

00524
62



A
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

RELACION ESTRUCTURA - ACTIVIDAD CITOSTATICA Y
CITOTOXICA DE DERIVADOS CUMARINICOS EN 4 LINEAS
TUMORALES HUMANAS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A:
ALEJANDRO FELIPE GARCIA SOLIS



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA



MEXICO D.F.

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

3

Jurado asignado:

- | | |
|----------------------|--|
| Presidente | Prof. José Juan Mandoki Weitzner |
| Vocal | Prof. José Sullivan López González |
| Secretario | Prof. Fausto Alejandro Jiménez Orozco |
| 1er Suplente. | Prof. Francisco Hernández Luis |
| 2do Suplente. | Profa. Liz Jannet Medina Reyes |

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Farmacología Celular, bajo la dirección del Dr. Fausto Alejandro Jiménez Orozco, del Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina. U.N.A.M.

La realización de este trabajo fue posible gracias a los financiamientos de las siguientes instancias. (i) la Dirección General de Asuntos Del Personal Académico (DGAPA) a través del proyecto PAPIIT IN246202. (ii) A Altana Pharma por su apoyo para presentar mis resultados en el "XIVth World Congreso of Pharmacology"

Asesor del tema:



Dr. Fausto Alejandro Jiménez Orozco

Sustentante:



Alejandro Felipe García Solís.

C

AGRADEZCO:

A Dios, por darme todo lo necesario para que surja esto.

A mis padres Maria Nieves Solis Correa y Juan Garcia Parra por todo el amor, cariño y apoyo recibido a lo largo de todos estos años.

A mis hermanos por todo su cariño, por todos esos momentos que nunca voy a olvidar.

A mi tía Ana Duran por su interés y apoyo para darme el consejo más sensato a lo largo de mis estudios.

A la UNAM por todo lo que obtuve de ella; A la Facultad de Química por todo lo que ahí aprendí, por los instantes de alegría y tristeza que surgen con el paso del tiempo, por todos los amigos que ahí conocí

Al M en C. Alejandro Fausto Jiménez Orozco por todo el tiempo, confianza y conocimientos que compartiste conmigo, gracias por ser mi amigo

Al grupo de investigación encabezado por el Med. Cir. J. J. Mandiki; al Med. Cir. Nicandro Mendoza, al M en C Juan Arcadio Molina, al Q.F.B. Marco Velasco y a Estela Estrada. Gracias por sus consejos y amistad.

Al Dr. Sullivan por sus valiosas aportaciones para el desarrollo de esta tesis.

A Omar (Lucas) por su amistad y por ayudarme a tener confianza, a Sajid por su amistad, a Carlos (chinito) por su tiempo y ayuda en cada momento, a Nacho por todos los momentos de relaxo que compartimos, a walter por ser la persona más sincera, a Jorge por enseñarme que siempre hay otros caminos

A Laura Muñoz mi hermanita hace mucho que no te veo

A Isabel eres lo más importante

D

Dedico este trabajo:

A mis padres, a mis hermanos, Fernando, Araceli, Juan, Erika y Maria con todo mi cariño y respeto. A mis sobrinos Isaac, Pablo y Fernanda por toda su ternura

En especial a Isabel Lozada por ser mi amiga y confidente. Gracias por todos los momentos lindos que hemos pasado.

I

**RELACIÓN ESTRUCTURA-
ACTIVIDAD CITOSTÁTICA Y
CITOTÓXICA DE DERIVADOS
CUMARÍNICOS EN 4 LINEAS
TUMORALES HUMANAS**

ÍNDICE

| Contenido | Página |
|--|--------|
| 1 ANTECEDENTES | 1 |
| 1.1 Epidemiología del Cáncer | 1 |
| 1.2 Definición y Origen del Cáncer | 1 |
| 1.3 Ciclo Celular | 3 |
| 1.4 Quimioterapia y Ciclo Celular | 6 |
| 1.5 Nuevos Fármacos Contra el Cáncer | 7 |
| 2 CUMARINAS | 8 |
| 2.1 Propiedades Físicoquímicas | 8 |
| 2.2 Biotransformación y Toxicología de la Cumarina | 8 |
| 2.3 La Cumarina no Tiene Efecto Mutagénico | 10 |
| 2.4 Usos Terapéuticos de Compuestos Cumarínicos | 11 |
| 2.5 Efecto Citostático de Cumarina y Ciclo Celular | 11 |
| 3 MATERIAL Y MÉTODOS | 12 |
| 3.1 Compuestos | 12 |
| 3.2 Líneas Celulares | 13 |
| 3.3 Medio y Condiciones de Cultivo | 14 |
| 3.4 Evaluación del Efecto Citostático por Cumarinas | 14 |
| 3.5 Evaluación de la Citotoxicidad | 16 |
| 4 RESULTADOS | 18 |
| 4.1 Efecto Citostático de Derivados Mono-sustituídos | 18 |
| 4.2 Efecto Citostático de Derivados Di-sustituídos | 19 |
| 4.3 Efecto Citotóxico de Compuestos Di-sustituídos | 20 |
| 5 DISCUSION | 21 |
| 5.1 Derivados Cumarínicos Mono-Sustituídos | 21 |
| 5.2 Derivados Cumarínicos Di-sustituídos | 22 |
| 5.3 Citotoxicidad | 23 |
| 6 CONCLUSIONES | 24 |
| 7 REFERENCIAS | 25 |

1 ANTECEDENTES

1.1 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER

Los patrones de mortalidad y morbilidad han cambiado debido a los nuevos estilos de vida. La incidencia de enfermedades infecciosas se han reducido y las enfermedades crónicas se han incrementado. Los tumores malignos son la segunda causa de muerte en México.^{1,2} En 1996 se reportaron 84 615 casos de neoplasias malignas, con predominancia del sexo femenino (64%). El grupo de edad más afectado fue el de 75 a más años (10%).¹ A partir de 1995 el cáncer de pulmón fue el de mayor mortalidad de todas las neoplasias malignas, con 6000 defunciones anuales, 6.3 por cada 100 000 hombres y 3.9 por cada 100 000 mujeres.²

1.2 DEFINICIÓN Y ORIGEN DEL CÁNCER

El cáncer es un término genérico que se emplea para describir a más de 100 tipos diferentes de enfermedades. Una característica común de estas enfermedades es el desarrollo de tumores malignos.³

Las células normales tienen múltiples mecanismos que regulan su proliferación, su diferenciación y apoptosis. El control de estos procesos genera y mantiene la arquitectura tisular de organismos multicelulares.⁴ El curso entre estos destinos celulares lo determina el balance entre, señales mitogénicas anti-mitogénicas, pro-apoptóticas y señales de diferenciación. *Las células tumorales* proliferan sin control, ya que adquieren características que desregulan los procesos arriba mencionados. Además, estas células pueden invadir tejidos vecinos y a distancia.³

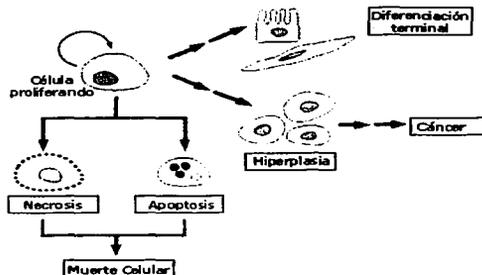


Figura 1. Los procesos a los que puede dirigirse una célula dependiendo de su contexto celular.

El desarrollo de un tumor ocurre en etapas o estadios conocidos como iniciación, promoción y progresión. En la iniciación, las células sufren algunas mutaciones al ser expuestas a un agente mutagénico, dando como resultado alteraciones en los genes, principalmente aquellos cuyos productos protéicos participan en la regulación del ciclo celular. Algunas mutaciones pueden ser heredadas. Las células alteradas y sus descendientes continúan su desarrollo por tiempo prolongado. Como resultado se produce una hiperplasia en forma local. Este tipo de tumores se conocen como benignos, son pequeños, se encuentran encapsulados, por lo que no invaden el tejido epitelial que los rodea.

