenia, neuropatía y cardiotoxicidad.
Docetaxel (taxotere)	Taxano semisintético induce polimerización de microtúbulos.	100 mg/m ² infusión 1h cada 3 semanas.	Índice de respuesta 21-38%. Sobrevida media 24-47 semanas.	Mielosupresión, especialmente neutropenia. Reacciones de hipersensibilidad.
Vinorelbina (navelbina)	Alcaloide. Causa disociación de microtúbulos.	30 mg/m ² / semana.	Índice de respuesta 33%. Sobrevida media 33 semanas.	Mielotoxicidad, leucopenia, anemia severa. Neurotoxicidad.
Gemcitabina (desoxifluorocitidina)	Análogo desoxicitidina. Inducción de apoptosis.	1000-2200 mg/m ² / semana 90 mg/m ² 2 veces por semana.	Índice de respuesta 20-28%. Sobrevida media 7-10 meses.	Toxicidad hepática Mielosupresión: leucopenia y trombocitopenia. Fiebre, hipotensión.
Irinotecan (CPT-11)	Alcaloide. Probable inhibición de la DNA topoisomerasa I.	100 mg/m ² / semana. 350 mg/m ² cada 3 semanas.	Respuesta 32-34%. Sobrevida media 42 semanas. Respuesta 37%.	Mielosupresión Toxicidad pulmonar, probablemente debida a reacciones de hipersensibilidad.

A pesar de que la quimioterapia, especialmente en terapias combinadas, ofrece un mayor tiempo de supervivencia, ésta es muy baja (la supervivencia a cinco años es del 5%). Además, cabe mencionar que los tumores diagnosticados con mayor frecuencia en nuestro país se encuentran en estadios avanzados¹. Así, la alta incidencia de metástasis en pacientes con cáncer de pulmón se asocia a índices pobres de supervivencia y a la necesidad de utilizar terapias sistémicas, las cuales pueden tener consecuencias tóxicas graves, como nefrotoxicidad, neurotoxicidad, mielosupresión severa y cardiotoxicidad severa¹⁸.

En base a lo anterior, existe la necesidad de buscar nuevas alternativas de tratamiento, que presenten baja toxicidad y en este sentido, los derivados cumarínicos pueden ser una alternativa.

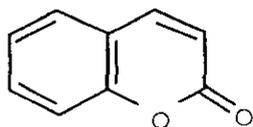
1.2 CUMARINAS

Las cumarinas son un grupo de sustancias heterocíclicas que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. Hasta la fecha, se han identificado más de 1000 derivados cumarínicos y se han aislado de más de 800 especies de plantas²⁵. Esta amplia distribución en el reino vegetal se ha asociado con el control de crecimiento, procesos de germinación y mecanismos de defensa.

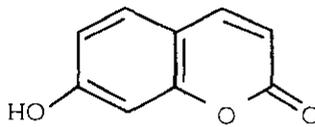
La cumarina se aisló por primera vez en 1820 por Vogel, a partir del árbol del tonka (*Coumarouna odorata*) del cual deriva su nombre y se sintetizó en 1868 por Perkin a partir de *orto*-hidroxibenzaldehído y anhídrido acético²⁶.

Estructuralmente, las cumarinas presentan un núcleo compuesto por la fusión de los anillos benceno y α -pirona. Las cumarinas se clasifican en: a) simples, que comprenden a los miembros hidroxilados, alcoxilados y alquilados, b) furanocumarinas, que consisten en un anillo furano de 5 miembros unido al núcleo de la cumarina, c) piranocumarinas, análogos de furanocumarinas que contienen un anillo de 6 miembros, y d) cumarinas sustituidas en el anillo pirona²⁶.

Estructura de la cumarina y 7-hidroxicumarina



cumarina



7-hidroxicumarina

1.2.1 Metabolismo

El metabolismo de la cumarina presenta diferencias interespecie importantes. En el humano, la principal vía metabólica es la 7-hidroxicumarina, catalizada por la enzima específica del citocromo P-450, denominada CYP2A6. Posteriormente la 7-hidroxicumarina se conjuga a glucurónido por la enzima UDP-glucuronosil transferasa^{27,28}. Una pequeña parte de la cumarina (<6%) se hidroxila en posición 3, resultando en la apertura del anillo y la formación de los ácidos o-hidroxifenil-láctico y o-hidroxifenilacético^{27,29}. También se ha revelado, en estudios de microsomas de hígado humano, la existencia de vías potencialmente menores como la 4- o 6-hidroxicumarina²⁸.

El metabolismo de la cumarina puede ser modificado por diferentes factores como el daño hepático. El metoxsalen (furanocumarina) inhibe la actividad de la 7-hidroxicumarina, mientras que sustancias como el fenobarbital, griseofulvina y cocaína incrementan la formación de 7-hidroxicumarina²⁹. En algunas especies animales, como los roedores, la principal ruta metabólica es la 3-hidroxicumarina y a ésta se asocian efectos hepatotóxicos y carcinogénicos (ver más adelante).

1.2.2 Toxicología

La toxicología está ligada al metabolismo de la cumarina debido a la formación de un intermediario 3,4-epóxido en la ruta de la 3-hidroxicumarina. Además, se ha demostrado que los efectos tóxicos son dependientes de especie³⁰.

El hígado es el principal órgano blanco de la toxicidad inducida por cumarina. En humanos, se ha reportado una incidencia de disfunción hepática baja, entre 0.37%³¹ y 9%³² y aunque no es común, la cumarina puede producir hepatonecrosis severa reversible. Por lo anterior, en los pacientes que reciban estos compuestos debe monitorearse el funcionamiento hepático³³.

Existe un estudio clínico de fase I, donde se observa que la cumarina puede ser administrada en un amplio rango de dosis, siendo tolerados hasta 7g al día, por períodos prolongados sin producir efectos tóxicos importantes³⁴.

En otros aspectos, se ha observado que la cumarina no es mutagénico de acuerdo a la prueba de AMES y de micronúcleos³⁵. En ratas y ratones, cuyo principal metabolito es la 3-hidroxycumarina, hay evidencias de actividad carcinogénica. Los efectos genotóxicos son raros²⁵.

1.2.3 Farmacocinética

La cumarina se absorbe rápida y completamente en el tracto gastro intestinal, su alto coeficiente de partición favorece su absorción por difusión pasiva. Se metaboliza ampliamente en hígado, por efecto de primer paso, produciendo la 7-hidroxycumarina (aproximadamente 97%). Su tiempo de vida media varía entre 1 y 1.5 horas, independientemente de la vía de administración. Presenta un amplio volumen de distribución con una unión a proteínas del 35% para la cumarina y 47% para la 7-

hidroxicumarina. Finalmente, se excreta en orina en forma de glucurónido a través de secreción tubular renal^{28,35}.

1.2.4 Usos industriales

Debido a su aroma, la cumarina se ha utilizado en perfumería como fijador y dulcificante, en la industria del tabaco como estabilizador y en la industria alimentaria como aditivo. La 7-hidroxicumarina se emplea en filtros solares y algunos de sus derivados como marcadores fluorescentes, al igual que el ácido aminometil-cumarinacético³⁵.

1.2.5 Aplicaciones clínicas

Dentro de los compuestos cumarínicos con aplicaciones clínicas, se encuentran los derivados de la 4-hidroxicumarina, warfarina y dicumarol, que presentan actividad anticoagulante por bloqueo del ciclo de la vitamina K, que impide la síntesis de ciertos factores de coagulación. La novobiocina tiene efecto antibiótico, mientras que la himecromona es un agente espasmolítico utilizado en afecciones biliares²⁵. Los psoralenos, pertenecientes al grupo de las furanocumarinas, son agentes fotosensibilizantes utilizados en el tratamiento de psoriasis. Por otra parte, la cumarina es eficaz en la reducción del linfoedema en el humano y se han descrito efectos inhibitorios de las vías proinflamatorias ciclo y lipoxigenasa por algunos derivados, así como características antioxidantes al interaccionar con especies reactivas dependientes de

oxígeno³⁶. Finalmente, se han observado algunos efectos antitumorales y antimetastásicos de la cumarina y algunos de sus derivados (ver: Antecedentes).

2. ANTECEDENTES

2.1.1 Usos de los compuestos cumarínicos como antitumorales

Se ha observado que la cumarina y algunos de sus derivados presentan actividad antitumoral y antimetastásica. Entre estas propiedades, se incluye la prevención del desarrollo del cáncer. En este sentido, se ha demostrado que derivados cumarínicos, en especial el 8-metoxipsoraleno, evita la formación de cáncer de piel en modelos animales al ser expuestos a luz U.V.³⁷. Así mismo, se ha observado una disminución en la carcinogénesis inducida por agentes químicos, como los hidrocarburos policíclicos aromáticos, benzo[a]pireno y 7,12-dimetilbenzo[a]-antraceno^{38,39}, y se ha observado que la 7-hidroxycumarina inhibe la transformación inducida por los oncogenes *myc* y *ras* en fibroblastos murinos⁴⁰.

Por otra parte, se han descrito propiedades antimetastásicas de compuestos cumarínicos, como el fenprocumon⁴¹ y la warfarina⁴², que además de su actividad anticoagulante, disminuyen el desarrollo de metástasis. Inicialmente, estas propiedades se atribuyeron a su potencial anticoagulante, pero aún cuando se restablece el mecanismo de coagulación, al administrar factores de coagulación, ambos compuestos mantienen sus propiedades antitumorales. Además, se ha descrito acción antimetastásica en la cumarina, substancia que no presenta propiedades anticoagulantes pero favorece la disminución del tamaño del tumor y reduce en un 40% el desarrollo de metástasis^{43,44}.

Se ha observado que la warfarina tiene actividad antineoplásica en humanos, ya que incrementa el tiempo de sobrevida en pacientes con linfosarcoma, adenocarcinoma ovárico y carcinoma de mama recurrentes⁴⁵. Además, se ha descrito que en pacientes con SCLC retarda la progresión del tumor y aumenta el tiempo de sobrevida al añadirse al tratamiento^{46,47}. Sin embargo, en otros tipos de cáncer como carcinoma de colon, próstata, cabeza y cuello, y NSCLC, no se observaron efectos benéficos significativos de la warfarina⁴⁸.

Por otra parte, un estudio clínico sobre el tratamiento con cimetidina del melanoma metastásico recurrente, sugiere que la adición de cumarina favorece la respuesta de los pacientes hacia la cimetidina, produciendo una rápida mejoría clínica y regresión del tumor⁴⁹. A partir de este reporte, otros grupos de investigación han realizado estudios clínicos en los que se administra cumarina sola o en combinación con cimetidina. En ellos, se ha demostrado que la cumarina tiene efectos significativos en contra de carcinomas renales metastásicos⁵⁰ y previene la recurrencia de melanoma maligno, al ser administrada en dosis diarias de 50 mg^{51,52}. En carcinoma prostático, se ha reportado respuesta favorable al administrar dosis de 3g de cumarina al día, observando beneficios principalmente en pacientes con tumores en estadios tempranos⁵³.

En la actualidad, no se conocen los mecanismos por los cuales estos compuestos ejercen su actividad antitumoral, aunque se sugiere que puede ser mediada por actividades inmunoestimulantes, así como por un efecto directo sobre las células tumorales.

2.1.2 Efectos inmunomoduladores de los compuestos cumarínicos

La capacidad de estos compuestos para modular la respuesta inmune puede contribuir a los efectos antitumorales observados en pacientes. Se han descrito diversas actividades inmunomoduladoras de los compuestos cumarínicos *in vitro*, principalmente sobre macrófagos y monocitos. En estas células, se ha reportado un incremento de su capacidad fagocítica. Hardt y Ritschel⁵⁴ observaron que las cumarinas favorecen la fagocitosis de partículas de látex por macrófagos. Otro grupo de investigación⁵⁵ mostró que la 7-hidroxicumarina, a concentraciones de 2 y 20 $\mu\text{g/mL}$, incrementa en la fagocitosis de partículas de zymosan por granulocitos de sangre periférica humana y por macrófagos peritoneales murinos. Así mismo, se ha observado en los monocitos, pero no en los macrófagos, un incremento en la producción enzimática y actividad proteolítica asociadas a una supresión modesta en la generación de especies reactivas dependientes de oxígeno⁵⁶.

