



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“EFECTO DE LA 4-HIDROXICUMARINA SOBRE LA  
EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES EN CÉLULAS  
DE MELANOMA MURINO B16.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICO BIOLOGA

P R E S E N T A :

SUSANA QUINTERO DÍAZ



MÉXICO, D.F.



2005

m341171



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.

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

NOMBRE: Susana Quintero Díaz

FECHA: 12/02/2005

FIRMA: 

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Juan José Mandoki Weitzner.
Vocal	Prof. Raul Aguilar Caballero.
Secretario	Prof. Marco Antonio Velasco Velázquez.
1er. Suplente	Profa. Mónica Berenice Heras Chavarria.
2do. Suplente	Profa. Ruth Bustamante García.

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio de Farmacología Molecular, Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, U. N. A. M. y Laboratorio de Inmunología Molecular, Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N.

Este Trabajo fue apoyado por el proyecto PAPIIT IN230202 (DGAPA-UNAM).

Asesor de tema:

Q.F.B. Marco Antonio Velasco Velázquez.

Supervisor técnico:

M. en C. Sonia Mayra Pérez Tapia

Sustentante:

Susana Quintero Díaz.

Dedicada:

A Mamá y Papá, Eli, Clau y Gus por el amor  
y el apoyo de toda la vida.

A Sofia por ser el ángel de mi vida.

Agradezco:

A Marco, Mayra y Diana, por tantas cosas que necesitaría escribir una tesis sobre eso. Por el apoyo, su paciencia, por todo lo que me han enseñado dentro y fuera del laboratorio, por ser mis amigos, por confiar en que soy capaz de hacer las cosas, por...

A Charmina, Adriana y Nohemí por los buenos momentos en el laboratorio y darme de comer.

A mi abuela, mis tíos Lola, Lupe, Chuy, Goyo, Rocío, Rubén, Mary, Toño y Elsa, a mis primos Zaida, Ale, Toño, Rubén, Caro, Víctor, Ana y Paty por todas las porras y por hacer que mi familia sea la mejor de todas.

A Alejandra, Mawi y Angel por ser mis amigos para siempre y porque sé que entienden por qué no necesito escribir más.

A la súper banda de los chochos por una vida inolvidable en la Facultad de Química y porque de ustedes aprendí que el cariño puede ser de todas las maneras posibles; a Aldo por su optimismo 🤪 y por contagiarme su ñoñez; a Amílcar (hiji di ti midri) por haber sido mi mejor compañero de clases 🤪, al Batis por ser el fanático número uno de los pumas y odiar a aquellos que se visten de azul y crema (ajá 🤪); a Belem por un mundo de chocolate y por enseñarme que todo se arregla no importa qué tan derretido esté; a Claudia por su amistad sobre todas las cosas (y no, no estás soñando); a Cristian por formar el mejor equipo de fútbol (¿¿tricampeones o

tetracampeones??); a Dianuchuis por encontrar siempre el lado bueno de las cosas, ah! y por su melodiosa voz; a Dulce por pensar en lo que a los demás no se les puede ocurrir (sabes a lo que me refiero); a Edgar por su amistad sincera, por cuidarme cuando lo necesité y por predecir lo que no va a pasar; a Erika por las mejores borracheras y las albóndigas de pollo; a Gris por confiar en que su hámster funcionará algún día 🐹 y por aferrarse a que las cosas nos salieran bien; a Israel por mitotero y organizador 📅; a Luis por hacer que yo ocupe el segundo lugar dentro de los amargados; a Mago por no abandonarme en ninguna iglesia y por sonsacarme en todas mis locuras 🐱; a Mariana por tener un abrazo en los momentos difíciles; a Pedro por perseverar y creer que se puede lograr todo (siempre y cuando se tenga una beca, jeje) y a Winnie por los buenos bailes (y la rodilla al piso). A papá Jacinto, que aunque no es chocho igual me quiere aunque diga que no 🐶.

A Panch y a Liliana por compartir los mejores y peores momentos conmigo, por ser de las personas más honestas que conozco, por llevarme de parranda y hacerme reír.

También quiero agradecer a todos los que forman parte del laboratorio de Inmunología Molecular II de la ENCB, IPN, especialmente a la Dra. Iris Estrada por todo su apoyo, su confianza y por adoptarme como su nieta, a Jeanet y Rommel por todas sus enseñanzas, por alentarme cuando las cosas se complicaban y por compartirlas conmigo cuando salían bien y al Exclavo (conste que así lo escribe) por ser mi amigo, preocuparse por mí y por hacer más divertido el laboratorio.

A Rafa por seguir vivo tanto en mis sueños como en mis recuerdos y por ocho años de buenos momentos.

## INDICE

	Página
Resumen	7
Antecedentes	
1. Cáncer.	
1.1 Definición.	8
1.2 Epidemiología.	8
1.3 Carcinogénesis.	9
1.4 Oncogenes y genes supresores de tumores.	11
1.5 Melanoma.	14
2. Cumarinas	
2.1 Generalidades de cumarinas.	15
2.2 Metabolismo de la cumarina.	17
2.3 Actividad antineoplásica de cumarinas.	18
2.1 Actividad de la 4-hidroxicumarina.	20
Objetivos	22
Hipótesis	23
Material y métodos.	
Material biológico.	24
Características de la exposición a 4-hidroxicumarina.	24
Extracción de RNA.	24
Tratamiento con DNAsa / reextracción.	25
Síntesis de cDNA.	26

Amplificación de los cDNAs / Geles de DD-RTPCR.	27
Identificación, purificación y reamplificación de bandas diferenciales.	29
Clonación y transformación.	30
Extracción de DNA plasmídico / Digestión.	31
Secuenciación.	32
Amplificación específica de ARM-1.	33
Resultados	36
Discusión.	44
Conclusiones.	47
Bibliografía.	48

## **RESUMEN.**

El cáncer tiene como causa principal de muerte la formación de tumores secundarios que se generan por el establecimiento y proliferación de células cancerosas que salen del tejido original; este proceso se conoce como metástasis tumoral. Nuestro grupo de trabajo ha descrito que la 4-hidroxycumarina disminuyendo la adhesión de células de melanoma murino B16 a moléculas de matriz extracelular y provoca un desarreglo en el citoesqueleto de actina, lo que sugiere que podría ser utilizada como anti-metastásico. Sin embargo el mecanismo de acción de la 4-hidroxycumarina aún no se ha aclarado; por esto el presente proyecto pretendió montar en nuestro laboratorio la metodología de reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción inversa para el análisis de la expresión diferencial de genes (DDRT-PCR). Esta técnica permite demostrar las diferencias existentes en la expresión de diversos genes como consecuencia del tratamiento con fármacos o de alteraciones patológicas. Utilizando esta técnica se comprobó que la 4-hidroxycumarina cambia la expresión de varios genes en células de melanoma murino B16 y pudimos esclarecer la identidad de uno de ellos en el que su expresión se ve disminuida con el tratamiento. Este gen pertenece a la molécula reguladora de adhesión (ARM-1). Esta molécula está involucrada en la adhesión de las células cancerosas al endotelio vascular y su disminución como consecuencia del tratamiento con 4-hidroxycumarina podría afectar diferentes etapas del proceso de carcinogénesis.

Con esto pretendemos aclarar parcialmente el mecanismo de acción de la 4-hidroxycumarina y señalar nuevos blancos farmacológicos para la generación de terapias anti-metastásicas.

## **ANTECEDENTES.**

### **1. CÁNCER.**

#### **1.1. Definición**

La palabra cáncer se utiliza para nombrar un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento anormal de células. Se manifiesta por la reducción o pérdida del control en el crecimiento y función celular. En términos moleculares y biológicos, todos los tipos de cáncer tienen defectos parecidos en la regulación de la proliferación y de la muerte celular (Tannock, 1999). Estas células presentan la capacidad de invadir tejidos diferentes al de origen y de metastatizar en sitios distantes (Ruddon, 1995). La presencia de células con capacidad invasiva, es diagnóstico suficiente para indicar malignidad (Lodish, 2000).

#### **1.2. Epidemiología**

Según el informe anual de la OMS del 2002, cada año en el mundo más de 10 millones de personas son diagnosticadas con cáncer, mientras que mueren 6 millones de personas y se estima que estas cifras se incrementarán en un 50% en los próximos 20 años. En México, durante el año 2002, los tumores malignos fueron causa de 24,798 muertes, que corresponden al 5 % del total de defunciones (Fuente: INEGI / SS, 2002). Se determinó como la cuarta causa de mortalidad en personas en edad productiva entre 15 y 64 años. 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 metastático es de 16%.

