

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

“ESTUDIO *IN VITRO* DEL EFECTO DE CINCO
CUMARINAS EN LA EXPRESION DE MOLECULAS DE
ADHESION EN LINEAS CELULARES DE CARCINOMA
PULMONAR HUMANO”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

D O C T O R E N C I E N C I A S

P R E S E N T A :

QFB. MARCO A. ^{Antonio} VELASCO VELAZQUEZ



MEXICO, D. F.

2005

341914



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

| | |
|------------|------------------------------------|
| Presidente | Dr. Alejandro Zentella Dehesa. |
| Secretario | Dr. Juan José Mandoki Weitzner. |
| Vocal | Dr. Ricardo Reyes Chilpa. |
| Vocal | Dra. Elia Martha Pérez Armendáriz. |
| Vocal | Dr. Marco Tulio González Martínez. |
| Suplente | Dr. Jesús Chimal Monroy. |
| Suplente | Dr. Alfonso León del Río. |

El presente trabajo se desarrolló en los siguientes Laboratorios de la Facultad de Medicina, UNAM: i) Laboratorio de Farmacología Celular (Departamento de Farmacología), ii) Laboratorio de Biología Molecular de Parásitos (Departamento de Microbiología) y iii) Laboratorio de Farmacología Molecular (Departamento de Farmacología).

Adicionalmente, colaboraron los Laboratorios de Cáncer Pulmonar del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, y de Síntesis Orgánica Heterocíclica de la Facultad de Química, UNAM.

Este trabajo fue financiado parcialmente por el proyecto PAPIIT IN230202 (DGAPA-UNAM) y el proyecto PAEP 102371 (DGEP-UNAM).

Marco Velasco fue becario del CONACYT (125266) y de la DGEP-UNAM (12982716) durante sus estudios de Posgrado.

A mi Familia

A mis maestros

A mis amigos

A mis compañeros de laboratorio

INDICE

| | Página |
|---|--------|
| 1. Resumen. | 1 |
| Abstract. | 2 |
| 2. Antecedentes. | |
| El cáncer: un problema de salud pública. | 3 |
| Cambios genéticos durante la progresión tumoral. | 3 |
| Mecanismos de formación de metástasis. | 6 |
| El proceso de metástasis requiere receptores de adhesión. | 9 |
| Participación de las integrinas en el proceso de metástasis. | 10 |
| Las integrinas regulan la formación de complejos de señalización. | 16 |
| Cumarinas | 21 |
| 3. Objetivo. | 26 |
| 4. Hipótesis. | 26 |
| 5. Material y métodos. | |
| Material biológico. | 27 |
| Compuestos utilizados. | 27 |
| Características de la exposición a cumarinas. | 28 |
| Evaluación del efecto citotóxico de cumarinas. | 29 |
| Evaluación de la expresión de integrinas. | 29 |
| Ensayos de adhesión a moléculas de matriz extracelular. | 31 |

| | |
|---|----|
| Efecto de 4-hidroxicumarina sobre el citoesqueleto. | 32 |
| Efecto de 4-hidroxicumarina en la migración. | 32 |
| Efecto de 4-hidroxicumarina sobre la fosforilación de tirosinas. | 33 |
| Efecto de 4-hidroxicumarina sobre la localización de paxilina. | 33 |
| Efecto de 4-hidroxicumarina sobre la expresión/ activación de paxilina. | 34 |
| Efecto de 4-hidroxicumarina sobre la expresión diferencial de genes. | 35 |
| | |
| 6. Resultados | 40 |
| | |
| 7. Discusión y conclusiones. | 59 |
| | |
| 8. Perspectivas. | 69 |
| | |
| 9. Bibliografía. | 71 |

1. RESUMEN.

Las metástasis tumorales son la principal causa de muerte en pacientes con cáncer. Durante el proceso de metástasis las células neoplásicas modifican su adhesión a otras células y/o a la matriz extracelular (MEC). Por lo tanto, los receptores de adhesión y las moléculas intracelulares que regulan la adhesión han sido señaladas como blancos farmacológicos para disminuir la invasividad. La cumarina es un producto natural que tiene actividad antitumoral en melanomas, carcinoma renal y carcinoma prostático y actividad antimetastásica en modelos murinos de diferentes tumores. *In vivo*, la cumarina es rápidamente metabolizada a derivados hidroxilados con mayor actividad biológica, por lo que se ha propuesto que la cumarina es un profármaco. Con el objetivo de aclarar el mecanismo de acción antimetastásico de la cumarina, este estudio utilizó diversas líneas celulares para analizar los efectos *in vitro* de cumarina y cuatro hidroxicumarinas en: i) la expresión de algunos genes (integrinas y paxilina); ii) la estabilidad del citoesqueleto; iii) la adhesión a componentes de la MEC; iv) la motilidad; y v) la fosforilación en tirosinas. En células A427 (adenocarcinoma pulmonar) 3-hidroxicumarina disminuyó la expresión de las integrinas αv y $\beta 1$. La 4-hidroxicumarina disminuyó la expresión de las integrinas αv y $\alpha 6$, mientras que 6-hidroxicumarina inhibió la expresión de la integrina $\alpha 6$, pero incrementó la de la $\alpha 4$. Sin embargo, ninguno de los tratamientos modificó la adhesión de células A427 a proteínas de la MEC. En células B16-F10 (melanoma murino) 4-hidroxicumarina desorganizó el citoesqueleto de actina. Este efecto correlacionó con reducciones en la adhesión a MEC y con la inhibición de la motilidad. La 4-hidroxicumarina disminuyó la expresión de paxilina y la fosforilación en residuos de tirosina de varias proteínas, efectos que podrían ser responsables de la desorganización del citoesqueleto. El efecto antimetastásico de la cumarina *in vivo* puede ser parcialmente explicado por los efectos de sus productos de biotransformación hidroxilados. Dada la importancia de la adhesión celular en el proceso de metástasis, la 4-hidroxicumarina podría ser útil como terapia adyuvante en el tratamiento de algunos tipos de cáncer.

Palabras clave: adhesión celular, cumarina, 4-hidroxicumarina, citoesqueleto, paxilina.

ABSTRACT.

Tumor metastasis is the leading cause of death in cancer patients. The translocation of tumor cells across extracellular matrix (ECM) barriers during the metastatic process, need the adhesion of tumor cells to other cells and/ or ECM proteins. Therefore, adhesion receptors as well as intracellular molecules involved in the regulation of adhesion have been pointed as pharmacological targets for diminishing the invasiveness of tumor cells. Coumarin, a widely distributed natural product, has antitumoral activity in renal and prostatic carcinomas, as well as in malignant melanomas. In addition, coumarin decreases the number of metastasis in murine models of different tumors. *In vivo*, coumarin is rapidly metabolized into hydroxylated derivatives with greater biological activity; this has lead to the proposal that coumarin is a prodrug. With the purpose of elucidating the mechanism by which coumarin acts as an antimetastatic agent, different cell lines were used to study *in vitro* the effects of coumarin and four hydroxycoumarins on: i) the expression of integrins and paxillin; ii) the reorganization of the actin cytoskeleton; iii) the cell adhesion to ECM proteins; iv) the cell motility; and v) the tyrosine phosphorylation of proteins. In the lung adenocarcinoma cell line A427, 3-hydroxycoumarin decreased the expression of integrin αv as well as that of integrin $\beta 1$. 4-Hydroxycoumarin produced a decreased the expression of integrins αv and $\alpha 6$. 6-Hydroxycoumarin inhibited the expression of integrin $\alpha 6$ expression but increased that of $\alpha 4$. However, none of these compounds altered the adhesion of A427 cells to ECM proteins. In B16-F10 melanoma cells, 4-Hydroxycoumarin disorganized the actin cytoskeleton, leading to a reduced adhesion to purified ECM proteins, and a decrease in cell motility. 4-Hydroxycoumarin also decreased paxillin expression and tyrosine phosphorylation of several proteins; such effects could be responsible for cytoskeletal disorganization. The antimetastatic activity of coumarin *in vivo* can be partially explained by the effects produced by its hydroxylated biotransformation products. Given the importance of cell adhesion in the metastatic process, 4-hydroxycoumarin might be useful for the prevention of metastasis and could eventually be used as an adjuvant therapy in cancer.

Key words: cell adhesion, coumarin, 4-hydroxycoumarin, cytoskeleton, paxillin.

2. ANTECEDENTES.

2.1. El cáncer: un problema de salud pública.

Según el informe anual de la OMS del 2002, en el mundo más de 10 millones de personas son diagnosticadas con cáncer cada año. Adicionalmente, el número de muertes por cáncer asciende a 6 millones anuales. Se estima que estas cifras se incrementarán en un 50% en los próximos 20 años [1]. En México, durante el año 2002, los tumores malignos fueron causa de 24,798 muertes, que corresponden al 5% del total de defunciones, y son la cuarta causa de mortalidad en personas en edad productiva entre 15 y 64 años (INEGI/ SS, 2002).

Las metástasis tumorales son responsables de una gran proporción de las muertes por cáncer. La presencia de células con capacidad invasiva es diagnóstico suficiente para indicar malignidad. Se ha demostrado que el tiempo de supervivencia del paciente correlaciona inversamente con la capacidad invasiva del tumor. Las terapias que disminuyen el número de células cancerosas, disminuyen también la probabilidad de que éstas invadan otros órganos; sin embargo, estos medios no son suficientes para curar el cáncer. A pesar de los avances en el manejo de la enfermedad, la supervivencia a 5 años para todos los tipos de cáncer de pulmón es de 13% y la de melanoma metastático es de 16% [2].

2.2. Cambios genéticos durante la progresión tumoral.

La transformación de una célula normal en una célula cancerosa requiere de múltiples mutaciones. Los principales mecanismos que inducen cambios genéticos incluyen mutaciones puntuales, deleciones, amplificaciones genéticas y

translocaciones. Estas alteraciones pueden presentarse en células germinales y por lo tanto estar presentes en todas las células de un organismo; de esta manera, la susceptibilidad a desarrollar cáncer puede ser heredada como cualquier otra enfermedad genética. Las mutaciones también pueden ocurrir en células somáticas y dar lugar a tumores tras la proliferación clonal de la célula alterada [3].

2.2.1 Oncogenes y genes supresores de tumores.

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. 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: i) mutaciones puntuales en el protooncogen que generan proteínas constitutivamente activas; ii) la amplificación de un segmento del ADN donde está incluido el protooncogen provocando la sobreexpresión de la proteína codificada; y iii) la translocación del protooncogen a un sitio bajo el control de un promotor diferente causando una expresión inadecuada del gen [3, 4]. 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); genes que codifican proteínas citoplasmáticas, involucradas en la transducción de señales que estimulan la proliferación (por ejemplo, proteínas de

la familia Ras); y genes que codifican para factores de transcripción y que a su vez activan genes promotores de crecimiento (por ejemplo, c-myc) [5].

Los genes supresores de tumores generalmente codifican para 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 adecuada regulación de la proliferación celular. La pérdida de una o más de estas proteínas reguladoras contribuye en el desarrollo de muchos tipos de neoplasias; por ejemplo, los individuos con mutaciones hereditarias en genes supresores de tumores tienen una mayor predisposición para ciertos tipos de cáncer [5]. Las proteínas producidas por los genes supresores de tumores se han clasificado en 5 grupos: i) proteínas intracelulares reguladoras del ciclo celular (como el inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p16); ii) receptores a hormonas que inhibe la proliferación celular (como el factor de crecimiento β derivado de tumor); iii) proteínas de puntos de inspección que detienen el ciclo celular cuando el ADN está dañado o existen anomalías en los cromosomas (como p53); proteínas que promueven la apoptosis (como bcl-2); y v) enzimas que participan en la reparación de ADN (como la nucleasa XPF) [5].

Mediante análisis de ADN en varias etapas del desarrollo del cáncer, se ha realizado estudios epidemiológicos que señalan la sobreexpresión de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores en diferentes tipos de neoplasias [4]. El carcinoma de colon ha sido particularmente útil para el estudio de la progresión tumoral, dado que se desarrolla lentamente y tiene estadios que pueden diferenciarse histológicamente. Vogelstein et al. [6] analizaron las regiones genéticas que mostraban alteraciones en carcinomas de colon y propusieron un

modelo que describe los eventos genéticos que participan en el desarrollo de este tipo de neoplasias. En este modelo, las células normales del tejido epitelial sufren mutaciones en el gen APC (localizado en el cromosoma 5), generando un tejido hiperproliferativo. La progresión hacia un adenoma benigno, involucra: i) la hipometilación del ADN; ii) la activación del protooncogen K-ras; y iii) la delección del gen supresor de tumores DCC. Por último, la progresión hacia un carcinoma maligno involucra mutaciones en el gen p53. Estos cambios genéticos descubiertos en el carcinoma de colon ilustran el hecho de que la mayoría de las neoplasias se generan a partir de una serie progresiva de eventos que incrementan el grado de transformación de las células.

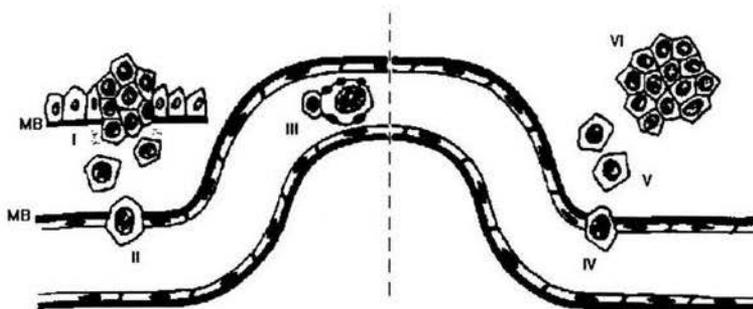
2.3. Mecanismos de formación de metástasis.

El proceso de metástasis comprende una serie de pasos secuenciales, todos los cuales deben ser exitosamente completados. Las células metastásicas, para entrar a la circulación y eventualmente formar tumores secundarios, deben invadir el tejido adyacente, rompiendo el contacto con otras células del tejido de origen y atravesando la barrera de la lámina basal. Una vez que las células cancerosas alcanzan los vasos sanguíneos, pueden llegar a órganos distantes mediante el torrente sanguíneo o circulación linfática y extravasar hacia tejidos distintos. Finalmente las células deben proliferar y estimular la vascularización del nuevo tumor [7] (Esquema 1).

Los sitios secundarios más comunes para la proliferación de metástasis de cualquier tipo de cáncer son los pulmones, el hígado, nódulos linfáticos, medula ósea y el cerebro. En general, el sitio inicial de formación de tumores secundarios tiende a ser el órgano que tenga la primera red capilar encontrada por las células después de

haber sido liberadas del tumor [8]. Sin embargo, las explicaciones hemodinámicas no aclaran totalmente la predilección de las células tumorales por un órgano específico, por lo tanto, se ha postulado la teoría de la existencia de interacciones selectivas entre la célula tumoral y el microambiente del órgano hospedero [9, 10].

Desde hace varios años se sabe que el proceso de metástasis es altamente ineficiente; sólo el 0.1% del las células cancerosas que entran a la circulación tienen la capacidad de formar un tumor secundario [9]. Por lo tanto, encontrar células cancerosas en el torrente sanguíneo, no es indicativo de la formación de metástasis. Mediante videomicroscopía *in vivo* se han analizado las diferentes etapas del proceso de metástasis; estos estudios han permitido concluir que, sorprendentemente, los pasos iniciales son muy eficientes. En contraste, el establecimiento en un nuevo tejido es ineficiente, por lo que se ha postulado que éste es el paso limitante de la formación de metástasis [7].



Esquema 1. Etapas del proceso de metástasis. I) Crecimiento tumoral y separación de células neoplásicas a partir del tumor primario. II) Migración hacia la vasculatura. III) Interacciones con plaquetas y leucocitos en la luz vascular. IV) Adhesión de la célula tumoral al endotelio vascular. V) Migración hacia el tejido blanco. VI) Crecimiento tumoral en el sitio de metástasis. MB: Membrana basal.

A pesar de que los cambios genéticos y moleculares necesarios para que una célula tumoral pueda invadir y generar metástasis aún no han sido identificados en su totalidad, se sabe que existen cambios en la expresión de:

I) Moléculas de adhesión. La participación específica de algunas moléculas de adhesión se discute en las secciones siguientes.

II) Enzimas proteolíticas. Actualmente las cinco familias de proteasas (serina-, cisteína, aspartil-, treonina-, y metaloproteasas de matriz) han sido implicadas en diferentes etapas del proceso de metástasis [11]. Algunas de estas enzimas, como la colagenasa tipo IV, estromelina (metaloproteasas de matriz), y las catepsinas B y L (proteasas de cisteína lisosomales) se secretan de forma inactiva. De esta manera, la regulación de su actividad depende de la presencia de activadores o inhibidores. Por ejemplo, en la activación de metaloproteasas de matriz, se ha identificado la participación del activador de plasminógeno tipo urokinasa (uPA) y de la plasmina (12). Esto indica que se requiere de la acción concertada de varias proteasas para degradar la matriz extracelular y permitir el escape de las células tumorales hacia el espacio intersticial.

III) Genes asociados a metástasis. Un pequeño número de genes que participan en la formación de metástasis han sido identificados en estudios en los que se compara la expresión génica de células no metastásicas con la de células metastásicas. En estos estudios se ha identificado disminuciones en la expresión de varias proteínas, incluyendo enzimas (como wdm-2, una reductasa) y moléculas adaptadoras que participan en la señalización intracelular (como KiSS-2). El gen asociado a metástasis más estudiado es nm-23, que codifica para una cinasa de nucleosidos difosfato. Se sabe que la transfección del gen nm-23 disminuye la capacidad de formar metástasis

en modelos murinos [13], por lo que se ha sugerido que nm-23 funciona como un gen supresor de metástasis. A pesar de esto, se han reportado tanto incrementos como disminuciones en la expresión de nm-23 en diferentes tipos de neoplasias [14]. De manera similar, no se han encontrado correlaciones claras entre la actividad enzimática de nm-23 y la formación de metástasis [15]. Por esto, el papel de nm-23 en el proceso de metástasis aún no se ha aclarado totalmente.

2.4 El proceso de metástasis requiere receptores de adhesión.

En cada uno de los pasos del proceso de metástasis, existe una cascada compleja de eventos adhesivos que pueden involucrar tanto células normales como células neoplásicas. Se sabe que las células tumorales presentan alteraciones en la adhesión célula-célula, en la adhesión célula-sustrato y en la motilidad celular. Por la tanto el estudio de los receptores celulares que median dichos eventos adhesivos es importante en la búsqueda de terapias que inhiban la diseminación tumoral [16], pues la inhibición de la capacidad invasiva constituye un blanco para la generación de nuevos tratamientos para las neoplasias malignas [17, 18].

Por ejemplo, la participación de la E-cadherina en el proceso de metástasis ha sido ampliamente estudiada. La E-cadherina es una molécula de adhesión dependiente de calcio, con un dominio extracelular que se une a otra E-cadherina de una célula adyacente. El dominio citoplasmático de la E-cadherina interacciona con moléculas intracelulares llamadas cateninas, que a su vez se une al citoesqueleto de actina. De esta manera, la E-cadherina regula un proceso que se conoce como adhesión homofílica célula-célula. En tumores de origen epitelial (carcinomas de mama, colon, próstata, estómago, hígado, piel, riñón, y pulmón), la pérdida de la

expresión o de la función de E-cadherina provoca la disociación de los contactos célula- célula y favorece la invasión y metástasis [19]. Por ejemplo se ha demostrado que anticuerpos que bloquean la función de E-cadherina, disocian las monocapas de células epiteliales en cultivo e inducen su transformación hacia un fenotipo móvil [20]. De manera contraria, la expresión forzada de E-cadherina en células tumorales en cultivo o modelos de ratón transgénicos, disminuye la invasividad de las células tumorales [21, 22].

La función de E-cadherina puede perderse por diversos mecanismos, que incluyen la mutación del gen de E-cadherina, su represión transcripcional y la proteólisis del dominio extracelular [19]. Estos cambios, permiten la translocación de la β -catenina de la membrana al núcleo, donde puede activar factores de transcripción y promover la expresión de genes como c-myc, ciclina D1, fibronectina, y matrilisina [23-25]. Por lo tanto, además de reducir la adhesión célula- célula, la pérdida de la E-cadherina proporciona a la célula señales oncogénicas que estimulan la proliferación y la migración.

2.5. Participación de las integrinas en el proceso de metástasis.

Las integrinas constituyen una familia de glicoproteínas de superficie que funcionan como receptores de adhesión. Estos receptores están formados por dos subunidades transmembranales: una subunidad α , que pesa entre 120 y 180 kDa y una β , que pesa entre 90 y 110 kDa. La unión entre estas cadenas se da de manera no covalente. A la fecha se han identificado 16 subunidades α , 8 subunidades β y por lo menos 22 heterodímeros [26, 27] (ver cuadro 1). La especificidad de ligando es resultado de la combinación de los dominios extracelulares de ambas cadenas. La

mayoría de las integrinas reconocen moléculas de matriz extracelular (MEC); la secuencia peptídica Arg-Gly-Asp (RGD) contenida en estas moléculas se ha identificado como uno de los sitios de unión a integrinas [28].

Cuadro 1. Ligandos de las subfamilias de integrinas (adaptado de [27]).

| FAMILIA | RECEPTOR | LIGANDOS |
|------------|--------------------|--|
| $\beta 1$ | $\alpha 1\beta 1$ | Laminina, colágena. |
| | $\alpha 2\beta 1$ | Laminina, colágena, $\alpha 3\beta 1$. |
| | $\alpha 3\beta 1$ | Laminina, colágena, fibronectina, entactina, $\alpha 2\beta 1$. |
| | $\alpha 4\beta 1$ | Fibronectina, VCAM. |
| | $\alpha 5\beta 1$ | Fibronectina, L1-CAM, fibrinógeno. |
| | $\alpha 6\beta 1$ | Laminina, merosina. |
| | $\alpha 7\beta 1$ | Laminina. |
| | $\alpha 8\beta 1$ | Fibronectina. |
| | $\alpha 9\beta 1$ | Tenascina. |
| | $\alpha v\beta 1$ | Fibronectina, vitronectina. |
| $\beta 2$ | $\alpha L\beta 2$ | ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3. |
| | $\alpha M\beta 2$ | C3bi, fibrinógeno, facto X, ICAM-1 |
| | $\alpha X\beta 2$ | C3bi, fibrinógeno. |
| αv | $\alpha v\beta 1$ | Fibronectina, vitronectina. |
| | $\alpha v\beta 3$ | Vitronectina, fibrinógeno, f. von Willebrand, PECAM-1 |
| | $\alpha v\beta 5$ | Vitronectina, osteopontina. |
| | $\alpha v\beta 6$ | Fibronectina. |
| | $\alpha v\beta 8$ | Fibronectina. |
| Otras | $\alpha 6\beta 4$ | Laminina. |
| | $\alpha 4\beta 7$ | VCAM, MADCAM, fibronectina. |
| | $\alpha 11\beta 3$ | Fibrinógeno, fibronectina, f. von Willebrand. |

Al unirse a moléculas de la MEC, las integrinas regulan, entre otros, los procesos de adhesión y migración, por lo que tienen una activa participación durante la generación de metástasis. Utilizado diversos modelos, se ha demostrado que la modificación en la expresión y/o en la funcionalidad de integrinas y algunas de las moléculas relacionadas, correlaciona con la capacidad metastásica. Por ejemplo, desde hace varios años se sabe que la administración de pequeños péptidos solubles que contienen la secuencia RGD (reconocida por muchas integrinas como sitio de adhesión) inhibe la formación de metástasis en modelos murinos [29]. Efectos similares sobre la formación de metástasis se han observado cuando se utilizan como antagonistas de integrinas proteínas naturales (conocidas como disintegrinas) que contienen la secuencia RGD [30] o compuestos no peptídicos que mimetizan dicha secuencia [31].