Por otra parte, se ha detectado un incremento en la expresión de moléculas DR y DQ en la superficie de células presentadoras de antígeno, las cuales son importantes en el reconocimiento antigénico por parte de los linfocitos T cooperadores, efecto que se ha descrito tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*⁵⁶. Además, Stuhlmeier y colaboradores⁵⁷ observaron que tanto la cumarina como la 7-hidroxicumarina, inducen la producción de IL-1 y en menor grado IL-6 y TNF- α en respuesta a la estimulación con LPS. Sin embargo, otros grupos no lograron demostrar un aumento en la liberación de TNF- α ⁵⁵, ni han observado inducción de citotoxicidad

mediada por macrófagos e inducida por cumarina o por alguno de sus derivados^{55,58}.

En pacientes con carcinoma renal, se observó un aumento en el número de monocitos en sangre periférica, después de dos semanas de tratamiento con cumarina, pero no se modificaron otros tipos celulares relacionadas con la respuesta inmune, como linfocitos T, linfocitos B y células NK⁵⁹.

Existe información limitada acerca de la acción de las cumarinas sobre linfocitos T, linfocitos B y células NK, ya que los resultados no son consistentes. Algunos reportes sugieren una modesta activación de células NK³⁵; sin embargo, otros grupos no detectan alteraciones en la actividad de este tipo de células cuando se enfrentan a líneas de células tumorales⁵⁹.

En lo referente a los linfocitos, pacientes que recibieron warfarina o cumarina mostraron un incremento significativo en la respuesta de linfocitos a fitohemaglutinina (PHA)⁶⁰; sin embargo, la respuesta hacia otros mitógenos (Concanavalina A y "Fitolaca") no se encontró alterada por la administración de cumarina⁵⁹. Por otro lado, los linfocitos de pacientes tratados con un derivado de la cumarina, el 8-metoxipsoraleno, presentaron una menor capacidad proliferativa en respuesta a mitógenos, pero no a antígenos⁶¹. Se ha reportado que linfocitos de sangre periférica humana coestimulados con PHA y cumarina, u otros derivados cumarínicos, presentan un efecto inhibitorio en su proliferación⁵⁵.

Se han descrito numerosos efectos inmunológicos inducidos por la cumarina o sus derivados *in vitro* e *in vivo*, en distintas especies animales,

incluyendo al humano, con resultados poco consistentes que causan problemas de interpretación. Por lo anterior, será necesario un mayor número de estudios que permitan definir con precisión la capacidad inmunomoduladora de estos compuestos.

2.1.3 Efectos antiproliferativos de los compuestos cumarínicos

Varios grupos de investigadores⁶²⁻⁶⁶ han evaluado los efectos antiproliferativos directos de las cumarinas sobre células malignas, encontrando que la cumarina y la 7-hidroxicumarina inducen *in vitro*, inhibición del crecimiento de varias líneas celulares malignas.

Gawron y Glowniak⁶² evaluaron el efecto de varias cumarinas simples y furanocumarinas, aisladas de dos especies vegetales, en células HeLa-53, encontrando una disminución en el número de células en división, en la cantidad de proteína, así como en el número y tamaño de las colonias formadas.

Myers y colaboradores⁶³ estudiaron el efecto de la cumarina sobre el crecimiento de dos líneas celulares prostáticas malignas (LNCaP y DU145) y dos líneas de carcinoma de células renales (786-O y A-498) en cultivos de 5 días, observando inhibición del crecimiento en tres líneas al emplear concentraciones de cumarina mayores a 100 µg/mL; mientras que la línea LNCaP fue sensible a concentraciones de 10-50 µg/mL.

El grupo de Marshall⁶⁴ expuso 14 líneas tumorales humanas a cumarina y 7-hidroxicumarina a concentraciones de 100 a 500 µg/mL empleando cultivos de 1 a 7 días, demostrando mediante cuenta celular, un efecto

citostático reversible, dependiente de la concentración y tiempo de exposición; además, observaron una disminución en la incorporación de timidina, uridina y leucina marcadas radiactivamente. En la línea LNCaP, la 7-hidroxicumarina suprimió la producción de antígeno prostático mientras que en la línea HL-60 indujo apoptosis.

Kolodziej y colaboradores⁶⁵ reportaron que varias cumarinas simples inducen un modesto efecto citotóxico en las líneas tumorales humanas GLC4 (carcinoma de pulmón de células pequeñas) y COLO 320 (línea celular de cáncer colorectal), mediante el empleo de la sal bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio (MTT).

Kofinas y colaboradores⁶⁶ aislaron 7 compuestos de una especie vegetal, probando su acción citotóxica sobre una línea de carcinoma bronquial de células no pequeñas (NSCLC-N6) y una de cáncer rinofaríngeo (KB) mostrando inhibición del crecimiento por la 7-hidroxicumarina y detectando un bloqueo en fase G1 del ciclo celular.

Otros grupos de trabajo, han asociado el efecto citostático de estos compuestos con un bloqueo en los mecanismos autócrinos de proliferación que presentan algunas líneas celulares o con la expresión de oncogenes⁶⁷. En este sentido, Seliger y Petterson demostraron que la 7-hidroxicumarina tiene efecto inhibitorio sobre dos líneas celulares de glioblastoma maligno, asociando este efecto a una disminución en los niveles de RNAm para el factor de crecimiento derivado de plaquetas; mientras que Zanker, estudió el efecto de la 7-hidroxicumarina sobre las líneas DUKX (línea con expresión incrementada del gen *Ha-ras*) y RBA (línea con expresión incrementada de *c-myc*) encontrando una inhibición

asociada con una disminución de los niveles de RNAm de *Ha-ras* y *c-myc*, respectivamente.

Todos estos resultados, nos muestran que los compuestos cumarínicos tienen efectos directos sobre las células tumorales; sin embargo, las variaciones en la sensibilidad de las diferentes líneas estudiadas, así como en las dosis requeridas para inducir efectos antitumorales significativos, nos exigen un estudio más profundo de la acción de los derivados cumarínicos sobre las células tumorales y en especial, las de origen pulmonar.

3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer pulmonar es un grave problema de salud a nivel mundial, siendo una de las principales causas de muerte en nuestro país. Además, los tratamientos actuales son altamente tóxicos y la esperanza de vida es aún muy pobre, por lo que es necesaria la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas, que repercutan en un mayor tiempo y mejor calidad de vida de los pacientes con cáncer.

Existen evidencias de que los compuestos cumarínicos, entre ellos la cumarina y su principal metabolito en el humano, la 7-hidroxycumarina, presentan actividad antitumoral. Sin embargo, la información en cuanto a su actividad frente al cáncer pulmonar es escasa. Adicionalmente, se ha reportado que estos compuestos pueden ser administrados en un amplio rango de dosis sin presentar efectos tóxicos importantes³⁴.

Por otra parte, los mecanismos de acción se desconocen, pero se ha sugerido que estos compuestos pueden tener una acción directa sobre las células tumorales, inhibiendo su proliferación. En este sentido, varios grupos de trabajo⁶²⁻⁶⁶ han evaluado *in vitro*, el efecto citostático de las cumarinas simples con resultados muy variables.

Tomando en cuenta las diferencias de sensibilidad para las distintas líneas tumorales hacia estos compuestos, en el presente trabajo se evalúa el papel que tienen las cumarinas sobre la proliferación de líneas tumorales de origen pulmonar, a fin de determinar el potencial terapéutico que estos compuestos pudieran tener para el beneficio de pacientes con cáncer de pulmón.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto *in vitro* de la cumarina y la 7-hidroxicumarina sobre la proliferación de líneas celulares de cáncer pulmonar.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar las condiciones experimentales para la evaluación del efecto citostático de la cumarina y 7-hidroxicumarina sobre la proliferación de células tumorales de origen pulmonar.
- Evaluar el efecto sobre la proliferación celular en ocho líneas celulares de cáncer pulmonar de las estirpes histológicas más frecuentes en México (adenocarcinoma y carcinoma epidermoide).
- Determinar la concentración inhibitoria 50 de la cumarina y 7-hidroxicumarina sobre las distintas líneas celulares en cultivos de 24 y 48h.
- Determinar la toxicidad de la cumarina y 7-hidroxicumarina sobre células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos, con el fin de definir si el efecto de estos compuestos es selectivo hacia las células tumorales.

5. HIPÓTESIS

En base a los reportes sobre la actividad citostática de la cumarina y 7-hidroxicumarina, se espera que ambos fármacos inhiban la proliferación de células tumorales *in vitro* y que el efecto inhibitorio sea mínimo o nulo sobre la proliferación de células no malignas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.1 Compuestos cumarínicos empleados

La cumarina y 7-hidroxicumarina utilizadas fueron obtenidas de Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI. USA.) con una pureza del 99%. Debido a que estos compuestos son poco hidrosolubles y solubles en etanol, se prepararon soluciones primarias de cumarina y 7-hidroxicumarina a concentraciones de 5 mg/mL y 2.5 mg/mL, respectivamente en una mezcla de 3 partes de etanol y 5 partes de medio RPMI-1640. Estas soluciones fueron esterilizadas por filtración en membranas de nitrocelulosa con poro de 0.22 μ m. A partir de ellas, se efectuaron diluciones seriadas de los fármacos hasta obtener concentraciones finales de 10 a 160 μ g/mL. Como control de diluyente, se empleó una mezcla con la misma proporción etanol-medio RPMI-1640 y a partir de ella se realizaron las diluciones correspondientes.

6.1.2 Líneas celulares

Se emplearon 8 líneas tumorales de origen pulmonar pertenecientes al grupo de células no pequeñas: 4 líneas obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, USA. (2 líneas tipo adenocarcinoma: A-427 y SK-LU-1 y 2 líneas de tipo epidermoide: SK-MES-1 y CALU-1) y cuatro obtenidas y establecidas partir del derrame

pleural de pacientes con diagnóstico de cáncer pulmonar y libres de tratamiento, las que se designaron: 1.3.11, 1.3.15, 3A5A y 3B1A. Todas ellas pertenecientes al tipo histológico adenocarcinoma.

Las líneas celulares se mantuvieron en botellas T-25 (Nunc, Denmark) con un volumen final de 5 mL de medio de cultivo completo que contenía medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina G sódica y 100 µg/mL de estreptomycin. Las células fueron incubadas en atmósfera húmeda con 5% de CO₂, a temperatura de 37°C. Todas las líneas celulares empleadas crecen adheridas al plástico, por lo que se trataron con una mezcla tripsina 0.25% - verseno 0.02% adquirida de In vitro (D.F. México) y agitación mecánica para favorecer su desprendimiento. La viabilidad celular se mantuvo mayor al 90% y fue determinada mediante la exclusión por tinción con azul de tripano. Todos los reactivos empleados se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO. USA) a excepción de aquellos en los que se indique otra cosa.

6.1.3 Determinación del número óptimo de células tumorales para formar una monocapa al 90% de confluencia

El efecto de estos compuestos se evaluó en cultivos a subconfluencia, para lo cual se determinó previamente la concentración celular adecuada para formar una monocapa al 90% tanto a las 24h como a las 48h de cultivo. Para ello, se recuperaron las células a partir de un cultivo a confluencia mediante tratamiento con tripsina-verseno y agitación mecánica. Las

células se lavaron dos veces con solución salina balanceada (SSB) y se resuspendieron en medio de cultivo completo, ajustando a una concentración de 1×10^6 células/mL. A partir de esta suspensión, se hicieron diluciones seriadas hasta 1×10^5 células/mL.

