



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"EFECTO DE CUMARINAS 4-SUSTITUIDAS SOBRE LA  
ADHESION DE CELULAS DE MELANOMA MURINO B16 A  
MOLECULAS DE MATRIZ EXTRACELULAR".

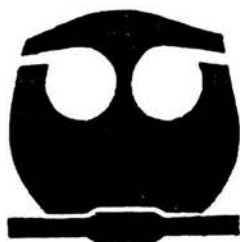
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

P R E S E N T A :

**CHARMINA AGUIRRE ALVARADO**



MEXICO, D. F.

EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

2004



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.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

Jurado asignado:

Presidente	Profa. Ana María Vázquez Álvarez.
Vocal	Prof. Felipe Cruz García.
Secretario	Prof. Marco Antonio Velasco Velázquez.
1er. Suplente	Profa. Adriana Camacho Villanueva.
2do. Suplente	Prof. Constantino III R. López Macias.

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio de Farmacología Molecular, Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina. U.N.A.M.

Este trabajo fue apoyado parcialmente por el proyecto PAPIIT IN230202 (DGAPA-UNAM) y el proyecto PAPIIT IX244804 (DGAPA-UNAM).

Asesor de tema:

Q.F.B. Marco Antonio Velasco Velázquez.

Supervisor técnico:

Dra. Diana Barrera Oviedo

Sustentante:

Charmina Aguirre Alvarado.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Aguirre Alvarado Charmina

FECHA: 7 de mayo de 2001

FIRMA: 

*DEDICADA A  
LOS CUATRO SERES MÁS IMPORTANTES DE MI VIDA:  
MILY, NANA, AGUIRRE Y LA HERMOSA.*

Agradezco a:

Marco y Diana, porque, sin sus conocimientos y su infinita paciencia esta tesis no hubiera sido posible.

A Adriana, Susanita y Nohemi por su amistad, colaboración y compañerismo; fueron las mejores compañeras de laboratorio que se puede tener.

A todos los integrantes del laboratorio de farmacología molecular del depto. de farmacología de la Facultad de Medicina: Juanola por tener siempre una sonrisa y una palabra de aliento cuando las cosas no salían tan bien, Estelita que sin su valioso trabajo, ningún experimento se hubiera realizado, Dr. Nicandro Mendoza, Dr. Mandoki. Dr. Alejandro Jimenez, Roberto por consejos y por compartir sus conocimientos conmigo.

A toda mi familia: abuelitas y abuelitos, tías y primos que ya sea por su apoyo moral o económico siempre se preocuparon por mis estudios.

A los ñoños escandalosos porque me enseñaron que por lo menos en la facultad de Química, la vida es color de rosa, no, mas bien de todos los colores del arcoiris.

A mi amiguito de siempre Ivancito, a la Briz porque me enseñó que siempre puede haber alguien mas malo que yo. A lara, Susa, Toño, Millet, Ale, Jorge, Ángel y todos los pseudoingenieros por aceptarme en su selecto grupo.

A todos los de la oficina por ser mis primeros amigos en la facultad y espero que lo sean por siempre.

A mis hermanitas por elección Mely y Massi.

A las dos personas mas parecidas a mi en el mundo Vane y Lu.

Gracias Adri porque junto con mi mamá son siempre mi mas grande apoyo y por poner siempre los intereses de tu familia sobre los tuyos.

**Efecto de cumarinas 4-sustituidas sobre la adhesión de células de  
melanoma murino B16 a moléculas de matriz extracelular.**

**INDICE.**

<b>I.- RESUMEN .....</b>	<b>4</b>
<b>II.- ANTECEDENTES .....</b>	<b>6</b>
<b>1. GENERALIDADES DEL CÁNCER</b>	
1.1 Carcinogénesis .....	6
1.2 Melanoma .....	9
1.3 Metástasis .....	9
<b>2.-ADHESIÓN A MATRIZ EXTRACELULAR</b>	
2.1 Integrinas .....	14
2.1.1.Vías de señalización dependientes de integrinas .....	14
2.2. Participación de las integrinas en el proceso de metástasis .....	17
2.3. Regulación redox de la adhesión a MEC .....	18
2.3.1 Especies reactivas de oxígeno (ERO) .....	19
2.3.2 Papel de ERO en células neoplásicas.	
2.3.3 Modulación redox de la adhesión mediada por integrinas .....	20
<b>3.-CUMARINAS</b>	
3.1 Generalidades de las cumarinas .....	22
3.2 Actividad antineoplásica .....	25
<b>III.- HIPÓTESIS .....</b>	<b>26</b>
<b>IV.- OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
<b>V.-MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
<b>VI.-RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
<b>VII.-DISCUSIÓN .....</b>	<b>42</b>
<b>VIII.-CONCLUSIONES .....</b>	<b>46</b>
<b>IX.-BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>53</b>

## I.RESUMEN.

Los actuales tratamientos contra el cáncer no son efectivos para combatir los tumores secundarios que se forman en el proceso de metástasis, por lo que se requiere desarrollar nuevos tratamientos que inhiban la formación de metástasis. El proceso de metástasis comprende varias etapas; en todas estas esta implicada la adhesión de las células tumorales a la matriz extracelular (MEC). La adhesión a MEC esta mediada por receptores de la familia de las integrinas, los cuales regulan la proliferación, la migración y la invasión. Tanto las integrinas como otras moléculas que intervienen en la adhesión celular son susceptibles a modulación redox. Las células tumorales presentan una producción elevada de especies reactivas de oxígeno (ERO) y disminuciones en la expresión de enzimas antioxidantes; estas evidencias sugieren que la capacidad metastásica de tumores esta directamente relacionada con el balance redox en la célula.

La cumarina tiene actividad antineoplásica *in vivo* e *in vitro*. En el humano, la cumarina se metaboliza generando derivados monohidroxilados que presentan vidas medias más largas y poseen actividades biológicas. Adicionalmente, por su estructura química, podrían actuar como eliminadores de ERO. Se sabe que la 4-hidroxycumarina desarregla el citoesqueleto de actina en cultivos de células B16, modificando la motilidad celular y la fosforilación de tirosinas. En el presente trabajo se utilizó esta línea celular para analizar el efecto de 5 cumarinas sustituidas en la posición 4 sobre: i) la viabilidad, ii) la adhesión a componentes de MEC, y iii) la producción de peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ).

Los resultados indican que el único compuesto que afecto la viabilidad celular fue la 4-metoxicumarina, por lo que no se evaluó en ensayos de adhesión. Ninguno de los otros compuestos afectó la viabilidad. Cuando se realizaron los ensayos de adhesión a componentes de MEC se encontró que: la 4-hidroxycumarina disminuyó la adhesión a fibronectina, laminina, colágena IV ó vitronectina. La 4,7-dihidroxycumarina aumentó la adhesión a las cuatro moléculas evaluadas. La 4-acetoxicumarina aumentó la adhesión a fibronectina y a vitronectina, mientras que el ácido (5,7-dihidroxi 2-oxo-2H cromen- 4il) acético disminuyó la adhesión a vitronectina. Finalmente se determinó la producción de peróxido de hidrógeno por células B16 tratadas con cumarinas, para analizar su correlación con los cambios en la adhesión a componentes de MEC. Aquellos compuestos que aumentaron la adhesión, como la 4-acetoxicumarina y la 4,7 -dihidroxycumarina, incrementaron la producción de  $H_2O_2$ . La 4-hidroxycumarina, que disminuye la adhesión a las cuatro moléculas de MEC, disminuye la producción de  $H_2O_2$ .

Con estos resultados concluimos que la presencia de sustituyentes en la posición 4 de la cumarina puede ser suficiente para modular la adhesión. Sin embargo, sustituyentes adicionales cambian la actividad, invirtiendo el efecto o haciéndolo selectivo. En células B16, el  $H_2O_2$  podría activar los mecanismos celulares que inducen la adhesión



a matriz extracelular. Existe una relación entre la producción de  $H_2O_2$  y el efecto en la adhesión celular producido por cumarinas 4-sustituidas. Los parámetros estadísticos evaluados indican que no existe suficiente evidencia significativa, en cuanto a la producción de  $H_2O_2$  estimulado por las cumarinas, por lo que se requieren estudios posteriores para aclarar la importancia de estos en la regulación de la adhesión producida por cumarinas.

## II.-ANTECEDENTES.

### 1. GENERALIDADES CÁNCER.

El término cáncer involucra más de 100 diferentes padecimientos que aparecen principalmente como consecuencia a la exposición a agentes carcinogénicos. Es un desorden celular que usualmente presenta la formación de un tumor, el cual es definido como una masa de tejido cuyos mecanismos de control de crecimiento y proliferación celular difieren de los presentes en tejidos normales (Franks, 1998).

Según el informe anual de la OMS del 2002 en el mundo más de 10 millones de personas son diagnosticadas con cáncer cada año, de los cuales 6 millones mueren y se estima que estas cifras se incrementen en un 50% en los próximos 20 años.

En México los tumores malignos fueron la segunda causa de muerte en 1999 con 53,662 casos (Fuente: INEGI, SS/ DGEI, 1999). En personas en edad productiva entre 15 y 64 años los tumores malignos fueron la principal causa de mortalidad. A pesar de los avances en el manejo de la enfermedad, la sobrevida a 5 años para todos los tipos de cáncer de pulmón es de 13% y la de melanoma metastásico es de 16%.

#### 1.1 Carcinogénesis.

La carcinogénesis es un proceso de multiestadios mediante el cual una célula normal da origen a una célula neoplásica. El proceso de carcinogénesis comprende tres etapas conocidas como iniciación, promoción y progresión (Franks, 1998). La secuencia total de eventos en el proceso de formación de un tumor es consecuencia de cambios genéticos. La iniciación es debida a alguna causa procarcinógena y resulta en la alteración específica de genes susceptibles. La célula mutada incrementa su capacidad de proliferación; se ha sugerido que los agentes *promotores* de la proliferación pueden interferir con el proceso de diferenciación que se lleva a cabo normalmente cuando una célula pasa de un estadio no divisorio a otro en el cual una

célula esta lista para dividirse. De cualquier forma estos estímulos promotores del crecimiento actúan sobre células que aún pueden ser sensibles a factores inhibidores de crecimiento normales. Lo anterior explica por qué algunas neoplasias presentan un carácter reversible (Franks, 1998), aún cuando los cambios moleculares sean irreversibles y permanezcan latentes hasta que otro estímulo induzca la proliferación (Ruddon, 1995).

El segundo estadio conocido como promoción se caracteriza por un estado de hiperproliferación o hiperplasia. Esta proliferación es selectiva sobre células iniciadas o activadas por un estímulo *promotor* y da origen a lesiones premalignas o tumores benignos. Los *promotores* son generalmente sustancias químicas exógenas, estímulos físicos o agentes endógenos como hormonas. Adicionalmente a la proliferación excesiva, la descendencia de estas células presenta apariencia anormal en estructura y orientación, condición que se denomina displasia. Los tumores denominados *in situ*, que normalmente derivan de epitelios, son tumores benignos pues la mayoría de las veces son de tamaño pequeño, se encuentran encapsulados y no invaden el tejido que los rodea. A su vez, causan daño al ejercer presión local u obstrucción en órganos vitales, por lo que el tratamiento quirúrgico constituye una solución efectiva (Andrés, 1999).

La tercera etapa se refiere a la conversión de lesiones premalignas en tumores malignos y su progresión. Durante esta etapa las células neoplásicas adquieren gradualmente características cada vez más agresivas, es decir, un fenotipo invasivo y metastático. Si los cambios genéticos permiten que el tumor comience a invadir la membrana basal y a diseminarse a través del flujo sanguíneo o linfático, se considera que el tumor es maligno (Andrés, 1999, Weinberg, 1996, Rouslahti, 1996).

Los genes involucrados en la transformación de células normales a células tumorales son conocidos como *oncogenes*. La mayoría de los oncogenes son derivados de

genes normales o progenitores de oncogenes (*protoncogenes*) (Lodish, 2000). Los protoncogenes pueden dar lugar a oncogenes por mutaciones puntuales inducidas por carcinógenos, por translocaciones cromosomales, o simplemente por sobreexpresión o expresión inapropiada (Franks, 1998). Los oncogenes codifican para proteínas con actividad anormal que alteran la transducción de señales, el crecimiento celular o la supervivencia de las células tumorales (Varmus, 1993).

Por la función que desempeñan, se han descrito cinco clases de oncogenes:

Los de clase I se refieren a factores de crecimiento, como el oncogen *sis* cuya oncoproteína es el factor de crecimiento derivado de plaquetas.

La Clase II incluye a los oncogenes que codifican para receptores que pueden ser de tipo tirosina-cinasa o receptores intracelulares. Un ejemplo de estos es el gen *erbB* que codifica para el receptor del factor de crecimiento epidermal.

Dentro de la Clase III se encuentran los transductores intracelulares, y de éstos los más representativos son las proteínas con actividad de tirosina-cinasas, como *src* o las serina/treonina cinasas. En este grupo también se encuentran oncogenes que codifican para proteínas de la familia de *Ras* con actividad de GTPasas.

En la clase IV están agrupados los receptores a factores de transcripción nuclear; por ejemplo *Myc*, que codifica para el factor de transcripción AP1 (Lodish, 2000).