Las integrinas se expresan de manera ubicua, aunque cada estirpe celular presenta un repertorio limitado de estas moléculas; sin embargo, durante el proceso de transformación puede haber cambios en la expresión de integrinas. Dichos cambios y su participación en las diferentes etapas del proceso metastático, se describen a continuación.

A. Desprendimiento y movimiento de las células tumorales a partir del tumor primario.

El repertorio de integrinas en epitelios normales y en neoplasias derivadas de estas células ha sido estudiado en carcinomas de pulmón, mama, colon, páncreas y piel. Aunque los resultados son heterogéneos, en todos los casos se ha observado que la expresión de las subunidades $\alpha 2$ y $\alpha 3$ (cuyas integrinas se unen a colágena o laminina) está disminuida o abolida en los tumores más invasivos [32], promoviendo el desprendimiento del tejido.

La expresión de integrinas puede facilitar la migración de células cancerosas a partir del tumor primario. La expresión de la integrina $\alpha 6\beta 4$ se ha correlacionado con el potencial metastásico de diferentes tumores [33-35]. La sobre-expresión de esta integrina facilita la adhesión y migración *in vitro* de células de carcinoma de colon [36]. La expresión de la subunidad $\alpha 6$ se incrementa en tumores mamarios invasivos en comparación con células normales [37]. La subunidad $\beta 4$ se expresa en líneas celulares de carcinoma pulmonar altamente invasivas, mientras que no lo hace en aquellas que son poco metastásicas [38]. Otra de las integrinas que facilitan la migración es $\alpha v\beta 3$, que reconoce la secuencia RGD contenida en vitronectina, fibrinógeno, osteopontina, y fibronectina. La expresión de esta integrina facilita la migración de células cancerosas en prácticamente cualquier tejido en que se encuentren durante el proceso metastásico. La integrina $\alpha v\beta 3$ se expresa pobremente en tumores benignos, pero tiene una alta expresión en las metástasis [39-41].

B. Interacción de las células tumorales con plaquetas.

Las interacciones entre células neoplásicas y plaquetas contribuyen a la diseminación hematológica del cáncer. Por ejemplo, se sabe que la inducción de trombocitopenia puede inhibir la formación de metástasis en modelos murinos [42]. La integrina $\alpha IIb\beta 3$ (GP IIa/IIIb), que se expresa tanto en la superficie de plaquetas como en algunas células tumorales, favorece la unión heterotípica entre ambas células. El empleo de antagonistas de la integrina $\alpha IIb\beta 3$ (anticuerpos o ligandos solubles) bloquean la adhesión entre células tumorales y plaquetas. En un modelo murino, estos antagonistas inhibieron la colonización del pulmón después de una administración intravenosa de células neoplásicas (metástasis experimentales) [42].

Adicionalmente, la adhesión de células tumorales a la MEC, bajo condiciones de flujo, es estimulada por la presencia de plaquetas; consecuentemente, el bloqueo de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ provoca una pérdida de la capacidad de adhesión a sustrato [43].

C. Adhesión de las células tumorales al endotelio vascular.

La adhesión de la célula tumoral al endotelio vascular está mediada por moléculas con la suficiente afinidad para permitir una adhesión fuerte y una posterior extravasación. La integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, que se expresa fuertemente en tumores malignos [39], puede unirse a la glicoproteína PECAM-1 (CD31) presente en el endotelio vascular. La unión mediada por $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ /PECAM-1 puede facilitar la extravasación de las células tumorales [35]. Anticuerpos monoclonales dirigidos contra integrinas αv , inhiben el desarrollo de melanoma implantado subcutáneamente, y previenen la formación de metástasis experimentales [44].

Existe una correlación entre el aumento en la expresión de la integrina $\alpha\text{4}\beta\text{1}$ (VLA-4) y la capacidad metastásica de melanomas malignos [45]. Esta integrina se une a VCAM-1, proteína de la superfamilia de las inmunoglobulinas que se expresa en el endotelio vascular; la interacción VLA-4/VCAM-1 favorece la adhesión fuerte de células cancerosas. Un estudio en melanomas invasivos y metastásicos encontró que los niveles de expresión de la integrina $\alpha\text{4}\beta\text{1}$ estaban aumentados en el 40% de las muestras [46].

D. Proliferación y supresión de apoptosis.

Modificaciones en la expresión de integrinas pueden alterar la proliferación celular y suprimir la apoptosis, favoreciendo el crecimiento tumoral. En el caso de la integrina $\alpha\text{5}\beta\text{1}$, una disminución en la expresión correlaciona con una mayor

tumorigenicidad. Se sabe que la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ está disminuída en fibroblastos transformados en comparación con fibroblastos normales [47]. Congruentemente, clonas de células CHO que sub-expresan la integrina $\alpha 5\beta 1$ proliferan más rápidamente que las clonas que la sobre-expresan cuando son inyectadas subcutáneamente a ratones desnudos [48]. La transfección de la integrina $\alpha 5\beta 1$ impide que células CHO se vuelvan tumorigénicas [49], e impide la proliferación de células tumorales que se encuentran en suspensión [50].

Cuadro 2. Posibles consecuencias de los cambios en la expresión de integrinas durante el proceso de metástasis.

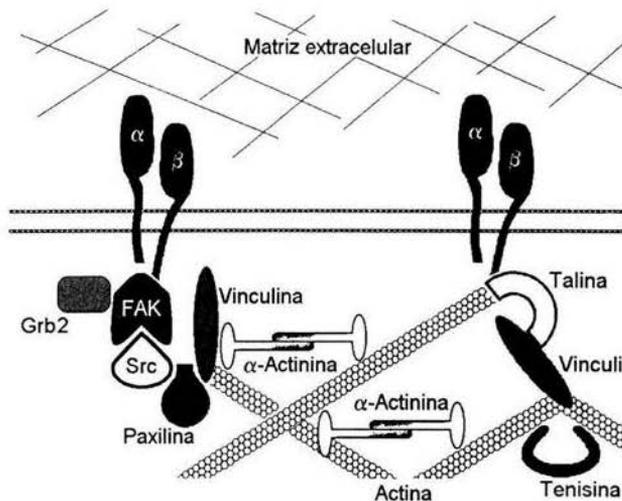
| ETAPA DEL PROCESO METASTÁSICO | ALTERACIONES EN LA EXPRESION DE INTEGRINAS | POSIBLE CONSECUENCIA DEL CAMBIO EN LA EXPRESION |
|---|--|--|
| Desprendimiento y movimiento a partir del tumor primario. | ↓ $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha 3\beta 1$ | Menor afinidad por la lámina basal. |
| | ↑ $\alpha v\beta 3$ y $\alpha 6\beta 4$ | Aumento de la capacidad migratoria a través de tejido conjuntivo. |
| Interacción de células tumorales con plaquetas. | ↑ $\alpha 11b\beta 3$. | Se facilita la formación de microtrombos alrededor de la célula tumoral. |
| Adhesión al endotelio vascular. | ↑ $\alpha v\beta 3$ y $\alpha 4\beta 1$ | Se favorece la extravasación. |
| Crecimiento tumoral y supresión de la apoptosis. | ↓ $\alpha 5\beta 1$ | Aumento en la proliferación. |

↑ Aumento en la expresión; ↓ disminución en la expresión.

2.6. Las integrinas regulan la formación de complejos de señalización.

La unión de integrinas a sus ligandos induce una amplia gama de eventos intracelulares de señalización, entre los que se incluyen la activación de cinasas (tanto de residuos de tirosina como de serina/ treonina) y la elevación en la concentración de segundos mensajeros (iones o fosfoinosítidos). Dado que las integrinas carecen de actividad enzimática, la activación de vías de señalización se da mediante el reclutamiento de proteínas señalizadoras y adaptadoras a complejos multiprotéicos especializados que se conocen como adhesiones focales (AF), contactos focales o placas de adhesión focal. En estas estructuras se concentran, además de integrinas: i) proteínas de citoesqueleto como α -actinina, vinculina, talina, tensina y paxilina; y ii) cinasas de tirosina como FAK (cinasa de adhesión focal) o Src [28, 51-53] (Esquema 2).

Muchas de las proteínas presentes en las AF están altamente fosforiladas, por lo que su formación puede ser bloqueada con inhibidores de cinasas de residuos de tirosina como la herbimicina [54]. Una de las moléculas más importantes en la señalización mediada por integrinas, es la cinasa de adhesión focal (FAK). FAK es una cinasa de residuos de tirosina intracelular con tres dominios: a) un dominio amino terminal, que se une a la región citoplasmática de la subunidad β de las integrinas [55]; b) un dominio central, que es el catalítico; y c) un dominio carboxilo terminal, que puede unirse a otras proteínas de la placa de adhesión focal [53, 56]. Estudios en células FAK $-/-$ han mostrado que aunque FAK no es necesaria para la activación de integrinas o la formación de AF, si es indispensable para la migración celular [57].



Esquema 2. Complejo de adhesión focal (AF). En estas estructuras, proteínas de citoesqueleto (como α -actinina, vinculina, talina, tenisina y paxilina), se enlazan con integrinas que han unido a su ligando. De esta manera, las AF permiten la conexión entre la MEC y los filamentos de actina de la célula. Adicionalmente, se agregan cinasas como FAK y Src. El reclutamiento y activación de estas cinasas permite la generación de señales que controlan la adhesión, la migración y la proliferación.

La unión a ligando y la agregación de integrinas en los sitios de adhesión focal, provoca un cambio conformacional en el dominio citoplasmático de la subunidad β , que induce la activación de FAK [51]. Una vez activa, FAK se autofosforila en la tirosina-397 generando un sitio de enlace de alta afinidad para el dominio SH2 de la cinasa de residuos de tirosina Src [58]. FAK es sustrato para Src, por lo que el reclutamiento y activación de esta cinasa, induce la fosforilación de otros residuos de tirosina en FAK, con las siguientes consecuencias:

I) La fosforilación de los residuos de tirosina 407 y 481 genera sitios de unión para proteínas que contienen el dominio SH2, entre las cuales se encuentran otras cinasas de la familia Src y proteínas de citoesqueleto como tenisina.

II) La fosforilación de los residuos de tirosina 576 y 577 aumenta la actividad enzimática de FAK [59]. La consecuente fosforilación de proteínas actúa en forma sinérgica con la agregación de integrinas y con la unión a ligando para conectar el citoesqueleto al receptor [60].

III) La fosforilación del residuo de tirosina 925 genera un sitio de unión para la proteína adaptadora Grb2, que permite la conexión con la vía de señalización Ras- MAP cinasa [61].

Adicionalmente, el complejo FAK/ Src también es capaz de fosforilar otras proteínas de la placa de adhesión focal, como paxilina y tenisina. Aparentemente, la fosforilación de estas proteínas depende de la actividad enzimática de Src, lo que sugiere que FAK actuaría como una proteína adaptadora [62].

FAK posee otros sitios de interacción proteína-proteína que no requieren de fosforilaciones. FAK posee dos regiones ricas en prolina a las que pueden unirse proteínas que contienen dominios SH3 [52, 63]. Además posee, en el dominio carboxilo, un sitio de interacción con paxilina. Es probable que la unión a paxilina contribuya al reclutamiento de FAK a las AF, aunque quizá no durante las etapas más tempranas de su formación [64, 65].

2.6.1. La paxilina participa en la señalización de integrinas.

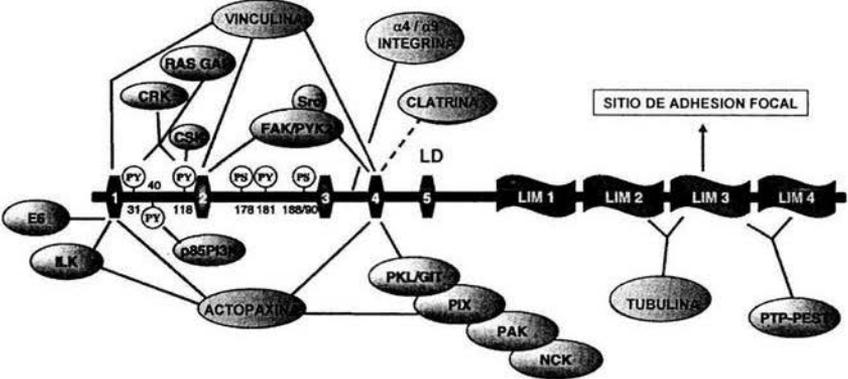
La paxilina es otra de las proteínas importantes en la señalización originada en las AF [53, 66]. La paxilina es una proteína multi-dominios que aporta sitios de

interacción proteína- proteína a las AF, permitiendo el acoplamiento de proteínas estructurales que se unen a actina y proteínas señalizadoras (Esquema 3). Por lo tanto, paxilina es una de las moléculas clave de los cambios del citoesqueleto promovidos por integrinas. En humanos, existen tres isoformas de paxilina, originadas por empalme alternativo del ARNm (α , β , γ), mientras que en ratones sólo se han reportado dos (α , β) [67, 68]. Aunque las diferentes isoformas de paxilina tienen diferentes patrones de expresión, la isoforma α es la más comúnmente expresada [67].

Estructuralmente, la paxilina puede ser dividida en dos regiones: el extremo carboxilo y el extremo amino. El extremo carboxilo contiene cuatro dominios ricos en residuos de cisteína/ histidina con dobles dedos de zinc, conocidos como dominios LIM. Este tipo de dominios se encuentran en factores de transcripción y en diferentes proteínas que se unen a los filamentos de actina. Los dominios LIM 2 y 3 de la paxilina requieren ser fosforilados en residuos de serina/ treonina para esta proteína colocalice con las AF [69]. Aunque la cinasa responsable de esas fosforilaciones no se conoce, se ha sugerido que puede ser ERK2 [70]. El extremo amino de la paxilina es responsable de su unión a vinculina, talina, Csk, FAK y Src. Esta región contiene cinco dominios LD ricos en leucinas (LDXLLXXL) y una secuencia rica en prolinas [71]. La asociación de paxilina con FAK, mediada por los dominios LD 2 y 3 [72], parece ser constitutiva y no requiere fosforilación [73].

La paxilina es una de las proteínas que se encuentra fosforilada en las placas de adhesión focal [74]. La unión de paxilina a FAK hace que la primera se encuentre en la proximidad del complejo FAK/ Scr y sea fosforilada en residuos de tirosina tanto por FAK como por Scr [75]. Se ha sugerido que la fosforilación de la paxilina por Src

es un paso crítico en la formación de AF [75]. Además de ser sustrato para FAK y Scr, paxilina puede ser fosforilada por las cinasas de residuos de tirosina Abl y Csk [76], que también participan en la señalización de integrinas. La paxilina fosforilada en los residuos de tirosina 31 y 118 se localiza específicamente en las AF y en la periferia de la célula [77]; esto demuestra que la fosforilación de paxilina en residuos de tirosina puede regular su localización. Adicionalmente, se sabe que la fosforilación de los residuos de tirosina 31 y 118 genera sitios de unión para la proteína adaptadora Crkl y esa asociación es requerida para la migración de células tumorales de vejiga (NBT II) [78].



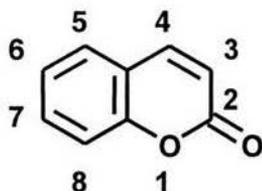
Esquema 3. Estructura de la paxilina. Se muestran los dominios de unión, los sitios de fosforilación y las interacciones con otras proteínas (modificado de [71]).

2.7. Cumarinas.

2.7.1. Generalidades.

Las cumarinas son un grupo de compuestos pertenecientes a las benzopironas. Estas presentan un benceno unido a un anillo heterocíclico que contiene un átomo de oxígeno y cinco carbonos con hibridación sp^2 (α -pirona) (Esquema 4). La cumarina tiene un peso molecular de 146.15 g/mol, un punto de fusión es de 68-70°C, un punto de ebullición de 303°C y es soluble en etanol, cloroformo y aceites [79].

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 [80]. 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 [81]. 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 [82].



Esquema 4. Estructura química de la cumarina. Los números indican las posiciones donde pueden presentarse sustituyentes.

2.7.2. Efecto antineoplásico de la cumarina.

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. Por esto, derivados cumarínicos con actividad anticoagulante, como la warfarina y el dicumarol, comenzaron a utilizarse en el tratamiento de neoplasias para prevenir la formación de estroma de fibrina alrededor del tumor. En protocolos clínicos se encontró que la warfarina, en combinación con otros tratamientos, alarga al doble la sobrevivencia de pacientes con carcinoma pulmonar [83]. Además, los compuestos cumarínicos han mostrado actividad antimetastásica en modelos murinos. La administración de warfarina, cumarina o fenprocumón (otro derivado cumarínico) bloquea la formación tanto de metástasis espontáneas [84] como experimentales [85-87].

Sin embargo, el efecto antineoplásico de los derivados cumarínicos no se debe a sus propiedades anticoagulantes. La administración de vitamina K, que antagoniza la acción anticoagulante de derivados cumarínicos como la warfarina, no antagoniza el efecto antineoplásico. La cumarina, aún cuando carece de efecto anticoagulante, presentó actividad antitumoral en protocolos clínicos de melanoma [88, 89], carcinoma

renal [90] y carcinoma prostático [91]. En estudios *in vitro* se observó que la cumarina inhibe el crecimiento de diferentes líneas tumorales [92-94].

La cumarina es considerablemente menos tóxica que la warfarina por lo que puede ser administrada a dosis mayores sin efectos tóxicos. Estudios en humanos han demostrado la tolerancia de hasta 7 gramos diarios con efectos adversos de poca importancia y reversibles al suspender el tratamiento [95].

Los mecanismos exactos involucrados en los efectos antineoplásicos y antimetastásicos de la cumarina se desconocen. Para explicar sus acciones se han propuesto dos mecanismos principales: 1) la inhibición de la proliferación de algunas células tumorales; 2) la estimulación de componentes del sistema inmune que participan en la reacción contra el tumor. El efecto sobre el crecimiento de células tumorales puede involucrar la regulación de la expresión de oncogenes. La 7-hidroxycumarina disminuye los niveles de ARNm de los oncogenes *ras* y *myc* en fibroblastos transfectados con dichos genes [96]. De manera similar, la 7-hidroxycumarina disminuye la expresión de la ciclina D1 en células A427 de carcinoma pulmonar humano, promoviendo un arresto del ciclo celular en la transición G₁/ S [97]. Respecto a la acción inmunoestimulante, se ha reportado que la cumarina estimula la actividad fagocítica de macrófagos [98, 99] y sinergiza la secreción de TNF α , IL-1 β e IL-6 inducida *in vitro* por LPS [100].

2.7.3. Metabolismo de la cumarina.

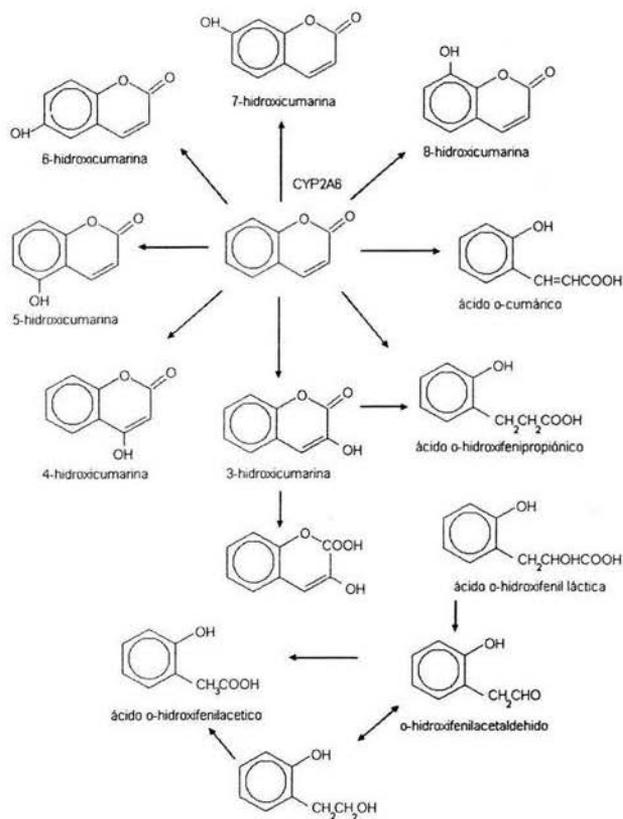
En humanos, la vida media biológica de la cumarina es de 1.2 h si se administra por vía oral y de 0.8 h cuando es administrada por vía intravenosa. La principal vía metabólica de la cumarina es la hidroxilación en la posición 7 [101, 102].

Sin embargo, la cantidad de 7-hidroxycumarina formada muestra una gran variabilidad interindividual [103-105]. Dicha variación es atribuida, al menos en parte, a polimorfismo genético de la enzima responsable de la 7-hidroxilación en el hígado: el citocromo P450 (CYP) 2A6 [104, 105]. Además, otras enzimas de la familia CYP 2A (como CYP 2A13) podrían participar en el metabolismo extra-hepático de la cumarina [106], incrementando la variabilidad. Otras cumarinas hidroxiladas han sido detectadas *in vivo* [107] e *in vitro* [102, 106] como metabolitos minoritarios; sin embargo, no se conocen las enzimas involucradas en su formación, ni su actividad biológica [108]. Las principales vías metabólicas de la cumarina se ejemplifican en el Esquema 5.

Algunos de los productos de biotransformación de la cumarina pueden tener actividad inmunoestimulante, antineoplásica y antimetastásica mayor que la cumarina. Por ejemplo, la 7-hidroxycumarina es un inhibidor de la proliferación *in vitro* de líneas tumorales, más potente que la cumarina misma [92, 94]. A concentraciones iguales, la 7-hidroxycumarina es un inductor más efectivo de la apoptosis que la cumarina, en células de cáncer pulmonar [109]. El acelerado metabolismo de la cumarina y las actividades reportadas de sus metabolitos han generado la propuesta de que los efectos antitumoral y antimetastásico son generados por sus productos de biotransformación [79, 94].

Sin embargo, los efectos de cumarinas sobre la proliferación y la viabilidad no explican totalmente su capacidad para inhibir la formación de metástasis. Algunos estudios muestran que los compuestos cumarínicos pueden afectar la adhesión y migración de células cancerosas. Por ejemplo, el tratamiento *in vitro* con 7-hidroxycumarina inhibe la adhesión de células de melanoma a colágena tipo I [111] y la

migración de células de adenocarcinoma de rata en una matriz de colágena [112]. Por lo tanto, en este estudio analizamos el efecto de varias cumarinas sobre el sistema de adhesión de células neoplásicas.



Esquema 5. La cumarina puede ser metabolizada a diferentes derivados monohidroxilados (adaptado de [110]).

3. OBJETIVO.

El presente trabajo pretende estudiar el efecto de la cumarina y cuatro monohidroxycumarinas (3-, 4-, 6-, y 7-hidroxycumarinas) sobre: i) la viabilidad celular; ii) la expresión de moléculas de adhesión importantes en la formación de metástasis (integrinas $\alpha 4$, $\alpha 6$, αv , $\beta 1$ y $\beta 4$); iii) la adhesión a moléculas de matriz extracelular; y iv) el rearrreglo del citoesqueleto de actina. Adicionalmente, con el objeto de contribuir al esclarecimiento del mecanismo de acción de los compuestos cumarínicos, se realizaron estudios bioquímicos con los compuestos más activos. El esclarecimiento del mecanismo de acción antimetastásica de las cumarinas permitiría generar nuevos fármacos que inhiban la formación de metástasis.

4. HIPOTESIS.

El tratamiento *in vitro* con cumarina o sus productos de biotransformación modificará la expresión de integrinas en líneas tumorales, por lo que se espera encontrar disminuciones en la expresión de integrinas y que esos cambios correlacionen con modificaciones en la adhesión a moléculas de matriz extracelular.

En cuanto a la potencia relativa de los compuestos, se espera que las hidroxycumarinas sean más activas que la cumarina misma.