Cuando alguna de estas células sufre mutaciones adicionales a la que ya tiene, la célula entra en el segundo estadio (de promoción). Esta fase se caracteriza por una proliferación celular excesiva inducida por algunos estímulos físicos, agentes endógenos o exógenos, que se denominan promotores. Además, las células hijas presentan apariencia anormal en estructura y orientación, lo que se denomina displasia.



Figura 2. Estadios del desarrollo de una neoplasia maligna

El tercer estadio (progresión) es una fase crónica en que hay una acumulación de alteraciones genéticas que produce cambios celulares, que le permite invadir tejidos vecinos. Al final, la célula puede adquirir capacidad metastásica al diseminarse por flujo sanguíneo o linfático e invadir otros órganos o tejidos, generando un nuevo tumor.³

1.3 CICLO CELULAR

El ciclo celular es el conjunto de eventos que regulan la proliferación celular y se divide en cuatro fases: G1, S, G2 y M.^{5,6} La progresión del ciclo celular, a través de las diferentes fases, ocurre de manera ordenada y está dirigida por la activación secuencial de cinasas serinas/treoninas, conocidas como CDKs.^{7,8}

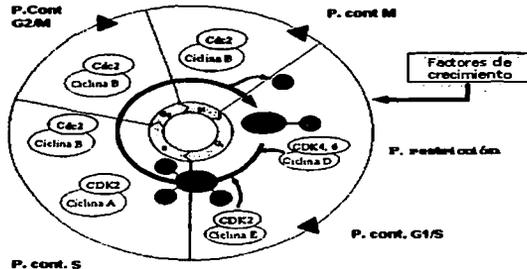


Figura 3. Progresión del ciclo celular por activación de CDKs, así como su puntos de restricción y sus puntos de control

Las células normales pasan de una fase a la siguiente, sólo después de la culminación exitosa de los eventos de la fase previa. Esto es posible gracias a

TEJIS CON
FALLA LE ORIGEN

sistemas de control que verifican la correcta ejecución de los eventos esenciales del ciclo celular y regulan la actividad de las CDKs.⁹⁻¹² Los sistemas de control son cascadas bioquímicas de señalización que pueden inhibir la progresión del ciclo, produciendo un estado conocido como "arresto celular". Se han descrito dos tipos de sistemas de control: (a) el punto de restricción, que regula el inicio del ciclo celular¹³ y (b) los puntos de control (del inglés checkpoints) que aseguran la estabilidad genómica.^{14,15}

El punto de restricción, también conocido vía ciclina D-cdk4/6-Rb-E2F, es un sistema que integra las señales mitogénicas, anti-mitogénicas y de diferenciación. Cuando las señales mitogénicas predominan, la célula inicia su ciclo y prolifera. Cuando las señales antiproliferativas o de diferenciación predominan, la célula sufre un arresto a la mitad de la fase G1 y puede diferenciarse.^{13,15} Diversos componentes de esta cascada presentan anomalías en las neoplasias malignas humanas (ver tabla 1).¹⁶

Tabla 1 Aberraciones componentes de los puntos de control (G1/S) en tumores humanos.

| TIPO DE GEN | PROTEÍNA | BASE MOLECULAR | TIPO DE CÁNCER |
|---------------------------|------------|--|-------------------------------|
| Proto-oncogen | Ciclina D1 | Amplificación de Genes, traslocación y sobre-expresión | Varios tipos de Cáncer |
| | Ciclina E | Amplificación del DNA y sobre-expresión | Carcinoma mamario y de ovario |
| | Cdc25A | Sobre-expresión | Carcinoma Mamario |
| Genes Supresores De Tumor | p53 | Delección, mutación puntual y sobre-expresión de la proteína | Varios tipos de cáncer |
| | p16 | Alteración en la expresión de la proteína | Varios tipos de cáncer |
| | pRb | Delección, Expresión alterada de la proteína | Carcinoma Mamario |

En cambio, los puntos de control son alarmas de estrés genotóxico que detectan errores genómicos. La activación de puntos de control produce varias respuestas celulares como: (i) activación de la maquinaria de reparación de ADN; (ii) arresto celular, lo que da tiempo a la célula de reparar el daño; (iii) inducción de muerte celular programada (apoptosis), cuando el daño es irreparable.¹⁵ Después de un arresto, las células normales sólo prosiguen a la siguiente fase, si el daño de la fase previa es reparado exitosamente, lo que garantiza la estabilidad genómica.¹⁷ La proteína p53 es un factor de transcripción que regula los procesos arriba mencionados, por lo que es también conocida como guardián del genoma.

La transmisión fiel del material genómico de la célula madre a las células hijas es asegurado por los puntos de control. Su funcionamiento ineficaz conduce a la acumulación de mutaciones y aberraciones cromosomales, las cuales incrementan la probabilidad de desarrollar malformaciones y neoplasias malignas.¹⁵

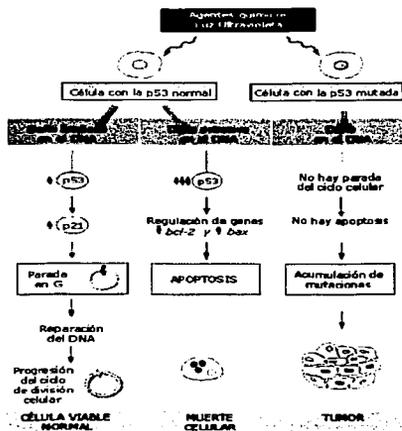


FIGURA 4. Distintos destinos celulares al estar o no mutado p53

1.4 QUIMIOTERAPIA Y CICLO CELULAR.

La quimioterapia es actualmente la opción indicada en el tratamiento de varios tipos de cáncer avanzado. Los principales agentes antineoplásicos empleados en la quimioterapia, como son los inhibidores de topoisomerasas, los agentes alquilantes y los antimetabolitos, producen daño al ADN.^{7,14} Con esto se busca inducir el arresto irreversible en la célula, activando los puntos de control; en último término se busca activar las vías de apoptosis. Los agentes antineoplásicos pueden producir arrestos en las células dependiendo de sus mecanismos de acción. En la tabla II se presentan los blancos, efectos y arrestos celulares mejor documentados de algunos agentes antineoplásicos.^{7,10}

Tabla 2. Principales agentes antineoplásicos actualmente en uso

| AGENTE ANTINEOPLÁSICO | BLANCO FARMACOLÓGICO | EFECTO EN EL CICLO CELULAR |
|---|--|--|
| Taxol Taxanos (inhibidores de microtúbulos) | microtúbulos | Arresto G2/M Arresto en M Apoptosis |
| Cisplatino y análogos (agentes alquilantes) | DNA | Arresto en G1/S Arresto en S Apoptosis |
| Campotectina | Inhibidor de la Topoisomerasa I. | Arresto en fase S Arresto en fase G1 |
| Fluorouracilo (Antimetabolitos) | Enzimas involucradas en la síntesis de ADN | Arresto en S |

En la práctica clínica, para incrementar la eficacia de los tratamientos, se administran en forma combinada agentes que actúen en distintas fases del ciclo celular.¹⁹ Sin embargo, la toxicidad de los agentes antineoplásicos en uso es poco selectiva y daña también a las células normales.