Por último, la clase V comprende las proteínas de control del ciclo celular o los genes que se encargan de inhibir la proliferación celular conocidos como genes supresores de tumores (*GST*). Han sido descritos más de una docena de *GST*, estos están implicados en funciones como detectar fallas en la replicación, en la reparación del DNA, o en el ensamblaje del huso, regulando así el ciclo celular (Lodish, 2000, Garibay, 1998). Las mutaciones a este nivel pueden generar proteínas que sean inactivas o tengan una actividad disminuida, impidiendo así un control adecuado del crecimiento celular (Franks, 1998). El ejemplo más estudiado de un gen supresor de

tumores es *p53*. Este gen es el responsable de inhibir la transición de la fase G1 a S en el ciclo celular y se encuentra mutado en tumores avanzados (Vogelstein, 1992).

### **1.2 Melanoma.**

Datos obtenidos del Registro Mexicano de Cáncer muestran que los tumores en la piel ocupan el tercer lugar en frecuencia y sólo son superados por el cáncer cervicouterino, el de mama y en varones el de pulmón y próstata (Mohar, 1999).

El melanoma maligno es una neoplasia de melanocitos que puede verse en piel, mucosas o tejido neural. Aunque el riesgo de padecer un melanoma es mayor en caucásicos que en individuos de razas más pigmentadas (Stein, 1992), este tipo de neoplasia causa el 75 % de los decesos por cáncer de piel en el país. La etiología del melanoma es desconocida, pero se han encontrado correlaciones con la exposición solar y con deleciones en el brazo largo del cromosoma 11 y del corto del cromosoma 1 (Franks, 1998). En ningún otro tumor se tiene la necesidad de dar un diagnóstico precoz como en el melanoma, pues sólo las etapas iniciales tienen tratamiento curativo (Mohar, 1999). Entre el 5 y el 10% de los casos de melanoma cutáneo se presentan como una enfermedad metastásica con una lesión primaria no detectable (Stein, 1992).

### **1.3 Metastasis.**

La metástasis es un proceso mediante el cual las células cancerosas abandonan el tumor primario y viajan a sitios distantes por vía circulatoria, estableciendo un tumor secundario en un órgano diferente al original (MacDonald, 2002). Debido a que, a diferencia de un tumor primario, los tumores secundarios no pueden ser retirados quirúrgicamente, la generación de metástasis es la principal causa de muerte en pacientes con cáncer. Este proceso requiere transformaciones adicionales de la célula tumoral, alterando la capacidad migratoria y la expresión de otras proteínas. Un factor

importante para desarrollar metástasis es la topografía del tumor primario. En el caso del melanoma, es mayor la posibilidad de desarrollar metástasis cuando la neoplasia se origina en mucosas que cuando se encuentran en la piel (Mohar, 1999). Se ha demostrado que cada tipo de célula cancerosa tiene afinidad para metastatizar a ciertos órganos. En general, el sitio inicial de formación de tumores secundarios tiende a ser el órgano que contiene la primera red capilar encontrada por las células después de ser liberadas del tumor (Liotta, 1974). Para melanoma los sitios mas frecuentes de metástasis son: la piel (lesiones satélite), el tejido subcutáneo, los ganglios linfáticos, el pulmón, el cerebro, el hígado y los huesos (Stein, 1992). Sin embargo las explicaciones hemodinámicas de la selectividad no aclaran totalmente la predilección de las células tumorales por un órgano específico, por lo que el proceso de metástasis ha sido estudiado detalladamente. Se han descrito varios pasos durante el proceso de metástasis, todos ellos involucran la participación de moléculas de adhesión (receptores y proteínas de matriz extracelular), las cuales median la capacidad migratoria e incluso la expresión de otras proteínas (Yamada, 1995). Las etapas de la metástasis se describen a continuación y se representan en la figura 1.

1. *Generación de nuevos vasos sanguíneos o angiogénesis.* Es esencial para que las células tumorales obtengan los nutrientes necesarios para el crecimiento, así como aumentar las posibilidades de que alguna célula se desprenda del tumor primario y alcance la circulación. El proceso de angiogénesis requiere de varios eventos:

- i) La degradación de la lámina basal que recubre los capilares.
- ii) La migración y proliferación de células endoteliales en cercanía del tumor.
- iii) La formación de una nueva membrana basal sobre el capilar que se va formando (Warren, 2000).

Estos eventos pueden ser promovidos por factores de crecimiento o moléculas llamadas péptidos angiogénicos que frecuentemente son secretados por las células

tumorales. Algunos ejemplos de estos péptidos son: el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento epidermal (EGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Estos pueden iniciar directamente el proceso de angiogénesis al estimular la proliferación y migración de las células endoteliales (Lu, 1994).

2. *Invasión de las células neoplásicas.* Los mecanismos utilizados por las células tumorales para llegar a torrente circulatorio son prácticamente los mismos que los utilizados por células normales e involucran superar las barreras de matriz extracelular. En general, estos mecanismos pueden dividirse en tres etapas:

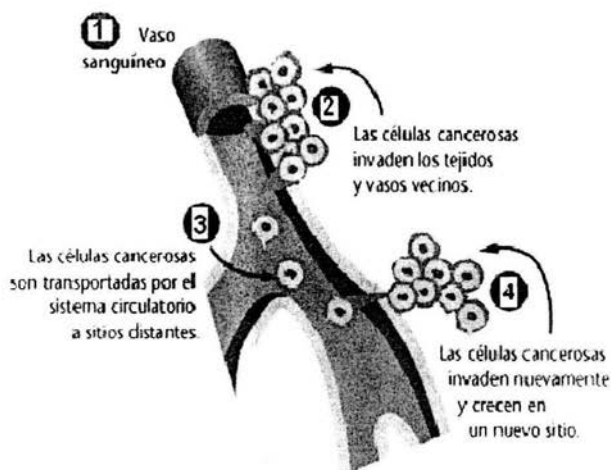
- a) Presión mecánica del tumor contra la lámina basal.
- b) Incremento de la síntesis y secreción de enzimas proteolíticas.
- c) Incremento en la motilidad individual de las células tumorales.

Debido a la rápida proliferación de las células tumorales, estas ejercen una presión mecánica sobre el endotelio vascular disminuyendo su resistencia y facilitando su ruptura (Franks, 1998). Por otro lado las células tumorales contienen altos niveles de proteasas y colagenasas, lo que contribuye a la capacidad invasiva del tumor. Existen varios factores que favorecen la movilidad. Uno de ellos consiste en factores secretados por las células tumorales o factores de motilidad autócrinos de los cuales ya se han identificado por lo menos 11, entre ellos se encuentran el factor de crecimiento II tipo insulina (IGF-II) y la autotaxina (ATX) (El-Badry, 1990, Stracke, 1992). Las proteínas de matriz extracelular como vitronectina, fibronectina, lamina colágena I o colágena IV, actúan también como factores de movilidad estimulando la quimiotaxis (a través de gradiente químico) y la haptotaxis (estimulada a través de la unión al sustrato) (Klominek J. 1993). Por último se encuentran los factores de crecimiento secretados por el sistema inmune como la interleucina 8 y la histamina (parácrinos) (Wang, 1990, Tilly, 1990). Los factores de

movilidad también contribuyen en cambios en la forma celular produciendo la formación de pseudópodos, rearreglos del citoesqueleto y fluidez de la membrana (Woodhouse, 1997).

3. *Interacción con células sanguíneas y extravasación.* Una vez que las células tumorales invaden los vasos linfáticos o vasculares interaccionan con plaquetas, linfocitos o neutrófilos, estimulando el depósito de fibrina para formar agregados que se adhieren en alguna red capilar de un órgano distante (Hilgard, 1984). Las células presentes en el agregado inician el daño sobre la pared de los vasos. Cuando los agregados se forman por plaquetas estas liberan histamina lo que promueve la permeabilidad capilar y la subsecuente migración de las células tumorales (Franks, 1998).
4. *Proliferación en el sitio secundario.* En esta etapa son indispensables factores de crecimiento. Por ejemplo las células de melanoma, a diferencia de los melanocitos, producen una gran cantidad de reguladores de crecimiento positivos como el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) que funciona como un factor de crecimiento autócrino (Halaban, 1988) y el IGF-I como un factor de crecimiento parácrino (Schanderdorf, 1993). Otros ejemplos son factor de crecimiento epidermal e IL-8 (Wit, 1992).





**Figura 1.** Etapas del proceso de metástasis:

(1) *Angiogénesis.* Durante esta etapa se realiza la formación de nuevos vasos sanguíneos que le proporcionaran nutrientes a la células tumorales y aumentaran su probabilidad de que alcancen la circulación.

(2) *Invasión.* En esta etapa las células tumorales invaden los vasos cercanos para llegar a la circulación.

(3) *Interacción con células sanguíneas y extravasación.* En este estadio las células tumorales viajan vía circulación con ayuda de las células sanguíneas hasta detenerse en otro órgano distante donde puedan establecerse.

(4) *Proliferación* en el sitio secundario. Esta etapa se caracteriza por una proliferación de las células tumorales para colonizar el sitio secundario.

## 2. ADHESIÓN A MATRIZ EXTRACELULAR (MEC).

### 2.1 Integrinas.

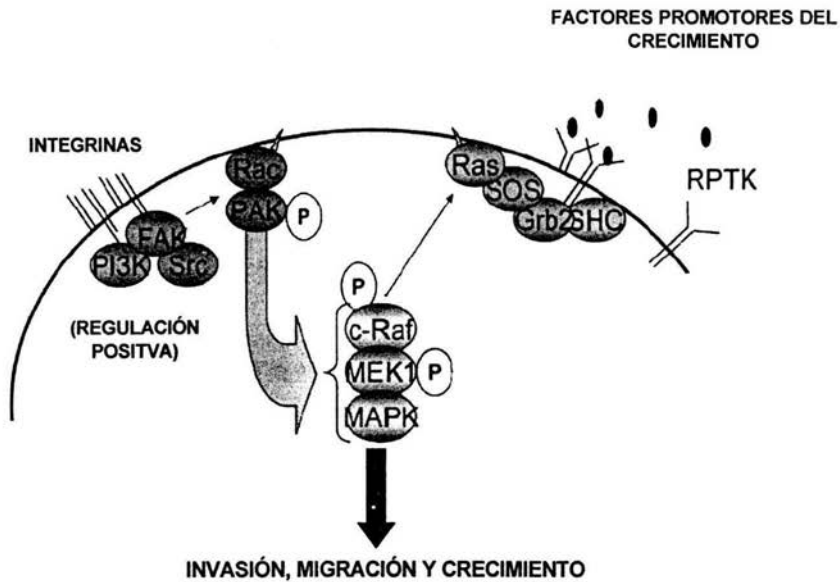
Las integrinas son una familia de glicoproteínas que funcionan como receptores a moléculas de la matriz extracelular. Están formadas por dos subunidades;  $\alpha$  (120-180 kDa) y  $\beta$  (90-110 kDa) y la especificidad de ligando se logra por las combinaciones entre estas subunidades. Actualmente se han identificado 24 tipos de subunidades  $\alpha$  y 9 de  $\beta$  (Danen, 2001). Ambas subunidades contienen puentes disulfuro internos que estabilizan la conformación de las cadenas peptídicas. Las integrinas reconocen en su ligando una secuencia peptídica específica (i.e. Arg-Gly-Asp) (Ruoslathi, 1996) y como consecuencia, se agrupan en complejos especializados conocidos como *sitios de adhesión focal*. Los complejos formados funcionan como conexión entre la matriz extracelular y el citoesqueleto, y generan señales que regulan la migración y la proliferación. En los sitios de adhesión focal se concentran, además de integrinas, proteínas del citoesqueleto y algunas cinasas (LaFlamme, 1996).

#### 2.1.1. Vías de señalización dependientes de integrinas.

La unión al ligando y la agregación de integrinas provocan un cambio conformacional en el dominio citoplasmático de la subunidad  $\beta$  que induce la activación de la cinasa de adhesión focal (FAK). FAK, que es una de las moléculas más importantes en la señalización mediada por integrinas, está formada por tres dominios:

- a) Un dominio amino terminal que se une a la subunidad  $\beta$  de las integrinas.
- b) Un dominio central con actividad de tirosina-cinasa,
- c) Un extremo carboxilo terminal que puede unirse a otras moléculas del complejo de adhesión focal (Schaller, 1995 A). En células no adheridas FAK esta desfosforilado; una vez que las integrinas se unen a su ligando, FAK se recluta a la región submembranal donde se activa y se autofosforila en el residuo Tyr 397 generando un

sitio de enlace de alta afinidad para la proteína tirosina cinasa c-Src, de la cual FAK es sustrato (Schaller M.1995 B). Los residuos de tirosina fosforilados sirven para la unión de moléculas que inician cascadas de señalización, por ejemplo, la unión de Grb2 conecta el estímulo inicial con la vía de Ras (Schlaepfer, 1994) modificando las vías de señalización activadas por factores de crecimiento. La estimulación por factores de crecimiento envuelve la activación consecutiva de Ras, Raf, MEK y finalmente la proteína –cinasa activada por mitógenos (MAPK). Por lo tanto, las vías de señalización mediadas por integrinas, que incluyen a FAK y Src, están directamente implicadas en la regulación de MAPK. Como consecuencia a la activación de la vía Ras/MAPK se activa la expresión y el ensamblaje de las ciclinas y las cinasas dependientes de ciclinas, principales moléculas reguladoras del ciclo celular (Lodish, 2000). De esta manera, regulan la migración, invasión y crecimiento celular tal como se muestra en el Figura 2.