5. MATERIAL Y METODOS.

5.1 MATERIAL BIOLOGICO.

Se utilizaron las líneas celulares de carcinoma pulmonar humano A-427 (adenocarcinoma) y Calu-1 (carcinoma epidermoide). Ambas líneas celulares fueron donadas por el Dr. José Sullivan López, investigador del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, México. Adicionalmente se utilizaron las líneas murinas B16-F10 (melanoma), B82 (fibroblastos) y L929 (fibroblastos). Las dos primeras fueron donadas por el Dr. Guillermo Alfaro del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM; mientras que la última nos fue proporcionada por la Dra. Diana Barrera de la Facultad de Medicina, UNAM. Todas las líneas fueron cultivadas rutinariamente en medio RPMI 1640 suplementado al 10% con suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor (Gibco), 100 U/ml de penicilina, y 50 µg/ml de estreptomycin. Los cultivos se mantuvieron incubados en una atmósfera de CO₂ al 5%, a una temperatura constante de 37°C. Se utilizaron botellas de cultivo de 80 cm² de área (Nunc), en un volumen de 15 mL, hasta obtener una monocapa confluyente. Para ser utilizadas en nuestros experimentos, las células se cosecharon con una solución fisiológica suplementada 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%.

5.2 COMPUESTOS UTILIZADOS.

La cumarina, la 4-hidroxicumarina y la 7-hidroxicumarina fueron adquiridos de Aldrich. La 3-hidroxicumarina y la 6-hidroxicumarina fueron sintetizadas en el

Laboratorio de Síntesis Orgánica Heterocíclica, del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química, bajo la supervisión del M. en C. Fernando León. La síntesis de la 3-hidroxycumarina se realizó de acuerdo con el método descrito por Kokotos y Tzougraki [113]. La síntesis de la 6-hidroxycumarina se realizó mediante los siguientes pasos: i) reacción de dietilmalonato con 2,5-dihidroxibenzaldehído (reacción de Knoevenagel [114]); ii) hidrólisis del producto obtenido [115]; y iii) decarboxilación [116]. Las estructuras de las cumarinas sintetizadas fueron comprobadas espectroscopia infrarroja y resonancia magnética nuclear. La pureza de todos los compuestos utilizados fue analizada por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), y en todos los casos fue superior a 99%.

5.3 CARACTERISTICAS DE LA EXPOSICION A CUMARINAS.

Las células se sembraron en placas estériles para cultivo de tejidos (Nunc), utilizando medio RPMI-10% SFB. Tras dejar que las células se adhirieran toda la noche, se adicionó al medio de cultivo el compuesto correspondiente y las placas se incubaron por 24 h. El intervalo de concentraciones de los tratamientos varió en progresión logarítmica base 10 entre 2 μM y 2mM. Las células control fueron expuestas a etanol (2% v/v), puesto que éste fue utilizado como disolvente para todas las cumarinas. Cada ensayo se repitió de manera independiente de dos a cuatro veces. El efecto de la 4-hidroxycumarina sobre células B16-F10 se evaluó en medio sin suero. Para esto, tras dejar que las células se adhirieran durante toda la noche, se sustituyó el medio con suero por medio sin suero conteniendo el correspondiente tratamiento.

5.4 EVALUACION DEL EFECTO CITOTOXICO DE CUMARINAS.

Utilizando placas de 96 pozos se sembraron células a una densidad de 45,000 células/ cm²; cada tratamiento se realizó por sextuplicado. Después de 24 h, se evaluó la viabilidad de las células tratadas, mediante el ensayo colorimétrico de reducción de MTT [117]. Este ensayo se basa en la capacidad de las células vivas de reducir el MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio), soluble en agua y de color amarillo, a formazán de MTT (1-[4,5-dimetil tiazol-2-il]3-3,5-difenilformazan), insoluble en agua y de color púrpura. Para realizar esta prueba, se adicionaron 20 μ L de solución de MTT al 0.5% a 100 μ L de medio existentes en cada pozo. Las células se incubaron 2 h a 37°C y posteriormente, se retiró el medio que contenía el MTT no reducido. Enseguida se adicionaron 100 μ L de dimetil sulfóxido (DMSO) para disolver los cristales formados de formazán de MTT. Se leyó la absorbencia de las soluciones formadas en un lector de microplacas (Biotek EL311) a una longitud de 570 nm; la absorbencia es directamente proporcional al número de células vivas en el pozo. Los datos se compararon estadísticamente mediante análisis de varianza de una vía. Cuando existieron diferencias entre los tratamientos se utilizó la prueba de Dunnett con un nivel de significancia (α) de 0.05.

5.5 EVALUACION DE LA EXPRESION DE INTEGRINAS POR RT-PCR.

Utilizando placas de 6 pozos, las células se sembraron a una densidad de 42,000 células/ cm² y se trataron durante 24 h como se describió previamente. Transcurrido el tiempo de exposición, se extrajo ARN total utilizando el reactivo TRIZOL (Gibco), conforme a las instrucciones del fabricante. La concentración de

ARN extraído se determinó espectrofotométricamente a 260 nm. Partiendo de 500 ng de ARN total, se sintetizó el ADNc, utilizando oligo dT (Gibco) como iniciador. Las reacciones de PCR se realizaron en 50 μ L de una mezcla de reacción que contenía 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH=8.4), 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 1.25 unidades de Taq ADN polimerasa y 0.2 μ M de cada uno de los iniciadores sentido y anti-sentido correspondientes. Las secuencias de los iniciadores específicos utilizados han sido reportadas previamente [118] y se indican en siguiente tabla:

| | Iniciador sentido (5'→3') | Iniciador anti-sentido (5'→3') | T _m promedio | Tamaño producto |
|------------|------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|--------------------|
| α 4 | ttctgtctgtgctgtggacc | ggagctccgatagcaacatc | 62 ^o C | 249 pb |
| α 6 | caagatggctaccagatat | ctgaatctgagaggaacca | 61 ^o C | 210 pb |
| α v | agatctggaccaggatggft | atctgtggctccttcattg | 61 ^o C | 197 pb |
| β 1 | gltacacggctgctggtgtt | ctactgctgacttagggatc | 61 ^o C | 264 pb |
| β 4 | aacgatgaacggtgccacct | ctccacgatgttgacgagt | 62 ^o C | 222 pb |
| GAPDH | accacagtccatgccatcac | tccaccacctgttgctgt | 61 ^o C | 452 pb |

El protocolo de amplificación empleado ha sido reportado previamente [118] y consistió en: 25 ciclos consistentes en 15 seg a una temperatura de desnaturalización de 95°C, 30 seg a una temperatura de alineación de 58°C y 30 seg a una temperatura de elongación de 72°C. En estas condiciones las concentraciones de los productos de PCR varían proporcionalmente a las concentraciones de ADNc.

5.6 ENSAYOS DE ADHESION A MOLECULAS DE MATRIZ EXTRACELULAR (MEC).

Los ensayos de adhesión se realizaron de acuerdo a la metodología descrita por Humphries [119]. En placas de 96 pozos (Nunc) se adicionaron a diferentes pozos soluciones de: 1) fibronectina humana (5 $\mu\text{g/ml}$); 2) vitronectina humana (1 $\mu\text{g/ml}$); 3) colágena tipo IV de ratón (20 $\mu\text{g/ml}$); o 4) laminina de ratón (10 $\mu\text{g/ml}$) [todas obtenidas de Gibco]. Las placas se incubaron toda la noche a 4°C para permitir la adsorción de las proteínas. Después se retiraron las soluciones y los pozos se bloquearon con albúmina (Sigma) desnaturalizada por calor a una concentración de 10 mg/mL durante 1 h.

Las células, tratadas por 24 h, se cosecharon utilizando EDTA (4 mM) en PBS libre de calcio y magnesio, se resuspendieron en medio RPMI libre de suero y se contaron. A cada uno de los pozos cubiertos con moléculas de la MEC se le adicionaron 10,000 células (en 100 μl de medio) y se permitió la adhesión durante 30 min a 37°C. Después, se retiraron las células no adheridas mediante lavados suaves y las células remanentes se fijaron con formaldehído (1.1%). El número de células adheridas fue cuantificado usando cristal violeta como se ha descrito previamente [119]. La absorbencia del colorante solubilizado en ácido acético (10%) se midió a 595 nm. La adhesión inespecífica de las células se evaluó en pozos cubiertos únicamente con albúmina, y nunca superó el 4%. En todos los experimentos, los valores de absorbencia generados por las células adheridas a albúmina se restaron de los valores obtenidos en los pozos cubiertos con moléculas de la MEC y bloqueados con albúmina.

5.7 EFECTO DE LA 4-HIDROXICUMARINA SOBRE EL CITOESQUELETO DE ACTINA.

Para analizar el contenido de microfilamentos de actina se trataron por separado, células de melanoma murino B16-F10 y fibroblastos B82 en portaobjetos con 8 pozos desmontables (Nunc) a una densidad de 43,000 células/ cm². Transcurridas las 24 h de exposición al compuesto, se retiró el medio haciendo dos lavados a cada pozo con PBS. Se fijaron las células con formaldehído 3.8% durante 10 min a temperatura ambiente. Luego de lavar nuevamente las células, éstas se permeabilizaron adicionando Tritón X-100 al 0.1% por 5 min. Después de lavar, las células se expusieron a 5 U/mL de la solución con faloidina- Alexa 488. Se dejaron incubar durante 1 hora a temperatura ambiente protegidos de la luz. Posteriormente, se lavó abundantemente con PBS, se montó un cubreobjetos. La morfología de ambos tipos celulares con los diferentes tratamientos se documentó mediante microfotografías utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon modelo Eclipse 600).

5.8 EFECTO DE LA 4-HIDROXICUMARINA EN LA MIGRACION CELULAR.

Utilizando placas de 6 pozos, se sembraron células B16-F10 a una densidad de 43,000 células/ cm². Después de dejar que las células se adhirieran durante toda la noche, se realizaron "heridas" en la monocapa utilizando un gendarme estéril. Antes de adicionar el medio con el correspondiente tratamiento, los cultivos se lavaron para retirar las células en suspensión. Transcurridas las 24 h de exposición se analizó la placa en microscopio invertido y los resultados se documentaron mediante microfotografías.

5.9 EFECTO DE LA 4-HIDROXICUMARINA SOBRE LA FOSFORILACION EN RESIDUOS DE TIROSINA.

Las células tratadas fueron cosechadas, se lavaron dos veces con PBS frío y se lisaron en amortiguador de lisis (50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, mezcla de inhibidores de proteasas, 1 mM pirofosfato de sodio, 1 mM ortovanadato de sodio, 50 mM fluoruro de sodio). Después de 15 min de incubación en hielo el material insoluble fue removido por centrifugación, se recolectaron los sobrenadantes y en éstos se cuantificó la proteína total. En geles de acrilamida (12%) se cargaron 40 µg de proteína total de cada tratamiento, y se realizó una electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE). Las proteínas fueron transferidas a membranas de nylon, que se bloquearon con albúmina y se incubaron con anticuerpos anti- fosfotirosina (clona PY20/ Santa Cruz Biotechnology, 1:500) y anti-actina (clona C11/ Santa Cruz Biotechnology, 1:2000). Las membranas fueron reveladas utilizando anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa y reactivos para quimioluminiscencia (Amersham-Pharmacia).

5.10 EFECTO DE LA 4-HIDROXICUMARINA SOBRE LA LOCALIZACION DE PAXILINA.

Células B16-F10 o L929 fueron sembradas en portaobjetos con pozos desmontables (Nunc) a una densidad de 43,000 células/ cm². Transcurrido el tiempo de tratamiento, las células se fijaron con formaldehído (4%), se permeabilizaron con Tritón X-100 (0.1%) y se bloquearon con albúmina al 3%. Finalizado el bloqueo, las células se incubaron con un anticuerpo policlonal anti-paxilina hecho en conejo (Santa Cruz Biotechnology, 1:200). Después de lavar las preparaciones con PBS, se adicionó

un anticuerpo secundario anti- IgG de conejo, conjugado con Alexa 546 (Santa Cruz Biotechnology, 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Concluida la incubación, las preparaciones se lavaron extensivamente y se montaron para su análisis y foto-documentación con microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 600).

5.11 EFECTO DE LA 4-HIDROXICUMARINA SOBRE LA EXPRESION/ ACTIVACION DE PAXILINA.

Células B16-F10 o L929 tratadas con 500 μM de 4-hidroxicumarina se lisaron en amortiguador de lisis frío como se describió previamente. De estos lisados se tomaron 80 μg de proteína total para evaluar la expresión de paxilina mediante inmunoensayos tipo "western blot". Para la inmunoprecipitación, los lisados se incubaron durante 3 h a 4°C y agitación constante con anticuerpos anti-paxilina (policlonal, Santa Cruz Biotechnology) que previamente habían sido unidos a las perlas de proteína A-agarosa. Al término de la incubación se realizaron 3 lavados con amortiguador salino de lavado (amortiguador de lisis 1:10, inhibidores de proteasas y fosfatasas 1X) y se prepararon para ser separados por electroforesis vertical en gel de acrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Después de la separación se realizó la transferencia, en cámara húmeda, a una membrana de nylon. La membrana fue incubada 1 hora a temperatura ambiente y agitación constante con los anticuerpos primarios anti-paxilina (policlonal, Santa Cruz Biotechnology, 1:1000) o anti-vinculina (policlonal, Santa Cruz Biotechnology, 1:1000) en TBS-Tween 20 (0.05%). Después de lavar las membranas, estas fueron incubadas con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa y reveladas con reactivos para quimioluminiscencia (Amersham-Pharmacia).

5.12 ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS: EFECTO DE LA 4-HIDROXICUMARINA SOBRE LA EXPRESION DIFERENCIAL DE GENES.

a) *Obtención del ARN para análisis por "differential display".*

El ARN de células tratadas se obtuvo mediante extracción con trizol (Gibco) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. 10 µg de ARN total fueron tratados con 0.13 unidades de DNAsa (Gibco) durante 5 min a 37°C. Posteriormente, se detuvo la reacción adicionando EDTA 25 mM (pH=8) e incubando por 5 min a 60°C. El ARN tratado con DNAsa fue precipitado utilizando glucógeno y se realizó una reextracción con trizol. El botón de ARN se resuspendió en agua estéril libre de RNAsas. Muestras de esta solución se utilizaron para cuantificar el ARN (mediante su absorbencia a 260 nm), para visualizar la integridad del ARN (mediante gel de agarosa al 1%) y para sintetizar ADNc.

b) *Síntesis y amplificación de ADNc.*

Para cada muestra se realizaron 3 reacciones de síntesis de ADNc, utilizando transcriptasa reversa (MMLV-RT) y cada uno de los siguientes oligonucleótidos como iniciadores:

DD1 = T₁₂CA

DD2 = T₁₂CG

DD3 = T₁₂CC

Cada una de las tres copias de ADNc generada por los oligonucleótidos DD se amplificaron por PCR utilizando como iniciador anti-sentido el primer DD correspondiente y como iniciador en sentido uno de los siguientes oligonucleótidos:

OPA 14: TCTGTGCTGG

OPA 18: AGGTGACCGT

OPA 20: GTTGCGATCC

En dichas reacciones se incluyó [α -³⁵S] dATP (1000 Ci/nmol) a una concentración final de 0.4 μ M. El protocolo de amplificación consistió en 35 ciclos de 94°C por 50 seg; 40°C por 90 seg y 72°C por 60 seg, con una extensión final a 72°C por 5 min. Una vez obtenidos los productos de PCR, se mezclaron con amortiguador de carga para secuenciación y se corrieron en gel desnaturizante de acrilamida/urea. Al final de la corrida, el gel se fijó con ácido acético (10%), se secó 2 h a 80°C y se expuso una placa de autoradiografía (Kodak) durante 48 h para documentar los resultados.

c) Purificación, reamplificación y clonación de una banda diferencial.

En la placa de autoradiografía se identificó una banda que se expresa en células control pero que disminuye en células tratadas con 4-hidroxycumarina. La placa se alineó con el gel, se cortó la banda correspondiente y se colocó en tubos de 1.5 mL (Eppendorf) nuevos. A la banda se le añadieron 400 μ L de agua estéril y se llevó a ebullición durante 15 min; posteriormente, la solución obtenida se centrifugó y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se adicionaron 40 μ L de acetato de sodio 3 M, 880 μ L de etanol absoluto, 2.5 μ L de glucógeno (20 mg/mL) y se dejó precipitar durante toda la noche a -20°C. El precipitado se separó por centrifugación y se lavó con etanol al 80%. Tras dejarlo secar, el ADN obtenido se resuspendió en agua para hacer la reamplificación por PCR, utilizando como iniciador sentido OPA20

y como iniciador anti-sentido DD1 (con éstos se obtuvo la banda aislada). En esta ocasión el protocolo de amplificación fue de 40 ciclos de 92°C por 30 seg; 42°C por 60 seg y 72°C por 30 seg, con una extensión final a 72°C por 5 min.

El producto de PCR se corrió en electroforesis horizontal en gel de agarosa (2%) al mismo tiempo que un marcador de pesos moleculares (Gibco) para estimar el tamaño del producto de amplificación. Este producto de amplificación también se utilizó para ser clonado en el vector pCR2.1, utilizando el estuche de reactivos "The Original TA Cloning" (InvitroGen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La reacción de ligación se incubó a 14°C durante toda la noche y posteriormente se tomaron 5 µL de la reacción para adicionarlos a un vial de células competentes (*E. coli* INVαF') y se homogenizó suavemente. Las bacterias se incubaron durante 30 min en hielo, 30 seg a 42°C y nuevamente 2 min en hielo; posteriormente, se les adicionó 250 µL de medio SOC y se incubaron nuevamente durante 1 hora a 37°C con agitación constante. Las células se sembraron sobre una placa de agar Luria-ampicilina adicionado con Xgal y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Las placas se incubaron en el refrigerador durante 3 h para permitir el desarrollo del color azul en las colonias no transformadas y posteriormente, se seleccionaron 5 colonias blancas que se expandieron resemebrando en medio líquido Luria-ampicilina.

De estas células se purificó el ADN plasmídico utilizando el estuche de reactivos "Miniprep Wizard Plus" (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido se cuantificó a 260 nm y se tomaron alícuotas con 1 µg de ADN para utilizarlas en reacciones de restricción con 1 U de *Eco* RI. Tras incubar la digestión 3 h a 37°C, se corrieron 10 µL de la reacción en una electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Simultáneamente, se corrió un marcador de pesos moleculares (Gibco) para verificar que el tamaño del inserto correspondiera con el del producto reamplificado.

d) Secuenciación.

Utilizando dos de las clonas que incorporaron el inserto, se realizaron reacciones de secuenciación. Se utilizó el método de Sanger con ligeras modificaciones usando un estuche de T7 Sequenase Versión 2.0 (Amersham Co). Se colocaron en tubos Eppendorf 2.5 μ l de cada uno de los cuatro dideoxinucleótidos (A, C, G, T) (ddNTPs) y se mantuvieron en hielo hasta su uso. Se preparó una mezcla de 5.5 μ l de agua, 1 μ l de NSA 10X y 0.5 μ l de HCl 1 N denominándola "solución de alineación". Se preparó una mezcla que contenía 1 μ l de ditiotreitól (DTT) 2X, 2 μ l de dNTPs diluidos (1:5), 2 μ l de sequenasa diluida en su amortiguador (1:8) y 0.5 μ l de α S³⁵ (dATP 500-1200 Ci/mmol de Amersham). Esta mezcla se denomina "mezcla maestra" y se mantuvo en hielo hasta su uso. Posteriormente, se mezclaron 3 pmol (1 μ l) del iniciador específico con 0.5 μ l de NaOH 1 N, y con 300 ng (2.5 μ l) del ADN molde para secuenciar. Esta mezcla se incubó a 37°C por 10 min y se agregaron 7 μ l de la solución de alineación y se incubaron por 5 min a la misma temperatura. Después se agregaron 5.5 μ l de la mezcla maestra y se incubó por 5 min adicionales a temperatura ambiente; inmediatamente se colocaron 3.5 μ l de esta reacción en cada uno de los tubos que contenían los ddNTPs y se incubaron a 45°C por 5 min, transcurrido el tiempo se agregaron 4 μ l de la solución de paro incluida en el estuche.

Los productos de las reacciones obtenidas se corrieron en un gel de acrilamida al 6% (p/v) de 0.4 mm de grosor y 45 cm de altura. Se utilizó una cámara de secuencia

modelo S2 (Gibco BRL Sequencing System), y la electroforesis se corrió utilizando amortiguador de TBE 1X. Después del tiempo de corrida, se fijó el gel con una solución de ácido acético al 10% y se secó en un horno a 55°C. El gel se puso en contacto con una placa de autoradiografía X-OMAT (Kodak) por 48 h a -70°C. Posteriormente la placa se reveló y fijó para hacer la lectura de la secuencia obtenida.

e) Amplificación específica de la molécula reguladora de adhesión 1 (ARM-1).

Para comprobar los cambios en la expresión de ARM-1 se realizaron reacciones de RT-PCR como se describió anteriormente. Los iniciadores utilizados fueron (5'→3'): agcaccgccaggatgacgactt (sentido) y cggggcctgggctggtg (anti-sentido). Aunque la T_m promedio de este par de iniciadores es de 66°C, empíricamente, se determinó que la mejor temperatura de alineamiento era de 60°C. El protocolo de amplificación empleado consistió en 30 ciclos de 94°C por 45 seg; 60°C por 45 seg y 72°C por 60 seg. Como control de expresión constitutiva se amplificó GAPDH en las condiciones descritas previamente.

4. RESULTADOS.

4.1 EFECTO DE CUMARINAS EN LA VIABILIDAD DE CELULAS DE CARCINOMA PULMONAR.

El efecto de cumarina y cuatro hidroxycumarinas sobre la viabilidad celular se evaluó utilizando el ensayo de reducción de MTT, que se basa en la capacidad metabólica mitocondrial. Con esta metodología, la señal de absorbencia varía de manera lineal con el número de células vivas (Fig. 1). Las concentraciones evaluadas fueron 2 μM , 20 μM , 200 μM y 2 mM para todos las cumarinas con excepción de la 6-hidroxycumarina, cuya su solubilidad en etanol es menor al resto de los compuestos, por lo que las concentración evaluadas fueron de 2 μM , 20 μM , 200 μM y 400 μM . Como control se utilizaron células tratadas con el disolvente etanol. Se utilizaron dos diferentes tiempos de exposición (24 y 48 h) para cada en las líneas celulares de carcinoma pulmonar A427 y Calu-1 y los resultados se anotan en la tabla I.

En la línea celular A427 (adenocarcinoma) el tratamiento con 2 mM de cumarina, 3-hidroxycumarina o 7-hidroxycumarina disminuyó significativamente la viabilidad celular desde las 24 h en 25%, 45% y 30% respectivamente. A este tiempo ni la 4-hidroxycumarina (2 mM) ni la 6-hidroxycumarina (400 μM) disminuyeron significativamente la viabilidad. A las 48 h, el tratamiento con cumarina (2mM) disminuyó la viabilidad en un 50%. Tanto la 3-hidroxycumarina como la 7-hidroxycumarina (2 mM), a las 48 h, provocaron una disminución en la viabilidad aproximadamente del 65%. Cuando se trató con 4-hidroxycumarina (2 mM) o 6-hidroxycumarina (400 μM), se encontró que también disminuye significativamente la viabilidad, pero la magnitud de su efecto no supera el 20%.

En la línea celular Calu-1 (carcinoma epidermíode) la concentración más alta de cumarina, 3-hidroxycumarina, o 7-hidroxycumarina produjeron citotoxicidad desde las 24 h, disminuyendo la viabilidad en 60%, 55% y 40% respectivamente. A las 48 h tanto la cumarina como la 3-hidroxycumarina y la 7-hidroxycumarina (2 mM) disminuyeron la viabilidad aproximadamente en un 75%. A los dos tiempos ensayados la 6-hidroxycumarina (400 μ M) produjo ligeros decrementos en la viabilidad, mientras que la 4-hidroxycumarina (2 mM) no presentó efecto citotóxico.