En una placa de 96 pozos (Nunc, Denmark), se colocaron 100 μ L de medio de cultivo completo y 100 μ L de la dilución celular a probar. La placa se incubó en atmósfera húmeda a 37°C y 5% de CO₂ y la concentración de células necesaria para formar la monocapa a subconfluencia se determinó mediante observación microscópica.

6.1.4 Obtención de células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMN) a partir de sangre completa heparinizada de cinco donadores sanos. La fracción de CMN fue separada por centrifugación en un gradiente de densidad empleando Ficoll/Hypaque (1.077 ± 0.001 g/mL) obtenido de Nycomed Pharma (Oslo, Norway). Después de dos lavados con SSB, las CMN fueron resuspendidas en medio de cultivo completo ajustando a una concentración de 1×10^6 células/mL.

6.1.5 Determinación del efecto citostático de la cumarina y la 7-hidroxicumarina mediante ensayo de incorporación de timidina-tritiada

La determinación del efecto citostático se llevó a cabo en experimentos a exposición única, para lo cual se emplearon placas de 96 pozos (Nunc, Denmark) en las que se colocaron 100 μL de la suspensión de células tumorales a la concentración óptima determinada con anterioridad, y 100 μL de: a) las diferentes diluciones de fármacos (cumarina o 7-hidroxicumarina), b) las diferentes diluciones de diluyente y c) del medio de cultivo (control negativo).

En el caso de las CMN, a la suspensión celular se adicionó PHA (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA) en una dilución 1:1000 para inducir su máxima proliferación. La exposición a los fármacos se realizó de la misma forma que para las células tumorales, colocando 100 μL de la suspensión de CMN, en presencia o ausencia del mitógeno, y 100 μL de los distintos tratamientos.

Las placas se incubaron en atmósfera húmeda a 37°C y 5% de CO_2 durante periodos de 24h y 48h para las líneas tumorales y de 72h para las CMN. En todos los casos, veinte horas antes del término del cultivo se adicionó 1 μCi /pozo de ^3H -timidina obtenida de Amersham International (Buckinghamshire, England). Al finalizar el tiempo de incubación, solamente los cultivos de las células tumorales se trataron con SDS al 0.3% y agitación constante, aproximadamente a 150 rpm durante 1h. Tanto en los cultivos de líneas tumorales como en los de CMN, se recuperó el material nuclear sobre papel filtro con ayuda de un

cosechador múltiple (Brandel, Gaithersburg, MA. USA). Después de secarse, el papel se colocó en 3 mL de líquido de centelleo Aquasol-2 adquirido de Packard Instrument Co. (Meriden, CT. USA) y se determinó la cantidad de marca radiactiva incorporada en cuentas por minuto (cpm) utilizando un contador beta de Beckman Instruments, Inc. (Fullerton, CA. USA). Los experimentos se realizaron al menos 2 veces y cada determinación se llevó a cabo por quintuplicado.

6.1.6 Cálculos y análisis estadístico

El control negativo que únicamente contiene medio de cultivo, se incluyó para determinar el efecto que ejerce cada dilución de etanol sobre la población de células tumorales y CMN estudiadas. El porcentaje de inhibición se obtuvo restando al valor de 1, la fracción resultante de dividir las cuentas por minuto (cpm) obtenidas en presencia del fármaco o diluyente y las cpm obtenidas en el control de medio (control negativo) respectivo, multiplicado por 100.

$$\% \text{ inhibición} = \left[1 - \frac{\text{cpm (fármaco o diluyente)}}{\text{cpm (medio)}} \right] \times 100$$

Para determinar si el diluyente presentaba un efecto significativo sobre la proliferación celular, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y posteriormente se empleó la prueba de Dunnett para identificar los grupos que presentaban diferencias con respecto al control de medio. Al no encontrar diferencias significativas entre el control de medio y los

diluyentes, se determinó el porcentaje de inhibición sobre el crecimiento celular inducido por los fármacos con respecto a su diluyente.

Finalmente, se utilizó la prueba *t* de Student para comparar el porcentaje de inhibición del grupo tratado, con su respectivo diluyente.

El análisis estadístico se realizó con el programa de cómputo SigmaStat V. 2.0 (Jandel Scientific) y en todos los casos para la significancia estadística se estableció un alfa menor de 0.05.

Con el fin de comparar las potencias de los fármacos, se calculó la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) para la cumarina y 7-hidroxycumarina a las 24 y 48h de exposición en cada una de las líneas celulares tratadas. Para ello se emplearon gráficas de concentración contra el porcentaje de inhibición.

7. RESULTADOS

7.1.1 Determinación del número óptimo de células tumorales para formar una monocapa al 90% de confluencia

La cantidad de células necesaria para formar una monocapa al 90% de confluencia, varió entre las distintas líneas celulares dependiendo de sus características de crecimiento y tamaño; por lo que se determinó para cada línea, la cantidad óptima necesaria para alcanzar una subconfluencia tanto a las 24h como a las 48h de cultivo. En la tabla 1, se muestra la cantidad determinada para cada línea tumoral.

7.1.2 Efecto del diluyente sobre las líneas tumorales.

Debido a las propiedades de solubilidad de los compuestos en estudio, fue necesario emplear como diluyente una mezcla etanol-medio. La cantidad de etanol necesaria para la disolución de la 7-hidroxicumarina es mayor en relación a la cumarina. Por ello, la cantidad de etanol presente en las diluciones de 7-hidroxicumarina, se ajustó al doble de la requerida para las diluciones de cumarina. La relación final de etanol, con respecto a cada una de las concentraciones empleadas de cumarina y 7-hidroxicumarina en los experimentos, se indica en el cuadro 5.

Cuadro 5. Cantidad de etanol correspondiente a cada dilución de los fármacos.

Concentración de cumarina µg/mL	Cantidad de etanol % (µL/pozo)	Concentración de 7-hidroxicumarina µg/mL	Cantidad de etanol % (µL/pozo)
10	0.07 (0.15)	10	0.15 (0.3)
20	0.15 (0.3)	20	0.3 (0.6)
40	0.3 (0.6)	40	0.6 (1.2)
80	0.6 (1.2)	80	1.2 (2.4)
160	1.2 (2.4)	160	2.4 (4.7)

Con el fin de determinar si el etanol presente en las soluciones interfería en la determinación del efecto de la cumarina y la 7-hidroxicumarina, se emplearon controles para cada una de las concentraciones en estudio y se calculó el porcentaje de inhibición inducido por el diluyente sobre las distintas líneas celulares.

A las 24h de exposición, etanol al 2.4% afectó el crecimiento de 6 de las 8 líneas tumorales estudiadas, observando una disminución en la cantidad de timidina tritiada incorporada. Dicha disminución, varió del 19 al 63% dependiendo de la línea celular (Figuras 1 a 8). Las líneas más afectadas fueron la CALU-1, SK-LU-1 y SK-MES-1, seguidas por las líneas 1.3.15 y 1.3.11. A este mismo tiempo, proporciones de etanol menores al 2.4% afectaron únicamente a la línea SK-MES-1. Por su parte, las líneas 3A5A y 3B1A no mostraron ninguna alteración al ser expuestas al diluyente, aún a la máxima proporción, en comparación a sus controles. A las 48h de cultivo, el efecto del diluyente disminuyó notablemente (Figuras 1 a 8).

7.1.3 Efecto de la cumarina y 7-hidroxicumarina sobre la proliferación de células tumorales

En cultivos de 24h de la línea adenocarcinoma A-427, la cumarina causó un efecto citostático que varió del 15 al 30% a concentraciones de 80 y 160 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente ($p=0.012$, prueba t de Student). A las 48h de cultivo, únicamente se presentó una inhibición del 20% a la concentración de 160 $\mu\text{g/mL}$ ($p=0.04$, prueba t de Student) (Figuras 1A y 1B). Por su parte, la 7-hidroxicumarina a las 24h de cultivo mostró mayor efecto que la cumarina, ya que al emplear la misma concentración, duplica la inhibición celular causada por la cumarina. A la mayor concentración estudiada, se observó una inhibición por la 7-hidroxicumarina del 60% ($p<0.001$, prueba t de Student); sin embargo, al observar al microscopio las células tratadas, se apreciaron cambios morfológicos que sugieren daño celular. A esta concentración, el diluyente también mostró alteraciones en la proliferación celular ($p<0.05$, prueba Dunnett) (Figuras 1C y 1D). En general el efecto disminuyó a las 48h.

A las 24h, la línea de adenocarcinoma SK-LU-1 presentó mayor sensibilidad a la cumarina que la línea A-427, siendo inhibida a partir de la concentración de 40 $\mu\text{g/mL}$ con porcentajes del 20 al 50% ($p<0.001$, prueba t de Student). El efecto inhibitorio disminuyó con respecto al tiempo en todas las concentraciones empleadas (Figuras 2A y 2B). La 7-hidroxicumarina indujo una inhibición superior que la cumarina al ser expuesta por 24h. Los valores obtenidos variaron entre el 30 y 80%

($p < 0.001$, prueba t de Student) (Figura 2C). Sin embargo, es importante señalar que el diluyente correspondiente a la concentración de $160 \mu\text{g/mL}$ interfirió en esta observación y adicionalmente se observó toxicidad en las células. A 48h de cultivo, concentraciones de $80 \mu\text{g/mL}$ e inferiores pierden el efecto ($p > 0.05$, prueba t de Student), mientras que la concentración de $160 \mu\text{g/mL}$ mantuvo una inhibición del 67% ($p < 0.001$, prueba t de Student) en la proliferación celular (Figura 2D).

La línea de carcinoma epidermoide CALU-1 sólo fue afectada a concentraciones altas, tanto de cumarina como de 7-hidroxicumarina (Figura 3). A las 24h de exposición, la concentración de $160 \mu\text{g/mL}$ de cumarina y $80 \mu\text{g/mL}$ de 7-hidroxicumarina, causaron una inhibición alrededor del 50% ($p < 0.001$, prueba t de Student), efecto que desapareció en ambos casos a las 48h. Concentraciones menores no mostraron efecto y al igual que las líneas A-427 y SK-LU-1, al ser expuestas a $160 \mu\text{g/mL}$ de 7-hidroxicumarina, se observó citotoxicidad.

Por su parte, la línea de carcinoma epidermoide SK-MES-1 fue muy sensible a los fármacos, sin presentar daño celular aparente. A las 24h de exposición, ambos compuestos causaron un efecto citostático significativo en todo el rango de concentraciones estudiadas, con porcentajes entre el 20 y el 75% ($p < 0.001$, prueba t de Student) (Figuras 4A y 4B). A las 48h, concentraciones hasta $80 \mu\text{g/mL}$ presentaron un menor efecto, mientras que a la mayor concentración empleada, la acción de la cumarina se mantuvo y la de 7-hidroxicumarina aumentó,

alcanzando una inhibición mayor al 90% ($p < 0.001$, prueba t de Student) (Figuras 4C y 4D).

En lo referente a las líneas establecidas a partir de derrame pleural de pacientes del INER, con características de adenocarcinoma, se obtuvieron los siguientes resultados.

En la línea 1.3.11 se presentó una inhibición por la cumarina a partir de concentraciones de 40 $\mu\text{g/mL}$ a las 24h de tratamiento ($p = 0.009$, prueba t de Student). El efecto a la concentración mayor se mantuvo alrededor de 40% con respecto al tiempo y, a concentraciones más bajas este efecto desapareció (Figuras 5A y 5B). En cuanto a la 7-hidroxycumarina, la concentración de 40 $\mu\text{g/mL}$ causó un efecto citostático del 30% ($p = 0.001$, prueba t de Student) tanto a 24h como a 48h de exposición. Concentraciones mayores, aumentaron su efecto en función del tiempo, alcanzando a las 48h porcentajes de inhibición de 60 y 97 ($p < 0.001$, prueba t de Student) con 80 y 160 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Figuras 5C y 5D). Sin embargo, a esta última concentración también se observó daño celular.