### **1.3. Carcinogénesis**

La carcinogénesis es un proceso de varias etapas que desemboca en el cambio de una célula normal en una célula cancerosa. Esta conversión requiere de múltiples mutaciones, principalmente en genes que codifican proteínas que participan en el control de la proliferación. Las mutaciones que inducen la formación de cáncer pueden ocurrir en células en división y pasar a la progenie. Los principales mecanismos que inducen cambios genéticos incluyen mutaciones puntuales, deleciones, amplificación genética, y translocaciones. Los factores que promueven la carcinogénesis pueden ser externos, como químicos ambientales, tabaquismo, radiación o infecciones virales; o internos, como defectos en el sistema inmune y predisposición genética. Dado que existen diferentes mecanismos que promueven la carcinogénesis, las neoplasias generadas son diferentes; varían en tiempo de crecimiento, grado de diferenciación celular, detectabilidad, invasividad, potencial metastásico, respuesta a tratamientos y pronóstico (Franks, 1998; Balmer, 1998; Ruddon, 1995).

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 está lista para dividirse. Estos estímulos promotores del crecimiento actúan sobre

células que aún pueden ser sensibles a factores inhibidores de crecimiento normales. Esto 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 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. 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 metastásico. Si los cambios genéticos permiten que el tumor comience a invadir la membrana basal y a diseminar a través del flujo sanguíneo o linfático, se considera que el tumor ha llegado a ser maligno (Andrés, 1999; Weinberg, 1996; Rouslahti, 1996).

#### **1.4. Oncogenes y genes supresores de tumores.**

El ciclo celular está dividido en cuatro etapas: una fase de síntesis de ADN, llamada fase S, otra fase de división celular denominada fase M, y dos estadios llamados G1 y G2 que separan las dos etapas anteriores. Cuando la célula se encuentra en un estado estacionario, se dice que se encuentra en una etapa especial llamada G0. Una vez que la célula ha sido estimulada para entrar a un nuevo ciclo, abandona la fase G0 y pasa al primer punto de restricción G1. Este punto se considera como el principal punto de control dentro del ciclo celular. Todas las células poseen mecanismos similares para regular el ciclo celular. Estos mecanismos de control se encargan de detectar fallas en la replicación, reparación del DNA, el ensamblaje del huso o algún otro mecanismo implicado en la división celular, regulando así el ciclo celular (Lodish, 2000; Garibay, 1998).

La falla en los mecanismos de control contribuye a la generación de cáncer. Prácticamente en todos los cánceres humanos, existen mutaciones que inactivan proteínas con funciones cruciales en el desarrollo del ciclo celular. Los dos tipos principales de genes, cuya mutación puede inducir la formación de tumores o dar lugar a transformaciones malignas, se conocen como protooncogenes y genes supresores de tumores. Mediante análisis de ADN en varias etapas del desarrollo del cáncer, se ha realizado estudios epidemiológicos que indican la sobreexpresión de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores en diferentes tipos de neoplasia (Franks, 1998).

##### **1.4.1. Oncogenes.**

Un oncogen es la forma mutada del protooncogen. Los protooncogenes codifican proteínas que estimulan la división celular. La conversión de protooncogen a un oncogen, mediante mutación, generalmente significa ganancia funcional en la

proteína que codifica. Existen tres mecanismos principales para producir un oncogen desde su correspondiente protooncogen: El primero requiere mutaciones puntuales en el protooncogen, que producen proteínas constitutivamente activas. El segundo necesita la amplificación de un segmento del DNA donde está incluido el protooncogen, provocando la sobreexpresión de la proteína codificada. El tercer mecanismo propone la translocación del cromosoma que contiene un gen regulador de crecimiento, bajo el control de un promotor diferente causando una expresión inadecuada del gen (Franks, 1998; Lodish, 2000).

#### **1.4.1.1. Clasificación de los Oncogenes.**

De acuerdo con la función que realiza el producto génico, los oncogenes se clasifican en: genes que codifican factores de crecimiento o sus receptores (por ejemplo, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, PDGF); genes que codifican proteínas citoplasmáticas, involucradas en la transducción de señales estimulantes (por ejemplo, proteínas de la familia Ras); genes codificantes de factores de transcripción y que activan genes promotores de crecimiento (por ejemplo, c-myc); y genes que codifican moléculas cuya función aún no está especificada (como mdm2) (Varmus, 1993; Weinberg, 1996).

#### **1.4.2. Genes supresores de tumores (GST).**

Los GST generalmente codifican proteínas que inhiben la proliferación celular por diferentes vías. Las mutaciones pueden causar que las proteínas producidas por este tipo de genes sean inactivas, evitando la regulación del crecimiento celular. La pérdida de uno o más de estos bloqueadores contribuye en el desarrollo de muchos tipos de neoplasias. Los individuos con mutaciones

hereditarias en GST tienen una mayor predisposición para ciertos tipos de cáncer (Varmus, 1993).

#### **1.4.2.1. Clasificación de GST.**

Las proteínas producidas por los GST se han clasificado en 5 grupos (Weinberg, 1996; Lodish, 2000):

- Proteínas intracelulares. Por ejemplo, p16 inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas, la cual regula una etapa específica del ciclo celular.
- Receptores a hormonas. Por ejemplo factor de crecimiento derivado de tumor  $\beta$ , que inhibe la proliferación celular.
- Proteínas de puntos de inspección que detienen el ciclo celular cuando el ADN esta dañado o existen anomalías en los cromosomas.
- Proteínas que promueven apoptosis.
- Enzimas que participan en la reparación de DNA.

Dentro los GST, el p53 es el que más frecuentemente se ha encontrado alterado en tumores avanzados, de mal pronóstico, o en metástasis. Las alteraciones moleculares de este gen parecen iniciar en distintas etapas del desarrollo tumoral, dependiendo del tipo de tumor que se trate. Las mutaciones de p53 en tumores metastásicos de próstata son características de este cáncer en comparación con carcinomas primarios que no presentan mutaciones en este gen (Lodish, 2000).

#### **1.4.3. Otros Genes Supresores.**

Se describen otros grupos de genes que se relacionan con la producción y progresión tumoral, dentro de los que destacan los genes supresores de

metástasis. Además, se mencionan genes reguladores de interacciones de la célula con elementos de la matriz extracelular, célula-célula y genes reguladores de la degradación de matriz extracelular. Muchos de estos genes han sido descritos recientemente y aún no se conoce completamente su función (Andrés, 1999).

Respecto a genes supresores de metástasis (GSM) el más conocido es el nm23. Este gen fue identificado por su escasa o nula expresión en células murinas de melanoma metastásico y en metástasis de carcinoma de mama. La expresión de nm23 en los respectivos tumores primarios es normal. Su función como GSM se comprobó con experimentos de transfección en células de melanoma altamente metastásico (Andrés, 1999).

## **1.5. Melanoma**

El melanoma es un tumor maligno de los melanocitos, células encargadas de dar la coloración a la piel. La mayoría de los melanomas se localizan en la piel, pero también pueden localizarse en otros lugares, como mucosas y retina. Aunque el riesgo de padecer un melanoma es mayor en caucásicos que en individuos de razas 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 a la luz solar y con deleciones en el brazo largo del cromosoma 11 y del corto del cromosoma 1 (Franks, 1998). La radiación ultravioleta tiene mayores consecuencias en personas con fenotipos de piel clara (Lodish, 2000).

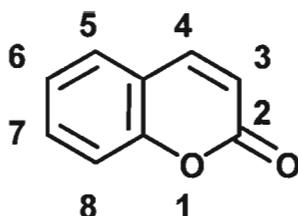
El melanoma tiene un comportamiento biológico que presenta dos fases de crecimiento, una radial (intraepidérmica) y otra vertical (intradérmica). En la fase de crecimiento radial, que puede durar meses o años, la tumoración está limitada a la

epidermis sin presentar capacidad de producir metástasis, en esta situación la extirpación quirúrgica es curativa. En la fase de crecimiento vertical, la tumoración invade la dermis con la capacidad de producir metástasis linfáticas o sanguíneas (Ruddon, 1995). En ningún otro tumor se tiene la necesidad de dar un diagnóstico precoz como en el melanoma, pues solo en 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).

## **2. CUMARINAS.**

### **2.1. Generalidades de 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 de la cumarina, cuyo nombre químico es 1,2-benzopirona del ácido orto-hidroxifenil-propenoico se muestra en el Esquema 1. Tiene un peso molecular de 146.15 g/mol, punto de fusión es de 68-70°C y un punto de ebullición de 303°C. Es soluble en etanol, cloroformo y aceites (O'Kennedy, 1997).



ESQUEMA 1. Estructura química de la cumarina (1, 2 benzopirona). Los números indican las posiciones donde pueden presentarse 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 a 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).