Basados en estos resultados se decidió reducir el intervalo de concentraciones a evaluar, de tal manera que la máxima concentración de fármaco a utilizar se fijó en 200 μ M, pues a esta concentración ninguno de los compuestos altera la viabilidad con respecto al control. Los estudios posteriores se realizaron utilizando exposiciones de 24 h.

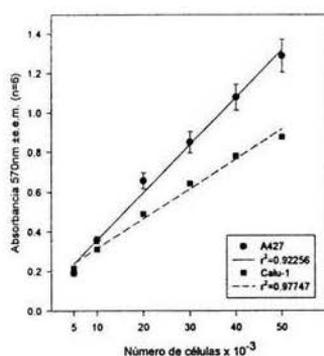


Figura 1. Curvas estándar para el método de reducción de MTT. Tanto para la línea celular A427 (●) como para la Calu-1 (■) la absorbancia es directamente proporcional al número de células vivas.

Tabla I. Efecto de la cumarinas sobre la viabilidad celular ^a.

| | | A427 | | Calu-1 | |
|---------------------|-------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h |
| CUMARINA | 2 μ M | 99.2 \pm 4.0 | 92.1 \pm 1.8 | 100.6 \pm 2.1 | 102.5 \pm 2.3 |
| | 20 μ M | 95.7 \pm 1.9 | 94.1 \pm 1.3 | 99.3 \pm 1.2 | 98.1 \pm 2.3 |
| | 200 μ M | 95.8 \pm 2.3 | 92.6 \pm 2.4 | 91.8 \pm 2.4 | 90.6 \pm 3.5 |
| | 2 mM | 75.2 \pm 2.6 ^b | 52.0 \pm 2.8 ^b | 41.6 \pm 2.9 ^b | 26.7 \pm 2.8 ^b |
| 3- HIDROXI-CUMARINA | 2 μ M | 102.0 \pm 2.0 | 101.9 \pm 3.9 | 108.2 \pm 3.1 | 105.7 \pm 1.9 |
| | 20 μ M | 105.3 \pm 2.9 | 96.1 \pm 4.1 | 101.1 \pm 2.3 | 102.6 \pm 3.1 |
| | 200 μ M | 100.8 \pm 3.8 | 92.8 \pm 2.4 | 88.4 \pm 4.2 | 94.0 \pm 2.2 |
| | 2 mM | 55.9 \pm 2.1 ^b | 33.8 \pm 2.9 ^b | 44.3 \pm 3.6 ^b | 27.6 \pm 1.3 ^b |
| 4- HIDROXI-CUMARINA | 2 μ M | 104.5 \pm 4.6 | 99.0 \pm 0.9 | 104.2 \pm 2.7 | 95.1 \pm 3.9 |
| | 20 μ M | 108.6 \pm 1.9 | 98.6 \pm 3.1 | 99.1 \pm 0.7 | 99.0 \pm 3.2 |
| | 200 μ M | 99.8 \pm 3.3 | 94.8 \pm 2.3 | 97.7 \pm 2.2 | 100.6 \pm 3.3 |
| | 2 mM | 94.2 \pm 4.6 | 83.2 \pm 4.6 ^b | 100.2 \pm 3.1 | 90.6 \pm 3.6 |
| 6-HIDROXI-CUMARINA | 2 μ M | 104.2 \pm 2.4 | 99.8 \pm 2.7 | 100.9 \pm 2.5 | 103.6 \pm 2.1 |
| | 20 μ M | 96.1 \pm 1.3 | 97.2 \pm 3.4 | 101.4 \pm 2.9 | 101.5 \pm 4.6 |
| | 200 μ M | 97.5 \pm 3.3 | 91.8 \pm 5.6 | 98.0 \pm 3.3 | 90.7 \pm 3.6 |
| | 400 μ M | 94.2 \pm 2.9 | 81.6 \pm 4.1 ^b | 99.2 \pm 2.3 | 80.2 \pm 3.1 ^b |
| 7- HIDROXI-CUMARINA | 2 μ M | 102.1 \pm 1.0 | 100.7 \pm 3.0 | 101.9 \pm 0.8 | 104.1 \pm 1.8 |
| | 20 μ M | 103.1 \pm 2.1 | 104.21 \pm 0.9 | 97.2 \pm 1.9 | 98.0 \pm 2.9 |
| | 200 μ M | 97.9 \pm 2.1 | 95.9 \pm 1.6 | 89.6 \pm 1.3 | 91.3 \pm 1.3 |
| | 2 mM | 72.2 \pm 5.6 ^b | 38.9 \pm 2.6 ^b | 57.9 \pm 4.2 ^b | 24.7 \pm 2.5 ^b |

^a Expresado como porcentaje del control % (promedio \pm e.e.m.; n=3).

^b Estadísticamente diferentes de su respectivo control (prueba de Dunnett, α = 0.05)

4.2 EFECTO DE CUMARINAS EN LA EXPRESION DE INTEGRINAS Y EN LA ADHESION EN CELULAS DE CARCINOMA PULMONAR.

Para estudiar el efecto del tratamiento con cumarinas sobre la expresión de moléculas de adhesión, se utilizó la técnica semicuantitativa de RT-PCR. Para confirmar la confiabilidad de esta metodología en la estimación de la cantidad de ARNm, se realizaron ensayos partiendo de diferentes concentraciones diferentes de ARN total y observamos modificaciones en la intensidad de la banda de los productos de amplificación (Fig. 2).

En células A427 obtuvimos los siguientes resultados (Fig. 3): i) la 3-hidroxicumarina disminuyó la cantidad de ARNm tanto de la integrina αv como la de $\beta 1$; ii) la 4-hidroxicumarina disminuyó la expresión de la integrina αv y, en menor medida, la de $\alpha 6$; iii) la 6-hidroxicumarina incrementa la cantidad de ARNm de la subunidad $\alpha 4$ de manera dependiente de la concentración, pero disminuye la expresión de la integrina $\alpha 6$; iv) ninguno de estos tres compuestos modificó la expresión de la subunidad $\beta 4$; v) en estos ensayos no encontramos efecto ni de la cumarina ni de la 7-hidroxicumarina.

Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la adhesión a moléculas de la MEC utilizamos varios sustratos: colágena tipo IV, laminina, fibronectina y vitronectina. Esto fue debido a que las subunidades de integrina propuestas, participan (en diferentes heterodímeros) en el reconocimiento de estos ligandos. A pesar de los cambios en la expresión encontrados, los tratamientos no tienen efecto sobre la adhesión a moléculas de la MEC (Fig. 4).

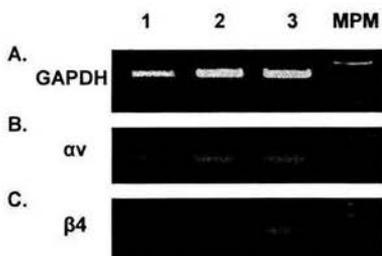


Figura 2. Estandarización del método semicuantitativo RT-PCR. La intensidad de la banda depende de la concentración inicial de ARNm. Las reacciones de RT se realizaron partiendo de 1.2 (carril 1), 2.5 (carril 2), o 5 μ g (carril 3) de ARN total. Posteriormente, se realizaron ampliificaciones por PCR para las moléculas previstas. Se muestran ejemplos de GAPDH (A) y de las integrinas αv (B) y $\beta 1$ (C).

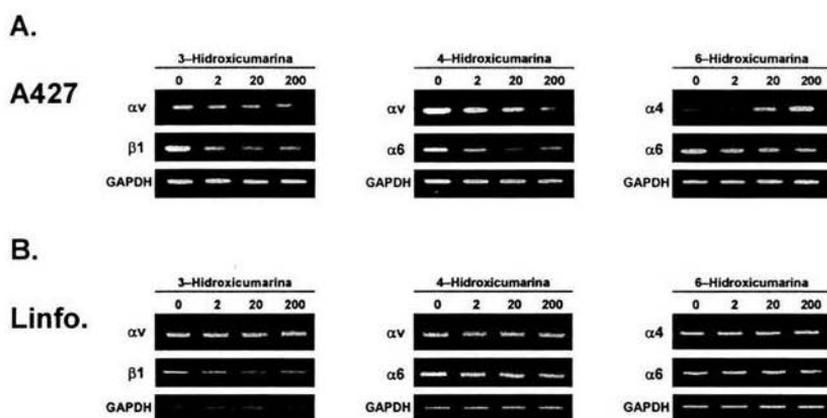


Figura 3. Análisis de la expresión de integrinas. Células A427 (A) o linfocitos de sangre periférica humana (B) fueron tratadas con cumarinas monohidroxiladas como se indica. Se muestran productos de RT-PCR en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

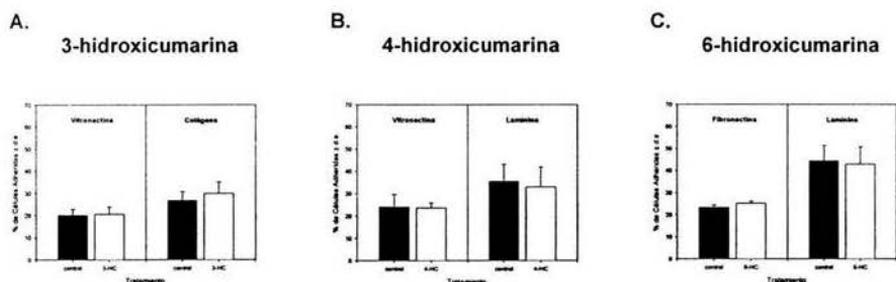


Figura 4. Efecto de cumarinas en la adhesión de células A427 a moléculas de la MEC. Las células se trataron 24 h con 200 μM de 3-hidroxycumarina (A), 4-hidroxycumarina (B), o 6-hidroxycumarina (C). En ninguno de los casos se encontraron diferencias estadísticamente significativas (t student; $\alpha=0.05$). Sólo se muestran experimentos representativos en los sustratos relevantes.

En la línea celular Calu-1, evaluamos el efecto de la 3-hidroxycumarina, la 4-hidroxycumarina y la 6-hidroxycumarina sobre la adhesión a moléculas de la MEC. De manera similar a lo encontrado en A427, la adhesión celular no fue alterada por ninguno de los tratamientos. La figura 5A muestra el efecto de la 6-hidroxycumarina sobre la adhesión (las gráficas correspondientes a los ensayos de adhesión con las otras cumarinas no se incluyen). En cuanto a la expresión de integrinas, en células Calu-1 encontramos que la subunidad $\alpha 4$ presenta una baja expresión y que la integrina αv no se expresa en esta línea. El efecto de cumarinas sobre la expresión de integrinas se evaluó parcialmente sin encontrar cambios significativos. Por ejemplo, el tratamiento con 6-hidroxycumarina, que modificó a la alta la expresión de la subunidad $\alpha 4$ y a la baja la de $\alpha 6$ en células A427 (Fig. 3A), no alteró la cantidad de ARNm de estas dos integrinas en las células Calu-1 (Fig. 5B).

A lo largo del desarrollo del proyecto observamos que los tratamientos con 4-hidroxycumarina producían cambios morfológicos en algunos cultivos. Por esto analizamos el efecto de concentraciones subtóxicas de 4-hidroxycumarina sobre la morfología celular. El tratamiento durante 24 h con 1 mM de 4-hidroxycumarina inhibió la adecuada extensión de las células sobre el sustrato ("spreading") (Fig. 6). Como se ha descrito previamente, el citoesqueleto de actina es el principal responsable de proveer soporte a la membrana plasmática y, por lo tanto, es posible que el grado de polimerización de actina fuese alterado por la 4-hidroxycumarina. Dado que un inadecuado ensamblaje del citoesqueleto puede afectar la capacidad adherente mediada por integrinas y la motilidad celular, decidimos estudiar el efecto de la 4-hidroxycumarina sobre el rearrreglo del citoesqueleto de actina. Sin embargo, la morfología normal y la limitada motilidad *in vitro* de las líneas celulares A427 y Calu-1, hacen que no sean un modelo donde fácilmente se puedan

estudiar cambios en el citoesqueleto de actina o en la migración. Ante la necesidad de cambiar de modelo, decidimos utilizar células B16-F10 de melanoma murino para los ensayos siguientes. Esta línea presenta las siguientes ventajas: i) ha sido utilizada para estudiar los mecanismos que regulan los cambios en el citoesqueleto de actina; ii) presenta una alta motilidad *in vitro*; y iii) los efectos de algunas cumarinas sobre su viabilidad han sido estudiados en nuestro laboratorio [78].

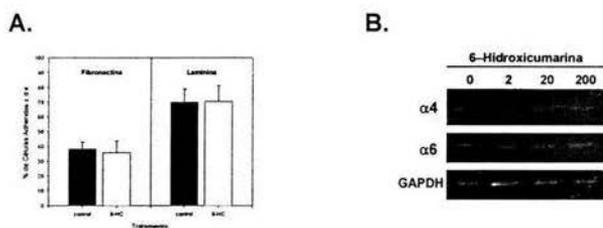


Figura 5. En células Calu-1, el tratamiento con 6-hidroxicumarina no modificó ni la adhesión a sustrato (A), ni la expresión de integrinas (B).

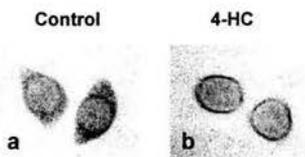


Figura 6. El tratamiento con 4-hidroxicumarina (4-HC) altera la morfología de la línea A427. Las células fueron tratadas con etanol [1 %] (a) o 4-HC [1 mM] (b) durante 24 h, expuestas a MTT y fotografiadas.

4.3 EFECTO DE LA 4-HIDROXICUMARINA SOBRE EL REARREGLO DEL CITOESQUELETO DE ACTINA EN CELULAS B16-F10.

Dado que algunos derivados cumarínicos son citotóxicos para diversas líneas celulares, evaluamos los efectos de 24 h de exposición a la 4-hidroxicumarina sobre la viabilidad de las líneas celulares B16-F10 y B82, utilizando la metodología de reducción de MTT. Las concentraciones mínima y máxima de 4-hidroxicumarina que se utilizaron (50 y 500 μM) fueron determinadas empíricamente. En las condiciones de exposición, la 4-hidroxicumarina no mostró efecto apreciable sobre la viabilidad de células B16-F10. De manera similar, la 4-hidroxicumarina no afectó la viabilidad de los fibroblastos B82 (Tabla II).

Tabla II. Efecto de la 4-hidroxicumarina en la viabilidad celular ^a.

| [4-Hidroxicumarina] μM | Línea celular | |
|-----------------------------------|----------------------|------------------|
| | B16-F10 ^b | B82 ^b |
| 0 | 100.0 \pm 7.99 | 100.0 \pm 5.56 |
| 50 | 104.4 \pm 9.89 | 107.0 \pm 3.32 |
| 160 | 97.5 \pm 10.95 | 110.2 \pm 5.50 |
| 500 | 91.3 \pm 10.18 | 109.9 \pm 7.57 |

^a Expresado como porcentaje del control % (promedio \pm d.e.).

^b Las diferencias entre los tratamientos no son estadísticamente significativas.

Los efectos de la 4-hidroxicumarina en la morfología celular y el contenido de F-actina (actina polimerizada) se analizaron utilizando células B16-F10 de melanoma y fibroblastos B82 como controles. Ambos tipos celulares, en ausencia de tratamiento, tienen una morfología poligonal, que presenta lamelipodios y filipodios concentrados en algunos puntos de la periferia celular y fibras de estrés que corren a lo largo de la célula. En las células B16-F10, esta morfología es alterada por el tratamiento con 4-hidroxicumarina (Fig. 7). Este compuesto impide la formación de fibras de estrés y de lamelipodios, y produce un encogimiento de la membrana celular, generando una célula redonda (Fig. 7, a-d). Sin embargo, en células tratadas con 4-hidroxicumarina aún se presentan filipodios radiales unidos a focos de adhesión (Fig. 7, d).

En el intervalo de concentraciones evaluadas el efecto sobre el citoesqueleto de actina fue selectivo para células tumorales, dado que la 4-hidroxicumarina no produjo cambios significativos en la morfología o en el contenido de F-actina en fibroblastos B82 (Fig. 7, f-i). Como control positivo se utilizó citocalasina D, una micotoxina que inhibe la polimerización de actina al interferir con la adición de unidades monoméricas de actina. El tratamiento con una concentración subtóxica (5 μM) de citocalasina D produjo una pérdida total de F-actina en ambas líneas celulares (Fig. 7, e y j).

Adicionalmente estudiamos si el efecto de la 4-hidroxicumarina es reversible. En la figura 8 se muestran células que se incubaron en medio sin suero sin fármaco durante un periodo de recuperación de 24 h, tras haber sido tratadas previamente con 500 μM de 4-hidroxicumarina. Como se puede observar, en estas condiciones las células B16-F10 recuperan totalmente su morfología normal.

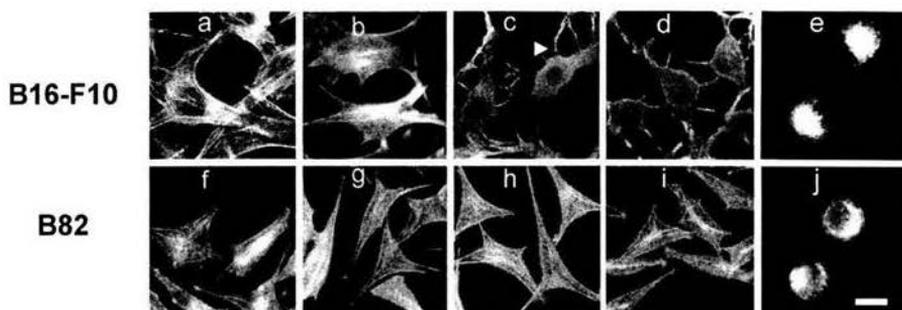


Figura 7. Efecto de la 4-hidroxicumarina en la morfología y el contenido de F-actina en células B16-F10 de melanoma y en fibroblastos B82. Se muestran microfotografías representativas de células marcadas con faloidina después de ser tratadas con etanol 0.75 % (a, f) o 4-hidroxicumarina 50 μM (b, g), 160 μM (c, h) o 500 μM (d, i). Como control positivo se utilizó citocalasina D 5 μM (e, j). La 4-hidroxicumarina indujo cambios morfológicos relacionados con la desorganización del citoesqueleto de actina en células B16-F10 (a-d). La flecha en la microfotografía (d) señala la presencia de filipodios, aún cuando se han perdido las fibras de estrés o los lamelipodios. Los fibroblastos B82 fueron menos sensibles al efecto de la 4-hidroxicumarina (f-i). Barra = 20 μm .

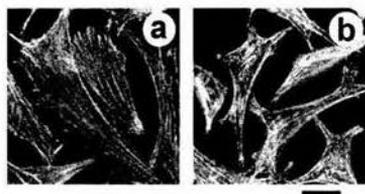


Figura 8. La desorganización del citoesqueleto de actina producida por la 4-hidroxicumarina fue reversible. Se muestran microfotografías representativas de células marcadas con faloidina después de ser tratadas 24 h con 4-hidroxicumarina 500 μM , lavadas e incubadas por 24 h adicionales en medio sin suero y sin fármaco. Las células B16-F10 (a) recobraron su morfología normal, mientras que los fibroblastos B82 (b) no mostraron cambios. Barra = 20 μm .

4.4 EFECTO DE LA 4-HIDROXICUMARINA EN LA ADHESION DE CELULAS B16-F10 A MOLECULAS DE LA MEC.

El tratamiento con 4-hidroxicumarina produjo decrementos en la adhesión de células B16-F10 a moléculas de la MEC, de manera dependiente de la concentración (Fig. 9). Cuando utilizamos vitronectina o fibronectina como sustrato, el tratamiento con 500 μM de 4-hidroxicumarina disminuyó la adhesión aproximadamente a la mitad del valor control. Adicionalmente, el mismo tratamiento redujo la adhesión a laminina y a colágena tipo IV a un décimo y un quinto del valor control, respectivamente. Mediante interpolaciones de los resultados mostrados en la figura 9, se calcularon las concentración inhibitorias 50 (CI 50) de 4-hidroxicumarina para los diferentes sustratos. La CI 50 de la 4-hidroxicumarina es de 460 μM para la adhesión a vitronectina, de 500 μM para la adhesión a fibronectina, de 120 μM para la adhesión a laminina y de 190 μM para la adhesión a colágena tipo IV.

4.5 EFECTO DE LA 4-HIDROXICUMARINA EN LA MIGRACION CELULAR.

El efecto en la motilidad aleatoria horizontal se estudió mediante ensayos en los que se provocaron "heridas" a las monocapas celulares (Fig. 10, a). La capacidad de migración se evaluó, tras 24 h de tratamiento, estimando el área recubierta nuevamente por células. La 4-hidroxicumarina inhibió parcialmente (50 y 160 μM , Fig. 10, c-d) o totalmente (500 μM , Fig.10, e) la migración que presentan las células control (Fig. 10, b). Nuevamente utilizamos como control positivo a la citocalasina D; esta micotoxina abolió por completo la aparición de células en el área dañada (Fig. 10, f).

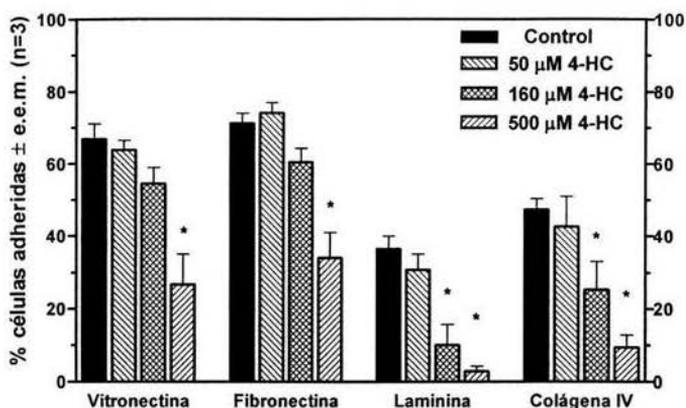


Figura 9. Inhibición de la adhesión a moléculas de la MEC por la 4-hidroxicumarina (4-HC). Células B16-F10 tratadas 24 h se recuperaron y se permitió su adhesión a vitronectina, fibronectina, laminina o colágena tipo IV durante 30 min. Las células no adheridas se removieron y las remanentes se cuantificaron por tinción con cristal violeta. Los resultados presentados son el promedio de tres experimentos independientes, cada uno incluyendo cuadruplicados. Las barras de error representan el error estándar de la media (e.e.m.) y los asteriscos (*) indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$; t de Bonferroni).

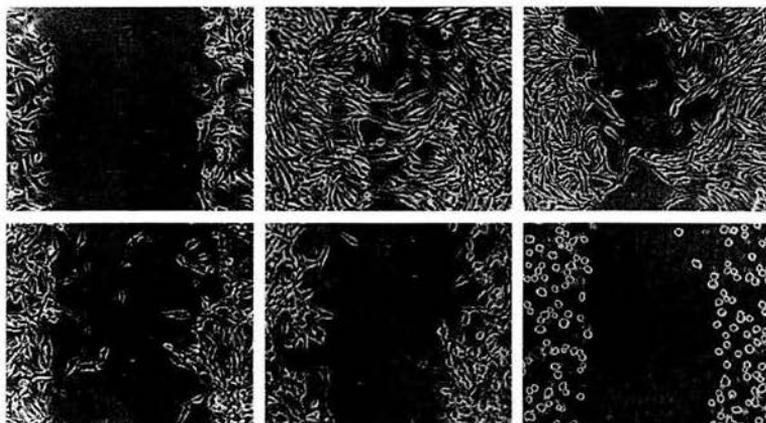


Figura 10. La 4-hidroxicumarina inhibió la migración aleatoria de las células B16-F10. Se muestran microfotografías representativas de cultivos al tiempo cero (a), o tras 24 h de tratamiento con etanol (0.75 %) (b), o 4-hidroxicumarina 50 μM (c), 160 μM (d) o 500 μM (e). Como control positivo se utilizó citocalasina D 5 μM (f). Barra = 200 μm .