La línea 1.3.15 fue ligeramente más sensible que la anterior, requiriendo menor cantidad de fármaco para ser inhibida significativamente. En este sentido, la cumarina a las 24h tuvo actividad a partir de 20 $\mu\text{g/mL}$, siendo su efecto máximo del 53% ($p < 0.001$, prueba t de Student) (Figura 6A). El efecto a las 48h se mantuvo a concentraciones de 80 y 160 $\mu\text{g/mL}$ y se

redujo al emplear concentraciones menores (Figura 6B). La 7-hidroxicumarina presentó efecto citostático en esta línea a partir de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 24h ($p < 0.001$, prueba t de Student) (Figura 6C), mostrando efecto tóxico sobre las células a la concentración de 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Al aumentar el tiempo de exposición, el efecto inhibitorio disminuyó fuertemente a concentraciones inferiores a 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mientras que a las 48h la concentración de 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ presentó una inhibición del 90% ($p < 0.001$, prueba t de Student) (Figura 6D).

La cumarina inhibió la proliferación de la línea 3A5A en concentraciones de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o superiores, a las 24h de exposición; alcanzando un 70% a la mayor concentración empleada ($p < 0.001$, prueba t de Student) (Figura 7A). A esta misma concentración, el efecto citostático a las 48h disminuyó a 47% ($p < 0.001$, prueba t de Student), mientras que la concentración de 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mantuvo su efecto en función del tiempo, siendo del 35% ($p = 0.003$, prueba t de Student) (Figuras 7A y 7B). La 7-hidroxicumarina presentó a las 24h un efecto inhibitorio entre el 25 y 75% a lo largo del rango de concentraciones empleadas ($p < 0.001$, prueba t de Student). A concentraciones menores de 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la citostasis disminuyó drásticamente a las 48h y en las concentraciones de 80 y 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$, el efecto aumentó hasta 84 y 88% ($p < 0.001$, prueba t de Student), respectivamente (Figuras 7C y 7D). En esta línea no se observó citotoxicidad en ninguno de los tratamientos.

Finalmente, en la línea 3B1A no se observaron alteraciones en su proliferación al ser expuestas por 24h a cualquiera de los compuestos ($p > 0.05$, prueba t de Student) (Figuras 8A y 8C). Sin embargo, a las 48h la concentración más alta de cumarina y 7-hidroxycumarina causó un aumento en la proliferación del 40 y 76%, respectivamente ($p < 0.001$, prueba t de Student) (Figuras 8B y 8D).

7.1.4 Concentración inhibitoria 50 de la cumarina y 7-hidroxycumarina sobre las distintas líneas tumorales

Con el fin de comparar la potencia de los fármacos y sensibilidad de las líneas tumorales hacia éstos, se calcularon las concentraciones inhibitorias 50 (CI_{50}) para cada línea tumoral a ambos tiempos de exposición. Para ello, se calculó el porcentaje de inhibición con respecto a los controles de diluyente, a cada concentración de los fármacos y se realizaron gráficas de concentración contra efecto (Figuras 9-12). Para calcular la CI_{50} no se tomaron en cuenta aquellos datos en los cuales el diluyente causara una alteración significativa de la proliferación y/o se observara daño celular microscópicamente.

En la tabla 2, se muestran las CI_{50} de los fármacos para cada línea tumoral, así como el porcentaje de inhibición máximo observado a las concentraciones estudiadas.

7.1.5 Efecto de la cumarina, 7-hidroxicumarina y diluyente sobre la proliferación de células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos

Para estudiar si el efecto de estos compuestos era selectivo sobre las líneas tumorales, se utilizaron como control las CMN de individuos sanos, las cuales fueron estimuladas con PHA para inducir su proliferación celular.

El diluyente (etanol) no afectó la proliferación de CMN estimuladas con PHA (Figura 13), así como las CMN no estimuladas (datos no mostrados).

En las células no estimuladas con PHA y expuestas a cumarina y 7-hidroxicumarina, se observó un efecto inhibitorio no significativo ($p > 0.05$, prueba t de Student) con respecto a sus controles (datos no mostrados). En las células estimuladas con PHA (Figura 13), se presentó una inhibición en la proliferación de CMN de alrededor del 20% al ser expuestas a 160 $\mu\text{g/mL}$ de cumarina o 80 $\mu\text{g/mL}$ de 7-hidroxicumarina, mientras que esta inhibición fue del 97% al ser tratadas con 160 $\mu\text{g/mL}$ de 7-hidroxicumarina ($p < 0.001$, prueba t de Student), donde no se observó efecto citotóxico.

7.2 TABLAS

Tabla 1. Determinación del número óptimo de células tumorales para alcanzar una monocapa al 90% de confluencia.

LÍNEA CELULAR	CANTIDAD DE CÉLULAS /mL	
	cultivo 24 h	cultivo 48 h
A-427	3.3×10^5	1.7×10^5
SK-LU-1	4×10^5	2×10^5
SK-MES-1	3×10^5	1.8×10^5
CALU-1	4×10^5	3×10^5
1.3.11	9×10^5	8×10^5
1.3.15	6×10^5	5×10^5
3A5A	4×10^5	3×10^5
3B1A	8×10^5	6.5×10^5

Tabla 2. Porcentaje de inhibición a la máxima concentración de los fármacos y concentración inhibitoria 50

LÍNEA CELULAR	CUMARINA						7-HIDROXICUMARINA					
	24 h			48 h			24 h			48 h		
	%INH (Cmax)	CI ₅₀ (µg/mL)	%INH (Cmax)	CI ₅₀ (µg/mL)	%INH (Cmax)	CI ₅₀ (µg/mL)	%INH (Cmax)	CI ₅₀ (µg/mL)	%INH (Cmax)	CI ₅₀ (µg/mL)	%INH (Cmax)	CI ₅₀ (µg/mL)
A-427	30.3	>500 ^a	8.2	- ^b	51.1	171.6	44.5	>500	53.7 ^c	95.6	55.8	466.4
SK-LU-1	52.4	371.6	7.2	-	66.4 ^c	41.4	93.3	69.0	55.0 ^c	119.9	75.8	188.0
SK-MES-1	59.3	122.2	70.3	143.3	23.3 ^c	>500	47.0 ^c	84.7	77.9	89.4	88.5	56.3
CALU-1	47.1	>500	1.0	-	14.5	-	-76.6	72.99 ^d	33.4	>500	42.2	>500
1.3.11	50.5	228.3	41.8	>500	47.0	270.0	44.4	56.3	50.5	228.3	41.8	>500
1.3.15	68.6	96.3	47.0	270.0	47.0	270.0	44.4	56.3	68.6	96.3	47.0	270.0
3A5A	-17.6	-	-39.3	-	-	-	-	-	-17.6	-	-39.3	-
3B1A												

^a Obtenido por extrapolación

^b No se presentó un efecto citostático significativo

^c Corresponde a la concentración de 80 µg/mL

^d Concentración que estimula la proliferación al 50%

7.3 FIGURAS

A-427

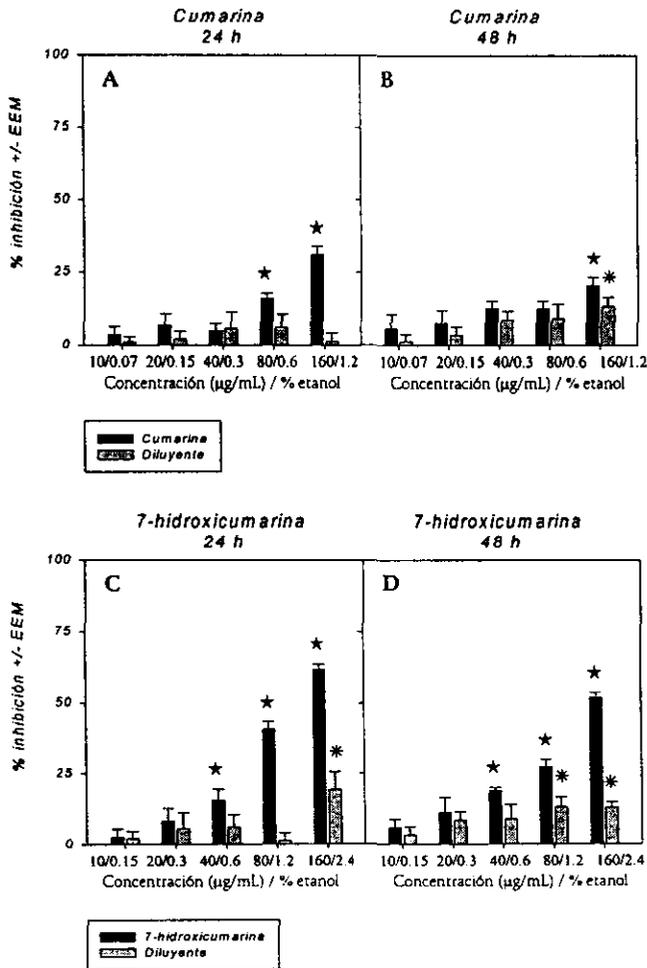


Figura 1. Efecto inhibitorio de la cumarina, 7-hidroxicumarina y diluyente sobre la línea A-427. Porcentaje de inhibición de la cumarina y sus respectivos diluyentes en exposiciones de 24h (A) y 48h (B). Porcentaje de inhibición de la 7-hidroxicumarina y sus respectivos diluyentes a las 24h (C) y 48h (D) de exposición.

* = diferencias significativas con respecto al medio ($p < 0.05$, prueba de Dunnett).

★ = diferencias significativas entre el fármaco y su respectivo diluyente ($p < 0.05$, prueba *t* de Student).

SK-LU-1

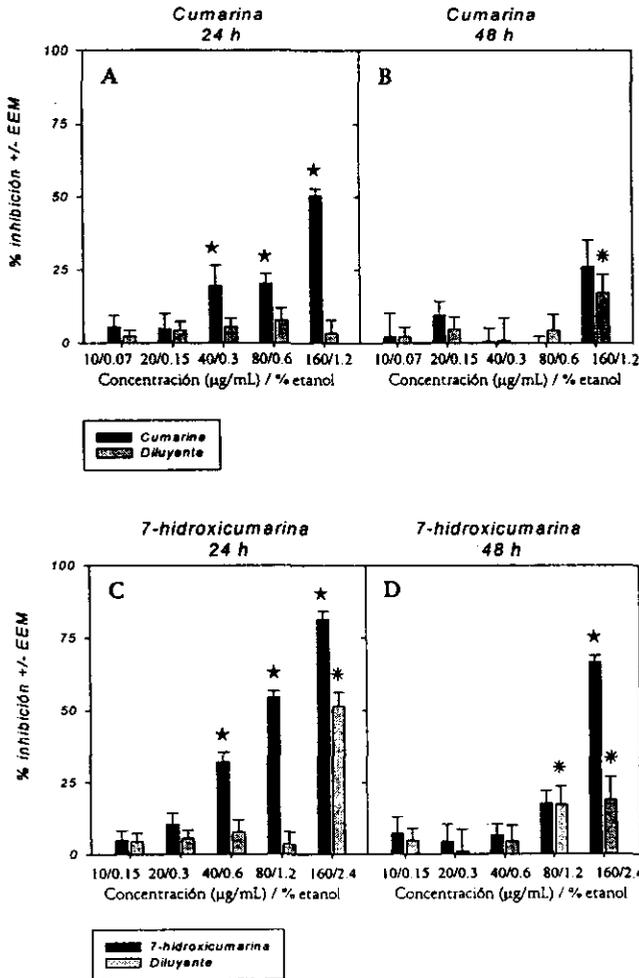


Figura 2. Efecto inhibitorio de la cumarina, 7-hidroxicumarina y diluyente sobre la línea SK-LU-1. Porcentaje de inhibición de la cumarina y sus respectivos diluyentes en exposiciones de 24h (A) y 48h (B). Porcentaje de inhibición de la 7-hidroxicumarina y sus respectivos diluyentes a las 24h (C) y 48h (D) de exposición.