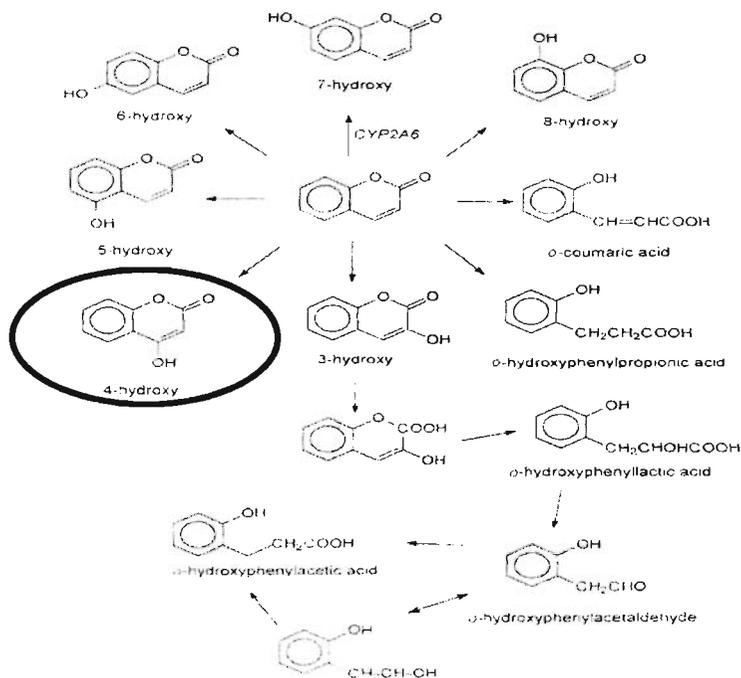
Se ha encontrado que la cumarina presenta efectos sedativos hipnóticos, antipiréticos y anti-inflamatorios por lo que se ha utilizado en el tratamiento de enfermedades reumáticas. Dado que estimula la actividad fagocitaria en macrófagos y otras células del sistema inmune, también se ha utilizado en el

tratamiento de infecciones crónicas (brucelosis, micoplasmosis, toxoplasmosis) (Casley, 1973).

## **2.2. Metabolismo de la cumarina.**

La vida media biológica de la cumarina es de 1.2 h si se administra por vía oral y de 0.8 h cuando es administrada por vía intravenosa. Se oxida tanto *in vitro* como *in vivo* en todas las posiciones de la molécula generando monohidroxicumarinas (Ritschel, 1979; Ritschel, 1984). Además, el anillo lactónico puede hidrolizarse y se han descrito como productos de excreción del ácido o-hidroxifenilacético y el ácido o-hidroxifeniláctico. Estos productos pueden estar acetilados, metoxilados, conjugados o sufrir otro tipo de transformación. Las principales vías metabólicas de la cumarina se ejemplifican en el Esquema 2.

La cumarina es metabolizada por el sistema del citocromo P450 (isoforma CYP2A6 en humanos), produciendo derivados monohidroxilados. Los productos de biotransformación varían cuantitativamente dependiendo de la especie (Cohen, 1979; Hadidi, 1997). El principal producto de biotransformación en el humano es la 7-hidroxicumarina, mientras que en el ratón es la 3-hidroxicumarina. El metabolismo en ratón es semejante al humano ya que posee hidroxilasas hepáticas y los productos metabólicos son derivados hidroxilados, a diferencia de la rata en la que los derivados son ácidos hidroxifenilcarbónicos mucho más tóxicos. Se ha propuesto que algunos de los productos de biotransformación de la cumarina pueden tener actividad inmunoestimulante, antineoplásica y antimetastásica mayor que la cumarina (Moran, 1987, Jiménez, 1999).



ESQUEMA 2. Vías metabólicas de la cumarina. Se muestran los metabolitos de la cumarina, en el ovalo se muestra la estructura de la 4-hidroxicumarina (Tomado de Thornes, 1997)

### 2.3. Actividad antineoplásica de cumarinas.

Actualmente derivados cumarínicos como la warfarina y el dicumarol tienen aplicación terapéutica como anticoagulantes. Estos derivados comenzaron a utilizarse en el tratamiento de neoplasias para prevenir la formación de estroma de fibrina alrededor del tumor. A mediados del siglo pasado se describió la asociación de la fibrina con los tumores y se postuló que ésta pudiera tener importancia en la producción de metástasis. Se ha demostrado que la warfarina en combinación con

otros tratamientos, alarga al doble la supervivencia 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. 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 (Moler, 1994). En un estudio *in vitro* se observó que la cumarina inhibe el crecimiento de 14 diferentes líneas tumorales humanas (Marshall, 1994a). 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 con efectos adversos de poca importancia y reversibles al suspender el tratamiento (Marshall, 1994b).

Se desconocen los mecanismos exactos involucrados en los efectos antineoplásicos y antimetastásicos 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 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 80mg/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 más potente inhibidor 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).

El acelerado metabolismo de la cumarina y las actividades reportadas de sus metabolitos, generado la propuesta de que los efectos antitumoral y antineoplásico son generados por sus productos de biotransformación.

#### **2.4. Actividad de la 4-hidroxycumarina.**

Previamente nuestro grupo ha reportado que, *in vitro*, la 4-hidroxycumarina induce alteraciones morfológicas en células B16, sin producir alteraciones en la línea celular no maligna B82. Estos cambios morfológicos correlacionan con una desorganización del citoesqueleto de actina, pues el tratamiento con 4-hidroxycumarina disminuye el contenido de fibras de estrés, lamelipodios y filipodios. Dado que la adecuada organización del citoesqueleto es necesaria para la adhesión célula-sustrato y la migración celular, la 4-hidroxycumarina produce también una inhibición de la adhesión a moléculas de matriz extracelular y de la

migración aleatoria (Velasco, 2003). Actualmente el mecanismo por el cual la 4-hidroxicumarina produce los efectos reportados se desconoce. Dado que tanto la adhesión como la organización del citoesqueleto influyen en la expresión de diversos genes, el presente estudio pretende analizar el efecto de la 4-hidroxicumarina sobre la expresión de genes, empleando la técnica Diferencial Display RT-PCR (análisis de la expresión diferencial de genes por reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción inversa).

## **OBJETIVOS.**

### **OBJETIVO GENERAL.**

El presente estudio analizará el efecto del tratamiento *in vitro* con 4-hidroxicumarina sobre la expresión diferencial de genes de células de melanoma murino B16.

### **OBJETIVOS PARTICULARES.**

1. Comprobar que el tratamiento de células de melanoma murino B16 con 4-hidroxicumarina cambia la expresión de algunos genes, mediante la metodología de DD-RTPCR (análisis de la expresión diferencial de genes por reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción inversa).
2. Aclarar la identidad de uno de los genes en el que la modificación en la expresión sea importante, por medio de técnicas de clonación y secuenciación.
3. Comprobar los cambios en la expresión de dicho gen y analizar su función y su posible participación de en los efectos reportados de la 4-hidroxicumarina.

## **HIPÓTESIS.**

El tratamiento *in vitro* con 4-hidroxicumarina provocara cambios en la expresión de genes de células de melanoma murino B16 involucrados con efectos en la migración celular, adhesión a moléculas de matriz extracelular o con modificaciones en el citoesqueleto de actina.

## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **MATERIAL BIOLÓGICO.**

Las células B16-F10 de melanoma murino se cultivaron en botellas de cultivo de 80 cm<sup>2</sup> de área (Nunc) con medio RPMI el cual contiene glucosa, folato, L-glutamina y rojo de fenol. El medio se suplementó con 10% de suero bovino fetal y una mezcla de antibióticos (penicilina 5mg/mL, estreptomycin 10 mg/mL y neomicina 10 mg/mL, Gibco). Para ser utilizadas en nuestros experimentos, las células se cosecharon con tripsina-EDTA (0.05% / 0.5mM, Gibco) y se contaron con un hematocitómetro evaluando simultáneamente la viabilidad por exclusión de azul tripán. En todos los casos se utilizaron cultivos con viabilidad igual o mayor al 95 %.

### **CARACTERÍSTICAS DE LA EXPOSICIÓN A 4-HIDROXICUMARINA.**

Se sembraron dos poblaciones de  $2 \times 10^8$  células B16 en placas Petri para cultivo de tejidos (Nunc) utilizando medio RPMI suplementado y se dejaron adherir durante toda la noche a temperatura constante de 37°C y en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y aire al 95%. Posteriormente se intercambié el medio suplementado por medio condicionado (sin suero) conteniendo 4-hidroxicumarina a una concentración de 500 µM (células tratadas) ó etanol al 0.75% (células control). Transcurridas 24 horas de exposición, se retiró el medio de cultivo y se lisaron las células por separado directamente en la caja petri con 1 mL de Trizol.

### **EXTRACCIÓN DE RNA.**

A las muestras lisadas con Trizol se agregaron 12.5 µL de glucógeno (concentración final 250 µg/mL) y se dejaron incubar durante 5 minutos en hielo. Se adicionaron 200

$\mu\text{L}$  de cloroformo y se mezclaron vigorosamente en vórtex hasta obtener una emulsión color rosa. Las muestras se incubaron durante 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y se centrifugaron a 10000 rpm durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se recuperaron las fases acuosas a las que posteriormente se les adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol, se incubaron 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y se centrifugaron a 10000 rpm durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se desecharon los sobrenadantes y las pastillas obtenidas se lavaron con 1 mL de etanol al 80%. Se centrifugaron a 6000 rpm durante 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y se desechó el etanol. Las muestras se incubaron durante 2 minutos a  $50^{\circ}\text{C}$  para permitir la evaporación del etanol residual y se resuspendieron en 34  $\mu\text{L}$  de agua estéril. Se cuantificaron 2  $\mu\text{L}$  en un espectrofotómetro a 260/280 nm para determinar la concentración de RNA y se corrieron 2  $\mu\text{L}$  en un gel de agarosa al 1% para visualizar la integridad del RNA.