4.6 EFECTO DE LA 4-HIDROXICUMARINA EN LA FOSFORILACION EN RESIDUOS DE TIROSINA.

Dado que diferentes proteínas estructurales y reguladoras requieren de la fosforilación en residuos de tirosina para la comunicación cruzada entre integrinas y el citoesqueleto, analizamos el efecto de la 4-hidroxicumarina sobre el contenido de fosfoproteínas. El tratamiento de células B16-F10 con 4-hidroxicumarina disminuyó la fosforilación en residuos de tirosina de varias proteínas, de manera dependiente de la concentración (Fig. A). Identificamos cambios importantes en el estado de fosforilación de proteínas de 125, 70, 65 y 35 kDa (flechas en la figura 11A). En fibroblastos B82, la 4-hidroxicumarina produjo sólo un ligero efecto, aún a la concentración de 500 μM (Fig. 11B). En esas mismas membranas se realizaron inmunoblots para actina; esto nos sirvió como control de carga y para descartar la posibilidad de que los cambios en el citoesqueleto de actina estuviesen relacionados con cambios en la expresión de esta proteína. En ninguna de las dos líneas celulares evaluadas se encontraron diferencias en la expresión de actina (paneles inferiores de la figura 11).

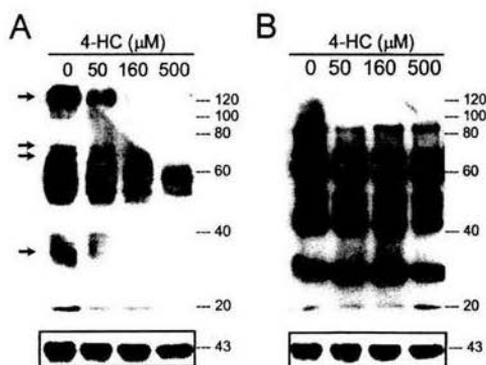


Figura 11. Efecto de la 4-hidroxicumarina (4-HC) en la fosforilación de residuos de tirosina. A. Células B16-F10 tratadas con 4-HC mostraron una inhibición de la fosforilación dependiente de la concentración (panel superior). Estos cambios no están asociados a cambios en la expresión de actina (panel inferior). B. En fibroblastos B82, la 4-HC produjo cambios moderados en la fosforilación de residuos de tirosina (panel superior) y no afectó la expresión de actina (panel inferior). Los marcadores moleculares (en kDa) se encuentran anotados a la derecha.

4.7 PARTICIPACION DE PAXILINA EN LOS EFECTOS DE LA 4-HIDROXICUMARINA.

Dado que paxilina es una de las proteínas involucradas en el rearrreglo del citoesqueleto de actina, estudiamos el efecto de la 4-hidroxicumarina en la distribución, expresión y activación de paxilina en células de melanoma murino B16-F10 y en fibroblastos L929. Mediante inmunolocalizaciones, observamos que la paxilina se agrega en las placas de adhesión focal (que aparecen como parches submembranales) en ambas líneas celulares (Fig. 12, a, c). En células B16-F10 tratadas con 500 μ M de 4-hidroxicumarina la distribución de paxilina hacia las placas de adhesión focal está disminuida, relocalizándose en la periferia del núcleo (Fig. 12, b). Esta misma concentración subtóxica de 4-hidroxicumarina no tiene efecto significativo en fibroblastos L929 (Fig. 12, c, d).

Con el objetivo de conocer si los cambios en la localización de paxilina están relacionados con cambios en su expresión, realizamos inmunoblots para evaluar la concentración de paxilina en células tratadas con 4-hidroxicumarina. En las células B16-F10 se expresan dos isoformas de paxilina: α (60 kDa) y β (64 kDa) (Fig. 13). El tratamiento con 4-hidroxicumarina produce una disminución del 60% en la expresión de la isoforma β , con cambios menores en la isoforma α (Fig. 13). Como control de carga, se realizó una inmunodetección con anticuerpos anti-tubulina en las mismas membranas (panel inferior de la Fig. 13A).

Dado que la activación de paxilina es dependiente de su estado de fosforilación, estudiamos el efecto de la 4-hidroxicumarina sobre la activación de paxilina en células B16-F10 analizando su estado de fosforilación en residuos de tirosina. A partir de lisados totales se inmunoprecipitó paxilina y para compensar el

efecto de la 4-hidroxicumarina sobre la expresión de esta proteína, se utilizó para el innumoblot únicamente la mitad del inmunoprecipitado obtenido de las células control. En estas condiciones se detectó aproximadamente la misma cantidad de paxilina en ambas muestras (Fig. 14A). El tratamiento con 4-hidroxicumarina disminuyó la cantidad de paxilina fosforilada (Fig. 14B).

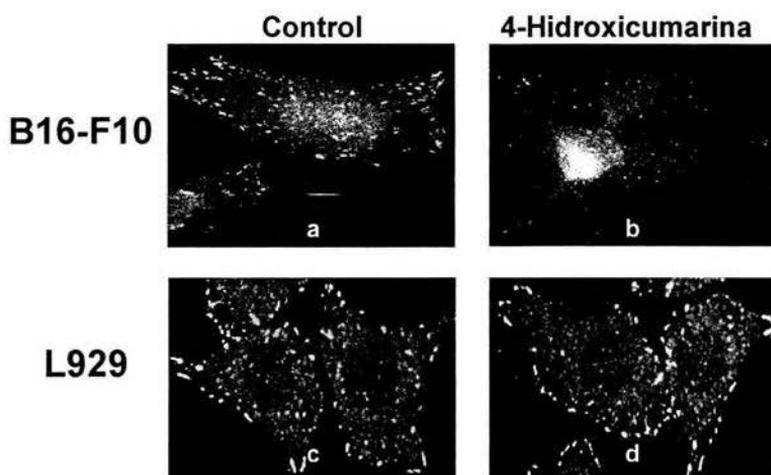


Figura 12. Efecto de la 4-hidroxicumarina (500 μM) sobre la distribución de paxilina en células B16-F10 de melanoma y en fibroblastos L929. Se muestran microfotografías representativas de células tratadas 24 h con etanol 0.75% (a, c) o con 4-hidroxicumarina (b, d).

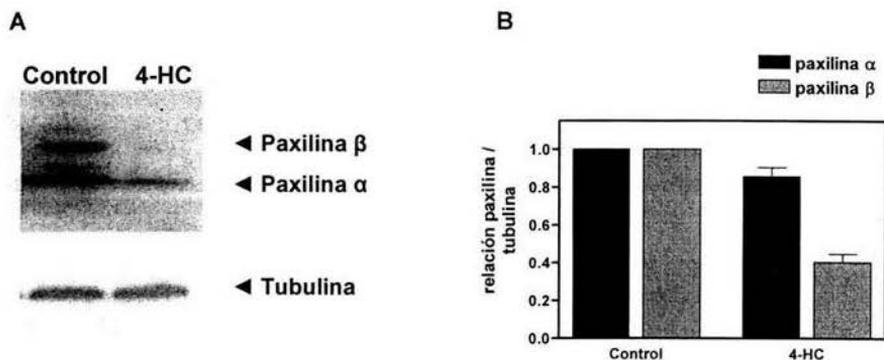


Figura 13. Efecto de la 4-hidroxicumarina sobre la expresión de paxilina en células B16-F10. A. Immunoblots en los que se observa que el tratamiento con 500 μ M de 4-hidroxicumarina (4-HC) disminuyó la expresión de paxilina. Como control de expresión constitutiva se utilizó tubulina (panel inferior). B. Cuantificación densitométrica de la expresión calculada a partir de cuatro experimentos independientes.

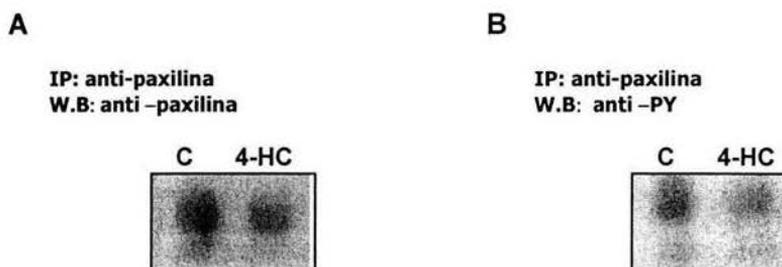


Figura 14. Efecto de la 4-hidroxicumarina (4-HC) sobre la fosforilación de paxilina en células B16-F10. Muestras de inmunoprecipitados (IP) anti-paxilina se separaron por electroforesis y se transfirieron a membranas. En el carril "C" (correspondiente al control) se cargó la mitad del inmunoprecipitado obtenido, mientras que en el carril "4-HC" se cargo todo. En estas condiciones se realizaron inmunodetecciones con anti-paxilina (A) y anti-fosfotirosina (B).

Estudios complementarios.

Gel DD-RTPCR.

Las muestras de ADN amplificado por PCR con los diferentes juegos de oligonucleótidos se corrieron en un gel de alta resolución y se obtuvo la autoradiografía correspondiente. En células B16-F10, la 4-hidroxycumarina produce diversas bandas de expresión diferencial (Fig. 15). Una de las bandas que disminuye como consecuencia del tratamiento (marcada en la Figura. 15) fue la que se eligió para realizar los análisis posteriores. Esta banda, obtenida con los oligonucleótidos DD1 y OPA 20, se purificó y se reamplificó utilizando los mismos iniciadores. Con el reamplificado se calculó el tamaño del fragmento en aproximadamente 350 pb (no se muestran los datos). Dicho fragmento se insertó en el plásmido pCR2.1; y el plásmido se utilizó para transformar células competentes *E. coli* INV α F'. Mediante selección con ampicilina/ X-gal se obtuvieron clonas que se propagaron para obtener ADN plasmídico. Tras comprobar, mediante digestión con *Eco* RI, que el fragmento se había incorporado al plásmido, éste se utilizó para secuenciar el inserto clonado. La secuencia de 365 pb obtenida (Fig. 16) se analizó en la base de datos del banco de genes (www.ncbi.nlm.nih.gov) por medio de un análisis de BLASTN para nucleótidos. El fragmento corresponde al gen de una proteína llamada Molécula Reguladora de Adhesión (ARM-1) del ratón (*Mus musculus*) (clave acceso: NM_019822).

Para la confirmación de la expresión diferencial de ARM-1 se realizaron reacciones de RT-PCR utilizando iniciadores específicos diseñados a partir de la secuencia completa del ARNm de ARM-1. Encontramos que el tratamiento con 4-hidroxycumarina efectivamente disminuye la expresión de ARM-1, sin afectar la expresión del gen constitutivo GAPDH (Fig. 17).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21



Figura 15. Autorradiografía de un gel de DD RT-PCR. A partir ADNc de células tratadas con etanol (carriles impares) o con 4-hidroxycumarina (carriles pares) se realizaron reacciones de PCR con los iniciadores indicados abajo. Las flechas señalan algunas de las bandas expresadas diferencialmente. El asterisco (*) señala la banda seleccionada para su análisis.

| Carril | Muestra | DD | OPA |
|--------|-----------|----|-----|
| 1 | Etanol | 1 | 14 |
| 2 | 4-HC | 1 | 14 |
| 3 | Etanol | 1 | 18 |
| 4 | 4-HC | 1 | 18 |
| 5 | Etanol | 1 | 20 |
| 6 | 4-HC | 1 | 20 |
| 7 | Etanol | 2 | 14 |
| 8 | 4-HC | 2 | 14 |
| 9 | Etanol | 2 | 18 |
| 10 | 4-HC | 2 | 18 |
| 11 | Etanol | 2 | 20 |
| 12 | 4-HC | 2 | 20 |
| 13 | Etanol | 3 | 14 |
| 14 | 4-HC | 3 | 14 |
| 15 | Etanol | 3 | 18 |
| 16 | 4-HC | 3 | 18 |
| 17 | Etanol | 3 | 20 |
| 18 | 4-HC | 3 | 20 |
| 19 | Control - | 1 | 14 |
| 20 | Control - | 2 | 18 |
| 21 | Control - | 3 | 20 |

GCGATCCAGAACACATTAACCTCGCCCCAGTTCAGCAGGCCCTGGGTATGTTCA
GTGCGGCCTTGGCCTCAGGACAGCTTGGCCCTCTCATGTGCCAGTTCGGCCTTC
CTGCAGAGGCTGTTGAGGCCGCCAACAAAGGTGATGTGGAAGCATTGCCAAAG
CCATGCAGAACAATGCCAAATCGGACCCAAAGGAGGGCGACACAAAAGACAAGA
AAGACGAAGAAGAAGATATGAGTCTAGACTAAATTATTCAGTGTCCGTCCCCAAG
TTGGAATTGGTAGCTGTGTGATTCCGTAGTGGTATTGTATTGCCACCTCAC
TAATAAAGTCCTTCCTTGTACCTGAAAAAAAAAAAAAAAA

Figura 16. Secuencia de la banda diferencial clonada. Esta secuencia corresponde al gen ARM-1 de ratón (clave acceso: NM_019822).

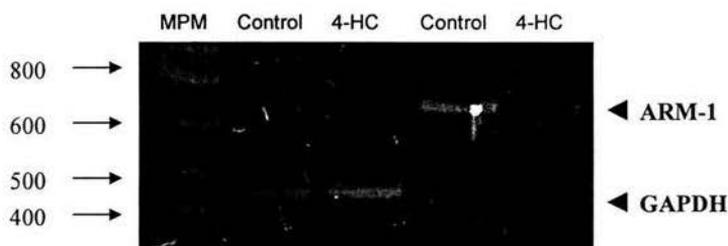


Figura 17. La 4-hidroxycumarina (4-HC) disminuyó la expresión de ARM-1 en células B16-F10. Amplificaciones, por PCR, de los ADNc de GAPDH (carriles 2 y 3) y ARM-1 (carriles 4 y 5).

7. DISCUSION Y CONCLUSIONES.

Los resultados muestran que la cumarina y la 7-hidroxicumarina tienen efecto citotóxico en las líneas celulares de carcinoma pulmonar A427 y Calu-1. Dado que el objetivo de este estudio no fue analizar el efecto citotóxico de los compuestos, el diseño experimental no es el adecuado para calcular CI_{50} ; sin embargo, con nuestros resultados podemos sugerir que la CI_{50} de la cumarina es mayor a 2 mM para la línea A427, y se encuentra entre 200 μM y 2 mM para la línea Calu-1. En el caso de la 7-hidroxicumarina, la CI_{50} se encuentra entre 200 μM y 2 mM tanto para A427 como para Calu-1. Estos datos son consistentes con lo reportado previamente: tanto la cumarina como la 7-hidroxicumarina tienen efectos citotóxicos o citostáticos en diferentes células cancerosas, especialmente en células de carcinoma renal [120, 121], carcinoma pulmonar [97, 110], melanoma [94, 122], y diferentes tipos de leucemias [123]. En prácticamente todos los casos, se ha reportado que la 7-hidroxicumarina es más potente que la cumarina, lo cual es consistente con la hipótesis de que la cumarina es un profármaco [79, 94]. En los reportes citados, dependiendo de la línea celular, las CI_{50} de la 7-hidroxicumarina se encuentran en el intervalo de 100 a 867 μM , mientras que las CI_{50} de la cumarina están entre 257 y 1917 μM [94, 97, 120-123]. Sin embargo, aún la potencia de la 7-hidroxicumarina es baja si se compara con otros compuestos estructuralmente relacionados con la cumarina. Por ejemplo, la 7,8-dihidroxicumarina tiene una CI_{50} = 4.3 μM en células de carcinoma renal [120], la 6,7-dihidroxicumarina tiene una CI_{50} = 20 μM en células de leucemia [123], y la mammea A/BA (una cumarina aislada de *Calophyllum brasilense*) tiene una CI_{50} = 0.31 μM en células de carcinoma de próstata [124].

Adicionalmente, identificamos que la 3-hidroxicumarina tiene efecto citotóxico en células de carcinoma pulmonar. La principal vía metabólica de la cumarina en ratas, es la 3-hidroxilación; interesantemente, la cumarina es hepatotóxica en ratas, pero no en humanos. Se ha postulado que la hepatotoxicidad producida por la cumarina está relacionada con la formación de un intermediario 3,4-epóxido que pudiese unirse covalentemente a biomoléculas [109]. Aunque en humanos, al igual que en el ratón, la cumarina es hidroxilada principalmente en la posición 7, se sabe que en algunos individuos una proporción importante de la cumarina es metabolizada por vías diferentes [101, 109, 125]. Actualmente, se desconoce cuál es la participación de la 3-hidroxicumarina en la actividad antineoplásica de la cumarina *in vivo*.

El mecanismo por el cual las cumarinas producen citotoxicidad o citostásis no se ha aclarado; sin embargo, se sabe que la exposición de células cancerosas a cumarina o 7-hidroxicumarina provoca disminuciones en la síntesis de ARN y proteínas [126]. Se ha demostrado que la 7-hidroxicumarina disminuye la expresión de los oncogenes c-myc y Ha-ras, lo cual puede provocar una reversión parcial del fenotipo maligno [96, 127]. Estudios recientes muestran que la 7-hidroxicumarina y el compuesto 8-nitro, 7-hidroxicumarina provocan apoptosis en células en diferentes líneas tumorales [110, 128].

Por otra parte, observamos que la 4-hidroxicumarina no tiene efecto citotóxico en ninguna de las líneas celulares utilizadas en este estudio. Estos datos concuerdan con los reportados previamente por Kawaii *et al.* [123], y sugieren que la hidroxilación en la posición 4 no es necesaria para que las cumarinas presenten efecto citotóxico.

Los cambios en la expresión de integrinas observados en la línea celular A427, muestran que diferentes hidroxycumarinas pueden regular la expresión de diferentes moléculas. El efecto de compuestos cumarínicos sobre la expresión de moléculas de adhesión ha sido poco estudiado; sin embargo, se sabe que el tratamiento *in vitro* con cumarina disminuye la expresión de ICAM-1 en células de melanoma [129]. Adicionalmente, la cumarina puede modificar la expresión de otros genes, por ejemplo incrementa la expresión de los antígenos DQ y DR del complejo principal de histocompatibilidad en células mononucleadas humanas [126].

Los efectos de cumarinas en la expresión de las integrinas $\alpha 6$ y $\alpha 4$ no se reproducen en células de carcinoma epidermoide Calu-1, a pesar de que esta línea es más sensible a los efectos citotóxicos. De manera similar, y al igual que en reportes previos [94, 122], las células normales utilizadas como controles en nuestro estudio (linfocitos humanos) son menos susceptibles a los efectos de las cumarinas. Diferentes estudios han demostrado que la sensibilidad al efecto de cumarinas es diferente en distintas líneas celulares [94, 128]. Los factores que originan estas diferencias en la susceptibilidad se desconocen, pero se ha descartado que la glicoproteína-P (que proporciona resistencia a fármacos) esté involucrada [128]. Aunque no se ha identificado que existan "receptores" a compuestos cumarínicos, está reportado que para la cumarina hay sitios de unión en diferentes líneas celulares. Sin embargo, estos sitios de unión tienen diferente afinidad y capacidad en distintas líneas celulares [130], lo cual puede afectar el grado de susceptibilidad.

Las integrinas reconocen ligandos presentes en la MEC, regulando así procesos celulares como la supervivencia, la diferenciación, la adhesión y la migración. Dado que algunas de las cumarinas evaluadas alteran la expresión de

integrinas, esperábamos que el tratamiento modificara también la adhesión a sustratos. Sorpresivamente, ninguna de las 3 monohidroxycumarinas evaluadas modifica la adhesión de células de carcinoma pulmonar a moléculas de la MEC. Esto sugiere: i) que el número de integrinas disponibles tras el tratamiento, aún es suficiente para activar eficientemente las vías de señalización que promueven la adhesión; o ii) que otras moléculas de adhesión (integrinas que no evaluamos o receptores de otras familias) pueden estar participando en la adhesión. Sin embargo, dado que nosotros sólo realizamos ensayos estáticos de adhesión a moléculas de la MEC, la posibilidad de que los cambios en la expresión de integrinas participen en el efecto antimetastásico de la cumarina no debe descartarse.

Con el objetivo de estudiar el mecanismo por el que la 4-hidroxycumarina altera la morfología celular, estudiamos la organización del citoesqueleto de actina utilizando la línea celular B16-F10. Dado que el citoesqueleto de actina juega un papel crucial en el mantenimiento de la forma celular [131, 132], los cambios morfológicos pueden ser explicados parcialmente por la desorganización del citoesqueleto encontrada. Como se ha observado también con otras cumarinas hidroxiladas [94, 122], el efecto de la 4-hidroxycumarina fue selectivo sobre células tumorales y reversible al retirar el tratamiento. La carencia de efecto de la 4-hidroxycumarina sobre la viabilidad muestra que los cambios morfológicos no están relacionados con la muerte celular.

Los cambios en la organización del citoesqueleto correlacionan con la inhibición de la adhesión a diferentes moléculas de la MEC. Como se describió previamente, las integrinas son los principales receptores para moléculas de la MEC y como

consecuencia del reconocimiento de su ligando inducen cambios en el citoesqueleto de actina [133]. Las señales transducidas dependen del tipo de integrina activada y del ligando reconocido, pues las integrinas, al ser receptores promiscuos, pueden reconocer más de un ligando. Por ejemplo, las integrinas $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 8$ se unen tanto a fibronectina como a vitronectina [27, 134, 135]. De manera similar las integrinas $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ pueden unirse tanto a colágenas como a laminina [27, 135]. Estas funciones compartidas pueden explicar parcialmente el por qué la 4-hidroxicumarina produce efectos de magnitud similar en la adhesión a fibronectina o vitronectina y en la adhesión a laminina o colágena tipo IV. Sin embargo, el decremento en la adhesión indica que la activación de integrinas por los ligandos mencionados no es suficiente para revertir la desorganización del citoesqueleto producida por la 4-hidroxicumarina. Como se describió anteriormente, una adhesión eficiente requiere, además de la activación de integrinas, la adecuada organización espacial del citoesqueleto [132, 136] y de su maquinaria contráctil [137, 138] para el reclutamiento de moléculas señalizadoras.

La organización del citoesqueleto también tiene un profundo efecto sobre la motilidad celular, por lo tanto el tratamiento con 4-hidroxicumarina inhibió la migración aleatoria de células B16-F10. La 7-hidroxicumarina, el principal metabolito de la cumarina en el hombre, también afecta la motilidad de células cancerosas. Lü et al. [112] reportaron que la 7-hidroxicumarina inhibe la migración de células de adenocarcinoma mamario de rata (RBA) en geles de colágena. Sin embargo, los autores de ese estudio no reportaron cambios en el citoesqueleto de actina.