* = diferencias significativas con respecto al medio ($p < 0.05$, prueba de Dunnett).

★ = diferencias significativas entre el fármaco y su respectivo diluyente ($p < 0.05$, prueba *t* de Student).

CALU-1

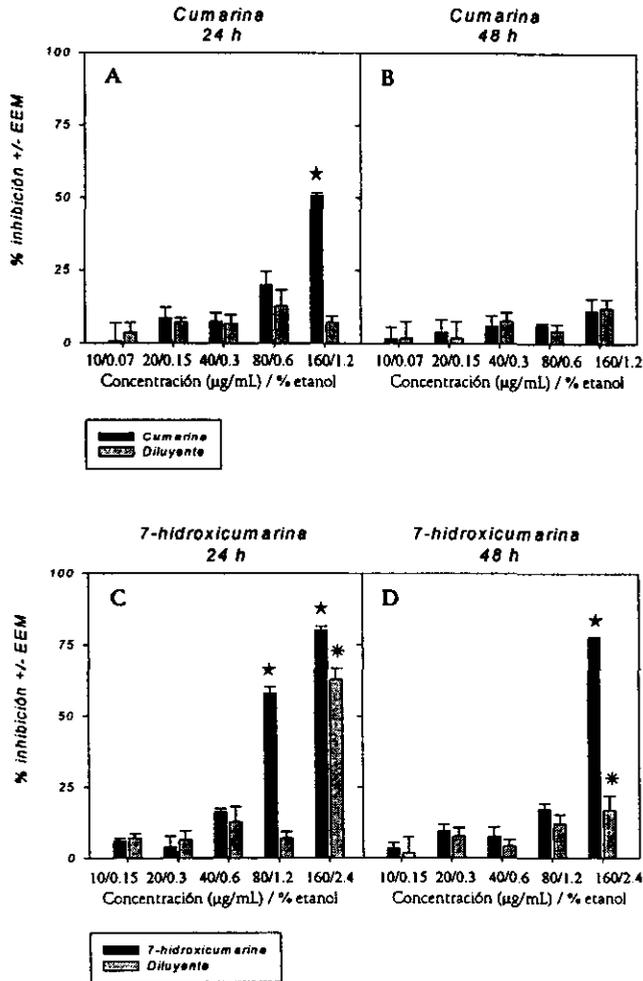


Figura 3. Efecto inhibitorio de la cumarina, 7-hidroxicumarina y diluyente sobre la línea CALU-1. Porcentaje de inhibición de la cumarina y sus respectivos diluyentes en exposiciones de 24h (A) y 48h (B). Porcentaje de inhibición de la 7-hidroxicumarina y sus respectivos diluyentes a las 24h (C) y 48h (D) de exposición.
 *= diferencias significativas con respecto al medio ($p < 0.05$, prueba de Dunnett).
 ★= diferencias significativas entre el fármaco y su respectivo diluyente ($p < 0.05$, prueba t de Student)

SK-MES-1

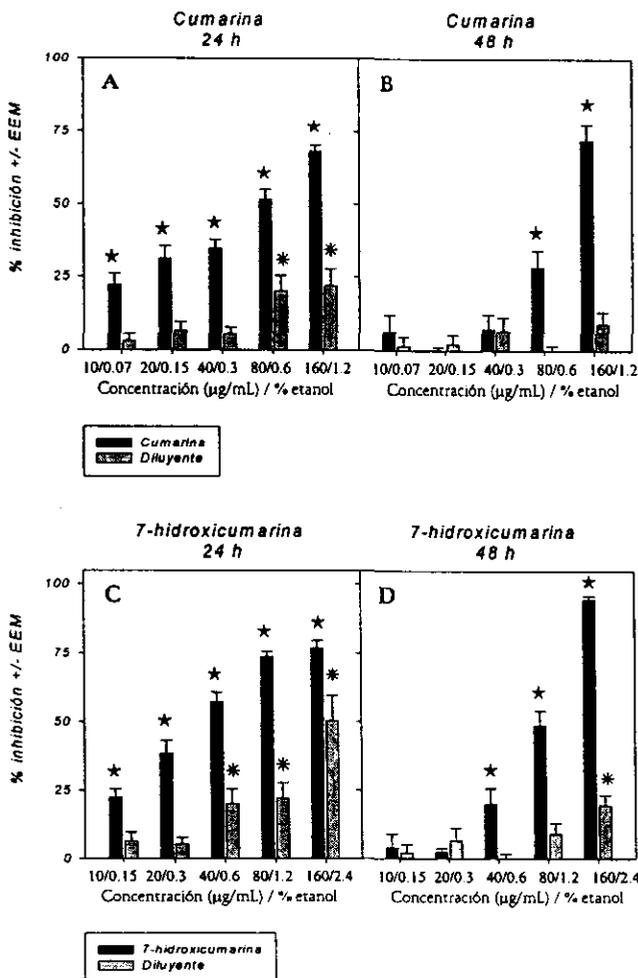


Figura 4. Efecto inhibitorio de la cumarina, 7-hidroxicumarina y diluyente sobre la línea SK-MES-1. Porcentaje de inhibición de la cumarina y sus respectivos diluyentes en exposiciones de 24h (A) y 48h (B). Porcentaje de inhibición de la 7-hidroxicumarina y sus respectivos diluyentes a las 24h (C) y 48h (D) de exposición.

* = diferencias significativas con respecto al medio ($p < 0.05$, prueba de Dunnett).

★ = diferencias significativas entre el fármaco y su respectivo diluyente ($p < 0.05$, prueba *t* de Student).

1.3.11

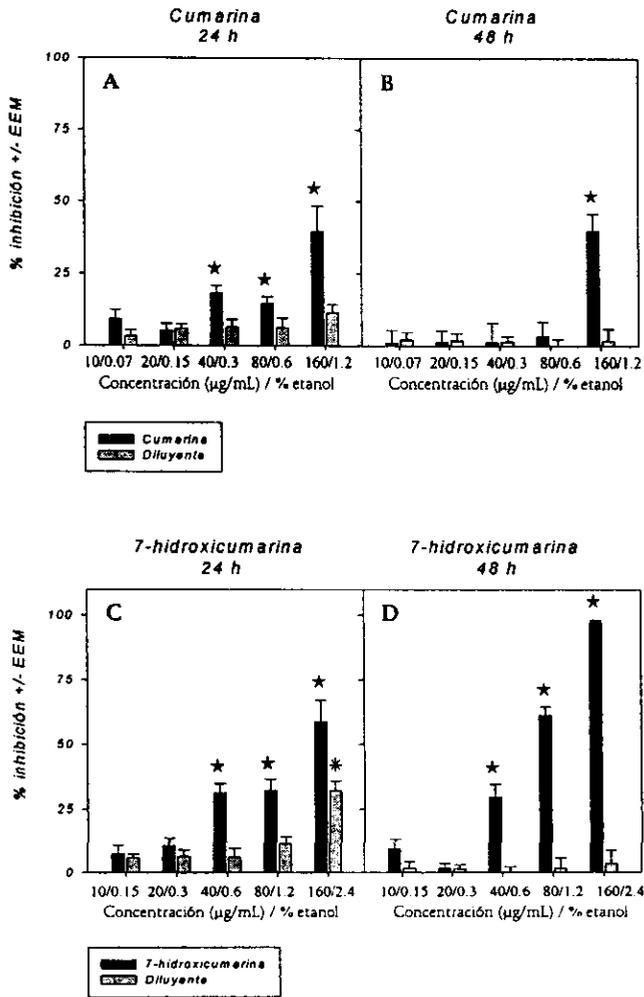


Figura 5. Efecto inhibitorio de la cumarina, 7-hidroxicumarina y diluyente sobre la línea 1.3.11. Porcentaje de inhibición de la cumarina y sus respectivos diluyentes en exposiciones de 24h (A) y 48h (B). Porcentaje de inhibición de la 7-hidroxicumarina y sus respectivos diluyentes a las 24h (C) y 48h (D) de exposición.

* = diferencias significativas con respecto al medio ($p < 0.05$, prueba de Dunnett).

★ = diferencias significativas entre el fármaco y su respectivo diluyente ($p < 0.05$, prueba t de Student).

1.3.15

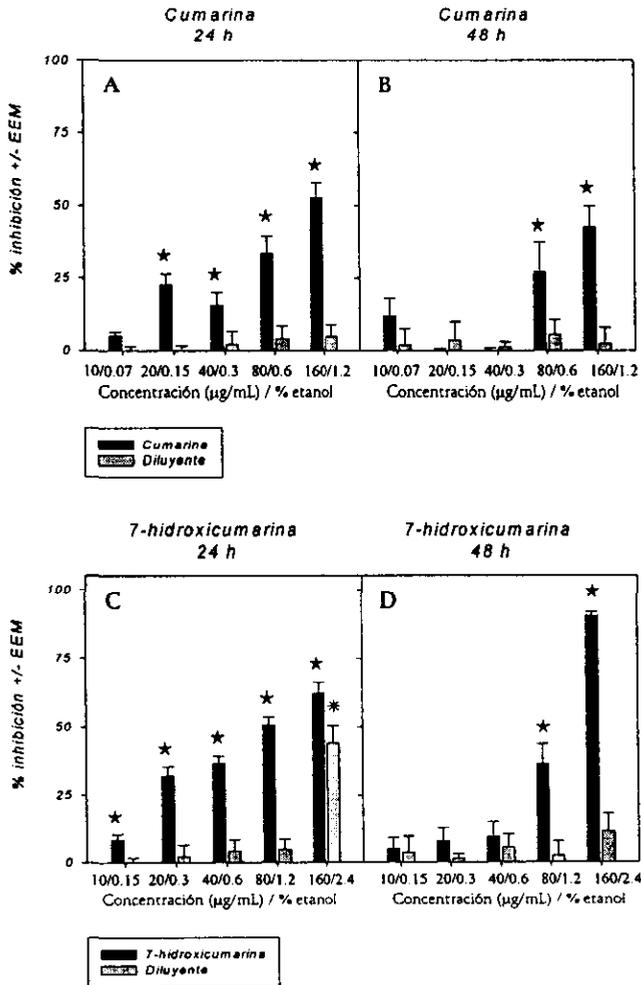


Figura 6. Efecto inhibitorio de la cumarina, 7-hidroxicumarina y diluyente sobre la línea 1.3.15. Porcentaje de inhibición de la cumarina y sus respectivos diluyentes en exposiciones de 24h (A) y 48h (B). Porcentaje de inhibición de la 7-hidroxicumarina y sus respectivos diluyentes a las 24h (C) y 48h (D) de exposición.

*= diferencias significativas con respecto al medio ($p < 0.05$, prueba de Dunnett).
 ★= diferencias significativas entre el fármaco y su respectivo diluyente ($p < 0.05$, prueba *t* de Student).