Por otra parte, algunas células tumorales no sufren arresto celular ni apoptosis porque tienen importantes anomalías en las vías de señalización de puntos de control. Esto favorece la selección de clones mutantes resistentes a estos tratamientos.^{15,20}

1.5 NUEVOS FÁRMACOS CONTRA EL CÁNCER

Las nuevas estrategias clínicas buscan inducir las vías de apoptosis con mayor selectividad en células tumorales radiadas o expuestas a agentes citotóxicos.^{15,20} También se busca el desarrollo de agentes que actúen selectivamente en proteínas clave del ciclo celular, como las CDKs o las ciclinas.^{21,22}

Por ejemplo existen varios inhibidores químicos de las CDK2, que producen arrestos en la transición de la fase G₁ a la fase S.²³ De todos ellos solo el flavopiridol se encuentra en fase clínica de investigación. Este compuesto puede tener un efecto sinérgico al combinarse con otros agentes antineoplásicos e incrementar la eficacia de la quimioterapia.²⁴ Actualmente se buscan agentes que actúen sobre otros blancos farmacológicos a los de los agentes en uso.^{25,26}

2. CUMARINAS

2.1 PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS

La cumarina (1,2 benzopirona) es un compuesto heterocíclico, es la lactona del ácido orto-hidroxifenil-propenoico, tiene un peso molecular de 146.15 g/mol, con punto de fusión de 60-70° C. Presenta un máximo de absorción a 272 nm en el rango de ultravioleta, es soluble en etanol, cloroformo y aceites, pueden obtenerse en forma de cristales incoloros de olor agradable.²⁷

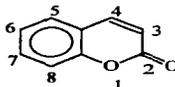


Figura 5. Estructura química de la cumarina

Vogel aisló la cumarina por primera vez en 1822, a partir del haba de tonka de la Guayana (*Coumorona odorata*).²⁷ En 1868, W. H. Perkin la obtuvo por síntesis química.²⁸ Se encuentra ampliamente distribuida en el reino vegetal,²⁶ principalmente en las: Leguminosas (Leguminoceae), orquídeas (Orchidaceae), rutáceas (Rutaceae) y Umbelíferas (Umbelliferae). Los cristales de cumarina tienen un agradable aroma característico.²⁷ Por lo que ha sido empleado en la industria cosmética y la perfumería.²⁸

2.2 BIOTRANSFORMACIÓN Y TOXICIDAD DE LAS CUMARINAS

La cumarina, tanto *in vivo* como *in vitro*, se hidroxila a 3, 4, 5, 6, 7 y 8-monohidroxycumarinas²⁷⁻³⁰ y en la 6,7-dihidroxycumarina. Además, el anillo lactónico puede ser metabolizado y formar o-hidroxifenilacetaldehído, que a su vez genera o-hidroxifeniletanol y ácido o-hidroxifenilpropiónico.³¹ Los porcentajes de cada uno de estos productos varían dependiendo de la especie.³²⁻³⁶ Esto es el resultado de que cada especie animal biotransforme la cumarina a través de diferentes vías metabólicas.³³⁻³⁶

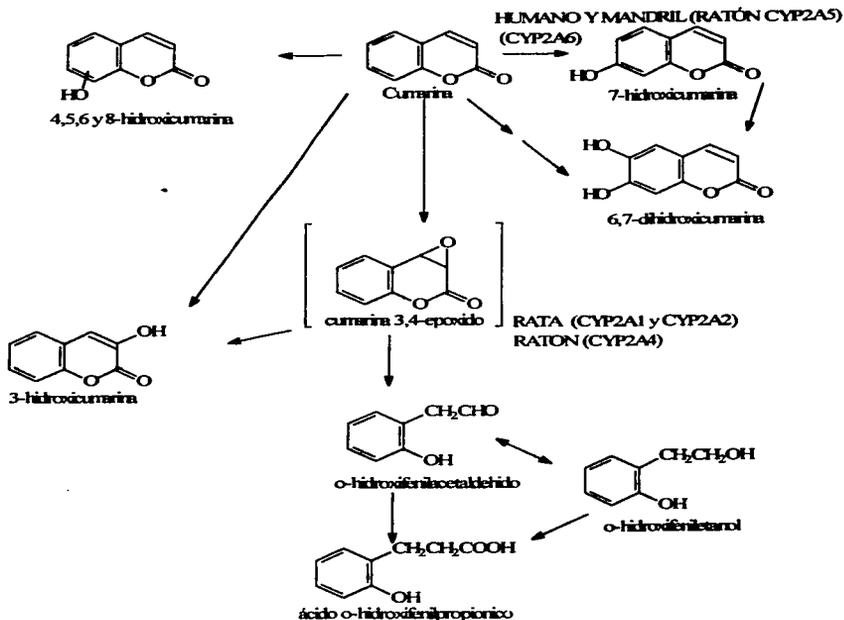


Figura 6. Vías metabólicas de la cumarina en primates y roedores.³¹

Por ejemplo, en primates como el mandril y el humano, la 7-hidroxycumarina es el principal producto de biotransformación (68-92%). Esta hidroxilación la cataliza la isoforma CYP2A6 del citocromo P450.^{36,39} En ratón y el hámster, esta reacción es catalizada por la isoforma CYP2A5 del citocromo P450^{31,32}

En rata y ratón, la cumarina se biotransforma principalmente en 3-4 epóxido cumarina y al abrirse el anillo lactónico genera o-hidrohifenilacetaldehído.³⁹⁻⁴¹ Esta reacción es catalizada en rata por las isoformas CYP2A1 y CYP2A2 del citocromo P450, mientras que en el ratón es la isoforma CYP2A4.^{31,34,41}

Estos productos de biotransformación pueden ser acetilados, metoxilados, sufrir conjugaciones con ácido glucurónico u otro tipo de transformaciones.

La toxicidad de la cumarina en las diferentes especies también se atribuye a las vías de biotransformación.^{31,37,40,41} (figura 6). En el humano, la cumarina tiene una vida media breve (1-1.5 h) y es poco tóxica.²⁶ En estudios multicéntricos se observó que dosis de hasta 7 g diarios producen efectos adversos de poca importancia, que son reversibles al suspender el tratamiento.³⁹ En cambio, diversos estudios en rata y ratón indican que la cumarina tiene importantes efectos hepatotóxicos.^{27,29,31,36,37}

2.3 LA CUMARINA NO TIENE EFECTO MUTAGÉNICO.

Diversos estudios demuestran que la cumarina *per se* no tiene actividad mutagénica.³¹ Esto se determinó a través de ensayos *in vivo* utilizando *Drosophyla melanogaster*, pruebas en micro-núcleo de ratón y cinco cepas de *S. typhimurium*.

Se ha calculado que el consumo humano de cumarina, es de aproximadamente 0.06 mg/Kg/día.³¹ En rata y en ratón se han realizado numerosos estudios a largo plazo para examinar los posibles efectos carcinogénicos de la cumarina. En ensayos *in vivo* se han administrado dosis de hasta 270 mg/Kg/día. Los resultados de estos ensayos no son consistentes, por lo que no se tiene información clara y contundente, que asegure que la cumarina es un agente carcinogénico.^{31,38,39}

En un estudio *in vitro* se observó que la administración de cumarina junto con Aflatoxina B₁ tiene efectos mutagénicos en ovario de hamster.³⁹ Esto se debe a que la cumarina incrementa la biotransformación de Aflatoxina B₁ a su epóxido en posición 8 y 9; este producto de biotransformación es el responsable del efecto mutagénico. En dicho estudio tampoco se observó efecto mutagénico al administrar solamente la cumarina.