#### **TRATAMIENTO CON DNAsa / RE-EXTRACCIÓN CON TRIZOL.**

Se colocaron 10  $\mu\text{g}$  de RNA a una concentración de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  en un tubo de 0.5 mL (Eppendorf). Se adicionaron 0.4  $\mu\text{L}$  de enzima DNAsa (1U/ $\mu\text{L}$ ) (Gibco BRL), 3  $\mu\text{L}$  de Buffer 10X y se completó el volumen a 30  $\mu\text{L}$  con agua inyectable. Se incubaron las muestras 5 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  y posteriormente se adicionó 1  $\mu\text{L}$  de EDTA 25 mM (pH=8), se incubaron a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos. Se cuantificaron 2  $\mu\text{L}$  en un espectrofotómetro a 260/280 nm para determinar la concentración de RNA y se corrieron 2  $\mu\text{L}$  en un gel de agarosa al 1% para visualizar la integridad del RNA. A 50  $\mu\text{L}$  de RNA tratado con DNAsa se le adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de Trizol y 1.25 mL de glucógeno, las muestras se homogenizaron y se incubaron 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se adicionaron 30 mL de cloroformo y se agitaron vigorosamente en vórtex hasta obtener una emulsión color rosa. Se incubaron 3 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y se centrifugaron 10 minutos a 10000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se recuperaron los sobrenadantes y se adicionaron 90 mL de

isopropanol. Se incubaron durante 15 minutos a 4°C y se centrifugaron durante 10 minutos a 10000 rpm. Se retiró el isopropanol y se adicionaron 80 mL de etanol al 80%. Las muestras se centrifugaron a 6000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se retiró todo el etanol. Se dejaron secar las muestras y se resuspendieron en 14 µL de agua estéril. Se cuantificaron 2 µL en un espectrofotómetro a 260/280 nm para determinar la concentración de RNA y se corrieron 2 µL en un gel de agarosa al 1% para visualizar la integridad del RNA.

### SÍNTESIS DE cDNA.

Para cada muestra se realizaron 3 reacciones de síntesis de cDNA, utilizando cada uno de los siguientes oligonucleótidos antisentido:

DD1 = T<sub>12</sub>CA

DD2 = T<sub>12</sub>CG

DD3 = T<sub>12</sub>CC

Se prepararon las mezclas de reacción para cada muestra conteniendo lo siguiente:

REACTIVOS	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
Agua	7.4 µL	-
Regulador para la primera cadena (5 X)	4.0 µL	1 X
dNTP's (250 µM)	1.6 µL	20 µM
Oligonucleótido DD (10 µM)	2.0 µL	1 µM
RNA 100 ng/µL	2.0 µL	10 ng/ µL
DTT (100 mM)	2.0 µL	10 mM

Se incubaron las mezclas de reacción durante 10 minutos a 65°C y se añadió 1 µL de enzima transcriptasa reversa MMLV-RT (200 U/µL). Se incubaron a 37°C durante 1 hora y posteriormente a 95°C durante 5 minutos.

### AMPLIFICACIÓN LOS cDNAs / GELES DD-RTPCR.

Cada una de las copias de cDNA, generada por los tres oligonucleótidos DD, se amplificó utilizando los siguientes oligonucleótidos en sentido:

OPA 14: TCTGTGCTGG

OPA 18: AGGTGACCGT

OPA 20: GTTGCGATCC

Utilizando tubos para PCR se preparan las siguientes mezclas de reacción:

REACTIVOS	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
Agua	8.9 µL	-
Regulador para PCR (10 X)	2 µL	1X
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0.6 µL	1.5 mM
dNTP's (25 µM)	1.6 µL	2 µM
Oligonucleótido DD (10 µM)	2 µL	1 µM
Oligonucleótido OPA (2 µM)	2 µL	0.2 µM
<i>Taq</i> polimerasa (5U/ µL)	0.1 µL	0.025 U/mL
[α-35S] dATP (1000 Ci/nmol)	0.8 µL	0.4 µM
DD-cDNA	2 µL	-

Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa bajo las siguientes condiciones:

Disociación	92°C/50 segundos	35 ciclos
Asociación	40°C/90 segundos	
Extensión	72°C/60 segundos	
Extensión final	72°C/5 minutos	1 ciclo

Una vez obtenidos los productos de PCR, se corrieron en gel desnaturalizante al 6%.

La preparación de dichos geles se realizó mezclando los siguientes reactivos:

REACTIVOS	Cantidad
Urea	48 g
Archilamida-Bisacrilamida (40%/3%)	15 mL
TBE 10 X	10 mL

Se llevaron a un volumen de 100 mL con agua destilada y se disolvieron los reactivos con agitación a 40°C. Se adicionaron 15 mL de TEMED y 1 mL de persulfato de amonio. Se agitó, se vació la mezcla inmediatamente a una cámara para geles de secuenciación y se dejó polimerizar durante dos horas.

En tubos de 0.5 mL (Eppendorf) se colocaron 5.0  $\mu$ L de la muestra y 2  $\mu$ L de buffer de carga para secuenciación. Se calentaron las muestras en Baño María durante dos minutos y se cargaron en el gel. Se corrieron las muestras durante dos horas a 60 Watts con los siguientes límites: 2000 V, 65 mA y 65 W. Se dejó secar el gel durante dos horas a 80°C, se expuso una placa fotográfica (Biomax Kodak) durante 48 horas y posteriormente se reveló.

## IDENTIFICACIÓN, PURIFICACIÓN Y REAMPLIFICACIÓN DE BANDAS DIFERENCIALES.

Se identificó en la placa fotográfica una banda expresada diferencialmente en células tratadas con 4-hidroxycumarina y células control la cual se amplificó con los primers DD1 y OPA 20, la placa se alineó con el gel, se cortó la banda y se colocó en tubos de 1.5 mL (Eppendorf) nuevos. A la banda se le añadieron 400  $\mu$ L de agua estéril y se llevó a ebullición durante 15 minutos; posteriormente se centrifugó a 13000 rpm durante 3 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se adicionaron 40  $\mu$ L de acetato de sodio 3 M, 880  $\mu$ L de etanol absoluto, 2.5  $\mu$ L de glucógeno (20 mg/mL) y se dejó precipitar durante toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se centrifugó 10 minutos a 12000 rpm y se lavó el precipitado con 1 mL de etanol al 80%, se centrifugó nuevamente a 12000 rpm durante 10 minutos y se dejó secar a temperatura ambiente durante 15 minutos. El precipitado se resuspendió en 10  $\mu$ L de agua para hacer la reamplificación por PCR.

El PCR se realizó en 40  $\mu$ L de mezcla de reacción los cuales contenían:

REACTIVO	CANTIDAD ( $\mu$ L)	CONCENTRACIÓN FINAL
DNA eluido	7	-
Buffer PCR 10X	4	1X
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	2	2.5 mM
dNTP's (200 $\mu$ M)	4	20 $\mu$ M
Oligonucleótido DD 1 (20 $\mu$ M)	5	2.5 $\mu$ M
Oligonucleótido OPA 20 (20 $\mu$ M)	1	0.5 $\mu$ M
<i>Taq</i> polimerasa (5U/ $\mu$ L)	0.5	2.5 U
Agua	16.5	-

Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa bajo las siguientes condiciones:

Disociación	94°C/30 segundos	40 ciclos
Asociación	42°C/60 segundos	
Extensión	72°C/30 segundos	
Extensión final	72°C/5 minutos	1 ciclo

En una cámara para electroforesis horizontal (Gibco), 10µL del producto de PCR se corrieron en gel de agarosa al 2% durante 60 minutos con una corriente constante de 80 Volts. Simultáneamente se corrió un marcador de pesos moleculares (Gibco) para estimar el tamaño del producto de amplificación. Al terminar la electroforesis, se reveló mediante tinción con bromuro de etidio y exposición a luz ultravioleta; los resultados se documentaron mediante fotografía.