3A5A

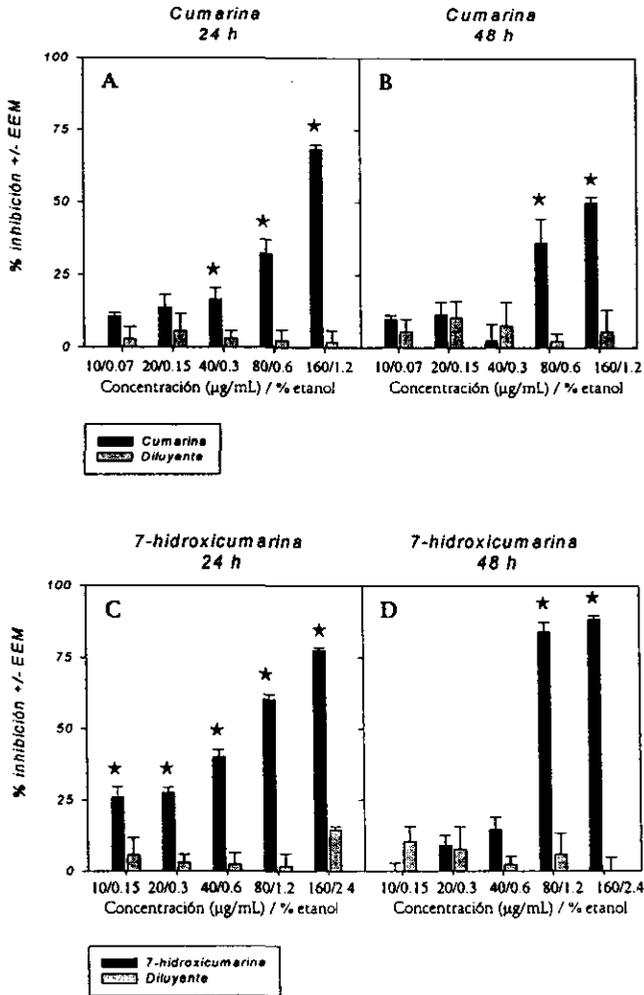


Figura 7. Efecto inhibitorio de la cumarina, 7-hidroxicumarina y diluyente sobre la línea 3A5A. Porcentaje de inhibición de la cumarina y sus respectivos diluyentes en exposiciones de 24h (A) y 48h (B). Porcentaje de inhibición de la 7-hidroxicumarina y sus respectivos diluyentes a las 24h (C) y 48h (D) de exposición.

* = diferencias significativas con respecto al medio ($p < 0.05$, prueba de Dunnett).
 ★ = diferencias significativas entre el fármaco y su respectivo diluyente ($p < 0.05$, prueba t de Student).

3B1A

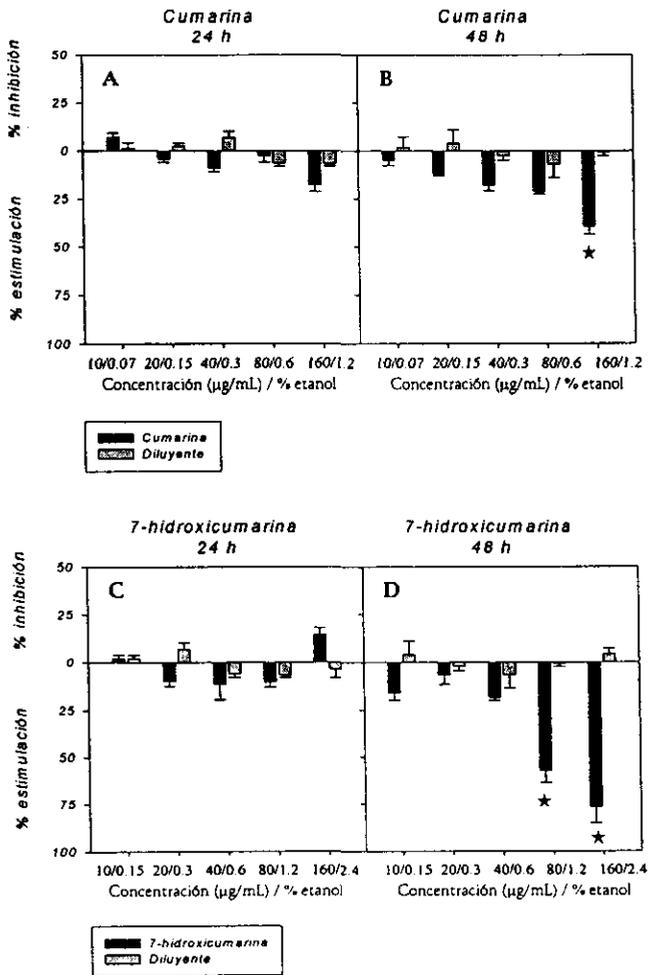


Figura 8. Efecto inhibitorio de la cumarina, 7-hidroxicumarina y diluyente sobre la línea 3B1A. Porcentaje de inhibición de la cumarina y sus respectivos diluyentes en exposiciones de 24h (A) y 48h (B). Porcentaje de inhibición de la 7-hidroxicumarina y sus respectivos diluyentes a las 24h (C) y 48h (D) de exposición.

* = diferencias significativas con respecto al medio ($p < 0.05$, prueba de Dunnett).
 ★ = diferencias significativas entre el fármaco y su respectivo diluyente ($p < 0.05$, prueba *t* de Student).

Concentración inhibitoria 50 de la cumarina y 7-hidroxicumarina sobre las líneas tumorales

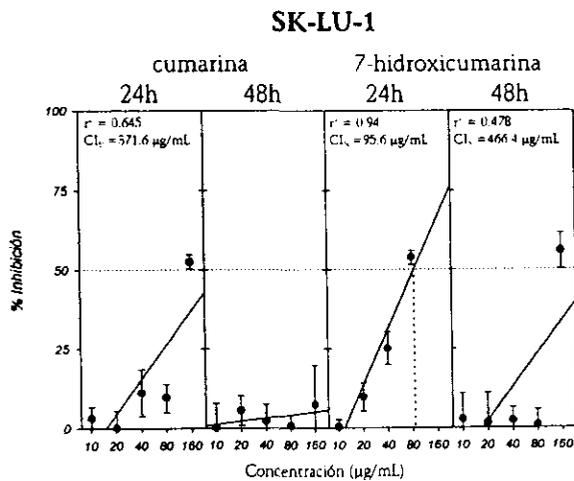
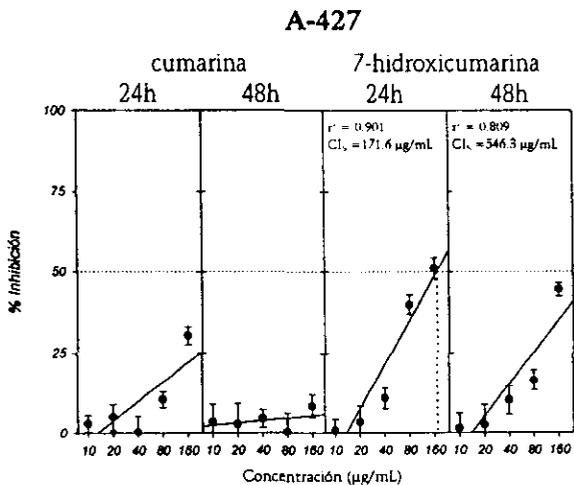
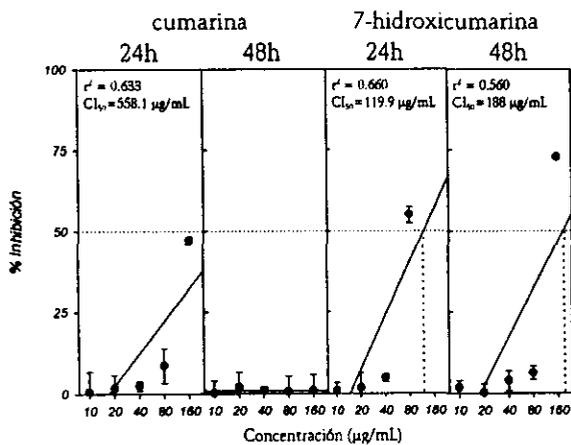


Figura 9.

CALU-1



SK-MES-1

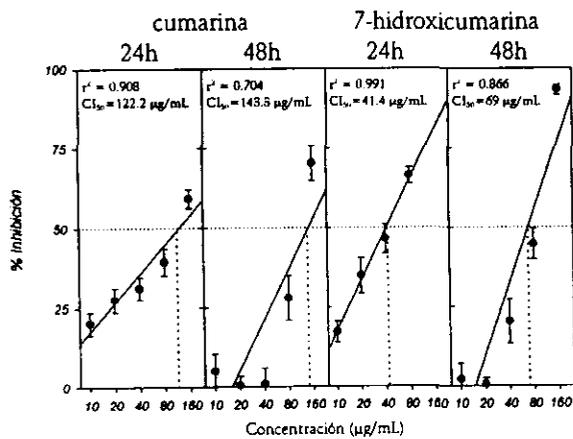
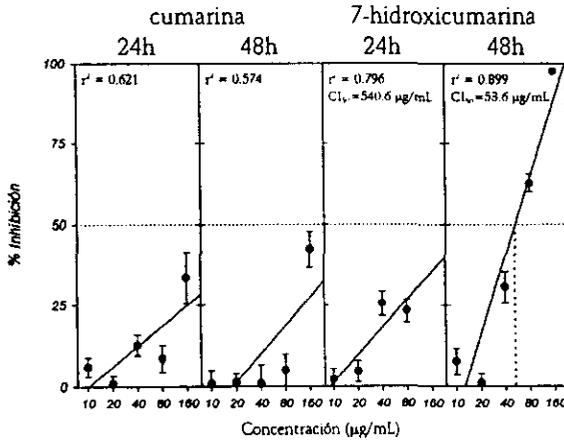


Figura 10.

1.3.11



1.3.15

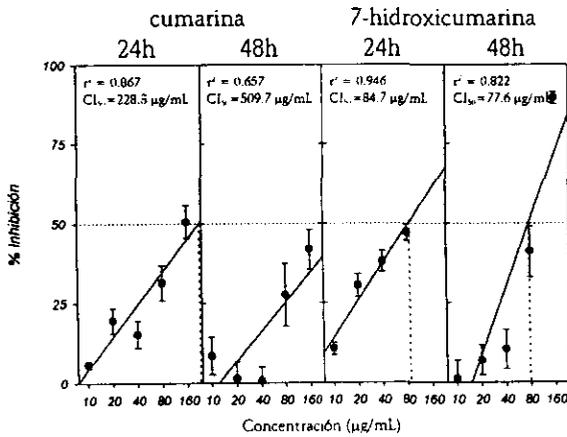
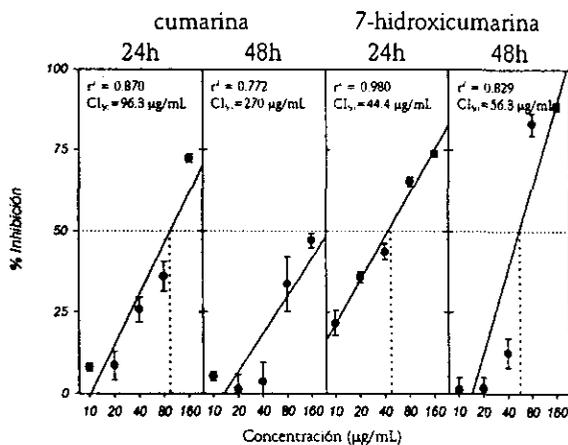


Figura 11.

3A5A



3B1A

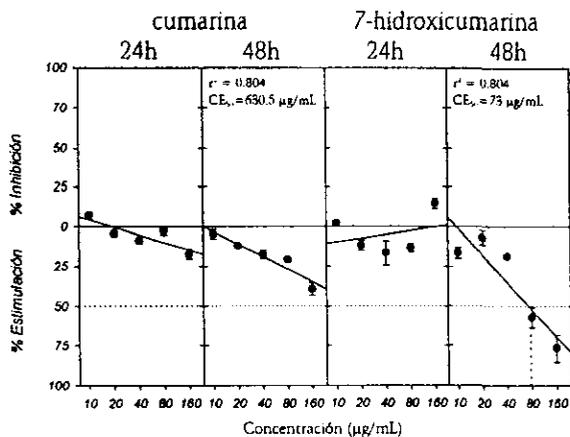


Figura 12.