2.4 USOS TERAPÉUTICOS DE COMPUESTOS CUMARÍNICOS

Existen compuestos cumarínicos con aplicación clínica importante. La warfarina es un fármaco usado para prevenir la formación de trombos, y cuando se ha producido, para evitar su extensión. Se emplea desde 1951 y es el anticoagulante oral que se prescribe con mayor frecuencia.⁴²

En pacientes con diferentes tipos de cáncer, tratados con warfarina con fines anticoagulantes, se observó un menor número de metástasis y un incremento al doble del tiempo de sobre-vida.⁴³ La actividad antineoplásica de la warfarina es independiente de sus efectos anticoagulantes.^{44,46} En modelos murinos se observó que la administración de vitamina K antagonizaba los efectos anticoagulantes de la warfarina, pero no los efectos antitumorales.^{3,43} Además, la cumarina carece de efecto anticoagulante y tiene efecto antineoplásico.⁴³⁻⁴⁵

En estudios multicéntricos se ha mostrado que la cumarina disminuye el desarrollo tanto de carcinoma renal^{46,47} como de próstata^{48,49}, y previene la recurrencia de melanoma.⁵⁰⁻⁵² Se ha propuesto que la cumarina es una pro-droga y su principal producto de biotransformación (la 7-hidroxycumarina) es la forma activa de la molécula.^{31,46-49}

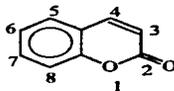
2.5 EFECTO CITOSTÁTICO DE CUMARINAS Y CICLO CELULAR

La cumarina y la 7-hidroxycumarina *in vitro* inhiben la proliferación de varias líneas de células tumorales humanas.⁵³⁻⁶¹ El efecto citostático de la 7-hidroxycumarina es mayor al de la cumarina. Dicho efecto es consistente con la inhibición del ciclo celular en la transición de la fase G1 a la fase S.⁵⁶⁻⁵⁸ Por otra parte, la 7-hidroxycumarina disminuye el porcentaje de células que expresan ciclina D1, sin afectar la expresión de las ciclinas A y E.⁵⁶⁻⁶¹ Esto indica que las acciones de 7-hidroxycumarina involucran eventos tempranos de la fase G1, que forman parte del punto de restricción. Existen otros compuestos cumarínicos con mayor actividad citostática que podría activar esta vía con mayor eficacia (Rb).¹⁸

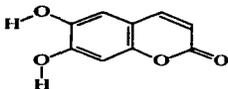
3 -MATERIAL Y MÉTODO

3.1 COMPUESTOS

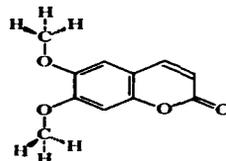
Se determinó la actividad citostática y citotóxica de compuestos cumarínicos mono-sustituídos con grupos hidroxilo en las posiciones 3, 4, 6, 7 y 8. Así como los éteres metílicos y ésteres acetílicos. También se ensayó la actividad de los siguientes compuestos di-sustituídos: La 6,7-dihidroxicumarina, la 6,7-dimetoxicumarina, la 6,7-diacetoxicumarina, la 7,8-dihidroxicumarina, la 7,8-metoxicumarina y la 7,8-diacetoxicumarina. La cumarina, la 4-hidroxicumarina, la 7-hidroxicumarina, la 6,7-dihidroxicumarina y la 6,7-dimetoxicumarina se obtuvieron comercialmente (Sigma-Aldrich). El resto de los compuestos fueron sintetizados por el grupo del maestro Fernando León Cedeño del Departamento de Química Orgánica, de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química. La pureza de los compuestos (99.9%) se caracterizó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), efectuado por la maestra Patricia Elizalde.



Cumarina



6,7-dihidroxicumarina



6,7-dimetoxicumarina

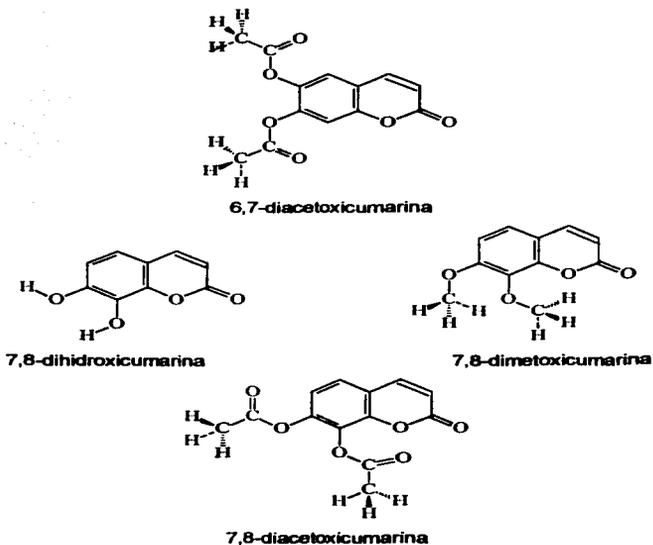


Figura 7. Estructuras químicas de compuestos cumarínicos di-sustituídos

3.2 LÍNEAS CELULARES

Se utilizaron 4 líneas celulares tumorales. La línea MCF-7 de cáncer mamario humano fue obtenida del American Type Culture Collection (ATCC). Las líneas A-427 (adenocarcinoma pulmonar humano) y CALU-1 (carcinoma epidermoide humano), fueron generosamente proporcionadas por el Dr. José Sullivan López González a este laboratorio. La línea B16 de melanoma murino, fue proporcionada por el Dr. Guillermo Alfaro del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

3.3 MEDIO Y CONDICIONES DE CULTIVO

Las líneas se crecieron en botellas de 25 cm² de área de cultivo (Nunc), a una temperatura de 37°C, en atmósfera humidificada y con inyección de CO₂ al 5%. Las líneas celulares A-427, B16 y CALU-1 se cultivaron en medio RPMI y la línea MCF-7 se cultivó en medio DMEM (alto en glucosa). Ambos medios fueron suplementados con antibióticos y con 10% de suero fetal bovino descomplementado por calor. Las células se sembraron en igual número (10⁴ células por pozo) en microplacas de cultivo de 96 pozos y se expusieron a concentración de 1 mM de los compuestos arriba mencionados (n=6). Se utilizó etanol (2 % v/v) como disolvente.

3.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOSTÁTICO POR CUMARINAS

El efecto citostático de los compuestos se estimó en base al ensayo colorimétrico de reducción de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio) [26]. Este ensayo se basa en la capacidad de células vivas de reducir la sal de MTT, que es hidrosoluble y de color amarillo, a formazán de MTT (1-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-3,5-difenilformazan), que es hidrofóbica y de color púrpura. La absorbancia del formazán de MTT es proporcional al número de células vivas.

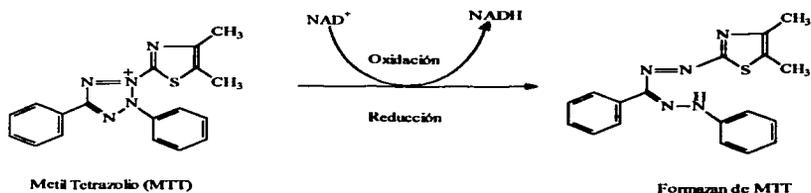


Figura. 8 Fundamento Químico de la prueba de MTT

Después de la exposición a los fármacos, las células son incubadas con MTT (0.05 %) por 2 horas; al término de la incubación se retira el sobrenadante. Los cristales de formazán de MTT, que permanecen en las mitocondrias de las células, se solubilizan en dimetilsulfóxido (DMSO). La absorbancia de ésta solución se mide espectofotométricamente en el lector de microplacas (Biotek EK11) a una longitud de onda de 570 nm.

De cada compuesto se evaluaron 6 concentraciones en rangos de 10 a 320 µg/ml ($n=6$ para cada concentración). Las células se sembraron en placas de 96 pozos (5×10^3 /pozo), fueron expuestas por 72 horas a los fármacos y al término de la exposición se estimó el número de células viables para cada concentración. El porcentaje de proliferación de las células tratadas se estimó con respecto a las células control que fueron expuestas sólo al disolvente (etanol 2%). La concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) de cada compuesto se calculó mediante curvas concentración-respuesta. Se estimó la significancia estadística comparando lecturas de las células control expuestas a etanol (2 %), con las células tratadas con cumarinas. Primero se realizó una prueba de ANOVA, a los valores con diferencia estadística se le realizó la prueba de Dunnett. Los compuestos con mayor actividad citostática se obtuvieron calculando el porcentaje de inhibición para cada compuesto con la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = (1 - (T/C)) \times 100.$$

Donde: T = Células tratadas con los compuestos (disueltos en etanol) a varias concentraciones.