#### **CLONACIÓN Y TRANSFORMACIÓN.**

Para la clonación se utilizó el kit The Original TA Cloning (InvitroGen). Se utilizaron 2 mL de producto de reamplificación de no más de 24 horas a los cuales se añadieron 1 µL de buffer 10X (60 mM Tris-HCl pH 7.5, 60 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, 1 mg/mL albúmina sérica bovina, 70 mM β-mercaptoetanol, 1 mM ATP, 20 mM ditiotretitol, 10 mM espermidina), 2 mL del vector pCR2.1 (25 ng/µL en 10 mM Tris-HCl y 1 mM EDTA pH=8), 1 µL de ligasa T4 (4U/µL) y 4 µL de agua. Se dejó incubar la mezcla de reacción a 14°C en termociclador durante toda la noche. Posterior a la incubación, se adicionaron 5 µL de ligación a un vial de células competentes (*E. coli* INVαF') y se homogenizó suavemente con la punta de la pipeta. Se incubó durante 30 minutos en hielo, 30 segundos a 42°C y nuevamente 2 minutos en hielo. Se adicionaron 250 µL

de medio SOC (2% Tristona, 0.5% Extracto de Levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glucosa) a temperatura ambiente y se dejaron incubar las células a 37 °C durante una hora a 225 rpm en posición horizontal. Durante el proceso de incubación se extendieron 40 µL de X-gal (40 mg/mL) a una placa de agar Luria con ampicilina (50 µg/mL) para permitir su absorción en el medio de cultivo. Después de la incubación se extendieron 200 µL de células transformadas sobre la placa de agar Luria-Ampicilina-Xgal y se dejaron incubar a 37°C durante toda la noche.

Las placas se incubaron en el refrigerador durante 3 horas para permitir el desarrollo del color (azul) en las colonias no transformadas y posteriormente se seleccionaron 5 colonias blancas, se resembraron en 5 mL de medio líquido Luria con ampicilina (50 µg/mL) y se dejaron incubar toda la noche a 37°C a 225 rpm para hacer la mini preparación de DNA plasmídico y analizarlas por restricción con *Eco* RI.

#### **EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO / DIGESTIÓN CON *Eco* RI.**

Para la extracción del DNA plasmídico se empleó el kit Miniprep Wizard Plus (Promega). Las células resembradas en el medio líquido Luria-ampicilina se centrifugaron a 13000 rpm durante 1 minuto. El paquete celular se resuspendió en 200 µL de "Cell Resuspension Solution" (50 mM Tris-HCl pH=7.5, 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNasa A) y se colocó en un tubo de 1.5 mL (Eppendorf). Se adicionaron 200 µL de "Cell Lysis Solution" (0.2 M NaOH, 1% SDS) y se mezcló seis veces por inversión del tubo. Se adicionaron 10 µL de enzima proteasa alcalina y se dejó incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. Se adicionaron 200 µL de "Neutralisation Solution" (4.09 M guanidina hidrociorada, 0.759 M Acetato de Potasio, 2.12 M ácido acético glacial pH 4.2), se mezcló seis veces por inversión del tubo y se centrifugó a 14000

rpm durante 5 minutos. Se colocó la columna que contiene la resina en su tubo correspondiente, se transfirió el sobrenadante a la columna y se centrifugó durante 1 minuto a 14000 rpm. Se lavó la columna con 750  $\mu\text{L}$  de "Column Wash Solution" (60 mM Acetato de Potasio, 8.3 mM Tris-HCl pH 7.5, 40  $\mu\text{M}$  EDTA y 60% Etanol) centrifugando durante 1 minuto a 14000 rpm y se lavó una vez más con 250  $\mu\text{L}$  de la misma solución. La columna se centrifugó 1 minuto a 14000 rpm para secarla y se transfirió a un tubo nuevo donde se eluyó con 20  $\mu\text{L}$  de agua estéril y se centrifugó nuevamente 1 minuto a 14000 rpm para recuperar el filtrado con el plásmido. El producto eluido se cuantificó a 260 nm.

Para la digestión, se mezclaron en un tubo de 600  $\mu\text{L}$  (Eppendorf) 1  $\mu\text{g}$  de DNA plasmídico purificado, 1  $\mu\text{L}$  de Buffer 3 10X para digestión, 0.5  $\mu\text{L}$  de la enzima de restricción *Eco* RI (10 U/ $\mu\text{L}$ ) y 3.5  $\mu\text{L}$  de agua. La mezcla se dejó incubar durante 3 horas a 37°C. Posteriormente 10 $\mu\text{L}$  de la digestión se corrieron en gel de agarosa al 2% durante 60 minutos con una corriente constante de 80 Volts en una cámara para electroforesis horizontal (Gibco). Simultáneamente se corrió un marcador de pesos moleculares (Gibco) para estimar que el tamaño del inserto correspondiera al producto de reamplificación. Al terminar la electroforesis, se reveló mediante tinción con bromuro de etidio y exposición a luz ultravioleta; los resultados se documentaron mediante fotografía.

### **SECUENCIACIÓN.**

El proceso se realizó por duplicado, uno para el promotor M13 en antisentido y la otra para el promotor T7 en sentido. Se colocaron 20  $\mu\text{L}$  de plásmido en un tubo de 1.5 mL (Eppendorf) al cual se le adicionaron 2  $\mu\text{L}$  de una solución de NaOH 2N - EDTA 2 mM,

se incubó 15 minutos a 37°C y se añadieron 2 µL de acetato de sodio 3M y 40 µL de etanol absoluto. Las muestras se congelaron 15 minutos a -70°C y posteriormente se centrifugaron 5 minutos a 10000 rpm, se lavaron con etanol al 80% y se secaron y resuspendieron en 14 µL de agua.

Se colocaron 7 µL de ssDNA en un tubo de 1.5 mL (Eppendorf) y se adicionaron 2 µL de Buffer de reacción para secuenciación 5X, se añadió 1 µL de oligonucleótido T7 en sentido (100 µM) ó del M13 en antisentido. Se completó a un volumen de 10 µL y se incubó 2 minutos a 65°C. Posteriormente se dejó enfriar 30 minutos a temperatura ambiente y se colocó en hielo. Se adicionó 1 µL de DTT 0.1 M, 2 µL de solución Labeling mix 5X (dGTP) diluido 1:5 con agua, 0.5 µL de [ $\alpha$ -35S] dATP (1000 Ci/nmol) y 2 µL de Sequenase diluida 1:8 con Buffer para dilución de enzima. La mezcla se homogenizó y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente.

Mientras tanto, se marcaron 4 tubos nuevos con A, C, G y T y a cada uno se adicionaron 2.5 µL de ddATP (dGTP), ddCTP (dGTP), ddGTP (dGTP) y ddTTP (dGTP) respectivamente a cada tubo y se precalentaron por 3 minutos a 37°C. Se transfirieron 3.5 µL de la mezcla de reacción a cada tubo y se incubaron a 37°C durante 5 minutos. Se adicionaron 4 µL de Stop Solution a cada tubo y se congelaron los tubos a -20°C. Los productos de las reacciones fueron cargados en un gel de secuenciación.

### **AMPLIFICACIÓN ESPECÍFICA DE ARM-1.**

Para realizar la amplificación de la molécula primero se purificó el RNA de las células tratadas tanto con etanol como con 4-hidroxycumarina mediante el procedimiento antes descrito. Se cuantificó y se tomaron 5 µg de cada RNA para realizar la transcripción inversa. Se añadieron 2 µL de una solución de oligo dT12-18 y se incubó la mezcla a

65°C durante 10 minutos. Se añadieron 2.4 µL de agua, 4.0 µL de regulador para la primera cadena 5X, 0.8 µL de enzima M-MLVRT 200 U/ µL, 0.8 µL de dNTP's 10 mM y 2.0 µL de ditiotreitól (DTT) 100 mM. Se incubó la mezcla a 37°C durante una hora y posteriormente a 95°C durante 5 minutos. Terminada la reacción se adicionaron 80 mL de agua para tener un volumen final de 100 µL y se prosiguió a realizar la amplificación.

Para realizar la amplificación de GAPDH y ARM-1 utilizando las siguientes cantidades:

Reactivos	Volumen	Concentración Final
Agua	35.3 µL	-
Regulador 10X PCR	5.0 µL	1X
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	2.5 µL	2.5 mM
dNTP's 10 mM	1.0 µL	200 µM
Primer 5' 20 µM	0.5 µL	0.2 µM
Primer 3' 20 µM	0.5 µL	0.2 µM
Taq polimerasa 5U/ µL	0.2 µL	1 U/reacción
cDNA	5.0 µL	-

Gen	Secuencia Sentido (5' - 3')	Secuencia Antisentido (5' - 3')	Tamaño del producto
ARM-1	AGCACCGCCAGGATGACGACTT	CGGGGCTTGGGCTGGTTG	748 pb
GAPDH	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCCTGTTGCTGT	452 pb

Se incubó la mezcla de reacción en un termociclador bajo las siguientes condiciones:

Disociación	94°C/45 segundos	30 ciclos
Asociación	60°C/45 segundos	
Extensión	72°C/90 segundos	
Extensión final	72°C/5 minutos	1 ciclo

## **RESULTADOS.**

### **Gel DD-RTPCR.**

Se corrieron las muestras de cDNA amplificado con los diferentes oligonucleótidos y se obtuvo una radiografía correspondiente al gel. En la Figura 1 se muestra que la 4-hidroxycumarina produce un aumento en la expresión de diversos genes, pero también provoca que otros disminuyan su expresión. Al obtener bandas diferenciales en el gel de poliacrilamida hay evidencia de que hay diferencias en la cantidad de RNA mensajero y por lo tanto diferencias en la expresión de los genes correspondientes. La banda señalada en la Figura 2, entre otras, se observa más intensa en las células control que en las células tratadas con 4-hidroxycumarina y fue la que se eligió para realizar los análisis posteriores. Esta banda fue obtenida con los oligonucleótidos DD1 y OPA 20, por lo que fueron los que se emplearon para la reamplificación posterior a la purificación.