Efecto de la cumarina, 7-hidroxicumarina y diluyente sobre la proliferación de células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos

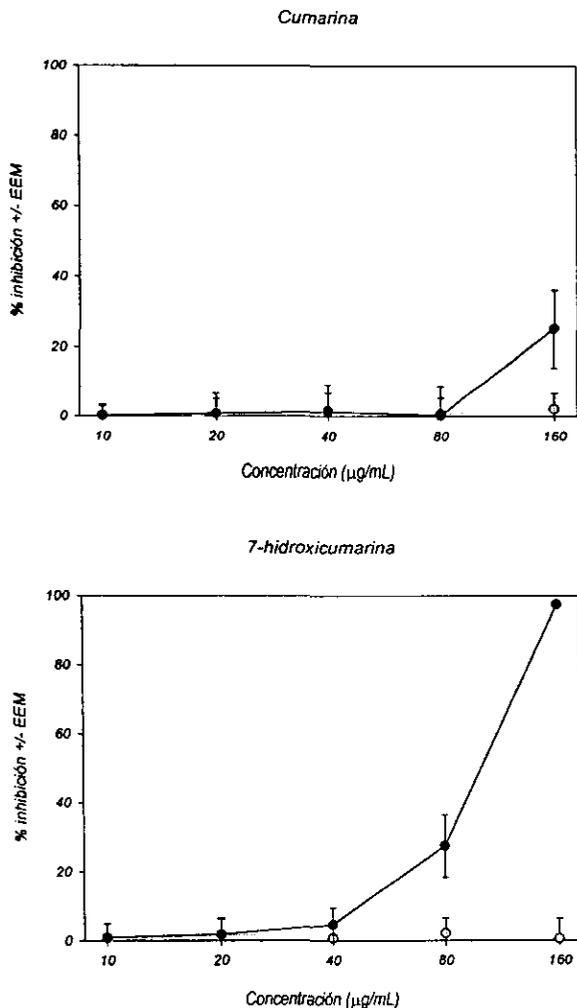


Figura 13. Efecto inhibitorio de la cumarina, 7-hidroxicumarina y diluyente sobre CMN estimuladas con PHA en cultivos de 72h. Los símbolos claros representan al diluyente y los símbolos negros a los fármacos.

8. DISCUSIÓN

En este estudio, decidimos evaluar la influencia de la cumarina y 7-hidroxicumarina en cultivos de células tumorales que alcanzaran el 90% de confluencia al término de 24 y 48h de cultivo, de forma tal que las células se encontraran en fase logarítmica de crecimiento. Consideramos que estas condiciones permiten determinar el efecto inhibitorio en forma más adecuada, ya que al emplear una cinética de proliferación, a las 24h de cultivo habría una densidad celular baja, principalmente de aquellas líneas celulares con un crecimiento lento, y cualquier variación en el ensayo podría afectar la determinación de manera importante.

Los métodos para solubilizar estos fármacos son muy variables, algunos autores^{62,65} emplean DMSO, otros utilizan cambios de pH⁶³ o etanol⁵⁸. En nuestro estudio no se utilizó DMSO ya que se observó que ocasiona cambios en la morfología celular y, por ello se decidió emplear etanol, a pesar de que altas concentraciones son tóxicas para las células.

Por otro lado, nuestros resultados indican que las cumarinas ejercen una acción citostática sobre las líneas tumorales de origen pulmonar, ya que inhibieron la proliferación en 7 de las 8 líneas estudiadas. Considerando la concentración de cumarina que induce el 50% de inhibición en la proliferación celular y que se indica entre paréntesis, la sensibilidad de las líneas estudiadas disminuyó en el siguiente orden: 3A5A (96 µg/mL), SK-MES-1 (122 µg/mL), 1.3.15 (228 µg/mL), SK-LU-1 (372 µg/mL); las líneas A-427, CALU-1 y 1.3.11 requieren concentraciones superiores a 500 µg/mL. En relación a la 7-hidroxicumarina, las líneas 3A5A y SK-MES-1

mostraron igual sensibilidad (40 µg/mL), y ésta disminuyó en el resto de las líneas celulares de la siguiente manera: 1.3.15 (85 µg/mL), SK-LU-1 (96 µg/mL), CALU-1 (120 µg/mL), A-427 (172 µg/mL) y 1.3.11 (>500 µg/mL). Como puede observarse, menores concentraciones de 7-hidroxycumarina con respecto a la cumarina, causan porcentajes de inhibición similares, siendo la potencia de la 7-hidroxycumarina 2 a 3 veces mayor.

Tomando en cuenta el efecto que causan estos compuestos en función del tiempo, existen reportes en los cuales hay un aumento del efecto citostático⁶⁴ o éste es similar a las 24 y 48h de exposición⁶². En nuestro estudio observamos un mayor efecto de la cumarina a las 24h en todas las líneas celulares; por su parte, la 7-hidroxycumarina mostró en 3 líneas (A-427, SK-LU-1 y CALU-1) una mayor actividad a las 24h, en otras 3 líneas (3A5A, SK-MES-1 y 1.3.15) la capacidad inhibitoria se mantuvo desde 24 hasta 48h, mientras que la inhibición en la proliferación de la línea 1.3.11 fue fuertemente favorecida a las 48h de cultivo.

En general, sugerimos que el menor efecto inhibitorio con respecto al tiempo puede deberse a una disminución en la disponibilidad del fármaco, debida posiblemente a su unión, incorporación y/o metabolismo por las células. Para confirmar esta posibilidad, se sugiere la realización de ensayos utilizando exposición múltiple al fármaco.

Por otra parte, se observó la persistencia y/o aumento del efecto citostático en algunas líneas celulares a ciertas concentraciones, todas estas células presentaron un fuerte efecto inhibitorio inicial, superior al

50%, que probablemente impidió la recuperación de la proliferación celular a mayor tiempo de cultivo.

El efecto citostático observado dependió de la línea celular empleada y no está asociado a algún tipo histológico, o a la velocidad de duplicación de las células.

Por otro lado, nuestros resultados nos permiten indicar que estos compuestos, a distintas concentraciones, inducen un efecto inhibitorio importante, mientras que a la concentración más alta probada en nuestro ensayo, presentan toxicidad sobre las células tumorales.

El número de reportes del efecto citostático y citotóxico de los compuestos cumarínicos en líneas de cáncer de pulmón es limitado. El grupo de Kolodziej⁶⁵, indica que la cumarina es más potente que la 7-hidroxicumarina, pero emplea una línea de carcinoma de células pequeñas. Este tipo histológico de cáncer pulmonar no fue evaluado en nuestro estudio.

Por su parte, Kofinas⁶⁶, utiliza una línea de carcinoma epidermoide, diferente a las empleadas por nosotros, la cual reportó sensible a la 7-hidroxicumarina. En este mismo sentido, Marshall y colaboradores⁶⁴ reportan que la 7-hidroxicumarina tiene un mayor efecto inhibitorio que la cumarina sobre 14 líneas celulares de distintos orígenes y únicamente emplean una línea de carcinoma de pulmón, que no fue utilizada en nuestro estudio; sin embargo, sus resultados correlacionan con nuestras observaciones.

Ya que la población celular de un tumor es heterogénea, debido principalmente a la acumulación de alteraciones genéticas, la respuesta a

los distintos agentes terapéuticos puede variar de acuerdo a la población. En este sentido, el incremento en la proliferación observada en la línea 3B1A, y no en las otras líneas celulares, nos sugiere que la 7-hidroxicumarina pudiera favorecer la proliferación de algunas células intratumorales causando selección de clones tumorales resistentes a este compuesto. Por lo anterior, sería preferible emplear este producto asociado a otros fármacos. Sin embargo, no debemos olvidar que esta observación se realizó *in vitro* y no necesariamente correlaciona con la actividad de estos compuestos *in vivo*.

Existen reportes contradictorios en relación al efecto de estos productos sobre la proliferación de CMN sanguíneas inducida por PHA, ya que se ha sugerido un incremento en la capacidad proliferativa de estas células⁶⁰ y, en contraposición, Roskopf y colaboradores encuentran efectos inhibitorios⁵⁵. Este último estudio, correlaciona con nuestros resultados y en ambos casos se emplearon concentraciones similares de los fármacos.

Los resultados obtenidos por nosotros, indican que la concentración de 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cumarina causa un ligero efecto inhibitorio sobre las CMN ($p < 0.05$, prueba *t* de Student), pero como ya se indicó anteriormente, esta misma concentración puede inducir mayores efectos inhibitorios en las células tumorales; un efecto biológico similar sucede con la 7-hidroxicumarina a concentraciones inferiores a 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Mientras que, la concentración de 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de 7-hidroxicumarina induce una fuerte inhibición en la proliferación de las CMN ($p < 0.001$, prueba *t* de Student); sin embargo, sobre la mayoría de las células malignas causa un efecto tóxico.

A partir de estas consideraciones, será necesario evaluar la aplicación clínica, principalmente de la 7-hidroxycumarina, en el cáncer de pulmón. En relación a este tipo de neoplasia, existe un sólo reporte de estudio clínico de fase II⁶⁸, en el que se administra cumarina en combinación con cimetidina, empleando un esquema reportado para el tratamiento de carcinoma renal y melanoma; en este estudio, no se encontró un incremento significativo en el tiempo de sobrevida de los pacientes tratados. Para estudios futuros, será necesario probar distintas dosis y su combinación con otros agentes quimioterapéuticos, a fin de definir la importancia *in vivo* que tengan estos productos biológicos en el control del crecimiento tumoral.

9. CONCLUSIONES

- La cumarina y la 7-hidroxicumarina tienen un efecto citostático y citotóxico sobre líneas tumorales de origen pulmonar, los que son dependientes de la concentración.
- La 7-hidroxicumarina es más potente que la cumarina.
- El efecto citostático de ambos compuestos se observa preferentemente a las 24h de cultivo y tiende a disminuir a las 48h.
- Las células tumorales presentan distintos grados de sensibilidad a estos fármacos.
- La cumarina no afecta la proliferación de las células mononucleares, mientras que la 7-hidroxicumarina sólo inhibe a altas concentraciones.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Medina FM, Barrera RR, Morales JF, Echegoyen RC, Chavarría JG, Rebora FT. Primary lung cancer in Mexico city: a report of 1019 cases. *Lung cancer* 1996; 14: 185-193.
2. Lazcano EC, Tovar V, Meneses F, Rascon RA, Hernandez M. Trends of lung cancer mortality in Mexico. *Arch Med Res* 1997; 28: 565-570.
3. Sethi T. Science, medicine, and the future. Lung cancer. *BMJ* 1997; 314: 652-655.
4. Mulshine JL, Treston AM, Brown PH, Birrer MJ, Shaw GL. Initiators and promoters of lung cancer. *Chest* 1993; 103 (Suppl.): 4-11.
5. Torroella M, Villa S. Bases genéticas del cáncer. México: Inst. Nal. de Cancerología. Fondo de Cultura Económica, 1998.
6. Crowell RE, Belinsky SA. Genetic changes in lung cancer: Potential biomarkers for early detection and prevention. *J Lab Clin Med* 1997; 130: 550-557.
7. Rusch VW, Dmitrovsky E. Molecular biologic features of non-small cell lung cancer. Clinical implications. *Chest Surg Clin N A* 1995; 5: 39-55
8. Giaccone G. Oncogenes and antioncogenes in lung tumorigenesis. *Chest* 1996; 109 (Suppl.): 130-134.
9. Carbone DP. The biology of lung cancer. *Semin Oncol* 1997; 24: 388-401.
10. Kalemkerian GP. Biology of lung cancer. *Curr Opin Oncol* 1994; 6: 147-155.
11. Salgia R, Skarin AT. Molecular abnormalities in lung cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16:1207-1217.