C = Células a las que solamente se les adicionó etanol (2 % v/v) y también funcionó como control.

De los compuestos que inhibieron en más del 50% el crecimiento en las líneas celulares, se realizaron curvas concentración-respuesta, para calcular la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}). De cada compuesto se ensayaron cinco concentraciones ($n = 4$) cada una en 4 pozos. Las concentraciones variaron en escala geométrica, en un rango de concentraciones de 25-400 µM. Se calculó el valor de CI_{50} para cada compuesto promediando los valores de tres ensayos independientes.

3.5 EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD

La toxicidad se estimó a través de la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) empleando el kit "Cytotoxicity Detection" (Roche). La actividad de la enzima LDH se determina mediante una reacción colorimétrica, donde la sal de tetrazolio (amarilla) se reduce a sal de formazán (roja).

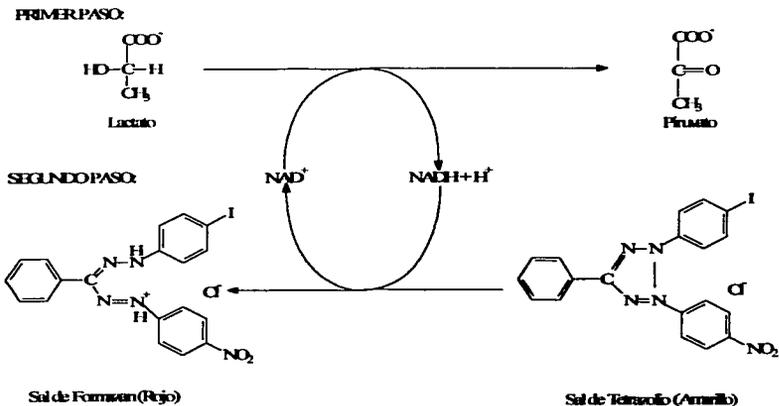


Figura 9. Fundamento químico del kit "Cytotoxicity Detection"

En el primer paso, (ver figura 9) la enzima LDH cataliza la oxidación de lactato a piruvato, lo que produce la reducción de NAD^+ a NADH/H^+ . En el segundo, paso el $\text{NADH} + \text{H}^+$ cataliza la reducción de la sal de tetrazolio INT (2-[4-yodofenil]-3-[4-nitrofenil]-5-clorhidrato de feniltetrazolio) de color amarillo a la sal de formazán que es de color rojo.⁶³

De los compuestos con mayor actividad citotóxica, se evaluó por triplicado el efecto citotóxico a cuatro concentraciones (6.25, 25, 100 y 400 μM). Las células (2×10^4) se incubaron en medio suplementado con 1% de suero fetal bovino y se expusieron 24 horas a los fármacos. El porcentaje de citotoxicidad se calculó a través de la siguiente fórmula:

$$\% \text{CITOTOXICIDAD} = (\text{valor exp.} - \text{control bajo} / \text{control alto} - \text{control bajo}) \times 100$$

Donde:

Control alto: Máximo valor de liberación de LDH, que se estableció lisando las células con tritón (0.002 % durante 5 minutos).

Control bajo: Valor mínimo o basal de liberación de LDH de células tratadas con el disolvente.

Valor experimental: Es el valor que se obtuvo midiendo el sobrenadante de células tratadas con los diferentes compuestos a cada concentración.

Después del tiempo de incubación se retiró la mitad del sobrenadante (50 μL), se adicionaron 50 μL de la mezcla de reacción. Se colocó en la oscuridad por 20 minutos y se paró la reacción con ácido clorhídrico 1 N. Las mezclas de la reacciones se leyeron a 490 nm en un lector de microplacas (Biotek EL311).

4 RESULTADOS

A concentración de 1 mM y con 48 horas de exposición, se observó que los compuestos di-sustituídos tienen mayor actividad citostática que los mono-sustituídos

4.1 DERIVADOS MONO-SUBSTITUIDOS

En la tabla 3 se observa que la 7-hidroxicumarina tiene mayor efecto citostático que la cumarina en las líneas celulares A-427, CALU-1 y B16. La 7-hidroxicumarina tiene valores entre 30-37% de inhibición mientras que la cumarina tiene valores entre 12-30%. En las células de la línea MCF-7 no se observa efecto con estos compuestos.

Tabla 3. Porcentaje de inhibición a 1 mM con compuestos mono-sustituídos (n = 3)

| COMPUESTO | LÍNEAS CELULARES | | | |
|-------------------|------------------|------------|------------|-------------|
| | A-427 | CALU-1 | MCF-7 | B16 |
| | MEDIA±EEM | MEDIA±EEM | MEDIA±EEM | MEDIA±EEM |
| Cumarina | 12 ± 1.8 | 30 ± 7.0 | -2.0 ± 1.3 | 24 ± 0.2 |
| 3-metoxicumarina | 4.7 ± 4.9 | 12 ± 7.0 | 4.1 ± 8.4 | 21 ± 10 |
| 3-hidroxicumarina | 13 ± 5.2 | 14 ± 13 | 14.0 ± 16 | 19 ± 1.5 |
| 3-acetoxicumarina | 56 ± 1.6 | 0.32 ± 4.7 | 25 ± 7 | 42 ± 6.1 |
| 4-hidroxicumarina | -0.6 ± 1.60 | 4.0 ± 2.8 | -16 ± 3 | 2.2 ± 10 |
| 4-metoxicumarina | 65 ± 17 | 40 ± 3.2 | -6.0 ± 6.3 | 51 ± 9 |
| 4-acetoxicumarina | 4.6 ± 0.4 | 11 ± 3.2 | 21.0 ± 8.5 | 38 ± 8 |
| 6-hidroxicumarina | 7.0 ± 0.1 | 8. ± 5.4 | -11 ± 3.0 | 7.0 ± 7.0 |
| 6-metoxicumarina | 18 ± 0.8 | 22 ± 7.0 | 8.0 ± 6.0 | 38 ± 3.4 |
| 6-acetoxicumarina | 4.7 ± 4.0 | 14 ± 6.0 | -6.0 ± 2.0 | 22 ± 4.7 |
| 7-hidroxicumarina | 30 ± 6.2 | 36 ± 7.3 | -0.4 ± 3.0 | 37 ± 3.0 |
| 7-metoxicumarina | 3.0 ± 0.6 | 22 ± 5.0 | 11 ± 1.2 | 11 ± 5.0 |
| 7-acetoxicumarina | 11 ± 4.5 | 30 ± 9.0 | 19 ± 9 | 20 ± 11 |
| 8-hidroxicumarina | 0.1 ± 3.0 | 18 ± 1.5 | 3.0 ± 4.0 | -4.5 ± 9.25 |
| 8-metoxicumarina | 25 ± 2.0 | 27 ± 13 | 1.2 ± 4.5 | 5.3 ± 7.4 |
| 8-acetoxicumarina | 13 ± 11 | 34 ± 17 | -3.0 ± 0.7 | 13 ± 1.3 |

Los compuestos mono-sustituídos con mayor actividad que la 7-hidroxycumarina fueron la 4-metoxycumarina y la 3-acetoxycumarina. A concentración de 1 mM la inhibición de estos compuestos fue de aproximadamente el 50%. Solo la 3-acetoxycumarina inhibió el desarrollo celular en las 4 líneas celulares.