**Figura 2.** Regulación de la proliferación, motilidad e invasión celular mediada por integrinas.

La activación de los receptores de la familia de las integrinas promueve la formación de sitios de adhesión focal donde se encuentran diferentes cinasas como FAK, Src y PI3K. La actividad de estas cinasas provoca el encendido de cascadas de señalización. Una de ellas es la vía de Ras /MAPK que actúan en conjunto con factores promotores del crecimiento para promover funciones celulares como la migración, la proliferación y la invasión.

## 2. 2 Participación de las integrinas en el proceso de metástasis.

Para desarrollar una metástasis exitosa es necesaria la habilidad de las células tumorales para adherirse a componentes de la matriz extracelular y a otras células (Woodhouse, 1997). Las integrinas juegan un papel crucial en la unión de células tumorales a MEC. Se ha reportado que en varias etapas de la generación de metástasis el patrón de expresión de integrinas se encuentra alterado.

a) **Angiogénesis.** Los factores angiogénicos secretados por células tumorales provocan cambios en el comportamiento adhesivo, migratorio y proliferativo de las células del endotelio vascular. Por ejemplo el VEGF aumenta 400% la expresión de integrinas  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 2\beta 1$  en células endoteliales (Senger, 1997).

b) **Desprendimiento del tumor primario.** Para que las células tumorales puedan llegar a la circulación es necesario que se desprendan de la masa tumoral. Un ejemplo que ilustra el papel de las integrinas en esta etapa es la expresión disminuida o abolida, en los tumores más invasivos, de algunas subunidades  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  que forman parte de integrinas capaces de unir colágena y laminina (Albeda, 1993).

c) **Interacción de células tumorales con plaquetas.** Una vez que las células tumorales han llegado a la circulación se unen a plaquetas para poder viajar a un nuevo sitio de colonización. La integrina  $\alpha IIb\beta 3$  se expresa tanto en plaquetas como en algunas células tumorales y favorece la unión entre ambas células (Dardik, 1997)

d) **Adhesión al endotelio vascular.** El papel de las integrinas en este paso se ejemplifica con la integrina  $\alpha v\beta 3$  que se expresa solo en células de tumores malignos, ésta se une a PECAM-1 que es una molécula que se expresa en el endotelio vascular lo que facilita la extravasación de células tumorales (Van Waes, 1995). Por otro lado, la expresión de la integrina  $\alpha 4\beta 1$  (VLA-4) que une VCAM-1 una proteína de la superfamilia de las inmunoglobulinas y que se expresa en el endotelio vascular, se

encuentra aumentada en un 40% en melanomas invasivos y metastáticos (Albeda, 1990).

e) Proliferación. Un ejemplo de cómo las integrinas intervienen en la proliferación de células cancerosas es la pérdida de la expresión de la integrina  $\beta 1$ , que ocurre en etapas tempranas de la tumorigénesis prostática y esta correlacionada con un incremento en la proliferación de la lesión neoplásica (Fornano, 1996).

### **2.3 Regulación redox de la adhesión a MEC.**

#### **2.3.1 Especies reactivas de Oxígeno (ERO).**

El oxígeno molecular es esencial para la supervivencia de los organismos aeróbicos. El metabolismo aeróbico es dependiente de la fosforilación oxidativa y de procesos mediante los cuales la energía de oxidorreducción obtenida del transporte mitocondrial de electrones es convertido a enlaces fosfato de alta energía en moléculas como ATP. La reducción parcial del oxígeno durante estas y otras reacciones de transferencia de electrones genera metabolitos altamente reactivos. Estos metabolitos incluyen al anión superóxido ( $O_2^-$ ) y al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), formados por una o dos reducciones electrónicas del oxígeno respectivamente y en presencia de metales de transición puede formarse el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ) que al igual que los anteriores es altamente reactivo. Por eso, estos metabolitos parcialmente reducidos son conocidos como especies reactivas de oxígeno (ERO) (Thannickal, 2000).

La producción de ERO ocurre por fuentes enzimáticas y no enzimáticas (Thannickal, 2000). Uno de los sistemas enzimáticos más activos en la producción de  $O_2^-$  en células es el complejo asociado a la membrana plasmática, NAD(P)H oxidasa. Este complejo cataliza la producción anión superóxido mediante la reducción de oxígeno utilizando NADPH como donador de electrones (Babior M. 1999). La NADPH oxidasa de

fagocitos y linfocitos B se compone de seis elementos: p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup> (phox por PHagocyte OXidase), la GTPasa Rac2 (que se encuentran en el citoplasma), p22<sup>phox</sup> y gp91<sup>phox</sup> (localizadas dentro de vesículas membranales) (Barbior M. 1999). Estas dos últimas subunidades forman el heterodímero inactivo del citocromo b558. Cuando una célula en reposo es expuesta a un estímulo, el componente p47<sup>phox</sup> es altamente fosforilado por la proteína-quinasa C o por MAP cinasas, con la consecuente migración del complejo citosólico a la membrana donde se asocia a un citocromo b<sub>558</sub> para armar la oxidasa activa (Werner, 2004). En células no fagocitarias la NADPH oxidasa funciona como un sensor de la presión de oxígeno modificando la producción de anión superóxido (Wang, 1996).

### **2.3.2 Papel de ERO en células neoplásicas.**

Al igual que en las células normales, pero en mayor proporción, las células tumorales producen espontáneamente ERO. Esto ya ha sido demostrado para siete tipos de líneas celulares tumorales humanas con capacidad de adhesión (Szatrowski, 1991). Éstas juegan un papel primordial en la proliferación de células neoplásicas. Se sabe que la señalización mitogénica de Ras y Rac esta regulada por O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Nimnual, 2003). Las ERO activan factores de transcripción como NF-κB en células de melanoma (Sukhedeve, 2002) y API (Thannickal, 2000). Por otro lado Nox 1, un homólogo de la subunidad catalítica (gp 91<sup>phox</sup>) de la NADPH oxidasa fagocitaria, se encuentra sobre-expresado en células de adenocarcinoma de colon humano (Cheng, 2001, Kikuchi, 2000). Incluso muchas células no malignas expuestas a peróxido de hidrógeno muestran un incremento en su proliferación (Burdon 1995). Las ERO pueden producir estos efectos mediante la modulación redox de proteína cinasas y proteína fosfatasas. Al cambiar el balance entre estas enzimas, pueden alterar prácticamente todos los mecanismos moleculares de la célula y modificar sus funciones como proliferación,

adhesión celular, expresión de genes, etc. (Pieri, 2003). En células tumorales, como las células de carcinoma (HCPC-I), la sobre-expresión de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (MnSOD) y la catalasa se encuentra directamente relacionada con la capacidad metastásica (Lam, 1999).

### ***2.3.3 Modulación redox de la adhesión mediada por integrinas.***

El mecanismo por el cual las especie reactivas de oxígeno intervienen en el proceso de adhesión a matriz extracelular aún no esta claramente descrito. En diferentes estirpes celulares los efectos de ERO en la adhesión son ambiguos, probablemente debido a que muchos mecanismos moleculares pueden estar sujetos modulación redox.

Por ejemplo: el tratamiento exógeno de células PC12 (una línea celular neuronal no cancerosa) con  $H_2O_2$ , produce una inhibición específica dependiente de la dosis en la adhesión a colágena (Zhang, 1994). De manera similar, las células TM (malla trabecular) las cuales son parecidas a las células endoteliales disminuyen su adhesión a fibronectina, laminina y colagena I y IV después del tratamiento con  $H_2O_2$  (1mM) durante 10 min. Este tratamiento modifica también la distribución de paxilina y de FAK en el sitio de adhesión focal, así como el acortamiento de las fibras de estrés de actina (Zhou, 1999). Las células endoteliales ECV304 disminuyen su adhesión a colágena después de 10 min de tratamiento con terbutil-hidroxiperoxido (t-BHP). No sucede lo mismo una línea celular de hibridoma epitelial EAhy926 donde la adhesión se aumenta en un 15% y 30% después del tratamiento con t-BHP a 125 y 250  $\mu M$  respectivamente. Este incremento se enfatiza en 40 % con el uso del antioxidante  $\alpha$ -D-Tocoferol y en el caso de las células ECV304 la disminución en la adhesión se previene (Lamari, 2001). Por otro lado los eosinofilos muestran un aumento en la adhesión a células endoteliales del cordón umbilical humanas al ser tratadas con  $H_2O_2$  dependiente de la

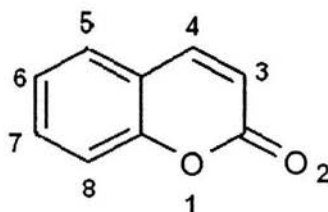


dosis, alcanzando su efecto máximo a  $1\mu\text{M}$ . Este efecto, que es revertido mediante la adición de catalasa, parece ser dependiente de las integrinas, que contienen la subunidad  $\beta 2$  (Nagata, 2000).

### 3.CUMARINAS.

#### 3.1 Generalidades de las cumarinas.

Las cumarinas son un grupo de compuestos pertenecientes a las benzopironas. Estas presentan un benceno unido a un anillo heterocíclico de seis miembros, el cual contiene un átomo de oxígeno y cinco carbonos con hibridación  $sp^2$  ( $\alpha$ - pirona). La estructura química de la cumarina, llamada también 1,2-benzopirona del ácido orto-hidroxifenil-propenoico, se muestra en la figura 3. Tiene un peso molecular de 146.15 g/mol, un punto de fusión de 68-70°C y un punto de ebullición de 303°C. Es soluble en etanol, cloroformo y aceites (O'Kennedy, 1997).

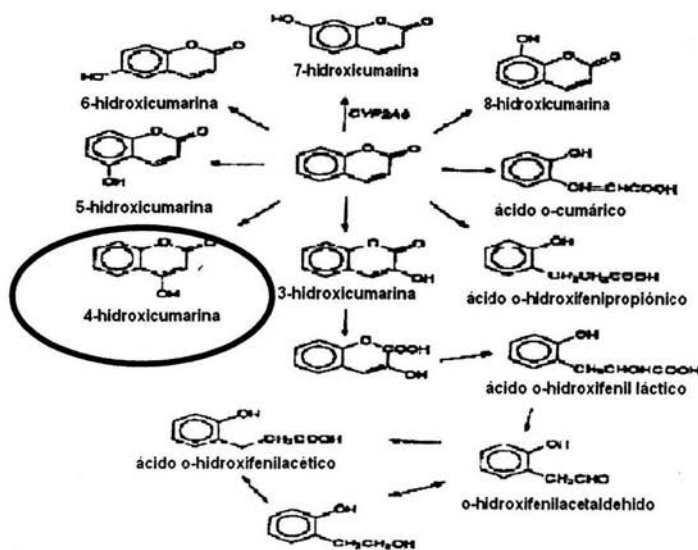


**FIGURA 3.** Estructura química de la cumarina (1,2 benzopirona). Los números representan las posiciones donde se pueden localizarse los sustituyentes.

Las cumarinas se encuentran libres en la naturaleza como metabolitos secundarios de una gran cantidad de microorganismos y plantas como el haba de tonka, el clavo, el trébol dulce y en algunos aceites esenciales como el de lavanda (Nair, 1991). Hasta la fecha se han encontrado más de 800 especies de plantas y microorganismos que producen cumarinas y se han descrito más de 100 derivados cumarínicos diferentes (National Toxicology program, 1992). En las plantas, las cumarinas se encuentran principalmente en las hojas y follaje actuando como repelente a insectos y algunos Otros invertebrados terrestres. Estos compuestos comenzaron a utilizarse por el hombre más por sus cualidades aromatizantes que por sus actividades biológicas. El uso en animales y humanos como bacteriostáticos y virustáticos e incluso como citostático se extrapoló del conocimiento de su capacidad en plantas para inhibir la germinación de las semillas y el crecimiento de la raíz (Scheel, 1972). La cumarina presenta también efectos sedativos hipnóticos, antipiréticos y antiinflamatorios. Sin embargo, la aplicación terapéutica de la cumarina es como anti-edematoso y vasodilatador (Casley, 1973).

La cumarina es metabolizada rápidamente por el sistema enzimático P450. En humanos tiene una vida media de una hora a una hora y media y el metabolito que se forma primordialmente es la 7-hidroxicumarina. Esta reacción está catalizada por la isoforma CYP2A6 (Cohen, 1979). Además de la 7-hidroxicumarina se producen en menor cantidad Otros derivados monohidroxilados en las posiciones 3, 4, 5, 6, y 8 (Ritschel, 1979). Alternativamente, el anillo lactónico puede hidrolizarse y producir ácido o-hidroxifenilacético y ácido-o-hidroifeniláctico. De estos anteriores se pueden obtener productos acetilados o metoxilados. Las vías metabólicas de la cumarina se muestran en el figura 4. Los productos de biotransformación varían cuantitativamente dependiendo de la especie (Cohen, 1979), por ejemplo, el metabolito que se forma en mayor proporción en el ratón es la 3-hidroxicumarina (O'Kennedy, 1997). Estos

metabolitos tienen una vida media considerablemente más larga, lo que hacen pensar que la cumarina actúa como un profármaco. Al respecto, se ha reportado que la 7-hidroxicumarina inhibe la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos con una magnitud parecida al ácido acetilsalicílico (Lee, 1981). Otras cumarinas como la esculetina (6,7-dihidroxicumarina) y la fraxetina (7,8-dihidroxi-6-metoxicumarina) presentan actividad inhibitoria de la ciclo y lipooxigenasa y activan la producción de anión superóxido en neutrófilos (Ozaki, 1986).