En la progresión del cáncer existen cambios en la expresión y/o funcionalidad tanto de receptores de adhesión, como de componentes intracelulares de los

complejos de adhesión focal [18]. La paxilina es una de las proteínas claves en la regulación de la motilidad que presenta alteraciones en diferentes tipos de neoplasias. La distribución de paxilina hacia los sitios de adhesión focal y su fosforilación en residuos de tirosina (31 y 118), es necesaria para una adecuada regulación de la polimerización de actina. Por lo tanto, la paxilina participa en la regulación de la motilidad de diferentes estirpes celulares [77, 139, 140] y cambios en la activación y expresión de paxilina están relacionados con alteraciones en la morfología, la adhesión y la migración celular [66, 67, 71]. Un aumento en la expresión de paxilina incrementa el proceso de metástasis en cáncer renal [141] y en cáncer de próstata [142]. Sin embargo, en células de cáncer de pulmón una disminución de la expresión de paxilina correlacionó con la generación de metástasis [143, 144]. Estas diferencias pueden deberse a que las isoformas de paxilina se expresan en distinta proporción dependiendo la estirpe y función de cada tipo de célula [67, 68]. Aparentemente, la isoforma más involucrada en la generación de metástasis es la β [68]. En tejidos normales, la expresión de la isoforma β es muy baja, pero aumenta durante el proceso de transformación [68]. En células B16-F10, la 4-hidroxycumarina disminuye principalmente la expresión de la isoforma β . La disminución en la expresión y activación de paxilina producida por la 4-hidroxycumarina podría ser responsable de que ésta no se distribuya eficientemente a los complejos de adhesión focal, alterando la función de dichos complejos.

El efecto de la 4-hidroxycumarina en la fosforilación en residuos de tirosina correlaciona con la desorganización del citoesqueleto y la disminución de la adhesión y la migración de las células B16-F10. Los resultados sugieren la 4-hidroxycumarina

disminuye la fracción de paxilina fosforilada. La paxilina requiere estar fosforilada para interactuar con otras moléculas y funcionar como proteína adaptadora; por lo tanto la fosforilación de paxilina en residuos de tirosina es esencial tanto para la adhesión como para la migración de células cancerosas [78]. La inhibición de la fosforilación de paxilina sería una segunda manera por la cual la 4-hidroxycumarina afectaría la distribución de paxilina. Cabe mencionar que, de manera congruente con el resto de los resultados presentados, la 4-hidroxycumarina fue menos efectiva en células no malignas.

Las GTPasas miembros de la familia Rho, incluyendo RhoA, Rac y Cdc42 son otros reguladores importantes de la organización del citoesqueleto. En fibroblastos Swiss 3T3, Cdc42 gobierna la extensiones de los filopodios, Rac regula la formación del lamelipodios, y RhoA controla el ensamblaje de las fibras de estrés [145]. Aunque se ha propuesto una jerarquía en la que Cdc42 activo estimula la actividad de Rac y Rac estimula la activación de Rho [145], durante el movimiento de la célula, estas proteínas trabajan antagónicamente en una manera compleja [146]. Rac y Cdc42 promueven la extensión y la adhesión de filopodios y de lamelipodios en el extremo líder de la célula, mientras que RhoA induce la contracción del extremo posterior [146]. La regulación de estas GTPasas necesita del reclutamiento y de la activación de proteínas estructurales y reguladoras que, a su vez, son activadas por fosforilación en residuos de tirosina. Por lo tanto, las cinasas y fosfatasas de tirosina desempeñan un papel crucial en la regulación de la adhesión y de la motilidad celular [137]. Por ejemplo, Nobes et al. demostraron que la activación de RhoA necesita una cinasa de residuos de tirosina arriba en la vía [147]; por lo tanto, los tratamientos con los inhibidores de cinasas de tirosina interrumpen la formación de fibras de estrés [54].

Dado que otros compuestos cumarínicos son inhibidores de cinasas, el mecanismo por el que la 4-hidroxicumarina produce los efectos reportados podría involucrar la inhibición de cinasas. La dafnetina (6,7-dihidroxicumarina) inhibe al receptor a factor de crecimiento epidermal (EGF-R), a la proteína cinasa C (PKC) y a la proteína cinasa A (PKA) en ensayos *in vitro* utilizando proteínas purificadas [148]. La inhibición producida por dafnetina es competitiva con el ATP y requiere de concentraciones entre 10 y 30 μM para inhibir el 50% de la actividad de las enzimas [148]. Por otro lado, la 7- hidroxicumarina inhibe la cinasa de cadenas ligeras de miosina (MLCK) ($\text{CI}_{50} = 197 \mu\text{M}$); mientras el ácido robustico, otro derivado de la cumarina, es un inhibidor selectivo de PKA ($\text{CI}_{50} = 10 \mu\text{M}$) [149]. Aún cuando 4-hidroxicumarina no modifica significativamente la actividad de esas enzimas [148, 149], no debe descartarse la posibilidad de que pueda inhibir otras cinasas, como Fak o Src, que son responsables de la fosforilación de paxilina. Otras posibles explicaciones son que la 4-hidroxicumarina altere la expresión de algunas cinasas, o que modifique la actividad de fosfatasas. Actualmente, no tenemos evidencia que soporte ninguna de estas posibilidades, por lo que se requieren estudios posteriores.

El efecto de la 4-hidroxicumarina sobre la adhesión y la motilidad podría afectar las siguientes etapas del proceso de metástasis: (i) intravasación, (ii) extravasación, y (iii) migración a través del tejido conectivo. Como se describió previamente, este último punto y la iniciación de la proliferación, son los pasos limitantes en la formación de metástasis. Por lo tanto, la 4-hidroxicumarina podría participar en la actividad antimetastásica de la cumarina, apoyando la hipótesis propuesta previamente de que la cumarina es un profármaco [79, 94]. Sin embargo, el mecanismo preciso por el cual la 4-hidroxicumarina genera los efectos reportados aún requiere estudios posteriores.

La identificación de dicho mecanismo podría generar terapias adyuvantes para el tratamiento del cáncer.

Estudios complementarios.

El tratamiento con 4-hidroxicumarina induce la expresión diferencial de genes en células B16-F10; se pretende continuar las investigaciones para aclarar la identidad de dichos genes. La banda que seleccionamos para su secuenciación, corresponde a un fragmento del gen que codifica para la molécula reguladora de adhesión 1 (ARM-1). ARM-1 es una proteína membranal tipo I, cuyo dominio extracelular, rico en residuos de serina y treonina, tiene regiones homólogas a las del antígeno carcinoembrionario (ACE) [150]. Por esta razón, los epítopes de ARM-1 son reconocidos por anticuerpos monoclonales generados contra ACE [151]. ARM-1 se encuentra distribuida en varios tejidos de ratón tales como riñón, testículos, músculo esquelético, hígado, pulmones, bazo, cerebro y corazón [152]. La amplia distribución de ARM-1 sugiere que la función de esta proteína es importante para las células independientemente de su estirpe. 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. 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 metastático [152]. 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 [152].

Utilizando iniciadores específicos, demostramos que el tratamiento con 4-hidroxicumarina disminuye la expresión de ARM-1. Esta disminución podría disminuir la adhesión entre células cancerosas y células endoteliales, y por lo tanto, afectar la extravasación durante el proceso de metástasis. Sin embargo, se requieren estudios posteriores para comprobar que la 4-hidroxicumarina disminuye la adhesión de células tumorales al endotelio vascular.

8. PERSPECTIVAS.

Los efectos de la 4-hidroxicumarina reportados en este trabajo nos llevan a plantear los experimentos siguientes:

1) Dado que la expresión de integrinas se modifica por el tratamiento con cumarinas en células de carcinoma pulmonar humano, debemos evaluar el efecto de la 4-hidroxicumarina sobre la expresión de integrinas en la línea celular B16-F10. Esta información complementaría la ya existente acerca del mecanismo por el cual la 4-hidroxicumarina disminuye la adhesión a moléculas de la MEC.

2) Los efectos de la 4-hidroxicumarina sobre el citoesqueleto de actina, la adhesión y la migración, pueden deberse a los cambios producidos en la expresión de la paxilina. Utilizar un modelo con células transfectadas que sobre-expresen paxilina ayudaría a analizar si la disminución en la expresión de paxilina es responsable de los efectos reportados de la 4-hidroxicumarina.

3) En este estudio, encontramos que el tratamiento de células B16-F10 con 4-hidroxicumarina altera la expresión de la molécula de adhesión ARM-1. La consecuencia funcional de la disminución en la expresión de ARM-1 puede evaluarse mediante ensayos de adhesión de células de melanoma tratadas con 4-hidroxicumarina a células endoteliales. Adicionalmente, debe analizarse el efecto de la 4-hidroxicumarina sobre la expresión de ARM-1 en células normales. Para esto, habría que seleccionar el control más adecuado, estudiando la expresión basal de ARM-1 en líneas celulares no malignas o en cultivos primarios.

4) En los estudios de expresión diferencial de genes en células B16-F10 tratadas con 4-hidroxicumarina, existen otras bandas que pueden estudiarse.

Actualmente, algunas de esas bandas de expresión diferencial han sido purificadas y se espera aclarar su identidad utilizando la misma metodología descrita en este trabajo.

5) Finalmente, se planea evaluar la actividad de la 4-hidroxicumarina en modelos *in vivo*. Utilizando la línea celular B16-F10 implantada en ratones C57/BL6, podremos estudiar el efecto del tratamiento en la supervivencia de los animales y en la formación de metástasis espontáneas (principalmente pulmonares).

9. BIBLIOGRAFIA.

1. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, Version 2.0. IARC CancerBase No. 5. Lyon, IARC Press, 2004. <http://www-depdb.iarc.fr/globocan2002.htm>
2. Finley R. Lung cancer, in *Pharmacotherapy, a pathophysiologic approach*. Di Piro J, et al. (ed) Appleton and Lange. 1997: 1958-1967.
3. Squire JA, Withmore GF, Philips RA. Genetic basis of cancer, in: I.F. Tannock, R.P. Hill (Eds.) *The Basic Science of Oncology*, McGraw-Hill, 1998: 48-78.
4. Teich NM. Oncogenes and cancer, in: L.M. Franks, N.M. Teich (Eds.) *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*, Oxford University Press, 1997: 167-201.
5. Weinberg RA. How cancer arises. *Sci Am*. 1996; 275: 62-70.
6. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet*. 1993; 9: 138-141.
7. Chambers AF, Groom AC, MacDonald I. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Review Cancer*. 2002; 2: 563-573.
8. Liotta L. Tumor invasion and metastases-role of the extracellular matrix. *Cancer Res*. 1986; 46: 1-7.
9. Weiss L. Metastatic inefficiency. *Adv Cancer Res*. 1990; 54: 159-211.
10. Chambers F, Naumov N, Vantyghem A, Tuc BA. Molecular biology of breast cancer metastasis. Clinical implications of experimental studies on metastasis inefficiency. *Breast Cancer Res*. 2000; 2: 400-407.
11. Chambers AF, Hill RP. Tumor progression and Metastasis, in: I.F. Tannock, R.P. Hill (Eds.) *The Basic Science of Oncology*, McGraw-Hill, 1998: 48-78.
12. Mazzeri R, Masiero L, Zanetta L, Monea S, Onisto M, Garbisa S, Mignatti P. Control of type IV collagenase activity by components of the urokinase-plasmin system: a regulatory mechanism with cell-bound reactants. *EMBO J*. 1997; 16: 2319-2332.

13. Leone A, Flatow U, King CR, Sandeen MA, Margulies IM, Liotta LA, Steeg PS. Reduced tumor incidence, metastatic potential, and cytokine responsiveness of nm23-transfected melanoma cells. *Cell*. 1991; 65: 25-35.
14. De la Rosa A, Williams RL, Steeg PS. Nm23/nucleoside diphosphate kinase: toward a structural and biochemical understanding of its biological functions. *Bioessays*. 1995; 17: 53-62.
15. MacDonald NJ, de la Rosa A, Steeg PS. The potential roles of nm23 in cancer metastasis and cellular differentiation. *Eur J Cancer*. 1995; 31A: 1096-1100.
16. Ruoslahti E, Giancotti FG. Integrins and tumor cell dissemination. *Cancer Cells*. 1989; 1: 119-126.
17. Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA. General mechanism of metastasis. *Cancer*. 1997; 80 Suppl: 1529-1537.
18. Velasco-Velázquez M, Molina JA, Mendoza N, Lopez J, Mandoki J. Integrinas y moléculas asociadas a integrinas: blancos para el desarrollo de terapias antimetastásicas. *Rev Invest Clin*. 1999; 51: 183-193.
19. Christofori G, Semb H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci*. 1999; 24: 73-76.
20. Behrens J, Mareel MM, Van Roy FM, Birchmeier W. Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol*. 1989; 108: 2435-2447.
21. Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Lochner D, Birchmeier W. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol*. 1991; 113: 173-185.
22. Vleminckx K, Vakaet L Jr, Mareel M, Fiers W, van Roy F. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell*. 1991; 66: 107-119.
23. Peifer M, Polakis P. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis- a look outside the nucleus. *Science*. 2000; 287: 1606-1609.
24. Crawford HC, Fingleton BM, Rudolph-Owen LA, Goss KJ, Rubinfeld B, Polakis P, Matrisian LM. The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene*. 1999; 18 : 2883-2891.

25. Gradl D, Kuhl M, Wedlich D. The Wnt/Wg signal transducer beta-catenin controls fibronectin expression. *Mol Cell Biol.* 1999; 19: 5576-5587.
26. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 1992; 69: 11-25.
27. Jin H, Varner J. Integrins: roles in cancer development and as treatment targets *Br J Cancer.* 2004; 90: 561-565.
28. Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M. Focal adhesions, contractility, and signaling. *Ann Rev Cell Dev Biol.* 1996; 12: 463-519.
29. Humpries MJ, Olden K, Yamada KM. A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis of murine melanoma cells. *Science.* 1986; 233: 467-470.
30. Beviglia L, Stewart GJ, Niewiarowski S. Effect of four disintegrins on the adhesive and metastatic properties of B16-F10 melanoma cells in a murine model. *Oncol Res.* 1995; 7: 7-20.
31. Hardan I, Weiss L, Hershkovis R, Greenspoon N, Alon R, Cahalon L, Reich S, Slaviv S, Lider O. Inhibition of metastatic cell colonization in murine lungs and tumor-induced morbidity by non-peptidic Arg-Gly-Asp mimetics. *Int J Cancer.* 1993; 55: 1023-1028.
32. Albelda S. Role of integrins and other adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab Invest.* 1993; 68: 4-17.
33. Mariani-Costantini R, Falcioni R, Battista P, Zupi G, Kennel SJ, Colasante A, Ventura I, Curio CG, Sacchi A. Integrin $\alpha 6 \beta 4$ expression in human lung cancer as monitored by specific monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 1990; 50: 6107-6112.
34. Carico E, French D, Bucci B, Falcioni R, Vecchione A, Mariani-Costantini R. Integrin $\beta 4$ expression in the neoplastic progression of cervical epithelium. *Gynecol-Oncol.* 1993; 49: 61-63.
35. Van Waes C, Surh DM, Chen Z, Kirby M, Rhim JS, Brager R, Sessions RB, Poore J, Wolf GT, Carey TE. Increase in suprabasilar integrin adhesion molecule expression in human epidermal neoplasms accompanies increased proliferation occurring with immortalization and tumor progression. *Cancer Res.* 1995; 55: 5434-5444.

36. Chao C, Lotz MM, Clarke AC, Mercurio AM. A function for the integrin $\alpha 6\beta 4$ in the invasive properties of colorectal carcinoma cells. *Cancer Res.* 1996; 56: 4811-4819.
37. Imhof BA, Piali L, Gisler RH, Dunon D. Involvement of $\alpha 6$ and αv integrins in metastasis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996; 213: 195-203.
38. Falcioni R, Cimino L, Perrotti D, Rizzo MG, Sacchi A. $\alpha 6/\beta 4$ integrin in lung carcinoma in *Cancer and Inflammation*. In: Epenetos A, Pignatelli M, editors. *Cell adhesion molecules in cancer and inflammation*. Switzerland: Harwood Academic Publishers, 1995: 45-58.
39. Albelda MA, Mette SA, Elder DE, Stewart RM, Damjanovich L, Herlyn M, Buck CA. Integrin distribution in malignant melanoma: association of the $\beta 3$ subunit with tumor progression. *Cancer Res.* 1990; 50: 6757-6774.
40. Filardo EJ, Brooks PC, Deming SL, Damsky C, Cheresh DA. Requirement of the NPXY motif in the integrin beta 3 subunit cytoplasmic tail for melanoma cell migration *in vitro* and *in vivo*. *J Cell Biol.* 1995; 130: 441-450.
41. Nip J, Shibata H, Loskutoff DJ, Cheresh DA, Brodt P. Human melanoma cells derived from lymphatic metastases use integrin alpha v beta 3 to adhere to lymph node vitronectin. *J Clin Invest.* 1992; 90: 1406-1413.
42. Nierodzik ML, Klepfish A, Karpatkin S. Role of platelets, thrombin, integrin IIb-IIIa, fibronectin and von Willebrand factor on tumor adhesion *in vitro* and metastasis *in vivo*. *Thromb Haemost.* 1995; 74: 282-290.
43. Dardik R, Kaufmann Y, Savion N, Rosenberg N, Shenkman B, Varon D. Platelets mediate tumor cell adhesion to the subendothelium under flow conditions: involvement of platelet GP IIb-IIIa and tumor cell alpha v integrins. *Int J Cancer.* 1997; 70: 201-207.
44. Mitjans F, Sander D, Adán J, Sutter A, Martinez JM, Jäggle CS, Moyano JM, Kreysch HG, Piulats J, Goodman SL. An anti-alpha v integrin antibody that blocks integrin function inhibits the development of a human melanoma in nude mice. *J Cell Sci.* 1995; 108: 2825-2838.
45. Rice GE, Bevilacqua MP. An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion. *Science.* 1989; 246: 1303-1306.

46. Albeda SM, Buck CA. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J* 1990; 4: 2868-2880.
47. Plantefaber LC, Hynes RO. Changes in integrin receptors on oncogenically transformed cells. *Cell*. 1989; 56: 281-290.
48. Schreiner C, Fisher M, Hussein S, Juliano RL. Increased tumorigenicity of fibronectin receptor deficient chinese hamster ovary cell variants. *Cancer Res*. 1991; 51: 1738-1740.
49. Giancotti FG, Ruoslahti E. Elevated levels of the $\alpha 5\beta 1$ fibronectin receptor suppress the transformed phenotype of chinese hamster ovary cells. *Cell*. 1990; 60: 849-859.
50. Varner JA, Emerson DA, Juliano RL. Integrin $\alpha 5\beta 1$ expression negatively regulates cell growth: reversal attachment to fibronectin. *Mol Biol Cell*. 1995; 6: 725-740.
51. La Flamme S, Auer KL. Integrin signaling. *Sem Cancer Biol* 7: 111-118.
52. Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science*. 1995; 268: 233-239.
53. Turner CE. Paxillin: a cytoskeletal target for tyrosin kinases. *BioEssays*. 1994; 16: 47-52.
54. Burridge K, Turner CE, Romer LH. Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. *J Cell Biol*. 1992; 119: 893-903.
55. Schaller MD, Otey CA, Hildebrand JD, Parsons JT. Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmatic domains. *J Cell Biol*. 1995; 130: 1181-1187.
56. Tachibana K, Sato T, D'Avirro N, Morimoto C. Direct association of pp125FAK with paxillin, the focal adhesion-targeting mechanism of pp125FAK. *J Exp Med*. 1995; 182: 1089-1099.
57. Ilic D, Furuta Y, Kanazawa S, Takeda N, Sobue K, Nakatsuji N, Nomura S, Fujimoto J, Okada M, Yamamoto T. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature*. 1995; 377: 539-544.

58. Schaller MD, Hilderbrand JD, Shannon JD, Fox JW, Vines RR, Parsons JT. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125^{FAK}, directs SH2-dependent binding of pp60^{Src}. *Mol Cell Biol.* 1995; 14: 1680-1688.
59. Calalb MB, Polte TR, Hanks SK. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role of Src-family kinases. *Mol Cell Biol.* 1995; 15: 954-963.
60. Yamada KM, Miyamoto S. Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. *Curr Op Cell Biol.* 1995; 7: 681-689.
61. Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T, Van der Geer P. Integrin mediated signal transduction linked to ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature.* 1994; 372: 786-791.
62. Klinghoffer RA, Sachsenmaier C, Cooper JA, Soriano P. Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction. *EMBO J.* 1999; 18: 2459-2471.
63. Hanks SK, Polte TR. Signaling through focal adhesion kinase. *BioEssays* 1997; 19: 137-145.
64. Miyamoto S, Akiyama SK, Yamada KM. Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function. *Science.* 1995; 267: 883-885.
65. Miyamoto SH, Teramoto O, Coso A, Gutkind JS, Burbelo PD, Akiyama SK, Yamada KM. Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J Cell Biol.* 1995; 131: 791-805.
66. Turner CE, Glenney JR Jr, Burridge K. Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions. *J Cell Biol.* 1990; 111: 1059-1068.
67. Mazaki Y, Hashimoto S, Sabe H. Monocyte cells and cancer cells express novel paxillin isoforms with different binding properties to focal adhesion proteins. *J Biol Chem.* 1997; 272: 7437-7444.
68. Mazaki Y, Hiroshi U, Okio H, Shigeru H. Paxillin Isoform in Mouse. *J Biol Chem.* 1998; 273: 22435-22441.
69. Brown MC, Perrotta JA, Turner CE. Serine and threonine phosphorylation of the paxillin LIM domains regulates paxillin focal adhesion localization and cell adhesion to fibronectin. *Mol Biol Cell.* 1998; 9: 1803-1816.

70. Ku H, Meier KE. Phosphorylation of paxillin via the ERK mitogen-activated protein kinase cascade in EL4 thymoma cells. *J Biol Chem.* 2000; 275: 11333-11340.
71. Brown MC, Turner CE. Paxillin: adapting to change. *Physiol Rev.* 2004; 84:1315-1339.
72. Thomas JW, Cooley MA, Broome JM, Salgia R, Griffin JD, Lombardo CR, Schaller MD. The role of focal adhesion kinase binding in the regulation of tyrosine phosphorylation of paxillin. *J Biol Chem* 1999; 274: 36684-36692.
73. Moro LM, Venturino C, Bozzo L, Silengo F, Altruda L, Beguino G, Tarone G, Defilippi P. Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival. *EMBO J.* 1998; 17: 6622-6632.
74. Bockholt SM, Burridge K. Cell spreading on extracellular matrix proteins induces tyrosine phosphorylation of tensin. *J Biol Chem.* 1993; 268: 14565-14567.
75. Richardson AR, Malik K, Hildebrand JD, Parsons JT. Inhibition of cell spreading by expression of the C-terminal domain of focal adhesion kinase (FAK) is rescued by coexpression of Src or catalytically inactive FAK: a role for paxillin tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 1997; 17: 6906-6914.
76. Takayama Y, Tanaka S, Nagai K, Okada M. Adenovirus-mediated overexpression of C-terminal Src kinase (Csk) in type I astrocytes interferes with cell spreading and attachment to fibronectin. Correlation with tyrosine phosphorylations of paxillin and FAK. *J Biol Chem.* 1999. 274: 2291- 2297.
77. Nakamura K, Yano H, Uchida H, Hashimoto S, Schaefer E, Sabe H. Tyrosine phosphorylation of paxillin alpha is involved in temporospatial regulation of paxillin-containing focal adhesion formation and F-actin organization in motile cells. *J Biol Chem.* 2000; 275: 27155-27164.
78. Petit V, Boyer B, Lentz D, Turner CE, Thiery JP, Valles AM. Phosphorylation of tyrosine residues 31 and 118 on paxillin regulates cell migration through an association with CRK in NBT-II cells. *J Cell Biol.* 2000; 148: 957-970.
79. Egan D, O'Kennedy R, Moran E. The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarin-related compounds. *Drug Metab Rev.* 1990; 22: 503-529.