4.2 COMPUESTOS DI-SUSTITUÍDOS

Los compuestos más activos fueron la 6,7-dihidroxycumarina, la 6,7-diacetoxycumarina, la 7,8-dihidroxycumarina y la 7,8-diacetoxycumarina. Compuestos con sustituciones en-7 y 8 tuvieron valores cercanos al 90 por ciento en las líneas celulares excepto la 7,8-dihidroxycumarina en B16 que presentó un valor del 77%. Por otra parte la formación de éteres metílicos (metóxilo) en ambas posiciones disminuye considerablemente la actividad citostática (tabla 4).

Tabla 4 Porcentaje de inhibición con compuestos di-sustituídos.

| COMPUESTO | LÍNEAS CELULARES | | | |
|-----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | A-427 | CALU-1 | MCF-7 | B16 |
| | MEDIA \pm EEEM | MEDIA \pm EEEM | MEDIA \pm EEEM | MEDIA \pm EEEM |
| 6,7-dihidroxycumarina | 68 \pm 2 | 26 \pm 2.5 | 34 \pm 10 | 69 \pm 9 |
| 6,7-dimetoxycumarina | 36 \pm 2 | 25 \pm 2 | 21 \pm 2 | 50 \pm 3 |
| 6,7-diacetoxycumarina | 68 \pm 8 | 38 \pm 10 | 67 \pm 8 | 87 \pm 2 |
| 7,8-dihidroxycumarina | 87 \pm 6 | 93 \pm 4 | 91 \pm 4 | 77 \pm 10 |
| 7,8-dimetoxycumarina | 0.5 \pm 4 | 25 \pm 8 | 6.4 \pm 1 | -5.1 \pm 8.1 |
| 7,8-diacetoxycumarina | 84 \pm 4 | 89 \pm 2 | 89 \pm 4 | 90 \pm 0.2 |

Se estimó la concentración inhibitoria 50 (C₅₀) de los compuestos di-sustituídos más activos mediante curvas concentración-respuesta a 48 horas de exposición. Los compuestos di-sustituídos en posición 7 y 8 tuvieron una actividad citostática mayor que los compuestos sustituidos en 6 y 7. Sus valores de C₅₀ fueron más bajos y presentan actividad en todas las líneas celulares (tabla 5).

Tabla 5 Valores de Cl_{50} (μM) en cada línea celular. (ND= No Determinado)

| COMPUESTO | LÍNEAS CELULARES | | | |
|-----------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | A-427 | CALU-1 | MCF-7 | B16 |
| | MEDIA \pm EEM | MEDIA \pm EEM | MEDIA \pm EEM | MEDIA \pm EEM |
| 6,7-dihidroxicumarina | 66 \pm 0.6 | >400 | >400 | 203 \pm 5 |
| 6,7-diacetoxicumarina | ND | >400 | >400 | ND |
| 7,8-dihidroxicumarina | 47 \pm 10 | 35 \pm 3.1 | 43 \pm 5 | 175 \pm 9 |
| 7,8-diacetoxicumarina | 109 \pm 8 | 46 \pm 5.5 | 65 \pm 9 | 24 \pm 11 |

4.3 EFECTO CITOTÓXICO

A concentraciones similares a los valores de Cl_{50} (25 y 100 μM) de cada compuesto, no se observaron efectos tóxicos. Incluso a concentración de 400 μM se obtuvieron valores por debajo del 40% de citotoxicidad (Tabla 6). A esta concentración, se observó que los compuestos di-sustituídos en posición 6 y 7 son menos tóxicos que los compuestos di-sustituídos en posición 7 y 8. Sólo la 7,8-dihidroxicumarina y la 7,8-diacetoxicumarina tuvieron efectos tóxicos estadísticamente significativos en las células de las líneas A-427 y B16.

Tabla 6 Porcentajes de citotoxicidad, a una concentración de 400 μM y 24 horas de exposición. ND = No Determinado * efecto significativo ($P < 0.05$).

| COMPUESTO | LINEA CELULAR | | | |
|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | A-427 | CALU-1 | MCF-7 | B16 |
| | MEDIA \pm EEM | MEDIA \pm EEM | MEDIA \pm EEM | MEDIA \pm EEM |
| 6,7-dihidroxicumarina | 21 \pm 2.5 | 2.4 \pm 2 | 24 \pm 5 | 25 \pm 6 |
| 6,7-diacetoxicumarina | ND | ND | ND | ND |
| 7,8-dihidroxicumarina | 38 \pm 11 * | 10 \pm 6 | 14 \pm 7 | 20 \pm 8 * |
| 7,8-diacetoxicumarina | 11 \pm 5 * | 8 \pm 6 | 13 \pm 2 | 30 \pm 5 * |

5 DISCUSIÓN

5.1 COMPUESTOS CUMARÍNICOS MONO-SUBSTITUIDOS

El efecto citostático de la cumarina y de la 7-hidroxicumarina en varias líneas celulares ha sido reportado por varios grupos de investigación.⁵²⁻⁶¹ El mayor efecto citostático de la 7-hidroxicumarina, comparado con el de la cumarina ⁵²⁻⁶¹ sugiere que la cumarina es una pro-droga y la 7-hidroxicumarina es la forma activa de la molécula.²⁷ Nuestros resultados fueron consistentes con los de estos autores. La cumarina y la 7-hidroxicumarina fueron inactivos en la línea de carcinoma mamario humano MCF-7.

Kawaii y cols;⁵⁴ Kolozkievi y cols⁶¹ han reportado que algunos compuestos mono-substituidos tienen baja actividad citostática. En un estudio previo, realizado en este laboratorio en la línea B16, se observó que la 3-acetoxicumarina, la 4-metoxicumarina y la 6-hidroxicumarina a 72 horas de exposición, tienen mayor actividad citostática que las otras cumarinas.⁵⁷ En este estudio a las 48 horas, nosotros también observamos actividad de la 3-acetoxicumarina, la 4-metoxicumarina, pero no de la 6-hidroxicumarina. Esto puede deberse a que el efecto de la 6-hidroxicumarina tenga un periodo de latencia mayor. El efecto citostático de estos compuestos se observó en las líneas celulares A-427, CALU-1 y B16, siendo la 4-metoxicumarina el compuesto que produjo los mayores porcentajes de inhibición en estas líneas. Las células de la línea MCF-7 fueron poco sensibles a la acción citostática de las cumarinas mono-substituidas estudiadas.

Con los compuestos mono-substituidos no podemos inferir la existencia de una clara relación estructura-actividad.

5.2 COMPUESTOS CUMARÍNICOS DI-SUBSTITUIDOS

Para incrementar la actividad citostática en los compuestos es primordial la naturaleza química del sustituyente.^{54,61} La adición de dos grupos polares al anillo aromático de la cumarina produce un aumento de efecto citostático.⁵⁴⁻⁶⁰ En el anillo de la cumarina la posición *para*, equivale a la posición 6; la posición *meta*, equivale a la posición 7 y la posición *orto* equivale a la posición 8. Los compuestos con grupos hidroxilos y acetilos en las posición 7 y 8 (*meta* y *orto*) son más activos que los compuestos di-sustituidos en las posición 6 y 7 (*para* y *meta*).^{54,56,59} Es decir los compuestos di-sustituidos en posición 7 y 8 tuvieron valores de CI_{50} más bajos que compuestos sustituidos en posición 6 y 7.

Los compuestos di-sustituidos en posición 7 y 8 con grupo hidroxilos libres presentaron mayor actividad citostática que los compuestos di-sustituidos con acetilos, es decir la formación de ésteres acetílicos. Los compuestos di-sustituidos en posición 6 y 7 con grupos acetilo tuvieron mayor actividad citostática que compuestos di-sustituidos con hidroxilos libres.