12. Vermeylen P, Roufosse C, Ninane V, Sculier J-P. Biology of pulmonary preneoplastic lesions. *Cancer Treat Rev* 1997; 23:241-262.
13. Stahel RA. Biology of lung cancer. *Lung cancer* 1994; 10 (Suppl. 1): 59-65.
14. Travis, WD, Linder J, Mackay B. Classification, histology, cytology, and electron microscopy. In: Pass HI, Mitchell JB, Johnson DH, Turrisi AT. Lung cancer. Principles and practice. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996: 361-395.
15. Fraire AE. Pathology of lung cancer. In: Aisner J, Arriagada R, Green MR, Martini N, Perry MC. Comprehensive textbook of thoracic oncology. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996: 245-275.
16. Litzky LA. The pathology of non-small cell lung carcinoma. In: Fishman AP, Elias JA, Fishman JA, Grippi MA, Kaiser LR, Senior RM. Fishman's pulmonary diseases and disorders. USA: Mc Graw-Hill, 1998: 1739-1758.
17. Naruke T, Tsuchiya R, Kondo H, Asamura H, Nakayama H. Implications of staging in lung cancer. *Chest* 1997; 112 (Suppl.): 242-248.
18. Schiller JH. Lung cancer: Therapeutic modalities and cytoprotection. *Lung* 1998; 176: 145-164.
19. Splinter TAW. Introduction to the treatment of lung cancer. *Semin Oncol* 1997; 24 (Suppl. 12): 1-5.
20. Ramanathan RK, Belani ChP. Chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer: Past, present, and future. *Semin Oncol* 1997; 24: 440-454.
21. Sorensen JB. Treatment of non-small cell lung cancer: New cytostatic agents. *Lung Cancer* 1993; 10: 173-187.
22. Giaccone G. New drugs in non-small cell lung cancer: An overview. *Lung Cancer* 1995; 12 (Suppl. 1): 155-162.

23. Klastersky J. New drug for therapy of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 1994; 11 (Suppl. 3): 139-149.
24. Georgoulas V, Androulakis N, Bouros D, Kouroussis Ch, Chatzakis K, Papadakis M, Apostopoloulou F, Georgopoulou T, Kotsakis T, Souklakos J, Hatzidaki D, Vlachonikolis J, Panagos G. Combination chemotherapy with docetaxel, vinorelbine and cisplatin as first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer: A multicenter phase II study of the Greek cooperative group for lung cancer. *Lung Cancer* 1998; 21: 213-220.
25. Weinmann I. History of the development and applications of coumarin and coumarin-related compounds. In: O'Kennedy R, Thornes RD. *Coumarins. Biology, applications and mode of action*. Chinchester: Jonh Wiley and Sons, 1997: 1-22.
26. Murray RDH, Méndez J, Brown SA. *The natural coumarins: Occurrence, chemistry and biochemistry*. New York: John Wiley and Sons, 1982.
27. Shilling WH, Crampton RF, Longland RC. Metabolism of coumarin in man. *Nature* 1969; 221: 664-665.
28. Pelkonen O, Raunio H, Rautio A, Pasanen MA, Lang M. The metabolism of coumarin. In: O'Kennedy R, Thornes RD. *Coumarins. Biology, applications and mode of action*. Chinchester: Jonh Wiley and Sons, 1997: 67-92.
29. Pelkonen O, Rautio A, Raunio H, Mäenpää J, Hakkola J. Regulation of coumarin 7-hydroxylation in man. *J Cancer Res Clin Oncol* 1994; 120 (Suppl.): 30-31.
30. Price RJ, Mistry H, Wield PT, Renwick AB, Beamand JA, Lake BG. Comparison of the toxicity of allyl alcohol, coumarin and menadione in precision-cut rat, guinea-pig, cynomolgus monkey and human liver slices. *Arch Toxicol* 1996; 71: 107-111.

31. Cox D, O' Kennedy R, Thornes RD. The rarity of liver toxicity in patients treated with coumarin (1,2 benzo-pyrone). *Human Toxicol* 1989; 8: 501-506.
32. Loprinzi ChL, Sloan J. Coumarin-induced hepatotoxicity. *J Clin Oncol* 1997; 15: 3167-3168.
33. Ghosh P, Markin RS, Sorrell MF. Coumarin-induced hepatic necrosis. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 348-349.
34. Marshall ME, Mohler JL, Edmonds K, Williams B, Butler K, Ryles M, Weiss L, Urban D, Bueschen A, Markiewicz M, Cloud G. An update review of the clinical development of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin. *J Cancer Res Clin Oncol* 1994; 120 (Suppl.): 39-42.
35. Egan D, O'Kennedy R, Moran E, Cox D, Prosser E, Thornes RD. The pharmacology, metabolism, analysis and applications of coumarin and coumarin-related compounds. *Drug Metab Rev* 1990; 22: 503-529.
36. Hoult JRS, Payá M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential. *Gen Pharmacol* 1996; 27: 713-722.
37. O'Neal MA, Griffin AC. The effect of oxypsoalene upon ultraviolet carcinogenesis in albino mice. *Cancer Res* 1957; 11: 911-916.
38. Wattenberg LW, Lam LK, Fladmoe AV. Inhibition of chemical carcinogen-induced neoplasia by coumarins and alpha-angelicalactone. *Cancer Res* 1979; 39: 1651-1654.
39. Cai Y, Kleiner H, Johnston D, Dubowski A, Bostic S, Ivie W, DiGiovanni J. Effect of naturally occurring coumarins on the formation of epidermal DNA adducts and skin tumors induced by benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in SENCAR mice. *Carcinogenesis* 1997; 18: 1521-1527.

40. Seliger B, Pettersson H. 7-Hydroxycoumarin inhibits oncogene-induced transformation of murine fibroblast. *J Cancer Res Clin Oncol* 1994; 120 (Suppl.): 23-27.
41. Maat B, Hilgard P. Anticoagulants and experimental metastases-evaluation of antimetastatic effects in different model systems. *J Cancer Res Clin Oncol* 1981; 101: 275-283.
42. McCulloch P, George WD. Warfarin inhibits metastasis of MtlN3 rat mammary carcinoma without affecting primary tumour growth. *Br J Cancer* 1989; 59: 179-183.
43. von Angerer E, Kager M, Maucher A. Antitumour activity of coumarin in prostate and mammary cancer models. *J Cancer Res Clin Oncol* 1994; 120 (Suppl.): 14-16.
44. Omarbasha B, Fair WR, Heston WDW. Effect of coumarin on the normal rat prostate and on the R-3327H prostatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 1989; 49: 3045-3049.
45. Thornes RD. Adjuvant therapy of cancer via the cellular immune mechanism or fibrin by induced fibrinolysis and oral anticoagulants. *Cancer* 1975; 35: 91-97.
46. Zacharski LR, Henderson WG, Rickles FR, Forman WB, Cornell CJ, Forcier RJ, Edwards R, Headley E, Kim SH, O'Donnell JR, O'Dell R, Tornyo K, Kwaan HC. Effect of warfarin on survival in small cell carcinoma of the lung. Veterans administration study No. 75. *JAMA* 1981; 245: 831-835.
47. Chahinian AP, Propert KJ, Ware JH, Zimmer B, Perry MC, Hirsh V, Skarin A, Kopel S, Holland JF, Comis RL, Green MR. A randomized trial of anticoagulation with warfarin and of alternating chemotherapy in extensive small-cell lung cancer by the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol* 1989; 7: 993-1002.
48. Zacharski LR, Henderson WG, Rickles FR, Forman WB, Cornell CJ, Forcier RJ, Edwards RL, Headley E, Kim SH, O'Donnell JF, O'Dell R, Tornyo K, Kwaan HC. Effect of warfarin anticoagulation on

- survival in carcinoma of the lung, colon, head and neck, and prostate. Final report of VA cooperative study No. 75. *Cancer* 1984; 53: 2046-2052.
49. Thornes RD, Lynch G, Sheehan MW. Cimetidine and coumarin therapy of melanoma. *Lancet* 1982; 8293: 328.
 50. Marshall ME, Mendelsohn L, Butler K, Riley L, Cantrell J, Wiseman Ch, Taylor R, Macdonald JS. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with coumarin (1,2-benzopyrone) and cimetidine: A pilot study. *J Clin Oncol* 1987; 5: 862-866.
 51. Thornes RD, Daly L, Lynch G, Breslin B, Browne H, Browne HY, Corrigan T, Daly P, Edwards G, Gaffney, E, Henley J, Healy T, Keane F, Lennon F, McMurray N, O'Loughlin S, Shine M, Tanner A. Treatment with coumarin to prevent or delay recurrence of malignant melanoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 1994; 120 (Suppl.): 32-34.
 52. Thornes D, Daly L, Lynch G, Browne H, Tanner A, Keane F, O'Loughlin S, Corrigan T, Daly P, Edwards G, Breslin B, Browne HY, Shine M, Lennon F, Hanley J, McMurray N, Gaffney E. Prevention of early recurrence of high risk malignant melanoma by coumarin. *Eur J Surg Oncol* 1989; 15: 431-435.
 53. Mohler JL, Williams BT, Thompson LM, Marshall ME. Coumarin (1,2-benzopyrone) for the treatment of prostatic carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 1994; 120 (Suppl.): 35-38.
 54. Hardt TJ, Ritschel WA. The effect of coumarin and 7-hydroxycoumarin on *in vitro* macrophage phagocytosis of latex particles. *Meth Find Exp Clin Pharmacol* 1983; 5: 39-43.
 55. Roskopf F, Kraus J, Franz G. Immunological and antitumor effects of coumarin and some derivatives. *Pharmazie* 1992; 47: 139-142.
 56. Zlabinger GJ. Coumarin as an immunomodulator. In: O'Kennedy R, Thornes RD. Coumarins. Biology, applications and mode of action. Chichester: John Wiley and Sons, 1997: 103-123.

57. Stuhlmeier K, Theyer G, Baumgartner G, Zlabinger GJ. Synergistic effect of coumarin (1,2-benzopyrone) and endotoxin in the induction of human interleukin-1. *Clin Exp Immunol* 1991; 84: 317-323.
58. Filice GA, Remington JS. Coumarin or warfarin treatment of mice does not increase the microbicidal or tumoricidal capacities of macrophages. *Br J Exp Path* 1981; 62: 131-135.
59. Marshall ME, Conley D, Hollingsworth P, Brown S, Thompson JS. Effects of coumarin (1,2-benzopyrone) on lymphocyte, natural killer cell, and monocyte functions in vitro. *J Biol Response Mod* 1989; 8: 70-85 (abstr.).
60. Berkarda B, Bouffard-Eyüboglu H, Derman U. The effect of coumarin derivatives on the immunological system of man. *Agents Actions* 1983; 13: 50-52.
61. Lischka G, Decker E. Dark effect of 8-metoxypsoralen (8-MOP) on lymphocytes. *Arch Dermatol Res* 1978; 261: 267-272. (abstr).
62. Gawron A, Glowniak K. Cytostatic activity of coumarins *in vitro*. *Planta Med* 1987; 53: 526-529.
63. Myers RB, Parker M, Grizzle WE. The effects of coumarin and suramin on the growth of malignant renal and prostatic cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* 1994; 120 (Suppl.): 11-13.
64. Marshall ME, Kervin K, Benefield C, Umerani A, Albainy-Jenei S, Zhao Q, Khazaeli MB. Growth-inhibitory effects of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin on human malignant cell lines in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol* 1994; 120 (Suppl.): 3-10.
65. Kolodziej H, Kayser O, Woerdenbag HJ, van Uden W, Pras N. Structure-cytotoxicity relationships of a series of natural and semi-synthetic simple coumarins as assessed in two human tumour cell lines. *Z Naturforsch* 1997; 52: 240-244.

66. Kofinas C, Chinou I, Loukis A, Harvala C, Roussakis Ch, Maillard M, Hostettmann K. Cytotoxic coumarins from the aerial parts of *Tordylium apulum* and their effects on a non-small-cell bronchial carcinoma line. *Planta Med* 1998; 64: 174-176.
67. Ebbinghaus SW, Mohler JL, Marshall ME. Renal cell carcinoma: The background, rationale and current development of coumarin (1,2-benzopyrone) as a potential therapeutic agent. In: O'Kennedy R, Thornes RD. Coumarins. Biology, applications and mode of action. Chinchester: Jonh Wiley and Sons, 1997: 209-239.
68. Marshall ME, Mendelsohn L, Butler K, Cantrell J, Harvey J, Macdonald J. Treatment of non-small-cell lung cancer with coumarin and cimetidine. *Cancer Treat Rep* 1987; 71: 91-92.