**FIGURA 4.** Vías metabólicas de la cumarina. Se muestran los metabolitos de la cumarina, en el círculo se muestra la estructura de la 4-hidroxicumarina (Tomado de Thornes, 1997).

### 3.2 ACTIVIDAD ANTINEOPLASICA DE LAS CUMARINAS.

Derivados cumarínicos como la warfarina, que actualmente son utilizados como anticoagulantes, comenzaron a utilizarse en el tratamiento de neoplasias para prevenir la formación de estroma de fibrina alrededor del tumor que se relaciona con la producción de metástasis. Se ha demostrado que la warfarina, en combinación con Otros tratamientos, alarga al doble la sobrevida de pacientes con carcinoma pulmonar (Zacharski, 1981). El efecto antineoplásico de los derivados cumarínicos no se debe a sus propiedades anticoagulantes. La administración de vitamina K antagoniza la acción anticoagulante de derivados cumarínicos como la warfarina, pero no antagoniza el efecto antineoplásico.

La cumarina, aún cuando carece de efecto anticoagulante, tiene actividad antineoplásica e inhibe la activación metabólica de carcinógenos potenciales. Se ha demostrado que la cumarina tiene actividad antineoplásica *in vivo* en melanomas malignos (Zänker, 1984), carcinoma renal metastásico (Dexeus, 1990) y en carcinoma prostático (Mohler, 1994). En un estudio *in vitro* se observó que la cumarina inhibe el crecimiento de 14 diferentes líneas tumorales humanas (Marshall, 1994 B). La cumarina es considerablemente menos tóxica que la warfarina por lo que puede ser administrada a dosis mayores sin efectos teratógenos (Cox, 1989). Estudios en humanos han demostrado la tolerancia de hasta 7 gramos diarios de cumarina con efectos adversos de poca importancia y reversibles al suspender el tratamiento (Marshall, 1994 A).

Se desconocen los mecanismos exactos involucrados en los efectos antineoplásicos y antimetastásico de la cumarina. Para explicar sus acciones se han propuesto dos mecanismos principales:

- 1) La inhibición del crecimiento de algunas células tumorales.
- 2) La estimulación de ciertos componentes del sistema inmune que participan en la reacción contra el tumor.

Respecto a la acción inmunoestimulante, se ha reportado que la cumarina tiene un efecto sinérgico *in vitro* con una endotoxina bacteriana estimulando la secreción de factores solubles (IL-1 $\beta$ , IL-6). En la cepa C57BL/6 la cumarina, a dosis de 80 mg/Kg, incrementa la actividad fagocitaria de macrófagos peritoneales murinos hasta en un 160% respecto a los controles (Orozco, 2000).

Algunos de los productos de biotransformación de la cumarina pueden tener actividad inmunoestimulante, antineoplásica y antimetastásica mayor que la cumarina (Moran, 1987.) Por ejemplo, la 7-hidroxycumarina (2 mM) inhibe el crecimiento *in vitro* de células del adenocarcinoma pulmonar humano línea A549. Este mismo compuesto es un inhibidor más potente del crecimiento *in vitro* de líneas tumorales, que la cumarina misma. En estos ensayos se ha demostrado que en las células expuestas al fármaco se disminuye la incorporación de análogos de timidina, aunque se desconocen los mecanismos moleculares que modulan estos efectos. Se ha propuesto que la cumarina y la 7-hidroxycumarina pueden controlar el crecimiento de ciertos tumores a través de la regulación de la expresión de oncogenes, ya que estudios moleculares en células transfectadas con los oncogenes *ras* y *myc* han mostrado que la 7-hidroxycumarina disminuye los niveles de RNA mensajero de dichos oncogenes (O' Kennedy, 1997). Por otro lado, se sabe que la 4-hidroxycumarina tiene efectos *in vitro* sobre el rearreglo del citoesqueleto de actina de células B16, modificando la motilidad celular. Estos cambios correlacionan con la disminución en la fosforilación de tirosinas

en células tratadas con 4-hidroxycumarina (Velasco, 2003). Las cumarinas por si mismas pueden actuar como eliminadores de especies reactivas de oxígeno, por lo que la actividad farmacológica de las cumarinas en pacientes con cáncer también puede estar relacionada con la inhibición del daño asociado a la presencia de ERO (Paya, 1992).

## **II. HIPÓTESIS.**

Diferentes sustituciones en la posición 4 de la cumarina producirán diferentes modificaciones en la adhesión de células B16 a moléculas de la matriz extracelular sin alterar la viabilidad celular. Estos efectos estarán asociados con diferencias en la producción de ERO.



### III. OBJETIVOS.

#### OBJETIVO GENERAL.

Analizar el efecto del tratamiento *in vitro* con cumarinas sustituidas en la posición 4, sobre la adhesión de células B16 de melanoma murino a moléculas de matriz extracelular.

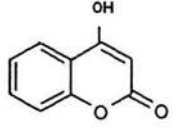
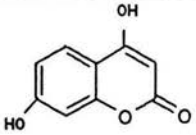
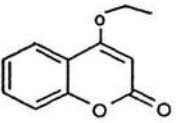
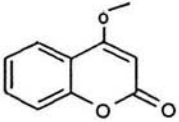
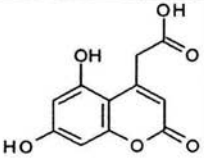
#### OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Analizar el efecto de cinco cumarinas sustituidas en la posición 4 sobre la viabilidad celular.
2. Evaluar la capacidad de adhesión a componentes de la matriz extracelular de las células de melanoma murino B16 tratadas con cumarinas 4-sustituidas.
3. Evaluar el efecto de peróxido de hidrógeno sobre la adhesión de células B16 a componentes de la matriz extracelular.
4. Analizar el efecto de los tratamientos en la producción de peróxido de hidrógeno.

## 5. IV. MATERIAL Y METODOLOGÍA.

## COMPUESTOS.

Tabla 1. La estructura química de las diferentes cumarinas sustituidas en la posición 4 empleadas en este estudio.

NOMBRE	SUSTITUYENTES			ESTRUCTURA QUIMICA	ABREVIATURA
	4	5	7		
4-hidroxycumarina	-OH	-	-		4HC
4,7-dihidroxycumarina	-OH	-	-OH		4,7HC
4-acetoxicumarina	-OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-	-		4AC
4-metoxicumarina	-OCH <sub>3</sub>	-	-		4MC
Ácido (5,7-dihidroxi 2-oxo-2H cromen-4il) acético	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	-OH	-OH		A4IA

## **MATERIAL BIOLÓGICO**

Las células B16 de melanoma murino se cultivaron en medio RPMI el cual es adecuado para el cultivo de células de mamíferos. Este medio contiene glucosa, folato, L-glutamina, rojo de fenol. Fue suplementado con 10% de suero bovino fetal y una mezcla de antibióticos (penicilina 5 mg/mL, estreptomicina 10 mg /mL y neomicina 10 mg /mL, Gibco), utilizando botellas de cultivo de 80 cm<sup>2</sup> de área (Nunc). Se incubaron a una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % a temperatura constante de 37°C. Las células se cosecharon con tripsina/EDTA (0.05%/0.5 mM, Gibco) y se contaron en un hematocitómetro donde se evaluó simultáneamente la viabilidad por exclusión de azul tripan. Para los experimentos reportados se utilizaron cultivos con viabilidad mayor o igual al 95%.

## **PRUEBA DE VIABILIDAD POR REDUCCIÓN DE METILTETRAZOLIO (MTT)**

Las células se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de  $5.0 \times 10^3$  células por pozo en medio RPMI suplementado con suero bovino fetal (10 %). Estas placas se incubaron toda la noche en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % a temperatura constante de 37°C para permitir la adhesión de las células. Después se intercambió el medio suplementado por 100 µL de medio condicionado (sin suero) conteniendo el compuesto a evaluar a las siguientes concentraciones: 5, 16, 50, 160 o 500 µM o, en el caso de los controles, etanol (disolvente de las cumarinas) al 0.75%. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Transcurridas 24 horas se evaluó la viabilidad de las células tratadas mediante el ensayo colorimétrico de reducción del bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol -2-il]-2-5-difenil tetrazolio (MTT). Este ensayo se basa en la capacidad de las células vivas de reducir el MTT soluble en agua y de color amarillo, a formazán de MTT (1-[4,5-dimetiltiazol -2-il]3-3-5-difenil formazán ) insoluble en agua y de color

púrpura mediante la acción succinil–deshidrogenasa mitocondrial. Para realizar esta prueba se adicionaron 15  $\mu$ L de solución de MTT al 0.5 % al medio existente en cada pozo. Se procedió a incubar durante 2 horas a 37° C y posteriormente se retiró el medio. Enseguida se adicionaron 100  $\mu$ L de dimetil sulfóxido (DMSO) para disolver los cristales de formazán de MTT. Las placas se leyeron a una longitud de onda de 570 nm en un lector de microplacas (Biotek EL311) siendo la absorbancia una medida proporcional de número de células vivas en el pozo (Mosmann, 1983). Los datos se compararon estadísticamente mediante la modificación de Bonferroni a la prueba t-student, con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05.

#### **ENSAYOS DE ADHESIÓN A MOLÉCULAS DE MATRIZ EXTRACELUAR.**

Dos poblaciones de  $2 \times 10^6$  células B16 fueron sembradas simultáneamente en placas Petri (Nunc) para cultivo de tejidos utilizando medio RPMI suplementado y se dejaron adherir durante toda la noche. Al igual que en los ensayos de viabilidad el medio suplementado se cambió por medio condicionado conteniendo el compuesto en una concentración de 500  $\mu$ M o etanol al 0.75%. Tras 24 horas de exposición, las células se cosecharon por separado y se utilizaron para cuantificar la adhesión a moléculas de MEC. El día anterior a los ensayos de adhesión, diferentes pozos de una microplaca fueron cubiertos con las siguientes moléculas de matriz extracelular: fibronectina (5  $\mu$ g/mL), laminina (5  $\mu$ g/mL), colágena IV (20  $\mu$ g/mL) o vitronectina (1 $\mu$ g/mL) y se incubaron toda la noche a 4°C. Para cada condición (tratamiento/ molécula de MEC) se utilizaron 4 pozos. Posteriormente se retiraron las soluciones de las moléculas de MEC y se bloquearon los pozos con 150  $\mu$ L de solución de albúmina desnaturalizada (10 mg/mL) durante 60 min. Para utilizarlos como controles de la adhesión inespecífica, se bloquearon pozos sin molécula de matriz extracelular. La adhesión se

cuantificó adicionando  $4.0 \times 10^4$  células (tratadas o controles) a los pozos correspondientes. Tras incubar durante 25 min. los pozos se lavaron con el fin de retirar aquellas células que no se adhirieron a la matriz extracelular. Las células remanentes (adheridas) se cuantificaron utilizando la técnica de reducción de MTT como se describió anteriormente en la prueba de viabilidad. Para cuantificar el porcentaje de células adheridas las lecturas de absorbancia se interpolaron en curvas patrón realizadas tanto para células tratadas con etanol como para las tratadas con la cumarina correspondiente. El porcentaje de células tratadas con cumarinas que se adhirieron a las distintas moléculas de MEC se comparó con su respectivo control de etanol utilizando la modificación de Bonferroni a la prueba t-student, con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05. Cada ensayo se realizó de manera independiente de tres a cuatro veces.

Para la evaluación del efecto del peróxido de hidrógeno sobre adhesión de células B16 a vitronectina, se utilizaron células sin tratamiento previo. Durante el tiempo en el que se permite la adhesión las células fueron expuestas a la concentración correspondiente de peróxido de hidrógeno (6, 12, 25, 50, 100 o 200  $\mu\text{M}$ ). Tras realizar los lavados correspondientes para eliminar las células no adheridas, los pozos se lavaron con buffer de fosfatos salino ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  7 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.5mM y NaCl 0.8%) para eliminar los restos de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y evitar la interferencia de este compuesto con el método de detección MTT. La señal correspondiente a cada tratamiento se normalizó comparándola con la señal del control de etanol.