Una vez identificada la banda de interés, se cortó del gel y se purificó para su posterior reamplificación por PCR con los oligonucleótidos DD1 y OPA 20. Posterior a la purificación y reamplificación de las bandas se corrió un gel de agarosa, para comprobar la reamplificación y determinar el tamaño del fragmento. En la Figura 3, que corresponde al gel de agarosa al 2%, se observa que el gen correspondiente al fragmento reamplificado tiene un tamaño aproximado a 350 pb.

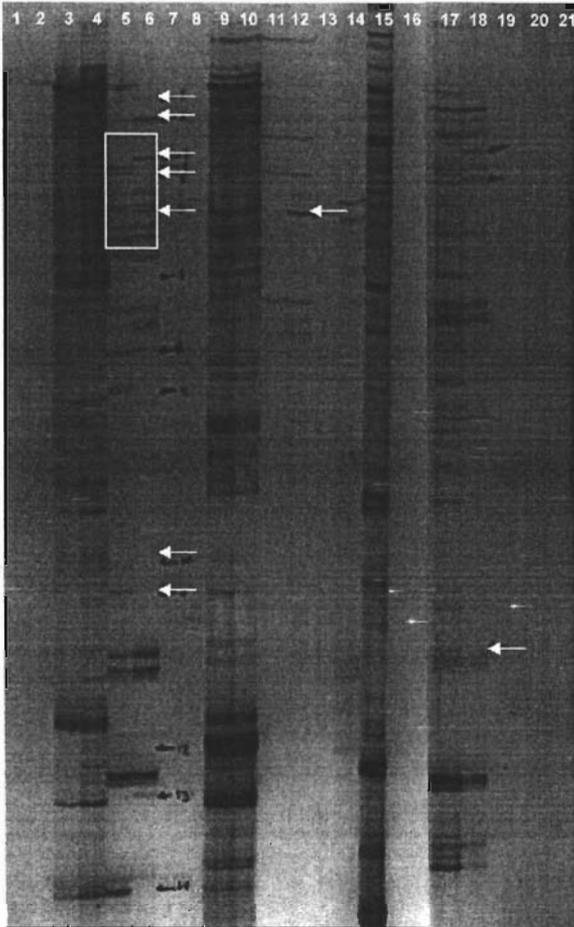


Figura 1. Autorradiografía de un gel de DD RT-PCR de RNAs de células control (carriles impares) o tratadas con 4-hidroxicumarina (carriles pares). Las flechas indican algunas de las bandas expresadas diferencialmente. El recuadro indica el acercamiento de la Figura 2.

Carril	Muestra	DD	OPA
1	Control	1	14
2	4-OHC	1	14
3	Control	1	18
4	4-OHC	1	18
5	Control	1	20
6	4-OHC	1	20
7	Control	2	14
8	4-OHC	2	14
9	Control	2	18
10	4-OHC	2	18
11	Control	2	20
12	4-OHC	2	20
13	Control	3	14
14	4-OHC	3	14
15	Control	3	18
16	4-OHC	3	18
17	Control	3	20
18	4-OHC	3	20
19	C (-)	1	14
20	C (-)	2	18
21	C (-)	3	20

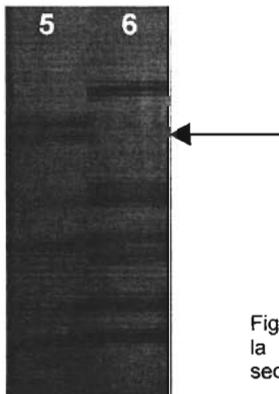


Figura 2. Acercamiento del gel de DD RT-PCR. La flecha indica la banda seleccionada para su purificación, clonación y secuenciación.

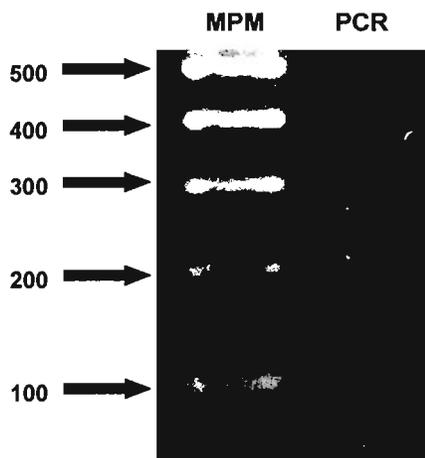


Figura 3. Gel de agarosa al 2% en TBE en donde se muestra la amplificación de la banda seleccionada del gel de DD RT-PCR con los oligonucleótidos DD1 y OPA20. El fragmento tiene un tamaño aproximado de 350 pb.

### OBTENCIÓN DE CÉLULAS TRANSFORMADAS.

Una vez reamplificado el fragmento, se realizó la ligación en el plásmido pCR2.1 y la transformación de las células competentes *E. coli* INV $\alpha$ F'. La clonación en *E. coli*, se comprobó de dos maneras, la primera por la capacidad de las células de crecer en medio con ampicilina y la segunda por la capacidad de las células transformadas de crecer en el medio sin el empleo de un análogo de la galactosa presente en el medio (x-gal). Las colonias no transformadas adquieren una coloración azul debido a la utilización del análogo de galactosa, x-gal, presente en el medio de cultivo. Las colonias transformadas mantuvieron el color blanco característico en medio Luria (Figura 4).

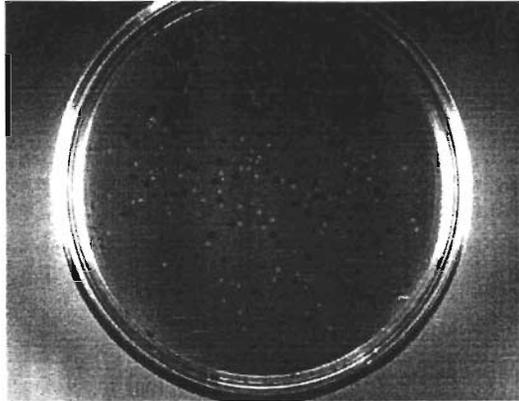


Figura 4. Transformación de células *E. coli* INV $\alpha$ F' con el fragmento reamplificado y ligado al plásmido pCR2.1. Las colonias transformadas son capaces de crecer en medio con ampicilina, además las diferenciamos de las no transformadas porque estas últimas emplean el análogo de la galactosa presente en el medio de cultivo (x-gal).

#### **DIGESTIÓN DEL PLÁSMIDO CON *Eco* RI.**

Las colonias seleccionadas se propagaron en medio líquido Luria-ampicilina de donde se aisló el plásmido. A este plásmido se le realizó una digestión con la enzima de *Eco* RI, con esto se comprobó que las células seleccionadas no solamente habían adquirido el plásmido sino que en éste se encontraba el inserto correspondiente al fragmento reamplificado y ligado, ya que al correr el gel de agarosa al 2% se obtuvieron dos bandas, una correspondiente al plásmido y la otra correspondiente al fragmento clonado con un tamaño de 350 pb (Figura 4).

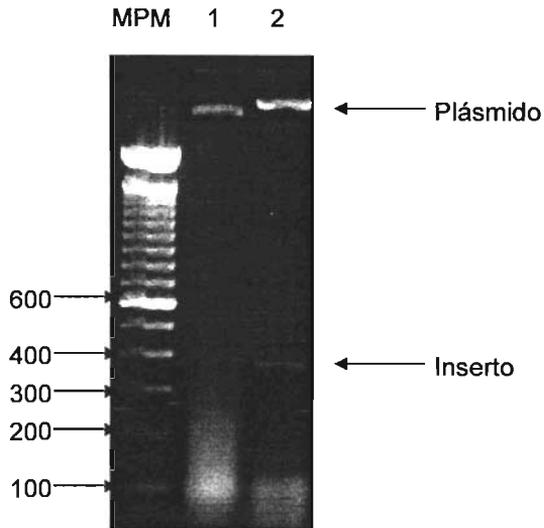


Figura 5. Digestión del plásmido con Eco RI. Se verificó la presencia del inserto en las células transformadas, en el carril 1 se observa el plásmido sin digerir y en el carril 2 se observa el plásmido digerido en el que vemos la banda correspondiente al plásmido y la banda correspondiente al fragmento reamplificado y ligado (360 pb).