80. Nair RV, Fischer PE, Safe HS, Cortez C, Harvey GR, DiGiovanni J. Novel coumarins as potential anticarcinogenic agents. *Carcinogenesis*. 1991; 12: 65-69.
81. National Toxicology Program. Toxicology and Carcinogenesis Studies of Coumarin (CAS No. 91-64-5) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser*. 1993; 422: 1-340.
82. Scheel LD. The Biological action of coumarins. *Microbiol Toxins*. 1972; 8: 47-66.
83. Zacharski L, Henderson W, Rickles F. Effects of warfarins on survival on small cell carcinoma of lung. *JAMA*. 1981; 245: 831-835.
84. Hilgard P, Schulte H, Wetzig G, Schmitt G. Oral anticoagulation in the treatment of a spontaneously metastasizing murine tumor. *Br J Cancer*. 1978; 35: 78-85.
85. Matt B, Hilgard P. Anticoagulants and experimental metastases-evaluation of antimetastasis effects in different model systems. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1981; 101: 275-283.
86. Maucher A, Kager M, Von Angerer E. Evaluation of the antitumor activity of coumarin in prostate cancer models. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1993; 119: 150-154.
87. Von Angerer E, Kager M, Maucher A. Antitumour activity of coumarin in prostate and mammary cancer models. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1994; 120 (Suppl): S14-S16.
88. Thornes RD, Lynch G, Sheehan MV. Cimetidine and coumarin therapy of melanoma. *Lancet*. 1982; 2: 238-241.
89. Zänker K. *et al*. Coumarin in melanoma patients: an experimental and clinical study. *Drugs Exptl Clin Res*. 1984; 11: 767-774.
90. Dexeus FH, Logothetis CJ, Sella A, Fitz K, Amato R, Reuben JM, Dozier N. Phase II study of coumarin and cimetidine in patients with metastatic renal carcinoma. *J Clin Oncol*. 1990; 8: 325-329.
91. Mohler JL, Williams BT, Thompson IM, Marshall ME. Coumarin (1,2-benzopyrone) for the treatment of prostatic carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1994; 120 (Suppl): S35-S38.
92. Marshall ME, Mohler JL, Edmonds K, Williams B, Butler K, Ryles M, *et al*. An updated review of the clinical development of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1994; 120 (suppl): S14-S16.

93. López-González JS, García-Herrera V, Aguilar-Cazares D, Medina-Morales F, Cervera-Mendieta I, Mandoki JJ, León F, Velasco-Velázquez MA, García MJ, Molina-Guarneros JA. Efecto citostático de la cumarina y la 7-hidroxycumarina en tres líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar humano. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 1998; 11: 261-267.
94. Jiménez A, Molina J, Mendoza N, León F, Flores B, Santos E, Mandoki JJ. Cytostatic activity of coumarin metabolites and derivatives in the B16-F10 murine melanoma cell line. *Melanoma Res.* 1999. 9: 243-247.
95. Marshall ME, Kervin K, Benefield C, Umerani A, Albainy-Jenei S, Zhao Q. Growth-inhibitory effects of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7-hidroxycumarin on human malignant cell lines in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1994; 120 (suppl): S3-S10.
96. Nakayasu M, Shima H, Aonuma S, Nakagama H, Nagao M, Sugimura T. Deletion of transfected oncogenes from NIH 3T3 transformants by inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988; 85:9066-9070.
97. Jimenez-Orozco FA, Lopez-Gonzalez JS, Nieto-Rodriguez A, Velasco-Velazquez MA, Molina-Guarneros JA, Mendoza-Patino N, Garcia-Mondragon MJ, Elizalde-Galvan P, Leon-Cedeno F, Mandoki JJ. Decrease of cyclin D1 in the human lung adenocarcinoma cell line A-427 by 7-hydroxycoumarin. *Lung Cancer.* 2001; 34:185-194.
98. Piller N. A morphological assesment of the stimulatory effect of coumarin on macrophages. *Br J Exp Path.* 1978; 28: 1407-1410.
99. Hardt T, Ritschel W. The effect of coumarin and 7-hydroxycoumarin on in vitro macrophage phagocytosis of latex particles. *Meth Find Exptl Clin Pharmacol.* 1983; 5: 39-43.
100. Stuhlmeier K, Theyer G, Baumgartner G, Zlabinger GJ. Synergistic effect of coumarin (1, 2 benzopyrone) and endotoxin in the induction of human interleukin-1. *Clin Exp Immunol.* 1991; 84: 317-323.
101. Ritschel WA, Brady ME, Tan HI, Hoffmann KA, Yiu IM, Grummich KW. Pharmacokinetics of coumarin and its 7-hydroxy-metabolites upon intravenous and peroral administration of coumarin in man. *Eur J Clin Pharmacol.* 1977; 12: 457-461.

102. Lake BG. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. *Food Chem Toxicol.* 1999; 37: 423-453.
103. Rautio A, Kraul H, Kojo A, Salmela E, Pelkonen O. Interindividual variability of coumarin 7-hydroxylation in healthy volunteers. *Pharmacogenetics.* 1992; 2: 227-233.
104. Ujjin P, Satarug S, Vanavanitkun Y, Daigo S, Ariyoshi N, Yamazaki H, Reilly PE, Moore MR, Kamataki T. Variation in coumarin 7-hydroxylase activity associated with genetic polymorphism of cytochrome P450 2A6 and the body status of iron stores in adult Thai males and females. *Pharmacogenetics.* 2002; 12: 241-249.
105. Xu C, Rao YS, Xu B, Hoffmann E, Jones J, Sellers EM, Tyndale RF. An in vivo pilot study characterizing the new CYP2A6*7, *8, and *10 alleles. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 290: 318-324.
106. Von Weymarn LB, Murphy SE. CYP2A13-catalysed coumarin metabolism: comparison with CYP2A5 and CYP2A6. *Xenobiotica.* 2003; 33: 73-81.
107. Shilling WH, Crampton FR, Longland RC. Metabolism of coumarin in man. *Nature.* 1969; 221: 664-665.
108. Von Weymarn LB, Murphy SE. Coumarin metabolism by rat esophageal microsomes and cytochrome P450 2A3. *Chem Res Toxicol.* 2001; 14: 1386-1392.
109. Lopez-Gonzalez JS, Prado-Garcia H, Aguilar-Cazares D, Molina-Guarneros JA, Morales-Fuentes J, Mandoki JJ. Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxycoumarin on human lung carcinoma cell lines. *Lung Cancer.* 2004; 43: 275-83.
110. Pelkonen O, Raunio H, Rautio A, Pasanen M. The metabolism of coumarin, in: R. O'Kennedy, R.D. Thornes (Eds.) *Coumarins Biology, Applications and Mode of Action*, Wiley, 1997: 67-92.
111. Velasco-Velazquez M, Molina-Guarneros J, Orozco A, Leon F, Santos E, Mendoza N, Mandoki JJ. Effects of five coumarins in vitro on the adhesion of the murine melanoma cell line B16-F10, and the expression of adhesion molecules LFA-1, ICAM-1 and CD44. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1998; 358 (Suppl): R733.

112. Lü HQ, Niggemann B, Zänker KS. Suppression of the proliferation and migration of oncogenic ras-dependent cell lines, cultured in a three-dimensional collagen matrix, by flavonoid-structured molecules. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1996; 122: 335-342.
113. Kokotos G, Tzougraki C. Síntesis and study of substituted coumarins. A facile preparation of D,L-o-tyrosine. *J Heterocyc Chem*. 1986; 23: 87-92.
114. Jones G. The Knoevenagel condensation. *Organic Reactions*. 1967; 15: 204-599.
115. Furniss BS, Hannaford AJ, Rogers V, Smith PWG, Tatchel AR. Aromatic compounds, in: *Voegel's Text-book of Practical Organic Chemistry*, Longman, 1978: 755.
116. Adams R, Bockstahler TE. Preparation and reactions of o-hydroxycinnamic acids and esters. *J Am Chem Soc*. 1952; 74: 5346-5348.
117. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferative and cytotoxic assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65: 55-63.
118. Arap W, Huang HJ. Expression of integrin transcripts in human cancer cells. *Methods Mol Biol*. 1999; 129: 91-101.
119. Humphries MJ. Cell adhesion assays. *Methods Mol Biol*. 2000; 139: 279-285.
120. Finn GJ, Kenealy E, Creaven BS, Egan DA. In vitro cytotoxic potential and mechanism of action of selected coumarins, using human renal cell lines. *Cancer Lett*. 2002; 183: 61-68.
121. Finn GJ, Creaven BS, Egan DA. Investigation of intracellular signalling events mediating the mechanism of action of 7-hydroxycoumarin and 6-nitro-7-hydroxycoumarin in human renal cells. *Cancer Lett*. 2004; 205: 69-79.
122. Finn GJ, Creaven B, Egan DA. Study of the in vitro cytotoxic potential of natural and synthetic coumarin derivatives using human normal and neoplastic skin cell lines. *Melanoma Res*. 2001; 11: 461-467.
123. Kawaii S, Tomono Y, Ogawa K, Sugiura M, Yano M, Yoshizawa Y. The antiproliferative effect of coumarins on several cell lines. *Anticancer Res*. 2001; 21: 917-924.

124. Reyes-Chilpa R, Estrada-Muniz E, Apan TR, Amekraz B, Aumelas A, Jankowski CK, Vazquez-Torres M. Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. *Life Sci.* 2004; 75: 1635-1647.
125. Hadidi H, Zahlsen K, Idle JR, Cholerton S. A single amino acid substitution (Leu160His) in cytochrome P450 CYP2A6 causes switching from 7-hydroxylation to 3-hydroxylation of coumarin. *Food Chem Toxicol.* 1997; 35: 903-907.
126. Marshall ME, Rhoades JL, Mattingly C, Jennings CD. Coumarin (1,2-benzopyrone) enhances DR and DQ antigen expressions by peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Mol Biother.* 1991; 3: 204-206.
127. Zänker KS, Blümel G, Lange K, Siewert JR. Coumarin in melanoma patients: an experimental and clinical study. *Drugs Exptl Clin Res.* 1984; 11: 767-774.
128. Egan D, James P, Cooke D, O'Kennedy R. Studies on the cytostatic and cytotoxic effects and mode of action of 8-nitro-7-hydroxycoumarin. *Cancer Lett.* 1997; 118: 201-211.
129. Molina-Guarneros JA, Velasco-Velázquez MA, García MJ, Jiménez FA, Mendoza N, Lascrain R, Zenteno E, Mandoki JJ. Expresión de moléculas de adhesión en el melanoma metastásico murino B16-F10 y su modificación farmacológica con el empleo de cumarina. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 1997; 10: 92-99.
130. Zänker KS. The mode of entry of coumarin into cells and its effects on cell-cell communication and migration, in: R. O'Kennedy, R.D. Thornes (Eds.) *Coumarins Biology, Applications and Mode of Action*, Wiley, 1997: 125-141.
131. Bar-Ziv R, Tlusty T, Moses E, Safran SA, Bershadsky A. Pearling in cells: a clue to understanding cell shape. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 10140-10145.
132. Ingber DE. Transegrity II, How structural networks influence cellular information processing networks. *J Cell Sci.* 2003; 116: 1397-1408.
133. Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada K. Transmembrane extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2: 793-805.
134. Stupack DG, Cheresh DA. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J. Cell Sci.* 2002; 115: 3729-3738.

135. Ivaska J, Heino J. Adhesion receptors and cell invasion: mechanisms of integrin-guided degradation of extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci.* 2000; 57: 16-24.
136. Zamir E, Katz BZ, Aota S, Yamada KM, Geiger B, Kam Z. Molecular diversity of cell-matrix adhesion. *J Cell Sci.* 1999; 112: 1655-1669.
137. Schoenwaelder SM, Burridge K. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Op Cell Biol.* 1999; 11: 274-286.
138. Pawlak G, Helfmann DM. Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 2001; 11: 41-47.
139. Romanova LY, Hashimoto S, Chay KO, Blagosklonny MV, Sabe H, Mushinski JF Phosphorylation of paxillin tyrosines 31 and 118 controls polarization and motility of lymphoid cell and in PMA-sensitive. *J Cell Sci.* 2004; 117: 3759-3769.
140. Iwasaki T, Nakata A, Mukai M, Shinkai K, Yano H, Sabe H, Schaefer E, Tatsuta M, Tsujimura T, Terada N, Kakishita E, Akedo H. Involvement of phosphorylation of tyr-31 and tyr-118 of paxillin in MMI cancer cell migration. *Int J Cancer.* 2002; 97: 330-335.
141. Jenq W, Cooper D, Ramirez G. Integrin expression on cell adhesion function and up-regulation of P125FAK and paxillin in metastatic renal carcinoma cells. *Connect Tissue Res.* 1996; 34: 161-174.
142. Tremblay L, Hauck W, Aprikian AG, Begin LR, Chapdelaine A, Chevalier S. Focal adhesion kinase (pp125FAK) expression, activation and association with paxillin and p50CSK in human metastatic prostate carcinoma. *Int J Cancer.* 1996; 68: 164-171.
143. Jackson J, Young M. Protein phosphatase-2A regulates protein tyrosine phosphatase activity in Lewis lung carcinoma tumor variants. *Clin Exp Metastasis.* 2003; 20: 357-364.
144. Salgia R, Li JL, Ewaniuk DS, Wang YB, Sattler M, Chen WC, Richards W, Pisick E, Shapiro GI, Rollins BJ, Chen LB, Griffin JD, Sugarbaker DJ. Expression of the focal adhesion protein paxillin in lung cancer and its relation to cell motility. *Oncogene.* 1999; 18: 67-77.

145. Nobes CD, Hall A. Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia and filopodia. *Cell*. 1995; 81: 53-62.
146. Schmitz AP, Govek E, Böttner B, Van Aelst L. Rho GTPases: signaling, migration and invasion. *Exp Cell Res*. 2000; 261: 1-12.
147. Nobes CD, Hawkins P, Stephens L, Hall A. Activation of the small GTP-binding proteins Rho and Rac by growth factor receptors. *J Cell Sci*. 1995; 108: 225-233.
148. Yang EB, Zhao YN, Zhang K, Mack P. Daphnetin, one of coumarin derivatives, is a protein kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 260: 682-685.
149. Wang BH, Ternai B, Polya G. Specific inhibition of cyclic AMP-dependent protein kinase by warangalone and robustic acid. *Phytochemistry*. 1999; 44: 787-796.
150. Shimada S, Ogawa M, Takahashi M, Schlom J, Greiner W. Molecular Cloning and Characterization of the Complementary DNA of an Mr 110,000 Antigen Expressed by Human Gastric Carcinoma Cells and upregulated by γ -Interferon. *Cancer Res*. 1994; 54: 3831-3836.
151. Shimada S, Ogawa M, Schlom J, Greiner W. Identification of a novel tumor-associated Mr 110,000 gene product in human gastric carcinoma cells that is immunologically related to Carcinoembryonic Antigen. *Cancer Res*. 1991; 51: 5694-5703.
152. Simins A, Weighardt H, Weidner KM, Weidle UH, Holzmann B. Functional cloning of ARM-1, an adhesion-regulating molecule upregulated in metastatic tumos cells. *Clin Exp Metastasis*. 1999; 17: 641-648.

4-Hydroxycoumarin disorganizes the actin cytoskeleton in B16–F10 melanoma cells but not in B82 fibroblasts, decreasing their adhesion to extracellular matrix proteins and motility

Marco Antonio Velasco-Velázquez^{a,*}, José Agramonte-Hevia^b, Diana Barrera^c,
Alejandro Jiménez-Orozco^a, María Juana García-Mondragón^a,
Nicandro Mendoza-Patiño^a, Abraham Landa^d, Juan Mandoki^a

^aDepartamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-297, Ciudad Universitaria, México, DF 04510, Mexico

^bDepartamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-228, Ciudad Universitaria, México, DF 04510, Mexico

^cDepartamento de Biología, Facultad de Química, Edificio B, Lab. 209, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, DF 04510, Mexico

^dDepartamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-297, Ciudad Universitaria, México, DF 04510, Mexico

Received 21 January 2003; received in revised form 8 April 2003; accepted 29 April 2003

Abstract

This study determined the *in vitro* effects of 4-hydroxycoumarin (4-HC) employing the melanoma cell line B16–F10 and the non-malignant fibroblastic cell line B82. 4-HC disorganized the actin cytoskeleton in B16–F10 cells, but not in B82 fibroblasts. Cytoskeletal disorganization correlated with reductions in cell adhesion to four extracellular matrix proteins and inhibition of random motility. 4-HC did not modify cell viability or actin expression, but decreased tyrosine phosphorylation of several proteins in melanoma cells. Because adhesion of tumor cells to extracellular matrix is required during the metastatic process, 4-HC might be useful as an adjuvant therapy for melanoma.

© 2003 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: 4-Hydroxycoumarin; Actin cytoskeleton; Cell motility; Coumarin; Melanoma

1. Introduction

Tumor metastasis is the leading cause of death in cancer patients. Therapeutic strategies that

specifically diminish the invasiveness of tumor cells may lead to the development of improved adjuvant therapies against cancer. The translocation of tumor cells across extracellular matrix (ECM) barriers during the metastatic process, need the adhesion of tumor cells to other cells and/or ECM proteins [1]. Thus, cell adhesion plays a fundamental role in invasion.

* Corresponding author. Tel.: +52-55-5623-2164; fax: +52-55-5616-1489.

E-mail address: marcovelasco@correo.unam.mx (M.A. Velasco-Velázquez).

Cell adhesion and motility require crosstalk between integrins, the major adhesion receptors for ECM proteins, and the actin cytoskeleton. Binding of integrins to the ECM drives the formation of focal adhesions, which transduce signals that critically influence the organization of the cytoskeleton, as well as cell growth and gene expression [2,3]. Reciprocally, changes on the actin cytoskeleton affect the function of integrins and can affect integrin-activated signaling pathways [4]. Therefore, the actin cytoskeleton, integrins, and the molecules involved in signaling between them have been pointed as pharmacological targets for decreasing invasiveness [5–7].

Coumarin (1,2-benzopyrone), a natural compound produced as a secondary metabolite by several families of plants [8], has antitumoral activity in renal [9,10] and prostatic carcinomas [11], and prevents the recurrence of malignant melanomas [12,13]. In addition, coumarin decreases the number of metastasis in murine models of different tumors [14]. Nevertheless, the mechanism by which such effects are produced remains to be elucidated.

In vivo, coumarin has a short half-life (approximately 1 h in humans [15]) because it is rapidly metabolized into hydroxylated derivatives [16,17]. The major pathway of coumarin metabolism is 7-hydroxylation [16,17]; nevertheless, in humans, the total amount of formed 7-hydroxycoumarin shows a great inter-individual variability [18–20]. Such variability is partially attributed to the genetic polymorphism of the enzyme responsible for coumarin 7-hydroxylation in human liver: the cytochrome P450 (CYP) 2A6 [19,20]. Furthermore, other CYP 2A enzymes (like CYP 2A13) may be participating in the extrahepatic metabolism of coumarin [21] increasing the metabolic variability. Hydroxylated coumarins other than 7-hydroxycoumarin have been detected as minor metabolites In vivo [22] and in vitro [17,21]. Nevertheless, little is known about the enzymes involved in the formation of such products or their biological activity [23]. The accelerated metabolism of coumarin and the identified activities of its metabolites, have led to the proposal that the antitumoral and antimetastatic effects of coumarin are produced by its biotransformation products [24,25]. Accordingly, we analyzed the effects of 4-hydroxycoumarin (4-HC), one minor biotransformation product of coumarin [17,22], on the reorganization of the actin cytoskeleton

employing the highly invasive melanoma cell line B16–F10 and the non-malignant fibroblastic cell line B82. Our results show that 4-HC selectively disorganizes the actin cytoskeleton in B16–F10 cells, leading to a reduced adhesion to purified ECM proteins, and a decrease in cell motility. These results suggest that 4-HC might be useful to prevent metastasis and could be used as an adjuvant therapy for melanoma.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and exposure to compounds

The murine melanoma cell line B16–F10 and the murine fibroblastic cell line B82 were generously supplied by Dr Guillermo Alfaro from the Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM (Mexico). Both cell lines were routinely cultured at 37 °C and 5% CO₂ in RPMI 1640 supplemented with 10% of fetal bovine serum (RPMI/FBS). For all the experiments, cells were seeded at a density of 3×10^4 cells/cm² in RPMI/FBS. After overnight incubation, the cells were washed twice with PBS and exposed during 24 h to ethanol (vehicle for 4-HC, 0.75%), 4-HC (50, 160 or 500 μM), or cytochalasin D (5 μM) in serum-free RPMI. Ethanol, 4-HC and cytochalasin D were purchased from Sigma.

2.2. Cell viability assay

The effect on cell viability was estimated using the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay [26]. The assay is based on the reduction of the soluble tetrazolium salt by mitochondria of viable cells. The product, an insoluble colored formazan, is dissolved in dimethyl sulfoxide and measured spectrophotometrically at 570 nm. The amount of reduced formazan is proportional to the number of viable cells. The experiments for this study were performed in sextuplicate using 96-well microplates.

2.3. Morphology and F-actin content

Cells treated in labtek chambers (Nunc) were fixed with 4% formaldehyde in PBS and permeated with triton X-100 (0.1%) diluted in PBS. The polymerized

actin (F-actin) was labeled by incubating with 5 U/ml of phalloidin-Alexa 488 (Molecular Probes) 1 h at 37 °C, protected from light. After extensive washing, the slides were mounted and analyzed with an epifluorescence microscope.

2.4. Adhesion to extracellular matrix proteins

The cell adhesion assay was performed as described by Humphries [27]. Human fibronectin (5 µg/ml), human vitronectin (1 µg/ml), mouse type IV collagen (20 µg/ml) or mouse laminin (10 µg/ml) diluted in PBS, were adsorbed at 4 °C overnight on different wells of a 96-well microplate. All these molecules were obtained from Gibco BRL. Before the assay, the wells were washed, and blocked with heat-denatured bovine serum albumin (BSA fraction V from Sigma) diluted in PBS (10 mg/ml). Treated cells were detached using non-enzymatic methods, resuspended in serum-free RPMI and counted. Cells (10^4 in 100 µl medium) were added to the coated wells and allowed to adhere for 30 min at 37 °C. Non-adherent cells were removed by gently washing and the remaining cells were fixed; the number of adherent cells was quantified using crystal violet as described previously [27]. The absorbance of the solubilized dye was measured at 595 nm. Absorbance values for each experimental condition were translated into '% of adhered cells' by interpolation in a standard curve. Such curve was built by seeding different inocula, corresponding to 20–100% of 10^4 cells, directly into uncoated wells; those cells were fixed without washing, and stained with crystal violet in the same way than cells adhered to ECM proteins. Unspecific adhesion of treated cells was estimated using wells coated only with BSA. In all experiments the % of cells adhered to BSA (which was lower than 4%) was subtracted to the % cells adhered to the ECM proteins.

2.5. Cell migration (wound healing assay)

After overnight incubation in RPMI/FBS, experimental wounds were made by dragging a cell scraper across cell cultures. The cultures were then rinsed twice with PBS, and serum-free medium containing either ethanol, 4-HC, or cytochalasin D, was added. The cultures were photographed immediately ($t = 0$) and 24 h later using an inverted microscope. Two

wounds were sampled for each specimen. Assays were repeated in three independent experiments.

2.6. Analysis of protein tyrosine phosphorylation

Treated cells were collected, washed twice with ice-cold PBS and lysed in cold lysis buffer (50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, protease inhibitor cocktail, 1 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 50 mM sodium fluoride). After a 15 min incubation on ice, insoluble material was removed by centrifugation, supernatants were collected and total protein concentration quantified. Total protein (40 µg) was loaded in each lane, separated by SDS-PAGE and transblotted onto nylon membranes. Cell extracts were probed with anti-phosphotyrosine (PY) antibody (clone PY20/ Santa Cruz Biotechnology, 1:500) or anti-actin (clone C11/ Santa Cruz Biotechnology, 1:2000) and then subjected to enhanced chemiluminescence according to the manufacturer's instructions (ECL, Amersham-Pharmacia).