## **PRODUCCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO MEDIANTE EL ENSAYO DE $\text{Fe}^{3+}$ -NARANJA DE XILENOL (FOX).**

Las células de melanoma murino B16 se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de  $2.0 \times 10^4$  células por pozo en medio RPMI suplementado. Estas placas se incubaron durante una noche en una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5 % y a temperatura constante de  $37^\circ\text{C}$  para permitir la adhesión de las células. Después se intercambié el medio suplementado por 100  $\mu\text{L}$  de medio condicionado sin indicador conteniendo el compuesto a evaluar (las mismas cumarinas utilizadas en los ensayos de adhesión) a una concentración de 500  $\mu\text{M}$ . Cada tratamiento se hizo por triplicado. Se determinó la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a las 24 horas mediante el ensayo de FOX. En este ensayo iones  $\text{Fe}^{2+}$  son oxidados a  $\text{Fe}^{3+}$  debido a la presencia del peróxido. El  $\text{Fe}^{3+}$  reacciona subsecuentemente con el naranja de xilenol formando un complejo cuyo pico de absorbancia se encuentra en 560 nm (Halliwell. 2000). Al tiempo a evaluar se tomó una alícuota de 90  $\mu\text{L}$  del sobrenadante del pozo, se adicionaron 10  $\mu\text{L}$  de metanol más 900  $\mu\text{L}$  de reactivo de Fox (Hidroxitolueno butilado 4 mM en metanol, naranja de Xilenol 1 mM y sulfato ferroso amoniacal 2.56 mM). Se dejó transcurrir la reacción durante 30 min. y las muestras se leyeron espectrofotométricamente a siendo la absorbancia una medida proporcional a la concentración de peróxido de hidrógeno producido por las células. Los resultados se analizaron estadísticamente utilizando el método de análisis de varianza (ANOVA) y, posteriormente, la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples contra un control.

## V. RESULTADOS.

### VIABILIDAD.

La viabilidad se evaluó por la técnica de reducción de MTT. La Figura 5 (A – E) muestra que 4-hidroxycumarina, 4,7-dihidroxycumarina, 4-acetoxicumarina ni ácido (5,7-dihidroxi 2-oxo-2H cromen- 4il) acético afectan la viabilidad de las células B16 a ninguna de las concentraciones evaluadas (5 - 500  $\mu$ M). A pesar de que la 4-hidroxycumarina (A) disminuyó ligeramente (10%) la viabilidad celular con respecto al control de etanol, esta diferencia no es estadísticamente significativa. Por otro, la 4-metoxicumarina (figura 5, E) induce una disminución en la viabilidad del 25 % a partir de la concentración de 160  $\mu$ M. Esta diferencia, que es estadísticamente significativa, provocó que se descartara el uso de este compuesto en los ensayos de adhesión. El análisis estadístico para estos resultados se muestra en el anexo 1, tablas 2-6.

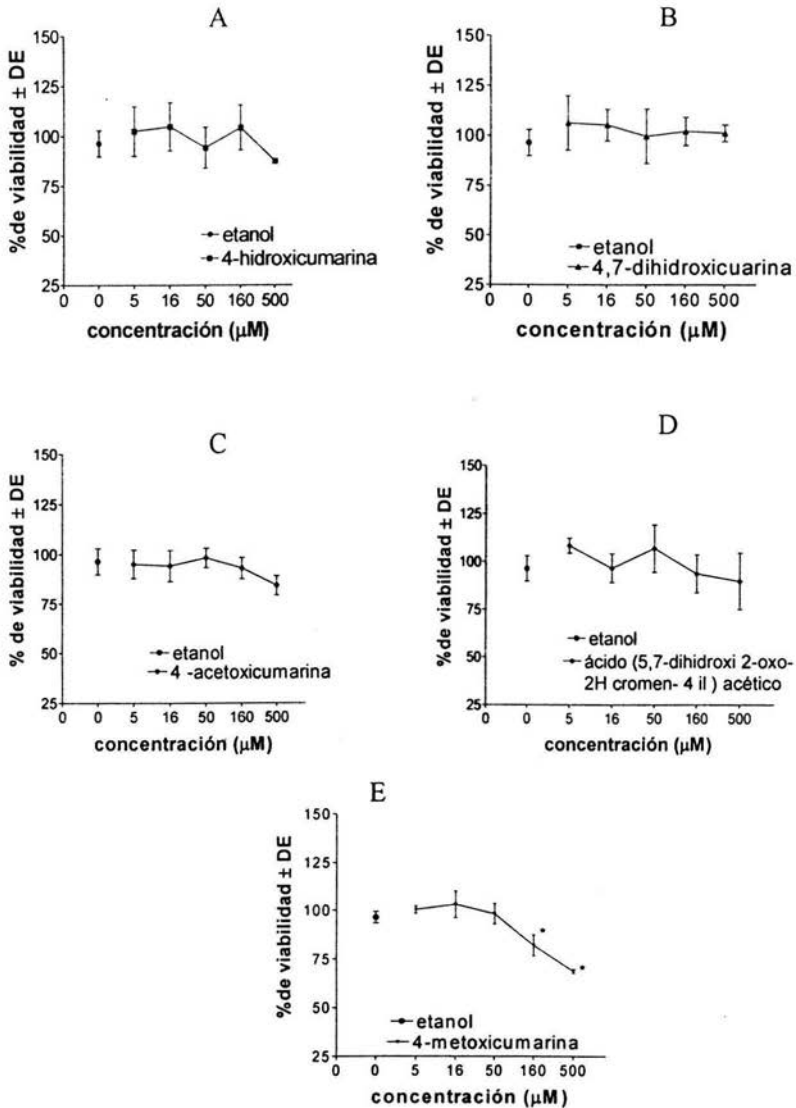


Figura 5. Efecto de cumarinas sustituidas en la posición 4 sobre la viabilidad de células B16 expuestas por 24 h. Las graficas muestran que las cumarinas utilizadas en A-D no presentan diferencias significativas con respecto a un control de etanol (0.75%) etanol. El tratamiento con 4-metoxicumarina (E) a partir de 160 μM disminuye la viabilidad celular de manera significativa. \* P<0.05



## ENSAYOS DE ADHESIÓN

Una vez que se determinó que los cuatro compuestos en estudio no afectaron la viabilidad celular, se realizaron los ensayos de adhesión a moléculas de MEC utilizando la concentración de 500  $\mu$ M. La 4-hidroxycumarina afectó la adhesión a las cuatro moléculas de MEC (Figura 6, A). El tratamiento con 4-hidroxycumarina disminuyó la adhesión a fibronectina y vitronectina a la mitad de el valor del control. Para laminina y colágena IV la adhesión disminuyó, en las células tratadas con 4-hidroxycumarina, a un quinto del control.

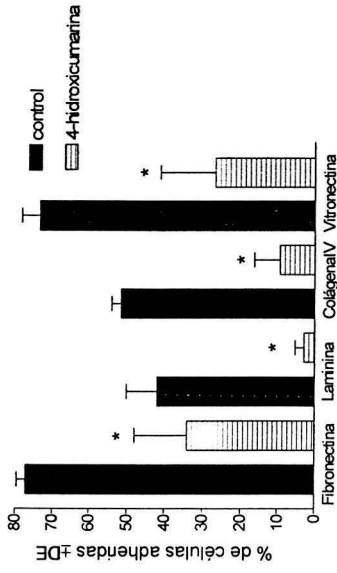
El tratamiento con 4,7-dihidroxycumarina incrementó la adhesión a las cuatro moléculas de matriz extracelular (Figura 6, B). Los incrementos fueron de aproximadamente 25 % En la adhesión a fibronectina o laminina y de casi 50 % en la adhesión a colágena IV o vitronectina.

El ácido (5,7-dihidroxi 2-oxo-2H cromen- 4 il) acético produjo un decremento de dos tercios en la adhesión a vitronectina (Figura 6, C). La adhesión a las otras moléculas de MEC evaluadas no se afectó.

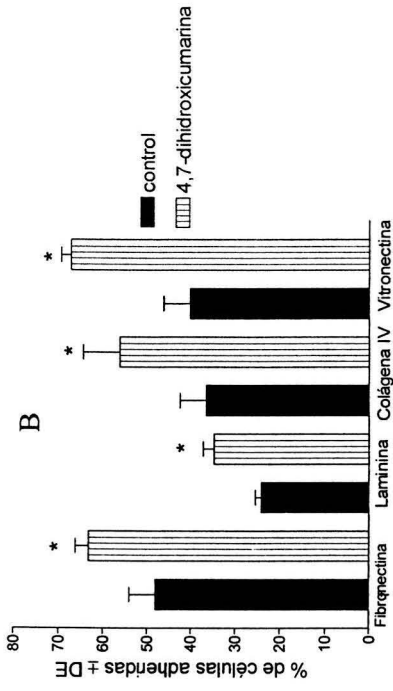
El tratamiento con 4-acetoxicumarina provocó que la adhesión a fibronectina y vitronectina se aumentara en 50% con respecto al control (Figura 6, D). Sin modificar la adhesión a laminina y colágena IV.

El análisis estadístico de estos resultados se muestra en las tablas 7-10 del anexo 1.

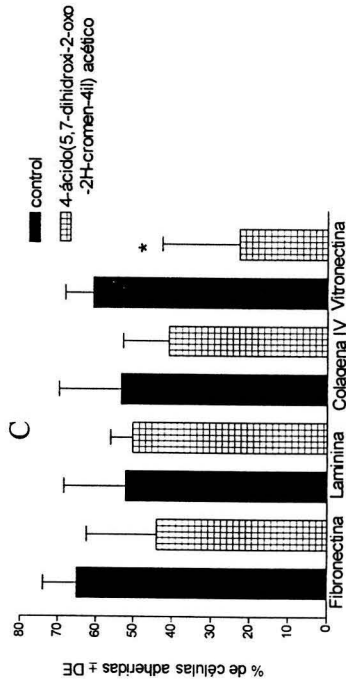
A



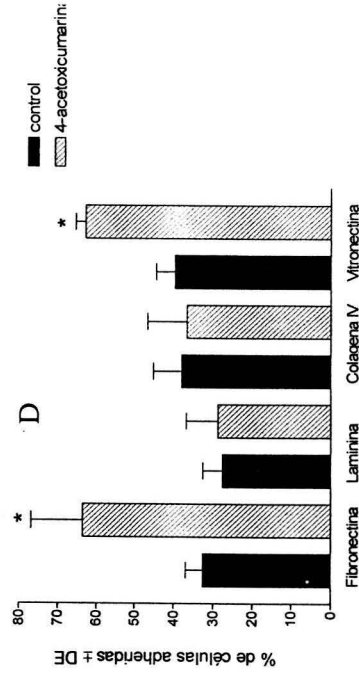
B



C



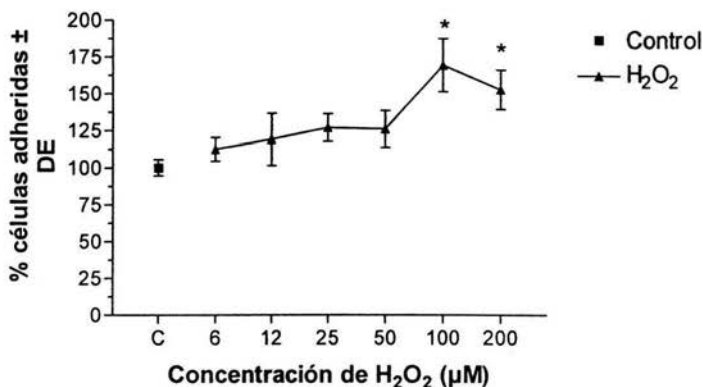
D



**Figura 6.** Adhesión a moléculas de MEC por células B16 tratadas con: A) 4-hidroxicumarina que disminuye la adhesión a las cuatro moléculas de MEC, B) 4,7-dihidroxicumarina la cual aumenta la adhesión a las cuatro molécula de MEC, C) 4-ácido (5,7dihidroxi-2-oxo-2H-cromen-4 il) acético que disminuye la adhesión solo a vitronectina y D) 4-acetoxycumarina que aumenta la adhesión a fibronectina y vitronectina. \* P<0.05.

## EFFECTO DEL PEROXIDO DE HIDROGENO SOBRE LA ADHESIÓN A VITRONECTINA.

La figura 7 representa una curva dosis–respuesta que se realizó con el objetivo de observar el efecto de  $H_2O_2$  sobre la adhesión a vitronectina de células B16. A partir de  $100 \mu M$  de peroxido de hidrogeno hay un incremento en la adhesión de un 70%, el cual disminuye ligeramente a una concentración de  $200 \mu M$ , pero aún es significativamente mayor al control. Las determinaciones estadísticas se muestran en el anexo 1, tabla 11.

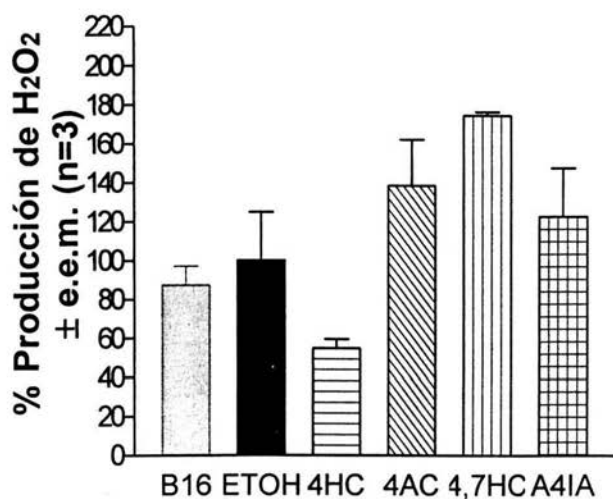


**Figura 7.** Efecto de diferentes concentraciones de  $H_2O_2$  sobre la adhesión de las células B16 a vitronectina. El  $H_2O_2$  incrementa la adhesión de células B16 a vitronectina a partir de la concentración de  $100 \mu M$ .