Kawaii y Cols,⁵⁴ en un trabajo reciente reportó que la 6,7-dihidroxicumarina fue activa en las líneas que el utilizó y los valores de CI_{50} entre 20-35 μM pero si se sustituye el hidroxilo de la posición 7 por un metoxilo la actividad citostática disminuye. Los valores de CI_{50} guardaron la proporción con respecto a los valores del porcentaje de inhibición. Finn y cols^{58,59} reportan que los compuestos di-sustituidos en posición 7 y 8 son activos en las líneas celulares SK-MEL-31 que son células de melanocitos de piel humana malignizadas y A-559 que es un adenocarcinoma de riñón.

Nosotros observamos que la 6,7-dihidroxicumarina inhibe en menos del 50% el crecimiento de las líneas CALU-1 y MCF-7, mientras que la 7,8-dihidroxicumarina inhibió a todas las líneas empleadas. Resultados similares encontraron Finn y colaboradores (2001) quienes observaron que la 6,7-dihidroxicumarina no inhibió el crecimiento de los melanocitos malignos de piel humana SK-MEL-31, mientras que la 7,8-dihidroxicumarina si lo hizo.

Los compuestos di-sustituídos con grupos electro-atractores incrementan la actividad citostática, mientras que grupos electro-donadores disminuyen la actividad del compuesto.⁵⁴ Nosotros encontramos que la cumarina sustituida con acetilos (electro-atractor) en posición 7 y 8 tuvieron mayor actividad citostática. Mientras que la introducción de grupos metóxilo (electro-donador) disminuye drásticamente la actividad citostática.

Solo los compuestos con grupos electro-atractores (acetilo) sustituidos en posición 7 y 8 y la 6,7-diacetoxicumarina son capaces de inhibir la proliferación celular de la línea MCF-7.

5.3 CITOTOXICIDAD

La citotoxicidad de los compuestos cumarínicos ha sido inferida por otros investigadores, a través de resultados obtenidos por ensayos de MTT.^{54,59,59}

Nosotros evaluamos la liberación de la enzima LDH como un mejor indicador para medir la citotoxicidad.⁶² Con este método determinamos que la toxicidad *in vitro* de las cumarinas es limitada y concuerda con la poca toxicidad observada *in vivo*.

Las cumarinas con mayor actividad citostática carecen de efectos tóxicos significativos en los rangos de las CI_{50} . Los sustituyentes electro-atractores le confieren menos toxicidad a la molécula.

El efecto tóxico de agentes antineoplásicos activan los puntos de control y producen arrestos correspondientes en el ciclo celular. El arresto en G₁, producido por cumarinas, como la 7-hidroxycumarina y la 6,7-dihidroxycumarina, concuerda más a la inhibición del punto de restricción que con la activación de los puntos de control. Este mecanismo es coherente con el efecto citostático de algunas cumarinas y su baja toxicidad.

En un reporte reciente se demuestra que compuestos cumarínicos como la dafnetina (7,8-dihidroxycumarina) no se une a ADN⁵⁹, lo que concuerda con la baja toxicidad que nosotros observamos.

6 CONCLUSIONES

Existe una clara relación estructura-actividad de los compuestos cumarínicos di-sustituídos, mientras que dicha relación no se observa con los mono-sustituídos.

Los grupos electro-donadores en las posiciones 7 y 8 inhibieron el crecimiento de todas las líneas celulares, incluso la de MCF-7. Los grupos acetilo disminuyen la toxicidad de los compuestos. Por lo anterior, 7,8-diacetoxi-cumarina resulta una molécula interesante y prometedora para estudios posteriores. De esta molécula se debe ensayar su actividad citotóxica y citostática, tanto en líneas celulares no malignizadas, como en modelos murinos tumorales. Además, sería conveniente estudiar la actividad de moléculas con otros tipos de grupos electro atrayentes, como: -CN, -COOH, Cl, -Br, -I, -OCF₃ y -CH₃CO.

7 REFERENCIAS

1. Medina-Morales F, Barrera RR, et al. (1996) Primary lung cancer in México city: a report of 1019 cases. *Lung Cancer*; 14: 185-193.
2. Meneses-García A., y Mohar Betancourt A. (1999). Principales neoplasias malignas en México. Primera Edición. Editorial Manual Moderno Págs.2, 3
3. Weinberg R.A. (1996). How cancer Arises. An explosion of research is uncovering the long-hidden molecular underpinnings of cancer-and suggesting new therapies. *Scientifics American* .275;3:32-33
4. Martínez F, Chávez AD, González D, Gutiérrez AA (2001) Regulation of cell division in higher eukaryotes. In *cell physiology Sourcebook*. New York , Ed 3th. Nicholas Sperelakis editor, Stockton Press,1135-1159.
5. Arellano, M. and Moreno, S. (1997). Regulation of CDK/ciclin complex during the cell cycle. *Biochem Cell Biol*;29:559-573.
6. Johnson DG and Walker CL. (1999). Cyclins and cell cycle checkpoints. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*;39: 295-312.
7. Pines, J. (1995). Cyclins and cyclin-dependent kinases: theme and variations. *Adv Cancer Res*;66:181-213.
8. Sherr Ch J. (1996). Cancer cell cycles. *Science*;274:1672-7.
9. Bartek J, Bartkova J and Lukas J. (1996). The retinoblatoma protein pathway and the restriction point. *Curr Opin Cell Biol*; 8:805-814.
10. Morgan, D.O. (1996). Principles of CDK regulation. *Nature*, 374, 131-134.
11. Sherr Ch J and Roberts JM. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*;13:1501-12.
12. Donnellan R, Chetty R. (1998). Cyclin D1 and human neoplasia. *Mol Pathol*;51:1-7.
13. O'Connor P.M. and Fan S. (1996). DNA damage checkpoints: implication for cancer therapy. *Prog Cell Cycle Res*. 2:165-173.
14. Bartek J. and Lukas J (2001). Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS lett* 490: 117-122.
15. Kornbluth S 2000 Cell cycle checkpoints. In: Conn PM, Means AR, O'Malley BW (eds) *Principles of Molecular Regulation*.Totowa, New Jersey.,407-413407-413.

16. Bartek J. and Lukas J (2001). Mammalian G1 and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol*; 13: 738-747.
17. Bartkova J, Lukas J, and Bartek J. (1997). Aberrations of the G1- and G1/S-regulating genes in human cancer. *Prog Cell Cycle Res*;3:211-20.
18. Jiménez-Orozco FA. et al (1999). Ciclo celular y sus anomalías en el cáncer de pulmón. *Rev Inst Nal Resp Méx*, 12-3: 214-220
19. Lodish H. Et al (2000). *Molecular Biology*. 4th edition. Scientific American Books. USA. 1033-1174.
20. Manish, A.S and Gary K.S. (2001). Cell cycle-mediated Drug Resistance: An Emerging Concept in Cancer Therapy. *Clin Cancer Res.*; 7: 2168-2181
21. Sausville, EA. (1999). Cyclin-Dependent kinases: novel targets for cancer Treatment. *Pharmacol Ther*; 82; 285-92
22. Toogood, P.L. (2001). Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors for Treating cancer. *Medicinal Res. Rev*; 21: 487-498
23. Senderowicz AM. (1999). Flavopiridol: the first cyclin-dependent kinase inhibitor in human clinical trials. *Invest New Drugs*. 17:313-320.
24. Blagosklonny M.V (2002). P53: an ubiquitous target of anticancer drugs. *Int. J. Cancer* 98: 161-66.
25. Sausville EA. (1999). Cyclin-dependent kinases: initial approaches to exploit a novel therapeutic target. *Pharmacol Ther*;82:285-92.
26. Meijer L. et al (1999). Properties and potential applications of chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Pharmacol Ther*;82:279-284.
27. Egan, D. et al. (1990). The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarin-related compounds. *Drug Metab. Rev*;22: 503-529.
28. Gary J, O'Kenney R, and O'Kenney K. (1997). The chemistry and occurrence of coumarins. In: *Coumarins biology, applications and mode of action*. New York O'Kenney R, and Thomes RD, editors. 23-66.
29. Cox D., O'Kennedy, and Thomes, R.D. (1989). The rarity of liver toxicity in patients treated with coumarin (1,2-benzopyreno). *Hum Toxicol*;8:501-506.
30. Murray DHR, Méndez J, and Brown AS. (1982). Introduction: Historical Development. *The Natural Coumarins*. John Wiley & sons LTD de. Chichester. Wiley Interscience Publication, Chapter 1:1-12