3. Results

Since some coumarin derivatives are cytotoxic, we evaluated the effects of 4-HC on the viability of the melanoma cell line B16-F10 and of B82 fibroblasts. 4-HC had not appreciable effect on cell viability of B16-F10 cells at the evaluated concentrations (50–500 µM). Similarly, 4-HC had no effect on the viability of B82 fibroblasts (Table 1).

Table 1
Effect of 4-hydroxycoumarin on cell viability after 24 h exposure

| [4-HC] (µM) | Cell line | |
|-------------|----------------------|------------------|
| | B16-F10 ^a | B82 ^a |
| 0 | 100.0 ± 4.61 | 100.0 ± 3.21 |
| 50 | 104.4 ± 5.71 | 107.0 ± 1.92 |
| 160 | 97.5 ± 6.32 | 110.2 ± 3.18 |
| 500 | 91.3 ± 5.88 | 109.9 ± 4.37 |

Cell viability was evaluated by MTT assay. Values (expressed as % of control) are mean ± SEM for three independent experiments.

^a Differences between treatments are not statistically significant (Bonferroni *t*-test, $\alpha = 0.05$).

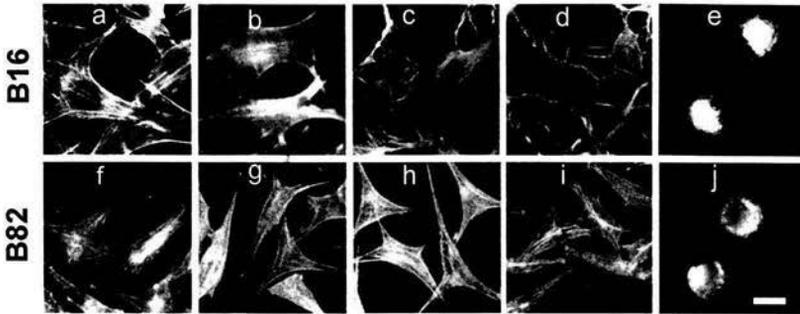


Fig. 1. Effect of 4-HC in morphology and F-actin content in B16–F10 melanoma cells and B82 fibroblasts. Representative micrographs of phalloidin-stained cells treated with vehicle (0.75% ethanol) (a, f), 50 μ M 4-HC (b, g), 160 μ M 4-HC (c, h), 500 μ M 4-HC (d, i) or 5 μ M Cytochalasin D (e, j). 4-HC induced disruption of the actin cytoskeleton and morphological changes in B16–F10 cells (a–d). Note the presence of filipodia in micrograph d, even when stress fibers or lamellipodia are absent. B82 fibroblasts were less sensitive to the effect of 4-HC (f–i). Cytochalasin D was used in both cell lines as positive control (e, j). Bar = 20 μ m.

The effects of 4-HC on the morphology and F-actin content were analyzed using B16–F10 melanoma cells and B82 fibroblasts. Both types of cells, when untreated, are polygonal, with lamellipodia and filipodia concentrated in one or a few locations on the cell periphery, and present stress fibers running along the cell. In B16–F10 cells, this morphology is disrupted by the addition of 4-HC (Fig. 1). In a concentration-dependent manner, 4-HC impaired the formation of stress fibers and of lamellipodia, and induced shrinkage of the outer envelope forming a round cell (Fig. 1a–d). Nevertheless, radial filipodia attached to adhesion points were still present in 4-HC treated cells (Fig. 1d). At the concentrations evaluated, this effect was selective for tumor cells, because 4-HC did not produce significant changes in morphology or F-actin content in B82 fibroblasts (Fig. 1f–i). Cytochalasin D, a fungal toxin that inhibits the polymerization of actin by interfering with the addition of monomeric actin units, was used as positive control. The treatment with 5 μ M (a subtoxic concentration) of cytochalasin D produced a total lack of F-actin on both cell lines (Fig. 1e and j). Fig. 2 shows cells following 24 h incubation with 500 μ M of 4-HC and a 24 h recovery period in conditioned medium with no drug. Total recovery of cell shape in B16–F10 cells occurred after removal of 4-HC.

4-HC produced a concentration-dependent reduction in the adhesion of B16–F10 cells to ECM

proteins (Fig. 3). When fibronectin or vitronectin were used as substratum, the treatment with 500 μ M of 4-HC decreased the adhesion to approximately one half of the control value. Furthermore, the same treatment reduced the adhesion to collagen type IV and laminin to one fifth and one tenth of the control value, respectively.

The effect on the horizontal motility was investigated by the wound healing assay (Fig. 4). Confluently plated B16–F10 cells were wounded and the random migration was evaluated 24 h later by the refilled wounded area. 4-HC partially (50 and 160 μ M, Fig. 4c and d) or totally (500 μ M, Fig. 4e) inhibited the migration seen in vehicle-treated cells (Fig. 4b). Cytochalasin D, which was used as positive

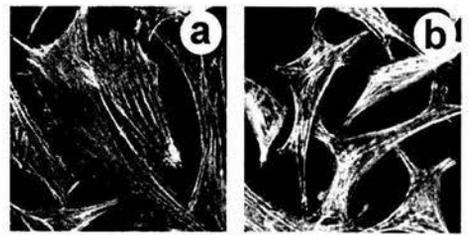


Fig. 2. Disorganization of actin cytoskeleton by 4-HC was reversible. Representative micrographs of phalloidin-stained cells treated 24 h with 500 μ M 4-HC, and then left in serum-free medium with no drug for additional 24 h. B16–F10 cells (a) recovered their normal morphology, while B82 fibroblast (b) showed no changes. Bar = 20 μ m.

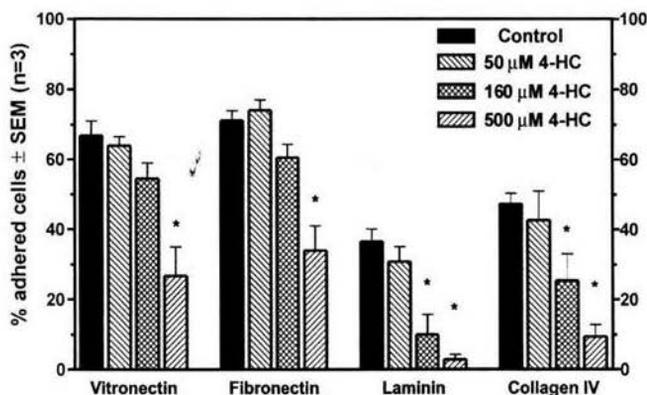


Fig. 3. Inhibition of cell adhesion to extracellular matrix proteins by 4-HC. B16–F10 cells, treated 24 h in serum-free medium, were seeded over fibronectin, vitronectin, type IV collagen or laminin. After 30 min, non-adherent cells were removed and remaining cells were quantified. Results are the means of three independent experiments performed in quadruplicate. Error bars represent SEM and asterisks (*) denote statistically significant difference ($P < 0.05$) from its corresponding control (Bonferroni *t*-test).

control, abolished the refilling of the wounded area (Fig. 4f).

Since tyrosine phosphorylation of structural and regulatory proteins is required for the integrin-cytoskeleton crosstalk, we analyzed the effect of 4-HC on protein phosphorylation. Treatment of B16-F10 cells with 4-HC decreased the tyrosine phosphorylation of several proteins in a concentration dependent manner (Fig. 5A). The major

changes on tyrosine phosphorylation were identified on proteins of 125, 70, 65 and 35 kDa (arrows in Fig. 5A). In B82 fibroblasts, 4-HC showed only a modest effect, even at 500 μM (Fig. 5B). Immunoblots for actin were performed as controls for loading and to rule out the possibility that changes in the cytoskeleton were due to changes on actin levels. Actin expression was not affected by 4-HC (lower panels of Fig. 5).

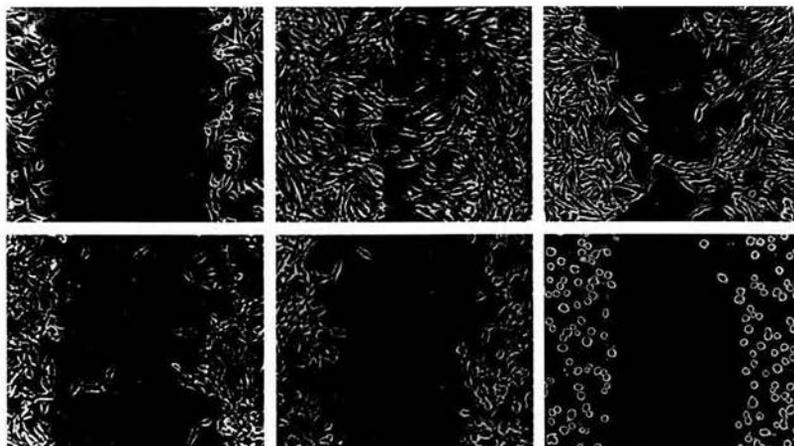


Fig. 4. 4-HC inhibited random migration of B16–F10 cells. Representative micrographs showing wounded cultures at $t = 0$ (a) or 24 h after treatment with vehicle (0.75% ethanol) (b); 50 μM 4-HC (c); 160 μM 4-HC (d); 500 μM 4-HC (e); or 5 μM cytochalasin D (f). bar = 200 μm.

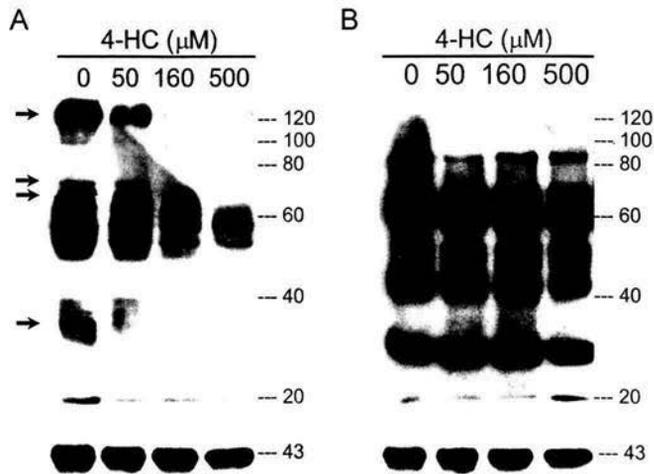


Fig. 5. Effect of 4-HC on tyrosine phosphorylation of proteins. (A) B16–F10 cells treated with 4-HC showed a concentration-dependent inhibition of tyrosine phosphorylation (upper panel). Differences in protein tyrosine phosphorylation are not associated to changes on actin expression (lower panel). (B) In B82 fibroblasts, 4-HC induced moderate changes on tyrosine phosphorylation (upper panel) and had no effect on actin expression (lower panel). Numbers to the right of the blots represent positions of molecular weight standards (kDa).

4. Discussion

Our experiments describe selective effects of 4-HC on metastatic melanoma cells on several parameters: cytoskeleton stability, adhesion to components of the ECM, motility, and phosphorylation on tyrosine residues. Various hydroxylated coumarins have anti-proliferative or cytotoxic activity in several cell lines, including B16–F10 [25,28]. Therefore, it was important to address if 4-HC had effect on cell viability. Our results (Table 1), which are consistent with those reported by Kawai et al. [29], showed that 4-HC has no cytotoxic effect in B16–F10 or B82 cells. These results suggest that the 4-hydroxylation of coumarin is not required for the cytotoxic effects of coumarins, and show that the effects of 4-HC reported in this study are not related to cell death.

4-HC affected the normal morphology of B16–F10 cells. The changes in cell shape can be explained by the cytoskeletal disorganization produced by 4-HC, as actin cytoskeleton rigidity plays a crucial role in the maintenance of cell morphology [30,31]. As seen with other hydroxylated coumarins [25,28], the effect of 4-HC was selective for tumor cells and was reversible.

The disruption of the cytoskeleton produced by 4-HC in B16–F10 cells, correlated with inhibition of cell adhesion. Integrins, the receptors for ECM proteins, activate transduction pathways that induce changes in the actin cytoskeleton [2]. The signals transduced are dependent on the types of integrins activated. Because integrins are promiscuous receptors, fibronectin and vitronectin share some of their receptors, namely integrins $\alpha v \beta 1$, $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 8$ [3,32]. Similarly, integrins $\alpha 1 \beta 1$, $\alpha 2 \beta 1$, $\alpha 3 \beta 1$ bind collagens as well as laminin [32]. Such overlapping functions of integrins can partially explain why 4-HC produced similar effects on adhesion to fibronectin or vitronectin and on adhesion to laminin or type IV collagen. Nevertheless, the reduced cell adhesion indicates that activation of integrins by the mentioned ligands is not enough to totally revert the cytoskeletal disorganization produced by 4-HC. As mentioned above, the organization of the cytoskeleton can affect the function of integrins. Efficient adhesion to ECM needs, beside integrin activation, adequate spatial organization of the cytoskeleton [4,33] and cytoskeletal contractility [31,34] for the recruitment of signaling molecules.

Organization of the cytoskeleton also can greatly determine the motility of the cells; therefore, treatment with 4-HC also inhibits the random migration of B16–F10 cells. The major metabolite of coumarin in man, 7-hydroxycoumarin, also affects motility of neoplastic cells; Lü et al. [35] reported that 7-hydroxycoumarin inhibits the migration in collagen gels of rat breast adenocarcinoma cells. However, the authors did not report changes in the actin cytoskeleton. The effects of 4-HC on cell adhesion and motility could affect the following steps of the metastatic process: (i) intravasation, (ii) extravasation, and (iii) migration through the connective tissue. Therefore, 4-HC may participate in the antimetastatic activity of coumarin, supporting the previously reported hypothesis that coumarin is a prodrug [24,25].

Members of the Rho family of GTPases, including RhoA, Rac and Cdc42, are important regulators of cytoskeletal organization. In Swiss 3T3 fibroblasts, Cdc42 governs the extensions of filopodia, Rac regulates the formation of lamellipodia, and RhoA controls the assembly of stress fibers [36]. Although a hierarchy has been established in which activated Cdc42 stimulates Rac activity and Rac stimulate Rho activation [36], during cell motility, these proteins work antagonistically in a complex way [37]. Rac and Cdc42 promote extension and adhesion of filopodia and lamellipodia on the leading edge of the cell, whereas RhoA induces retraction of the rear end [37]. The proper regulation of these GTPases need the recruitment and activation of structural and regulatory proteins, which in turn depend of their phosphorylation on tyrosine residues. Therefore, tyrosine kinases and phosphatases play a crucial role in the regulation of cell adhesion and motility [4]. For example, Nobes et al. demonstrate that RhoA activation needs an upstream tyrosine kinase [38]; consequently, treatments with tyrosine kinase inhibitors disrupt stress fibers [39].

The effect of 4-HC on protein tyrosine phosphorylation correlated with the disorganization of the cytoskeleton and the impaired adhesion and migration of B16–F10 cells. Congruously with the results of the F-actin content assays, 4-HC was less effective on B82 fibroblasts. Because other coumarins are kinase inhibitors, the mechanism responsible for the 4-HC effects may be related to inhibition of tyrosine kinases. Daphnetin (6,7-dihydroxycoumarin) produces an ATP-competitive inhibition of EGF receptor

tyrosine kinase, PKC and PKA [40]. 7-Hydroxycoumarin inhibits myosin light chain kinase, while robutic acid, another coumarin derivative, is a selective inhibitor of PKA [41]. Even when 4-HC has no significant effect on the activity of those enzymes [40,41], the possibility that 4-HC can inhibit other kinases should not be discarded. Other possible explanations are that 4-HC bind directly to cytoskeletal proteins or that activate phosphatases. Currently, we do not have evidence that support any of these possibilities. We shall investigate further the mechanism involved in the effects produced by 4-HC. Such information could lead to the development of improved adjuvant therapies for melanoma.

Acknowledgements

We thank the technical help provided by Dr Juan Molina-Guarneros. This research was supported by Conacyt (125266), PAEP-UNAM (102371) and PAPIIT-UNAM (IN230202).

References

- [1] E.C. Woodhouse, R.F. Chuaqui, L.A. Liotta, General mechanisms of metastasis, *Cancer* 80 (Suppl.) (1997) 1529–1537.
- [2] B. Geiger, A. Bershadsky, R. Pankov, K. Yamada, Transmembrane extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2 (2001) 793–805.
- [3] D.G. Stupack, D.A. Cheresh, Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival, *J. Cell Sci.* 115 (2002) 3729–3738.
- [4] S.M. Schoenwaelder, K. Burridge, Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins, *Curr. Opin. Cell. Biol.* 11 (1999) 274–286.
- [5] M.A. Jordan, L. Wilson, Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy, *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10 (1998) 123–130.
- [6] E. Ruoslahti, Integrins as signaling molecules and targets for tumor therapy, *Kidney Int.* 51 (1997) 1413–1417.
- [7] M.A. Velasco-Velázquez, J.A. Molina-Guarneros, N. Mendoza-Patiño, J.S. López-González, J.J. Mandoki, Integrinas y moléculas asociadas a integrinas: blancos para el desarrollo de terapias antimetastásicas, *Rev. Invest. Clin.* 51 (1999) 183–193.
- [8] J.G. Keating, R. O’Kennedy, The chemistry and occurrence of coumarins, in: R. O’Kennedy, R.D. Thorne (Eds.), *Coumarins Biology, Applications and Mode of Action*, Wiley, New York, 1997, pp. 23–26.
- [9] M.E. Marshall, K. Butler, A. Fried, Phase I evaluation of coumarin (1,2-benzopyrone) and cimetidine in patients with advanced malignancies, *Mol. Biother.* 3 (1991) 170–178.

- [10] O. Kokron, S. Maca, G. Gasser, P.R. Schmidt, Cimetidine and coumarin therapy of renal-cell carcinoma, *Oncology* 48 (1991) 102–126.
- [11] J.L. Mohler, B.T. Williams, I.M. Thompson, M.E. Marshall, Coumarin (1,2-benzopyrone) for the treatment of prostatic carcinoma, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 120 (1994) 35–38.
- [12] K.S. Zänker, G. Blümel, J. Lange, J.R. Siewert, Coumarin in melanoma patients: an experimental and clinical study, *Drugs Exp. Clin. Res.* 10 (1984) 767–774.
- [13] R.D. Thomes, L. Daly, G. Lynch, B. Breslin, H. Browne, H.Y. Browne, et al., Treatment with coumarin to prevent or delay recurrence of malignant melanoma, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 120 (Suppl.) (1994) 32–34.
- [14] B. Maat, P. Hilgard, Anticoagulants and experimental metastases. Evaluation of antimetastatic effects in different model systems, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 101 (1981) 275–283.
- [15] W.A. Ritschel, M.E. Brady, H.L.S. Tan, K.A. Hoffmann, I.M. Yiu, K.W. Grummich, Pharmacokinetics of coumarin and its 7-hydroxy-metabolites upon intravenous and peroral administration of coumarin in man, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 12 (1977) 457–461.
- [16] O. Pelkonen, H. Raunio, A. Rautio, M. Pasanen, The metabolism of coumarin, in: R. O'Kennedy, R.D. Thomes (Eds.), *Coumarins Biology, Applications and Mode of Action*, Wiley, New York, 1997, pp. 67–92.
- [17] B.G. Lake, Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment, *Food Chem. Toxicol.* 37 (1999) 423–453.
- [18] A. Rautio, H. Kraul, A. Kojo, E. Salmela, O. Pelkonen, Interindividual variability of coumarin 7-hydroxylation in healthy volunteers, *Pharmacogenetics* 2 (1992) 227–233.
- [19] P. Ujjin, S. Satarug, Y. Vanavanitkun, S. Daigo, N. Ariyoshi, H. Yamazaki, P.E.B. Reilly, et al., Variation in coumarin 7-hydroxylase activity associated with genetic polymorphism of cytochrome P450 2A6 and the body status of iron stores in adult Thai males and females, *Pharmacogenetics* 12 (2002) 241–249.
- [20] C. Xu, Y. Rao, B. Xu, E. Hoffmann, J. Jones, E.M. Sellers, R.F. Tyndale, An in vivo pilot study characterizing the new CYP2A6*7, *8, and *10 alleles, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290 (2002) 318–324.
- [21] L.B. von Weyarn, S.E. Murphy, CYP2A13-catalysed coumarin metabolism: comparison with CYP2A5 and CYP2A6, *Xenobiotica* 33 (2003) 73–81.
- [22] W.H. Shilling, F.R. Crampton, R.C. Longland, Metabolism of coumarin in man, *Nature* 221 (1969) 664–665.
- [23] L.B. von Weyarn, S.E. Murphy, Coumarin metabolism by rat esophageal microsomes and cytochrome P450 2A3, *Chem. Res. Toxicol.* 14 (2001) 1386–1392.
- [24] D. Egan, R. O'Kennedy, E. Moran, D. Cox, E. Prosser, R.D. Thomes, The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarin-related compounds, *Drug Metab. Rev.* 22 (1990) 503–529.
- [25] F.A. Jiménez-Orozco, J.A. Molina-Guarneros, N. Mendoza-Patiño, F. León-Cedeño, B. Flores-Pérez, E. Santos-Santos, J.J. Mandoki, Cytostatic activity of coumarin metabolites and derivatives in the B16–F10 murine cell line, *Melanoma Res.* 9 (1999) 242–247.
- [26] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferative and cytotoxic assays, *J. Immunol. Meth.* 65 (1983) 55–63.
- [27] M.J. Humphries, Cell adhesion assays, *Meth. Mol. Biol.* 139 (2000) 279–285.
- [28] G.J. Finn, B. Creaven, D.A. Egan, Study of the in vitro cytotoxic potential of natural and synthetic coumarin derivatives using human normal and neoplastic skin cell lines, *Melanoma Res.* 11 (2001) 461–467.
- [29] S. Kawaii, Y. Tomono, K. Ogawa, M. Sugiura, M. Yano, Y. Yoshizawa, The antiproliferative effect of coumarins on several cell lines, *Anticancer Res.* 21 (2001) 917–924.
- [30] R. Bar-Ziv, T. Tlusty, E. Moses, S.A. Safran, A. Bershadsky, Pearling in cells: a clue to understanding cell shape, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96 (1999) 10140–10145.
- [31] D.E. Ingber, Transegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks, *J. Cell Sci.* 116 (2003) 1397–1408.
- [32] J. Ivaska, J. Heino, Adhesion receptors and cell invasion: mechanisms of integrin-guided degradation of extracellular matrix, *Cell. Mol. Life Sci.* 57 (2000) 16–24.
- [33] G. Pawlak, D.M. Helfmann, Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11 (2001) 41–47.
- [34] E. Zamir, B. Kats, S. Aota, K. Yamada, B. Geiger, Z. Kam, Molecular diversity of cell-matrix adhesion, *J. Cell Sci.* 112 (1999) 1655–1669.
- [35] H.Q. Lü, B. Niggemann, K.S. Zänker, Suppression of the proliferation and migration of oncogenic ras-dependent cell lines, cultured in a three-dimensional collagen matrix, by flavonoid structured molecules, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 122 (1996) 335–342.
- [36] C.D. Nobes, A. Hall, Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia and filopodia, *Cell* 81 (1995) 53–62.
- [37] A.A.P. Schmitz, E. Govek, B. Böttner, L. Van Aelst, Rho GTPases: signaling, migration and invasion, *Expt. Cell Res.* 261 (2000) 1–12.
- [38] C.D. Nobes, P. Hawkins, L. Stephens, A. Hall, Activation of the small GTP-binding proteins Rho and Rac by growth factor receptors, *J. Cell Sci.* 108 (1995) 225–233.
- [39] K. Burridge, M. Chrzanowska-Wodnicka, Focal adhesions, contractility and signaling, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12 (1996) 463–519.
- [40] E.B. Yang, Y.N. Zhao, K. Zhang, P. Mack, Daphnetin, one of coumarin derivatives, is a protein kinase inhibitor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260 (1999) 682–685.
- [41] B.H. Wang, B. Ternai, G. Polya, Specific inhibition of cyclic AMP-dependent protein kinase by warangalone and robustic acid, *Phytochemistry* 44 (1999) 787–796.