### SECUENCIACIÓN.

En el gel de secuenciación se verificó la orientación del inserto y se obtuvo la secuencia siguiente de 365 pb:

```
GCGATCCAGAACACATTAACCTCGCCCCAGTTCAGCAGGCCCTGGGTATGTTCA
GTGCGGCCTTGGCCTCAGGACAGCTTGGCCCTCTCATGTGCCAGTTCGGCCTTC
CTGCAGAGGCTGTTGAGGCCGCCAACAAAGGTGATGTGGAAGCATTGCCAAAG
CCATGCAGAACAAATGCCAAATCGGACCCAAAGGAGGGCGACACAAAAGACAAGA
AAGACGAAGAAGAAGATATGAGTCTAGACTAAATTATTCAGTGTCCGTCCCAAGT
```

TGGAATTGGTAGCTGTGTGATTCCGTAGTGGTGATTGTGATTTGCCACCTCACTA  
ATAAAGTCCTTCCTTGTACCTGAAAAAAAAAAAAAAAA

Esta secuencia se analizó en la base de datos del banco de genes ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) por medio de un análisis de BLASTN para nucleótidos. El fragmento corresponde al gen de una molécula llamada Molécula Reguladora de Adhesión (ARM-1) del ratón (*Mus musculus*) cuya secuencia es la siguiente:

GGT GTG **AGC ACC GCC AGG ATG ACG ACT** TCA GGC GCT CTG TTC CCA AGC  
CTG GTG CCC GGC TAT CGG GGG TCT TCT TCT ACC AAA TAT TTG GTG GAG  
TTC CGG GCA GGA AAA ATG TCA TTA AAA GGA ACT ACG GTC ACC CCA GAT  
AAA CGG AAA GGT CTC GTG TAC ATC CAG CAG ACG GAC GAC TCC CTT ATT  
CAC TTC TGT TGG AAA GAC AGG ACC TCT GGG ACC GTG GAG GAT GAC TTG  
ATT ATC TTT CCT GAT GAC TGT GAG TTC AAG CGG GTA CCT CAG TGC CCC  
AGT GGG AGG GTC TAC GTG CTC AAG TTT AAG GCA GGG TCC AAG CGG CTC  
TTC TTC TGG ATG CAG GAG CCC AAG ACT GAC CAA GAT GAG GAG CAC TGC  
CGG AAA GTC AAC GAA TGT CTG AAC AAC CCC CCC ATG CCT GGG TCA CTG  
GGA GCA AGT GGG AGT AGT GGC CAT GAG CTT TCA GCA CTG GGC GGT GAG  
GGT GGC CTG CAG AGC CTG TTG GGG AAC ATG AGT CAC AGC CAG CTT ATG  
CAG CTC ATC GGA CCA GCC GGC CTG GGA GGA CTG GGT GGA CTT GGG  
GCC CTC ACT GGG CCA GGC CTG GCC AGC TTG CTG GGG AGC AGT GGA CCT  
CCA GCC AGC TCT TCA TCC AGC TCC CGG AGC CAG TCG GCA GCC GTC ACC  
CCA TCC TCC TCC ACC TCT TCC GCT CGC GCC ACC CCA GCC CCT TCT GCC  
CCA GCA GCT GCC TCG **GCA ACC AGC CCA AGC CCC** GCA CCC AGC TCA  
GGT AAT GGA ACC AGC ACA GCA GCC AGC CCG ACC CAG CCC ATC CAG CTG

AGC GAC CTC CAG AGC ATT CTG GCC ACT ATG AAC GTG CCG GCA GGG CCA  
GGC AGC CAG CAA GTG GAT CTG GCG AGT GTG CTG ACC CCA GAG ATC ATG  
GCT CCC ATC CTT GCC AAT GCA GCA GAC GTT CAG GAG CGC CTG CTG CCC  
TAC CTG CCC TCT GGG GAG TCT CTG CCC CAG ACT GCA GAT GAG ATC CAG  
AAC ACA TTA ACC TCG CCC CAG TTC CAG CAG GCC CTG CTG GGT ATG TTC  
AGT GCG GCC TTG GCC TCA GGA CAG CTT GGC CCT CTC ATG TGC CAG ATC  
GGC CTT CCT GCA GAG GCT GTT GAG GCC GCC AAC AAA GGT GAT GTG GAA  
GCA TTT GCC AAA GCC ATG CAG AAC AAT GCC AAA TCG GAC CCA AAG GAG  
GGC GAC ACA AAA GAC AAG AAA GAC GAA GAA GAA GAT ATG AGT CTA GAC  
TAA ATT ATT CAG TGT CCG TCC CCA AGT TGG AAT TGG TAG CTG TGT GAT  
TCC GTA GTG GTG ATT GTG ATT TCG CCA CCT CAC TAA TAA AGT CCT TCC  
TTG TAC CTG TAA AAA

La secuencia subrayada corresponde al fragmento clonado y secuenciado.

Para la confirmación de la expresión diferencial del gen se realizó la extracción del RNA total de las células control o tratadas con 4-hidroxicumarina para realizar la amplificación por RT-PCR. De la secuencia completa de ARM-1 se diseñaron oligonucleótidos específicos para verificar la expresión de la molécula en células B16.

Los oligonucleótidos iniciadores utilizados fueron:

Primer 5': AGC ACC GCC AGG ATG ACG ACT T

Primer 3': CGG GGC TTG GGC TGG TTG

En la secuencia de la molécula se señalan en negritas las secuencias de alineación de los oligonucleótidos.

En la Figura 5 se observa la amplificación del gen constitutivo que corresponde a la enzima Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y la amplificación de la Molécula Reguladora de Adhesión 1 (ARM-1). Se observa claramente que la molécula ARM-1 se encuentra en menor cantidad en las células tratadas con 4-hidroxicumarina.

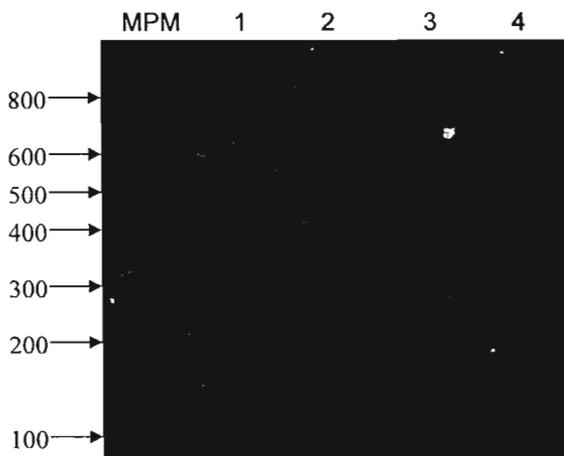


Figura 6. Amplificación específica de GAPDH y ARM-1.

- 1: MPM,
- 2: GAPDH células control,
- 3: GAPDH células tratadas con 4-hidroxicumarina,
- 4: ARM-1 células control,
- 5: ARM-1 células tratadas con 4-hidroxicumarina.

## DISCUSIÓN.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se demostró que el tratamiento con 4-hidroxicumarina 500  $\mu\text{M}$  durante 24 horas induce cambios en la expresión diferencial de genes en células B16. Actualmente desconocemos la identidad de los genes con expresión diferencial, pero es probable que algunos sean genes que participen en la organización del citoesqueleto y la regulación de la adhesión y la migración. Por ejemplo, en nuestro laboratorio hemos identificado que el tratamiento con 4-hidroxicumarina disminuye la expresión de paxilina, que es una molécula adaptadora indispensable para la formación de placas de adhesión focal (datos sin publicar). Los cambios en la expresión de proteínas involucradas en el rearrreglo del citoesqueleto podrían ser responsables de los efectos reportados de la 4-hidroxicumarina. En cuanto al mecanismo por el cual la 4-hidroxicumarina induce cambios en la expresión génica, se ha reportado que este compuesto disminuye la fosforilación en tirosinas de varias proteínas de células de melanoma (Velasco, 2003), esta podría ser una de las razones por las que se este afectando la expresión de genes.

La banda que seleccionamos para su secuenciación, se trata de un fragmento del gen que codifica para la molécula reguladora de adhesión 1 (ARM-1). ARM-1 es una proteína integral de membrana que está constituida por tres fragmentos, un dominio extracelular rico en serinas y treoninas, un dominio hidrofóbico transmembranal, y un dominio intracelular altamente cargado. Esta molécula tiene varios sitios de O-glicosilación y N-glicosilación, por lo que está altamente conjugada con carbohidratos (Simins, 2000).

La proteína ARM-1 tiene identidad con la proteína T9J22.26 de *Arabidopsis thaliana* (33.33%) y con la proteína C56G2.7 de *Caenorhabditis elegans* (32.78%). Sin embargo tiene mayor similitud con el antígeno Mr 110,000 de *Homo sapiens* (96.31%) y a la glicoproteína 110 de *Rattus norvegicus* (99.02%), lo cual indica que existen

genes homólogos tanto humano como en rata. El antígeno Mr 110,000 se identificó en células de carcinoma gástrico y comparte epitopes con el antígeno carcinoembrionario (CEA) (Shimada, 1991). Se ha descrito que Mr 110,000 y CEA tienen cuatro regiones homólogas en el dominio extracelular (Shimada, 1994). Por esta razón, los epitopes compartidos de Mr 110,000 con el CEA son reconocidos por los anticuerpos monoclonales COL-4 y B1.1 generados contra CEA. CEA es una molécula, miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, que promueve la adhesión entre células tumorales. Se sabe que la expresión de CEA está incrementada en carcinomas de colon, páncreas, estómago y mama (Abbas, 2000), mientras que no se expresa en tejidos normales; esto indica que la expresión de CEA favorece la progresión de la neoplasia.