\*  $P < 0.05$

## PRODUCCION DE PERÓXIDO DE HIDROGENO (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

En la figura 8 se observa el efecto del tratamiento de células B16 con cumarinas sustituidas en la posición 4, sobre la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los porcentajes de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fueron obtenidos respecto al control de etanol (100%). La presencia de etanol no interviene en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a las 24 hr, lo que es un indicativo de que en estas células el etanol no modifica la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producidas de manera basal. Cualitativamente, observamos que existen variaciones en las cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido por las células B16 tratadas con los compuestos evaluados. Por ejemplo, la 4-hidroxycumarina produjo menor cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (aproximadamente 40 % menos que el control), mientras que las células tratadas con 4,7- dihidroxycumarina o 4-acetoxicumarina presentan una cantidad elevada de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (40 y 70 % mayores, respectivamente). Sin embargo, los datos representados en esta gráfica se analizaron estadísticamente utilizando análisis de varianza y, posteriormente para interpretar el resultado obtenido del análisis de varianza, se utilizó la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples contra un control. Dicho análisis indicó que la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no fue significativamente diferente al control para ninguno compuestos evaluados. La tabla de ANOVA y la de Dunnett se muestran el anexo 1, tablas 12 y 13.



**Figura 8.** Producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por células B16 tratadas durante 24 hr. con cumarinas sustituidas en la posición 4. La 4-hidroxicumarina (4HC) muestra un decremento en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mientras que la 4-acetoxicumarina (4AC) y la 4,7 dihidroxicumarina (4,7HC) aumentan la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tanto las células sin tratamiento como las tratadas con ácido (5,7-dihidroxi 2-oxo-2H cromen-4il) acético 4AIA no varían mucho en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con respecto al control de etanol. En ninguno de los casos las diferencias en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son significativamente diferentes.

## VI. DISCUSIÓN.

De los cinco compuestos evaluados, sólo uno (4-metoxicumarina) afectó la viabilidad de células B16 en el rango de concentraciones evaluado. Estos resultados concuerdan con reportes previos de la baja toxicidad de cumarinas (Cohen A. 1979). Existen Otros reportes que indican la capacidad antiproliferativa en células de melanoma de algunas cumarinas que se utilizaron en este trabajo como la 4-hidroxycumarina, 4-acetoxicumarina y la 4-metoxicumarina donde para los tres compuestos la  $IC_{50}$  es mayor a  $400\mu M$  (Satoru K. 2001). Para los ensayos de adhesión utilizamos los cuatro compuestos que no presentaron efecto tóxico a la concentración de  $500\mu M$ . Dado que no existió efecto citotóxico podemos descartar que las modificaciones en la adhesión a matriz extracelular estén relacionados con la muerte celular.

En el caso de la 4-hidroxycumarina, la disminución en la adhesión a las cuatro moléculas de MEC evaluadas correlaciona con el desarreglo del citoesqueleto de actina que provoca este compuesto (Espinoza O. 2002) y a la disminución en la cantidad de proteínas fosforiladas en tirosina (Velasco V. 2003). Como ya se mencionó, el citoesqueleto de actina y la activación de proteínas, mediante su fosforilación en tirosina, son indispensables para una adecuada adhesión.

Para los demás compuestos evaluados no existen reportes acerca de su efecto sobre la adhesión a matriz extracelular celular. Observamos que el efecto en la adhesión cambia con la presencia de Otros sustituyentes además de la hidroxilación en 4: la disustitución en las posiciones 4 y 7 invierte el efecto de la 4-hidroxycumarina aumentando la adhesión a las cuatro moléculas de MEC. En el caso de la 4-acetoxicumarina, donde tenemos un sustituyente menos polar y de mayor tamaño en la posición 4, encontramos aumentos en la adhesión a fibronectina y a vitronectina. Por último, el ácido (5,7-dihidroxi 2-oxo-2H

cromen- 4 il) acético disminuyó la adhesión a vitronectina. Estos resultados muestran que la presencia de diferentes sustituyentes en el anillo cumarínico cambia la selectividad de la adhesión a diferentes sustratos. La complejidad de los resultados y el bajo número de compuestos evaluados, nos impiden establecer una relación estructura- actividad que explique la modificación en la adhesión observada.

Se sabe que diferentes líneas celulares tumorales muestran una baja o nula expresión de enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (*MnSOD*), y que esto está relacionado con la invasividad de los tumores (Lam W. 1999). Además, existen diferentes evidencias de que el  $H_2O_2$  estimula la adhesión celular mediada por integrinas. En fibroblastos murinos tratados con DPI (inhibidor de la NADPH oxidasa) o con el antioxidante N-acetilcisteína (NAC) se observa una disminución de la adhesión a fibronectina (Chiarugi P.2001). El tratamiento de células B16 con concentraciones subtóxicas de  $H_2O_2$  produce un aumento en la adhesión a células del endotelio hepático (HSE), debido a la unión de la molécula-1 de adhesión vascular (VCAM-1) al receptor VLA-4 (integrina  $\alpha 4\beta 1$ ). En el mismo trabajo se demostró que el aumento en la adhesión puede prevenirse con la sobreexpresión de catalasa o con la adición del antioxidante NAC (Mendoza L. 2001). La adhesión celular requiere de la activación de Rho para formar fibras de estrés; dicha activación es inducida por la producción de ERO dependiente del complejo Rac/ NADPH oxidasa (DPI-sensible). Al mismo tiempo, Rac promueve la organización de actina en estructuras corticales; tanto estas estructuras como las fibras de estrés son necesarias para la adhesión (Nimnual A. 2003, Nobes D. 1995). En conjunto estos datos, sugieren que la producción de ERO por células neoplásicas pudiera funcionar como un mecanismo de estimulación autócrino. En este trabajo demostramos que la línea celular cancerosa B16, donde el peróxido de

hidrógeno estimula la adhesión a vitronectina, es sensible a la modulación de adhesión a matriz extracelular por ERO.

El mecanismo por el cual  $H_2O_2$  y otras ERO regulan la adhesión no se ha identificado totalmente, pero se sabe que pueden modular de manera directa a las integrinas o pueden modificar de las vías de transducción de señales dependientes de integrinas. En el caso de la regulación directa existe evidencia de que los tioles superficiales que se encuentran en las subunidades constituyentes de las integrinas están sujetos a la oxidación por ERO lo que produce una modificación en la actividad de estos receptores (Laragione T. 2003). El  $H_2O_2$  puede cambiar la densidad de receptores en la superficie: en células BSC-1, la exposición a 1mM de  $H_2O_2$  promueve la redistribución de subunidades  $\alpha_3$  almacenadas en el citoplasma, hacia la membrana (Gailit J. 1993).

Por otro lado, en lo que se refiere a regulación de la adhesión a matriz extracelular por la modulación de las cascadas de señalización medida por integrinas se conoce que las ERO inhiben la actividad de la fosfatasa LMW-PTP, lo que promueve un estado de fosforilación permanente de FAK, aumentando la adhesión (Chiarugi P.2001). La fosforilación de FAK promueve la formación de fibras de actina necesarias para la adhesión celular (Euikyung K. 2002).

Se sabe que muchos compuestos fenólicos derivados de plantas como los flavonoides modifican el daño mediado por radicales libres (Yizhong C. 2004, Paya 1996). Para analizar la posibilidad de que los compuestos evaluados afecten la formación y eliminación de ERO, se determinó la producción de  $H_2O_2$  por las células B16 tratadas. Los compuestos cumarínicos sustituidos en la posición 4 no producen diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de  $H_2O_2$  producido, por lo que pareciera que estos compuestos no desactivan, ni eliminan por si solos esta especie reactiva de oxígeno; este efecto ya había sido demostrado para la 4-hidroxycumarina en



neutrófilos (Paya,1993). Cabe mencionar que se observa una tendencia entre la producción de  $H_2O_2$  y el efecto de cumarinas; por ejemplo la 4-hidroxicumarina que disminuye la adhesión a las cuatro moléculas de matriz extracelular produce una menor cantidad de  $H_2O_2$ . La 4,7-dihidroxicumarina que aumenta la adhesión a las cuatro moléculas de MEC induce una mayor producción de  $H_2O_2$ , observándose algo similar con la 4-acetoxicumarina, que aumenta la adhesión a fibronectina y vitronectina. La trascendencia de estas diferencias en el fenómeno biológico de adhesión aún no se conoce, pero existe la posibilidad de pequeños cambios en la producción de ERO (que no sean estadísticamente significativos), que sean suficientes para inducir modificaciones en la actividad de integrinas o en las vías de señalización activadas por estas. Por esto, el papel de ERO en la modificación de la adhesión producida por cumarinas requiere más estudios.

La identificación del mecanismo de acción de estos compuesto cumarínicos podrían dar lugar a fármacos más eficientes y baratos para el tratamiento de neoplasias.

## VII. CONCLUSIONES

- La 4-hidroxycumarina, la 4,7-dihidroxycumarina, la 4-acetoxicumarina y el ácido (5,7-dihidroxi 2-oxo-2H cromen- 4il) acético no presentan efecto citotóxico *in vitro* sobre la línea celular de melanoma murino B16 en un rango de concentraciones de 5  $\mu$ M-500 $\mu$ m.
- La 4-metoxicumarina es tóxica para las células B16 a partir de una concentración de 160 $\mu$ M.
- La 4-hidroxycumarina disminuye la adhesión a fibronectina, laminina, colágena o vitronectina.
- La 4,7-dihidroxycumarina aumenta la adhesión a fibronectina, laminina, colágena o vitronectina.
- La 4-acetoxicumarina aumenta la adhesión a fibronectina o vitronectina.
- El ácido (5,7-dihidroxi 2-oxo-2H cromen- 4il) acético disminuyó la adhesión a vitronectina.
- El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produce un incremento en la adhesión a vitronectina. Esto indica que el peróxido puede estar activando los mecanismos celulares, susceptibles a regulación redox, implicados en la adhesión a matriz extracelular.
- -Existe una relación entre el efecto producido por las cumarinas en la adhesión celular y la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A pesar de que las diferencias no son estadísticamente significativas, estos resultados sugieren que la modulación redox participa en el efecto de cumarinas sobre la adhesión celular.
- Se requieren estudios posteriores para aclarar la importancia de la producción de ERO en la regulación de la adhesión producida por cumarinas.

## ANEXO 1. PRUEBAS ESTADÍSTICAS.

TABLAS 2 a 6. PRUEBA t-STUDENT CON LA MODIFICACIÓN DE BONFRRONI PARA EL EFECTO DE CUMARINAS SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR.

Nota: En el modelo experimental los tratamientos se aplicaron al azar.

TABLA 2A. Tabla ANOVA para la viabilidad con 4-hidroxycumarina.

	suma de cuadrados	grados de libertad	suma de cuadrados medios	F EXPERIMENTAL
TRATAMIENTO	686.3	5	137.3	4.226
RESIDUAL	1080	13	83.05	
TOTAL	1766	18		

$F (P<0.05) = 3.02$

TABLA 2B. Prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples para la viabilidad con 4-hidroxycumarina.

Grupos	Diferencia entre los promedios	valor de t	valor de P	Diferencia significativa
ETOH vs 5 $\mu$ m	6.095	0.7994	P > 0.05	NO
ETOH vs 16 $\mu$ m	8.398	1.262	P > 0.05	NO
ETOH vs 50 $\mu$ m	-2.127	0.3196	P > 0.05	NO
ETOH vs 160 $\mu$ m	7.864	1.182	P > 0.05	NO
ETOH vs 500 $\mu$ m	8.975	1.349	P > 0.05	NO

$t_{(\alpha=0.05) / 13} = 2.160$

TABLA 3A. Tabla ANOVA para la viabilidad con 4,7-dihidroxycumarina.

	suma de cuadrados	grados de libertad	suma de cuadrados medios	F EXPERIMENTAL
TRATAMIENTO	327.2	5	65.43	0.7244
RESIDUAL	2168	24	90.33	
TOTAL	2495	29		

$F (P<0.05) = 2.62$

TABLA 3B. Prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples para la viabilidad con 4,7-dihidroxycumarina

Grupos	Diferencia entre los promedios	valor de t	valor de P	Diferencia significativa
ETOH vs 5 $\mu$ m	5.560	0.9250	P > 0.05	NO
ETOH vs 16 $\mu$ m	8.782	1.461	P > 0.05	NO
ETOH vs 50 $\mu$ m	3.222	0.5360	P > 0.05	NO
ETOH vs 160 $\mu$ m	5.597	0.9311	P > 0.05	NO
ETOH vs 500 $\mu$ m	4.719	0.7851	P > 0.05	NO

$t_{(\alpha=0.05) / 24} = 2.064$

TABLA 4A. Tabla ANOVA para la viabilidad con 4-acetoxicumarina.

	suma de cuadrados	grados de libertad	suma de cuadrados medios	F EXPERIMENTAL
TRATAMIENTO	595.9	5	119.2	3.069
RESIDUAL	931.9	24	38.83	
TOTAL	1528	29		

$$F (P<0.05) = 2.62$$

TABLA 4B. Prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples para la viabilidad con 4-acetoxicumarina.