31. Lake BG. (1999). Coumarin Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity: Relevance for Human Risk Assessment. *Food and Chem Toxicol* ;37: 423-453
32. Zhuo X Gu J, Zhang QY , Spink DC, Kamisky L, Ding X. (1999) Biotransformation of coumarin by rodent and human cytochromes P-450: metabolic basis of tissue-selective toxicity in olfactory mucosa of mucosa of rats and mice. *J Pharm Exp Ther* , 288, 288, 463-471.
33. Honkakoski P. and Negishi M. (1997). The structure, function, and regulation, and cytochrome P450 2A enzymes. *Drug metab Rev.* 29, 977-996
34. Pearce R., Greenway D. and Parkinson A. (1992). Species differences and interindividual variation in liver microsomal cytochrome P450 2A enzymes : effects on coumarin dicumarol, and testosterone oxidation. *Arch of Biochemist and Biophysics* 298, 211-225.
35. Pelkonen O., Raunio H., and Lang M. A. (1993). Coumarin 7-hydroxylase: characteristics and regulation in mouse and man. *Journal of the Irish Colleges of Physicals and Surgeons* 22 (Suppl. 1), 24-28.
36. Pelkonen O., Raunio H., and Lang M. A. (1997). The metabolism of coumarin. *In coumarins: Biology, Applications and mode of action*, New York,. R. O Kennedy and R. D. Thornes editor, 67-92
37. Cohen AJ. (1979). Critical Review of the Toxicology of Coumarin with Special Reference to Interspecies Differences in Metabolism and Hepatotoxic Response and their Significance to Man. *Food. Cosmetic Toxicol* 17 7., 277-289
38. Shilling, W.H., Cramton, F.R., and Longland, R.C. (1969). Metabolism of coumarin in Man. *Nature*;221:664-665.
39. Fry J.R. et al. (1993). Structural requirements for the direct and cytochrome P450-dependent reaction of cyclic α,β -unsaturated carbonyl compounds with glutathione: a study with coumarin and related compounds. *J of pharmacy and Pharmacol* 45, 166-170
40. Bom S.L. et al. (1997). Synthesis and reactivity of coumarin 3,4 epoxide. *Drug Metab and Dispos* 215, 1318-1323.
41. Lake B.G., Gaudin H., Price R. and J.Walters D. G. (1994). Metabolism of [3-¹⁴C]coumarin to polar and covalently bound products by hepatic microsomes

- from the rat, Syrian Hamster, gerbil and humans. *Food and Chem. Toxicol* 34, 105-115.
42. Majerus PW, Tollefsen DM (2000) Anticoagulant, thrombolytic, and antiplatelet drugs. In: Goodman AG, Hardman JG, Limbird LE (eds) *The pharmacological basis of therapeutics*. New York. Ed 10, McGraw-Hill 1519-1538.
 43. Thomes RD, Lynch G, and Sheehan. (1982). *Cimetidine and Coumarine therapy of melanoma*. *Lancet*: 328.
 44. Maat B and Hilard P. (1981). *Anticoagulants and Experimental Metastases Evaluation of Antimetastatic Effects in Different Model Systems*. *Cancer Res Clin Oncol* 101: 272-283
 45. Zacharski LR. (1981). *Effect of warfarin on survival in small cell carcinoma of the lung*. *JAMA* 245: 831-835.
 46. Marshall, M.E. et al. (1987) *Treatment of metastatic renal cell carcinoma with coumarin (1,2-benzopyrone) and cimetidin: A pilot study*. *J Clin Oncol*;5:862-6.
 47. Deux, F.H. et al. (1990) *Phase II study of coumarin and cimetidin in patients with metastatic renal cell carcinoma*. *J Clin Oncol*;8:325-329.
 48. Marshall, M.E., Butler, K., and Hermansen, D. (1990) *Treatment of hormone-refractory stage D carcinoma of prostate with coumarin (1,2-benzopyrone) and cimetidin: A pilot study*. *Prostate*;17:95-9.
 49. Mohler J.L. et al. (1992). *Phase II evaluation of coumarin (1,2-benzopyrone) in metastatic prostatic carcinoma*. *Prostrate* 20:123-31.
 50. Thomes, R.D., Lynch, G., and Shenan, H. (1982) *Coumarin and cimetidin therapy of melanoma*. *Lancet*;2:328-328.
 51. Thomes, R.D. et al. (1984) *Treatment with coumarin to prevent or delay recurrence of malignant melanoma*. *J. Cancer Res Clin Oncol*;120:32-34.
 52. Marshall, M.E. et al. (1984). *Growth-inhibitory effects of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin in human malignant cell lines in vitro*. *J. Cancer Res Clin Oncol*;120:3-10.
 53. López-González, J.S. García-Herrera Verónica, Agilar-Cazares et al. (1998). *Efecto citostático de la cumarina y la 7-hidroxycumarina en tres líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar humano*. *Rev Inst Nac Enf Res*;11:267-267.
 54. Kawaii S., Tomono Y., Yoshizawa Y (2001) *The antiproliferative effect of coumarins on several cancer cell lines*. *Anticancer Res* 21:917-924.

55. López-González J.S. et al (2000) Efecto en el ciclo celular de líneas de adenocarcinoma pulmonar por cumarina y 7-hidroxicumarina. *Rev Inst Nac Enf Res*;3:192-197.
56. Jiménez-Orozco FA. López-González JS. Nieto-Rodríguez A et al. (2001). Decrease of cyclin D1 in the human lung adenocarcinoma cell line A-427 by 7-hydroxycoumarin. *Lung Cancer* 31:185-194.
57. Jiménez-Orozco, F.A. Molina-Guameros JA. Medoza-Patiño N et al. (1999). Cytostatic activity of coumarin metabolites and derivatives in the B16 F10 murine melanoma cell line. *Melanoma Res*;9:243-47.
58. Finn G.J. Creaven B. And Egan D.A. (2001) Study of the in vitro cytotoxic potential of natural and synthetic coumarin derivatives using human normal and neoplastic skin cell lines. *Melanoma Res* 11:461-7
59. Finn G.J. et al. (2002). In vitro cytotoxic potential and mechanism of action of selected coumarins, using human cell lines. *Cancer Lett* 183 61-66.
60. Pelkonen O, et al. (1994). Regulation of Coumarin 7 hidroxilation in man. *Cancer Res Clin Oncol.* 120: 30-31.
61. Kolodziej H. et al. (1989). Structure-Cytotoxicity Relationships of a Series of Natural and Semi-Synthetic Simple Coumarins as Assessed in Two Human Tumor Cell Lines. *Z Naturforsch* p.240-244.
62. Mosmann T. (1983). Rapit Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Citotoxicity Assay. *J. Of Immunological Methods*, 65 m: 55-63.
63. Decker, T and Lohmann-Matthes, M.-L. (1988). A quick and simple method for the quantification of lactate dehydrogenase release on measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J inmunol. Methods*; 151: 61-9
64. Avendaño C. Capítulo 4. Introducción a la Química Farmacéutica. (2001). Ed. Interamericana Mc Graw-HillSherr Ch J. Pags: 85-95.