En el caso de la proteína homóloga a ARM-1 en rata, se encontraron homólogas con la cadena pesada de la inmunoglobulina humana y con la región V de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón (Nakane, 2000). Estas homólogas se encuentran en el dominio extracelular de la proteína de rata. La presencia de dichos dominios es una característica importante de las moléculas que actúan como moléculas de adhesión celular.

En ratón ARM-1 presenta tres de los cuatro dominios extracelulares idénticos a los de la proteína de rata. ARM-1 se encuentra distribuida en varios tejidos de ratón tales como riñón, testículos, músculo esquelético, hígado, pulmones, bazo, cerebro y corazón (Simins, 2000). La amplia distribución de ARM-1 sugiere que la función de esta proteína es importante para las células independientemente de su estirpe.

Se ha demostrado que ARM-1 incrementa su expresión en células tumorales metastásicas de mama MCF7ADR y MDA-MB435 4A4 comparándolas con el fenotipo no metastásico (Simins, 2000). Estos mismos autores encontraron que la expresión de ARM-1 se ve inducida por la presencia de IFN- $\gamma$ . El aumento en la expresión de ARM-

1 resulta en un incremento en la adhesión a células endoteliales que es independiente de la expresión de integrinas. Por lo tanto la sobreexpresión de ARM-1 correlaciona con un aumento en la capacidad metastásica. Hasta el momento no se han reportado claramente las funciones de ARM-1, pero los datos disponibles apuntan a que funciona como molécula de adhesión.

Utilizando iniciadores específicos, demostramos que el tratamiento con 4-hidroxicumarina disminuye la expresión de ARM-1. Este efecto podría disminuir la adhesión entre células cancerosas y células endoteliales, y por lo tanto afectar i) la extravasación durante el proceso de metástasis y ii) la formación de nuevos vasos sanguíneos en el seno del tumor. Este podría ser uno de los mecanismos por los cuales uno de los metabolitos de la cumarina participe en su efecto antimetastásico. Demostrar que la 4-hidroxicumarina es efectiva, en modelos animales, como inhibidor de la formación de metástasis corroboraría nuestra hipótesis. Adicionalmente, se requieren más estudios para identificar con precisión el mecanismo de acción de la 4-hidroxicumarina. Estos estudios apoyarían la propuesta de la 4-hidroxicumarina como un posible fármaco para el tratamiento de neoplasias.

## CONCLUSIONES.

- ✓ Empleando la técnica DD-RT-PCR se comprobó que el tratamiento con 4-hidroxicumarina induce cambios en la expresión de genes en células de melanoma murino B16.
- ✓ Se identificó que un gen que disminuye su expresión por el tratamiento con 4-hidroxicumarina codifica para la Molécula Reguladora de Adhesión 1 (ARM-1).
- ✓ Se comprobó la disminución en la expresión de ARM-1 por RT-PCR.
- ✓ Se requieren estudios posteriores para comprobar que la disminución de ARM-1 disminuye la adhesión de células tumorales al endotelio vascular.

## BIBLIOGRAFIA.

- Abbas A. K., Lichtman A. H., Pober J. S. 2000. Cellular and Molecular Immunology. Fourth edition. USA. Ed. Saunders. Pp. 553
- Andrés J. P. 1999. Patología molecular de la progresión tumoral. Fox Chase Cancer Center. **9**:138-143
- Balmer C. Wells A. 1998. Basics principles of cancer treatment and cancer chemotherapy; En: Tannock I, Hill R. The basics science of oncology. 3ª ed. Mc Graw-Hill, USA.
- Casley S., Földy-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.
- 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.
- Dexeus F. 1990. Phase II study of coumarin and cimetidine in patients with metastasic renal carcinoma. Journal o Clinical Oncol. **8**: 325-329.
- Franks L. M. 1998. Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. 3rd. Edition. London. Oxford University Press. 458 pp.
- Garibay M. A. 1998 Importancia de las integrinas en el proceso metastásico. México D.F. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. 56pp. Tesis para obtener el grado de Licenciatura.
- Hadidi H., Zahlsen K., Idle J. R. and Cholerton S. 1997. A single amino acid substitution (Leu160His) in cytochrome P450 CYP2A6 causes switching from 7-

hydroxylation to 3-hydroxylation of coumarone. Food and chemical Toxicology. **35**: 903-907.

- Jiménez. O. A., Molina G. J., Mendoza P. N., León C. F. Flores P. B., Santos S. E., Mandoki J. J. 1999. Cytostatic activity of coumarin metabolites and derivatives in the B16-F10 murine melanoma cell line. *Melanoma Research*. **9**: 243-247.
- Jung J. C., Lee J. H., Oh S., Lee J. G., Park O. S. 2004. Synthesis and antitumor activity of 4-hydroxycoumarin derivatives. *Bioorganic and medicinal Chemistry Letters*. **14**: 5527-2231.
- Lodish H.; Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P., Baltimore D. and Darnell J. 2000. *Molecular Biology*. 4th edition. Scientific American Books. USA. 1033-1174.
- Marshall M. E. 1994a. An updated review of the clinical development of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7- hydroxycoumarin. *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-hydroxycoumarin on human malignant cell lines in vitro. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **120** (suppl): S3-S10.
- 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. M. and Marshall M. E. 1994. Coumarin (1,2-benzopyrone) for the treatment of prostatic carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **120** suppl.: S35-S38.

**ESTA TESIS NO SALI  
DE LA BIBLIOTECA**

- 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.
- Nair R. V., Fischer P. E., Safe H. S., Cortez C. Harvey G. R. and DiGiovanni J. 1991. Novel coumarins as potential anticarcinogenic agents. *Carcinogenesis*. **12**: 65-69.
- Nakane T., Inada Y., Itoh F., Chiba S. 2000. Rat homologue of the human Mr 110 000 antigen is the protein that expresses widely in various tissues. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1493**: 378-382
- 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.
- O'Kennedy R, Thornes D. R. 1997. Coumarins, Biology, Application and Mode of Action. Ed. John Wiley and Sons. Cap. 2, Cap. 3.
- Orozco A. 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. 120p. Tesis para obtener el grado de licenciatura.
- 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 coumarone and predicted dosage regimens. *Drug Res*. **34**: 907-910.

- Rouslahti E. 1996. How cancer spreads. Scientific American. Special issue: What you need to know about cancer? Sep. 42-47.
- Ruddon W. R. 1995. Cancer Biology. 3rd. edition. N.Y. Oxford University Press. 520 pp.
- Scheel L.D. The Biological action of coumarins. 1972. Microbiol. Toxins. **8**: 47-66.
- Shimada S., Ogawa M., Schlom J., Greiner W. 1991. Identification of a Novel Tumor-associated Mr 110,000 Gene Product in Human Gastric Carcinoma Cells That Is Immunologically Related to Carcinoembryonic Antigen. Cancer Research. **51**: 5694-5703
- Shimada S., Ogawa M., Takahashi M., Schlom J., Greiner W. 1994. Molecular Cloning and Characterization of the Complementary DNA of an Mr 110,000 Antigen Expressed by Human Gastric Carcinoma Cells and Upregulated by  $\gamma$ -Interferon. Cancer Research. **54**: 3831-3836.
- Simins A., Weighardt H., Weidner K. M., Weidle U. H., Holzmann B. 1999. Functional cloning of ARM-1, an adhesion-regulating molecule upregulated in metastatic tumor cells. Clinical & Experimental Metastasis. **17**: 641-648
- Stein H.J. 1992. Medicina Interna. 3ra ed. Tomo 1. Editorial Salvat. México. 1148-1150.
- Varmus H., Weinberg R. 1993. Genes and biology of cancer. Scientific American Library.
- Velasco M., 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 adhesion to extracellular matrix proteins and motility. *Cancer Letters*. **198**: 179-186.

- Tannock I. and Hill R. 1999. *The basics science of oncology*. 3th edition. Mc Graw-Hill. USA. Cap 1, 2.
- Weinberg A. R. 1996. How cancer arises. *Scientific American Library*. Special issue: What you need to know about cancer? **275**; 3:32-40.
- Zacharski L., Henderson W., Rickles F. 1981. Effects of warfarins on survival on small cell carcinoma of lung V. A. study No. 75. *JAMA*. **245**(8): 831-835.
- Zänker K. S., Blümel G., Lange., Siewert J.R. 1984. Coumarin in melanoma patients: an experimental and clinical study. *Drugs Exptl. Clin. Res*. **11**:767-774.