Grupos	Diferencia entre los promedios	valor de t	valor de P	Diferencia significativa
ETOH vs 5 $\mu$ m	1.382	0.3507	P > 0.05	NO
ETOH vs 16 $\mu$ m	2.272	0.5765	P > 0.05	NO
ETOH vs 50 $\mu$ m	-1.773	0.4498	P > 0.05	NO
ETOH vs 160 $\mu$ m	3.407	0.8645	P > 0.05	NO
ETOH vs 500 $\mu$ m	12.17	3.089	P > 0.05	NO

$$t_{(\alpha=0.05)/24} = 2.064$$

TABLA 5A. Tabla ANOVA para la viabilidad con ácido (5,7-dihidroxi 2-oxo-2H cromen-4il) acético.

	suma de cuadrados	grados de libertad	suma de cuadrados medios	F EXPERIMENTAL
TRATAMIENTO	663.7	5	132.7	1.508
RESIDUAL	1232	14	88.02	
TOTAL	1896	19		

$$F (P<0.05) = 2.92$$

TABLA 5B. Prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples para la viabilidad con ácido (5,7-dihidroxi 2-oxo-2H cromen-4il) acético.

Grupos	Diferencia entre los promedios	valor de t	valor de P	Diferencia significativa
ETOH vs 5 $\mu$ m	-8.667	1.265	P > 0.05	NO
ETOH vs 16 $\mu$ m	-0.2941	0.04292	P > 0.05	NO
ETOH vs 50 $\mu$ m	-10.55	1.539	P > 0.05	NO
ETOH vs 160 $\mu$ m	2.659	0.3880	P > 0.05	NO
ETOH vs 500 $\mu$ m	6.596	0.9627	P > 0.05	NO

$$t_{(\alpha=0.05)/14} = 2.145$$

TABLA 6A. Tabla ANOVA para la viabilidad con 4-metoxicumarina

	suma de cuadrados	grados de libertad	suma de cuadrados medios	F EXPERIMENTAL
TRATAMIENTO	4414	5	882.7	9.262
RESIDUAL	2287	24	95.31	
TOTAL	6701	29		

$F (P<0.05) = 2.92$

TABLA 6B. Prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples para la viabilidad con 4-metoxicumarina.

Grupos	Diferencia entre los promedios	valor de t	valor de P	Diferencia significativa
ETOH vs 5 $\mu$ m	-3.783	0.6128	P > 0.05	NO
ETOH vs 16 $\mu$ m	-6.451	1.045	P > 0.05	NO
ETOH vs 50 $\mu$ m	-1.733	0.2807	P > 0.05	NO
ETOH vs 160 $\mu$ m	14.33	2.721	P < 0.05	SÍ
ETOH vs 500 $\mu$ m	27.74	4.492	P < 0.001	SÍ

$t_{(\alpha=0.05)/13} = 2.62$

**TABLAS 7 a 10. PRUEBA t-STUDENT CON LA MODIFICACIÓN DE BONFERRONI PARA EL EFECTO DE CUMARINAS SOBRE LA ADHESIÓN DE CÉLULAS B16 A MOLÉCULAS DE MATRIZ EXTRACELULAR.**

TABLA 7A. Tabla ANOVA para la adhesión a moléculas de MEC con 4-hidroxycumarina

	suma de cuadrados	grados de libertad	suma de cuadrados medios	F EXPERIMENTAL
TRATAMIENTO	19060	7	2723	35.55
RESIDUAL	1685	22	76.61	
TOTAL	20750	29		

$F (P<0.05) = 2.47$

TABLA 7B. Prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples para la adhesión a moléculas de MEC con 4-hidroxycumarina.

Grupos	Diferencia entre los promedios	valor de t	valor de P	Diferencia significativa
fibronectina	43.28	6.993	P < 0.001	SÍ
Colágena IV	42.14	6.808	P < 0.001	SÍ
Laminina	39.08	5.846	P < 0.001	SÍ
Vitronectina	46.65	6.979	P < 0.001	SÍ

$t_{(\alpha=0.05)/22} = 2.074$

TABLA 8A. Tabla ANOVA para la adhesión a moléculas de MEC con 4,7-dihidroxicumarina

	suma de cuadrados	grados de libertad	suma de cuadrados medios	F EXPERIMENTAL
TRATAMIENTO	6346	7	906.5	37.03
RESIDUAL	587.6	24	24.48	
TOTAL	6933	31		

$$F (P<0.05) =2.43$$

TABLA 8B. Prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples para la adhesión a moléculas de MEC con 4,7-dihidroxicumarina.

Grupos	Diferencia entre los promedios	valor de t	valor de P	Diferencia significativa
fibronectina	15.27	4.366	P < 0.001	SI
Colágena IV	19.66	5.618	P < 0.001	SI
Laminina	10.70	3.059	P < 0.001	SI
Vitronectina	27.10	7.746	P < 0.001	SI

$$t_{(\alpha=0.05)/24} = 2.064$$

TABLA 9A. Tabla ANOVA para la adhesión a moléculas de MEC con el ácido (5,7-dihidroxi 2-oxo-2H cromen- 4il) acético

	suma de cuadrados	grados de libertad	suma de cuadrados medios	F EXPERIMENTAL
TRATAMIENTO	3999	7	571.3	2.911
RESIDUAL	4317	22	196.2	
TOTAL	8316	29		

$$F (P<0.05) =2.47$$

TABLA 9B. Prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples para la adhesión a moléculas de MEC con el ácido (5,7-dihidroxi 2-oxo-2H cromen- 4il) acético.

Grupos	Diferencia entre los promedios	valor de t	valor de P	Diferencia significativa
fibronectina	21.06	2.127	P > 0.05	NO
Laminina	1.878	0.1895	P > 0.05	NO
Colágena IV	12.48	1.260	P > 0.05	NO
Vitronectina	38.04	3.326	P < 0.05	SI

$$t_{(\alpha=0.05)/22} = 2.045$$

TABLA 10A. Tabla ANOVA para la adhesión a moléculas de MEC con 4-acetoxicumarina

	suma de cuadrados	grados de libertad	suma de cuadrados medios	F EXPERIMENTAL
TRATAMIENTO	4792	7	684.6	5.224
RESIDUAL	2490	19	131.0	
TOTAL	7282	26		

$F (P<0.05) = 2.55$

TABLA 10B. Prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples para la adhesión a moléculas de MEC con 4-acetoxicumarina.

Grupos	Diferencia entre los promedios	valor de t	valor de P	Diferencia significativa
fibronectina	-30.91	3.819	$P < 0.01$	SÍ
Colágena IV	1.293	0.1384	$P > 0.05$	NO
Laminina	-1.183	0.1266	$P > 0.05$	NO
Vitronectina	-22.99	2.630	$P < 0.05$	SÍ

$t_{(\alpha=0.05)/19} = 2.093$

TABLA 11. PRUEBA t-STUDENT CON LA MODIFICACIÓN DE BONFERRONI PARA EL EFECTO DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO SOBRE LA ADHESIÓN DE CÉLULAS B16 A VITRONECTINA.

TABLA 11A. Tabla ANOVA para la adhesión vitronectina con peróxido de hidrógeno.

	suma de cuadrados	grados de libertad	suma de cuadrados medios	F EXPERIMENTAL
TRATAMIENTO	22540	6	3757	4.055
RESIDUAL	37990	41	926.6	
TOTAL	60530	47		

$F (P<0.05) = 2.315$

TABLA 11B. Prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples para la adhesión a moléculas de MEC con 4-acetoxicumarina.

Grupos	Diferencia entre los promedios	valor de t	valor de P	Diferencia significativa
ETOH vs 6 $\mu$ m	12.55	0.7232	$P > 0.05$	NO
ETOH vs 12 $\mu$ m	19.06	1.160	$P > 0.05$	NO
ETOH vs 25 $\mu$ m	15.74	1.034	$P > 0.05$	NO
ETOH vs 50 $\mu$ m	17.21	1.092	$P > 0.05$	NO
ETOH vs 100 $\mu$ m	61.95	4.070	$P < 0.01$	SÍ
ETOH vs 200 $\mu$ m	52.53	3.195	$P < 0.05$	SI

$t_{(\alpha=0.05)/41} = 2.02$

**TABLA 12. ANÁLISIS DE VARINAZA DE UNA VÍA PARA LA PRODUCCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO POR CÉLULAS B16 TRATADAS CON DIFERENTES CUMARINAS .**

	suma de cuadrados	grados de libertad	suma de cuadrados medios	F EXPERIMENTAL
TRATAMIENTO	22130	5	4426	4.226
RESIDUAL	11520	11	1047	
TOTAL	33650	16		

F (P<0.05) =3.20

**TABLA 13. PRUEBA DE DUNNETT PARA COMPARACIONES MÚLTIPLES CONTRA UN GRUPO CONTROL (ETANOL) PARA LA PRODUCCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO POR CÉLULAS B16 TRATADAS CON DIFERENTES CUMARINAS.**

Grupos	Diferencia entre los promedios	valor de q'	valor de P	Diferencia significativa
ETOH vs B16	12.59	0.4765	P > 0.05	NO
ETOH vs 4OH	45.19	1.710	P > 0.05	NO
ETOH vs 4HC	-38.27	1.448	P > 0.05	NO
ETOH vs 4,7HC	-74.44	2.520	P > 0.05	NO
ETOH vs A4AI	-22.47	0.8503	P > 0.05	NO

Valor de q'  $_{6/11}$  ( $\alpha = 0.05$ ) = 2.94.



### VIII. BIBLIOGRAFIA

- Albelda S. 1993. Biology of disease: Role of integrin and other adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab. Invest.* **68**: 4-17.
- Albelda S., Buck C. 1990. Integrin and other adhesion molecules *FASEB J.* **4**: 2868-80.
- Andrés J. P. 1999. Patología molecular de la progresión tumoral. *Fox Chase Cancer Center.* **9**:138-143.
- Babior M. Bernard. 1999. NADPH oxidase: An Update, Review Article, *Blood* **93**: 1464-1476,
- Burdon R.1995. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation . *Free Radical Biol. and Medicine* **18**:775-794.
- Casley S., Földi-Börcksök E., Földi M. 1973. The electron microscopy of effects of treatment with coumarin (Venalot) and by thoracic duct cannulation on thermal injuries. *Journal Exp. Pathol.* **53**:1-5.
- Cheng G., Cao Z., Xu X., Van Meir E., Lamberth J., Homologus of gp91 phox : clonig and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5, *Gene* . **269**.131-140.
- Chiarugi P., Giovambattista P., Giannoni E., Taddei L., Colavatti R. Raugei G., Symons M., Borrello S., Galeotti T., Ramponi G. 2003. Reactive oxygen species as essential mediators of cell adhesion: the oxidative inhibition of a FAK tyrosine phosphatase is required for cell adhesion. *J Celll Biol.* **161**: 933-944.
- Cohen A. J. 1979. Critical review of the toxicology of coumarin with special reference to interspecies differences in metabolism and hepatotoxic reponse and their significance to man. *Fd. Cosmet. Toxicol.* **17**: 277-289.
- Cox D., O'Kennedy R., Thornes R. D. 1989. The rarity of liver toxicity in patients treated with coumarin (1,2-Benzopyrone). *Human Toxicol.* **8**: 501-506.
- Danen H., Yamada M. 2001. Fibronectin, Integrins and Growth Control, *Journal of Cellular Physiology*, **189** :1-13.
- Dardik R., Kaufman Y., Savion N., EROenberg N., Shenkman B.,Varon D. 1997. Platelets mediated tumor an cell adhesion to the subendothelium under flow condirion involmnet of platelet GP IIb-IIIa and tumor cell alpha v integrins. *Int Journal of Cancer.* **70**: 201-207

- Dexeus F. 1990. Phase II study of coumarin and cimetidine in patients with metastatic renal carcinoma. *Journal of Clinical Oncol.* **8**: 325-329.
- El-Brady O., Minniti C., Kohn E., Houghton P., Daughaday W., Helman L. 1990. Insulin like growth factor II acts as autocrine growth and motility factor in human rhabdomyosarcoma tumors. *Cell Growth Differ* **1**: 325-331.
- Espinoza O. C. 2002. Efecto de la 4-hidroxycumarina sobre la organización del citoesqueleto de actina en células de melanoma murino B16. México D.F. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis para obtener el grado de Licenciatura. 45p.
- Euikyung K., Jung H., Hyeon S., Sung H., Pann G. 2002. Thimerosal stimulates focal adhesion kinase and cytoskeletal changes by redox modulation. *Biochem. Biophys.* **1593**: 9-15.
- Franks L. M. 1998. Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. 3rd. Edition. London. Oxford University Press. Cap. 1, Cap. 2, Cap. 10.
- Finn J.G., Kenealy E., Creaven S., Egan A. 2002. In vitro cytotoxic potential and mechanism of action of selected coumarins, using human renal cell lines. *Cancer Letters*. **183**: 61-68.
- Fornano M., Tallini G., Bofetiado C., Bosari S., Languino L. 1996. Down regulation of beta1-integrin, an inhibitor of cell proliferation, in prostate carcinoma. *Am. Journal Pathol.* **149**:765-773.
- Garibay M. A. 1998. Importancia de las integrinas en el proceso metastásico. México D.F. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis para obtener el grado de Licenciatura. 56p.
- Gailit J., Colflesh D., Rabiner I., Simone J., Goligorsky. 1993. Redistribution and dysfunction of integrins in cultured renal epithelial cells exposed to oxidative stress. *American J. Physiology.* **264**: F149-F157.
- Halaban R., Known B., Gosh S., Delli P., Baird A. 1988. bFGF as autocrine growth factor for human melanocytes. *Oncogene Research.* **3**:177-186.
- Halliwell Barry, Gutteridge M.J. 2000. Free Radicals in Biology and Medicine. 3ra edición. Oxford Science Publications. U.S.A. pags 395-399.
- Hilgard P. 1984. Anticoagulants and tumor growth: Pharmacological considerations. En: Nicholson G. and Milas L. Cancer invasion and metastasis: biologic and therapeutic aspect. New York Raven press. 353-360.

- Kikuchi H., Hikage M., Miyashita H., Fukumoto M., 2000. NADPH oxidase subunit, gp91 (phox) homologue, preferentially expressed in human colon epithelial cells, *Gene*. **254**: 237-343.
- Klominek J., Robert K., Sundquist K. 1993. Chemotaxis and haptotaxis of human malignant mesothelioma cells; effects of fibronectin, laminin, type IV collagen and autocrine motility factor like substance. *Cancer Research*. **53**:4376-82.
- LaFlamme S., Auer K. Integrin signaling. 1996. *Sem. Cancer Biology*. **7** :111-18.
- Lam W., Zwacka R., Septor A., Nieva R., Davidson L., Engelhardt F., Hendrix J., Oberley W. 1999. Effects of antioxidant enzyme overexpression on the invasive phenotype of hamster cheek pouch carcinoma cells. *Free Radical Biology and Medicine*. **27**: 572-579.
- Lamari F., Bernard M., Braut-Boucher F., Derappe C., Pichon J., Foglietti M., Aubery M. 2001. Opposite effects of oxidative –stress on Endothelial cell lines (ECV304 and Eahy926). Interactions with extracellular matrix. *Biological Reactive Intermediates VI*. Edited by Dansette *et al* Kluwer Academic/ Plenum Publishers.
- Laragione T., Bonetto V., Casoni F., Massignan T., Bianchi G., Gianazza E., Ghezzi P. 2003. Redox regulation of surface protein thiols: Identification of integrin  $\alpha$ -4 as a molecular target by using redox proteomics. *PNAS*. **100**(25): 14737-14741.
- Lee R., Bykadij., Ritche W., 1981. Inhibition of pEROtragtaIndin biosynthesis by coumarin, 4-hydroxicoumarin and 7-hydroxicoumarin *Arzneim-Forsch-Drug Research*. **31**.640-642.
- Liotta L., Kleinmar J. and Saidel G. 1974. Quantitative relationships of intravascular tumor cells: tumor vessels and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res*. **34**: 997-1003.
- Lodish H., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P., Baltimore D. and Darnell J. 2000. *Molecular Biology*. 4th edition. Scientific American Books. USA Cap. 26.
- Lu C., Kerbel R. 1994. Cytokines, growth factors and the loss of negative growth controls in the progression of human cutaneous malignant melanoma. *Curr. Opin. Oncol*. **6**: 212-220.
- MacDonald C., Groom C., Chambers F. 2002. Cancer Spread an micrometastasis development. *BioEssays* **24**:885-893.

- Marshall M. E. 1994 A. An updated review of the clinical development of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7- hydroxicoumarin. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **120** (suppl): S14-S16.
- Marshall M. E., Kervin K., Benefield C., Umerani A, Albainy-Jenei S and Zhao Q. 1994B. Growth-inhibitory effects of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7- hidroxicoumarin on human malignant cell lines in vitro. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **120** (suppl):S3-S10.
- Mendoza L., Carrascal T., De Luca M., Fuentes M., Salado C., Blanco J., Vidal V. 2001. Hydrogen peroxide mediates vascular cell adhesion molecule -1 expression from interleukin-18-activated hepatic sinusoidal endothelium; Implications for circulating cancer cell arrest in murine liver. *Hepatology.* **34**(2): 298-309.
- Mohar A., Meneses A. 1999. Principales neoplasias malignas en México. Ed. El manual moderno. México. Cap 10.
- Mohler J. L., Williams B. T., Thompson I., Marshall M. E. 1994. Coumarin (1,2-benzopyrone) for the treatment of prostatic carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **120** suppl.:S35-S38.
- Moran E., O’Kennedy R. and Thornes R. D. 1987. Analysis of coumarin and its urinary metabolites by high-performance liquid chromatography *Journal of Chromatography.* **416**: 165-169.
- Mosmann T. 1983. Rapid Colorimetric Assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity Assays. *Journal of immunological Methods.* **65**:55-63.
- Nair R., Fischer P., Safe H., Cortez C., Harvey G., Di Giovanni J. 1991. Novel coumarins as potential anticarcinogenic agents. *Carcinogenesis.* **12**: 65-69.
- National Toxicology program Technical report on the toxicology and. Carcinogenesis of coumarin F344/N Rats and B6C3F Mice (Gavage Studies) U.S department of Health and human Services. 1992. NIH publication 92-31523.
- Nagata M., Yamamoto H., Shibasaki S., Sakamoto Y., Matsuo H. 2000. Hydrogen Peroxide augments eosinophil adhesion via  $\beta_2$  integrin. *immunology.* **10**:412-418.
- Nimnual A., Taylor L., Bar-Sagi D. 2003. Redox-dependent down regulation of Rho by Rac. *Nat. Cell Biology.* **5**: 236-241.

- Nobes D. C. and Hall A. 1995. Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filipodia. *Cell*. **81**: 53-62.
- O'Kennedy Richard, Thornes D.R. 1997. Coumarins, Biology, Application and Mode of Action. Ed. John Wiley and Sons : Cap 2, Cap 3.
- Orozco A. 2000. Estudio in vivo del efecto antineoplásico de la cumarina en un modelo de melanoma murino. México D.F. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis para obtener el grado de licenciatura. 120p.
- Ozaki Y., Ohashi T., Niwa Y. 1986. A comparative study on the effect of inhibitors of lipoxygenase pathway and neutrophil function. *Biochem. Pharmacol.* **35**: 3481-3488.
- Paya Miguel, Barry Halliwell and J.R.S. Hoult. 1992. Interactions of a series of coumarins with Reactive Oxygen Species. *Biochemical Pharmacology*. **44**(2): 205-214.
- Paya Miguel and J.R.S. Hoult. 1996. Pharmacological and biochemical Actions of simple Coumarins: Natural Products with Therapeutic Potential. *General Pharmacology*, **22** (4):713-722.
- Pieri L., Dominici S., Del Bello B., Maellaro E., Comporti M., Policchi A., Pompella A. 2003. Redox Modulation of protein kinase/phosphatase balance in melanoma cells: role of endogenous and  $\gamma$ -glutamyltransferase-dependent  $H_2O_2$  production. *Biochimica et Biophysica acta*. **1621**:76-83.
- Ritschel W. A., Brady E. M. and Tan I. S. 1979. First-pass effect of coumarin in man. *International Journal of Clinical Pharmacology and Biopharmacy*. **17**: 99-103.
- Ritschel W. A. 1984. Therapeutic concentration of coumarine and predicted dosage regimens. *Drug Res.* **34**: 907-910.
- Ruddon W. R. 1995. *Cancer Biology*. 3rd. edition. N.Y. Oxford University Press. 520pp.
- Ruoslahti E. 1996. How cancer spreads. *Scientific American*. Special issue: What you need to know about cancer? Sep: 42-47.
- Satoru K., Yasuhiko T., Kazunori O., Minoru S., Masamichi Y., Yuko Y. 2001. The Antiproliferative Effect of Coumarins on Several Cancer Cell Lines. *Anticancer Research*. **21**: 917-924
- Schandendorf D., Moller A., Algermissen B, Worm M, Sticherling M. Czarnetski B.1993. Interleukin-8 (IL-8) produced by human malignant melanoma cells in vitro as an essential autocrine growth factor. *J. Immunol.* **151**: 2667-75.

- Schlaepfer D., Hanks S., Hunter T., van der Geer P. 1994. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature*. **372**: 786-91.
- Schaller M., Otey C., Hildebrand J., Parsons J. 1995a. Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. *Journal of Cell Biology*. **130**:1181-1187.
- Schaller M., Hildebrand J., Shannon J., Fox J., Vines R., Parsons J. 1995b. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125<sup>Fak</sup>, directs SH-dependent binding of pp60<sup>Fak</sup>. *Mol. Cell Biology*. **14**:1680-1688.
- Scheel L.D. The biological action of coumarins. 1972. *Microbiol. Toxins*. **8**: 47-66
- Senger D., Claffery K., Benes J., Perruzi C., Sergiou A., Detmar M. 1997. Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor regulation through  $\alpha 1\beta 1$  and  $\alpha 2\beta 1$  integrins. *Proc. National Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 13612-17.
- Stein H.J. 1992. *Medicina interna*. 3ra ed. Tomo 1. Editorial Salvat. México. pp: 1148-1150.
- Stracke M.L., Krutzsch H.C., Unsworth E., Arrestad A., Cioce V., Schiffman E. 1992. Identification, purification and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility stimulating protein. *Journal Biol. Chem.* **267**:2524-2529.
- Sukhdev S., Kennedy P., Sturrock A., Huecksteadt T., Quinn M., Whornton A., Hoidal J. 2002. An NAD(P)H oxidase regulates growth and transcription in melanoma cells, *American Journal of Physiology Cell Physiology*. **282**: C1212-C1224.
- Sztatowski P., Nathan F. 1991. Production of Large Amounts of Hydrogen Peroxide by Human Tumor Cells. *Cancer Research*, **51**: 794-798.
- Thannickal J. Victor, Fanburg B. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling, Invited Review, *American Journal of Physiology*, **279**: L1005-L1028.
- Thorne R. D., Daly L. and Lynch H. 1989. Prevention of early recurrence of high risk malignant melanoma by coumarin. *European Journal of Surgical Oncology*. **15**: 431-435.
- Tilly B., Tertoolen L., Remorie R., Ladoux A., Veerlaan I, Laat S. 1990 Histamine as growth factor and chemoattractant for human carcinoma and melanoma cells: Action through Ca<sup>2+</sup>-mobilizing H<sub>1</sub> receptors. *Journal of Cell Biology*. **110**:1211-1215.
- Van Waes C. Surth D., Chen Z., Kirby M., Rhim J., Brager S. 1995. Increase in a suprabasilar integrin adhesion molecule expression in human epidermal neoplasms

accompanies increase proliferation occurring with immortalization and tumor progression . *Cancer Research* .**55**: 5434-44

- Varmus H., Weinberg R. 1993. Genes and biology of cancer. Scientific American Library
- Velasco V. Marco, Agramonte J., Barrera D., Jiménez A., García J., Mendoza N, Landa A. Mandoki J. 2003. 4- hidroxicoumarin disorganizes the actin cytoskeleton in B16-F10 melanoma cells but not in B82 fibroblasts, decreasing their adhesión to extracellular matrix proteins and motility. *Cancer Letters*. **198**:179-186.
- Vogelstein B., and Kinzler K. 1992. p53 function and dysfunction. *Cell* **70**: 523-526
- Wang J. M. , Tarabolletti G., Matsushima K. Van Damme J. Matovari A. 1990. Induction of haptotic migration of melanoma cells by neutrophil activating protein/intrleukin-8. *Biochem. Biophys Res Commun* .**169**:165-170.
- Wang D., Youngson C, Wong V., Yeger H., Dinauer M.,Vega M.,Rudy B., Cutz E. 1996. NADPH oxidase and hydrogen peroxide sensitive K<sup>+</sup> channel my function as an oxygen sensor complex in airway chemoreceptors and small cell lung carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA*. **93**:13182.
- Warren R. A. 2000. Cell and tissue movements, invasion and angiogenesis. *Cancer and Metastasis Reviews in Kluwer Academic Publishers*. **19**: 257-279.
- Weinberg A. R. 1996. How cancer arises. Scientific American Library. Special issue: What you need to know about cancer?. **275** (3):32-40.
- Werner Erica . 2004. GTPases and reactive oxygen species: switches for killing and signaling. *Journal of Cell Science*.**117**:143-153.
- Wit P., Moretti S., Koenders P., Wetterman A., Van Muijen G.,Gianotti B. 1992. Increasing epidermal growth factor expression in human melanocyte tumor progression. *Journal Invest. Dermatol.***99**:168-173
- Woodhouse C.E., Chuaqui F.R., Liotta A. L.1997. Genral Mechanisms of Metastasis, Skeletal Complications of Malignacy Symposium , Bethesda Maryland, American Cancer Society,19-20.
- Yamada K., Miyamoto S. 1995. Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. *Curr. Op. Cell Biol*. **7**: 681-689.
- Yizhong C., Qiong L., Mai S., Harold C. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer, *Life Science*, **74**: 2157-2184.

- Zacharski L., Henderson W., Rickles F. 1981. Effects on warfarins on survival on small cell carcinoma of lung V.A. study No. 75. JAMA. **245**(8):831-835
- Zänker K., Blümel G., Lange., Siewert J. 1984. Coumarin in melanoma patients: an experimental and clinical study. Drugs Exptl. Clin. Res. **11**:767-774.
- Zhang Z., Tuner C., Drzewiecki J., Hinshaw B., Hyslop A. 1994. Brain Research **662**:189-197
- Zhou L., Yuhong U., Yue B. 1999. Oxidative stress affects cytoskeletal structure and cell –matrix interactions in cells from an ocular tissue : The trabecular meshwork. Journal of Cellular Physiology. **180**: 182-189.