



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE DAFNETINA
EN CICLO CELULAR DE LA LÍNEA CELULAR DE
ADENOCARCINOMA MAMARIO HUMANO MCF-7”**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA
VIOLETA LARIOS SERRATO



MÉXICO, D. F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado

Presidente:	Prof. Juan José Mandoki Weizner.
Secretario:	Prof. Fausto Alejandro Jiménez Orozco.
Vocal:	Profra. Alicia Beatriz Cervantes Peredo.
1er. suplente:	Profra. Elia Brosla Naranjo Rodríguez.
2do. suplente:	Prof. Felipe Cruz García.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de farmacología celular bajo la dirección del Dr. Fausto Alejandro Jiménez Orozco Profesor Asociado "C" T. C., del Departamento de Farmacología, de la Facultad de Medicina de la UNAM; en el laboratorio de Cáncer Pulmonar, del Departamento de Enfermedades Crónico Degenerativas del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), en colaboración con el del Dr. José Sullivan López González.

Con el financiamiento de la siguiente instancia: la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (DGAPA) a través del proyecto PAPIIT UNAM, clave: IN246202-2.

Dr. Fausto Alejandro Jiménez Orozco
Tutor

Violeta Larios Serrato
Sustentante

A mis padres.

Matilde Serrato Acevedo.

José María Larios Pérez.

Por darme alas para volar, por su amor, por darme vida y la filosofía para vivirla plenamente.

A mis hermanas, hermano y sobrino.

Paloma Larios Serrato.

Sofía Larios Serrato.

José María Larios Serrato.

Diego Aldebarán Moreno Larios.

Maya Larios Serrato.

Por ser mis cómplices en esta vida y sacar lo mejor de mi.

A mi hija.

Xanat Victoria Muñoz Larios.

Por ser mi luz y mis pies en este camino.

A mi esposo.

Juan José Muñoz César.

Por ser el amor de mi vida.

A mi Asesor.

Al Dr. Fausto Alejandro Jiménez Orozco por sus enseñanzas, su amistad, su apoyo y su enorme paciencia.

A mis amigos.

Mario y Alejandra por su compañía en la escuela.

A los integrantes del laboratorio de farmacología celular por formar parte de mi tan agradable estancia: Juanita, Amelia, Estelita, Dra. Diana, Lilian, Beti, Ana y Gaby.

Al Dr. Nicandro Mendoza Patiño y al Dr. Juan José Mandoki Weitzner, por haber permitido la realización de este trabajo.

ÍNDICE

1	Introducción.....	1
1.1	Cáncer.....	1
1.1.1	Cáncer de mama.....	2
1.2	Tratamiento del cáncer de mama y quimioterapia.....	4
1.3	Ciclina D1.....	6
1.3.1	Ciclina D1 y transición de la fase G1 a la fase S (vía pRB).....	7
1.3.2	Funciones de la ciclina D1.....	9
1.3.3	Degradación de la ciclina D1.....	10
1.3.4	Anormalidades de la ciclina D1 y cáncer de mama.....	11
1.4	Aspectos generales de las cumarinas.....	13
1.4.1	Actividad antiproliferativa de algunos compuestos cumarínicos y sensibilidad de líneas celulares.....	13
1.4.2	Esculetina.....	14
1.4.3	Dafnetina.....	15
1.5	Etopósido.....	16
2	Justificación.....	18
2.1	Hipótesis.....	19
2.2	Objetivos generales.....	19
2.3	Objetivos particulares.....	19
3	Material y métodos.....	20
3.1	Reactivos.....	20
3.2	Anticuerpos.....	20
3.3	Línea celular de adenocarcinoma mamario MCF-7.....	20
3.4	Medio y condiciones de cultivo.....	20
3.5	Ensayos de asociación de fármacos.....	21
3.5.1	Ensayos de MTT.....	21
3.5.2	Condiciones experimentales.....	22
3.5.3	Diseño experimental.....	22
3.6	Análisis del ciclo celular por citometría de flujo.....	23
3.6.1	Condiciones experimentales.....	23
3.6.2	Procedimiento del análisis	23
3.7	Análisis de ciclinas por inmunotransferencia Western.....	24
3.7.1	Condiciones experimentales.....	24
3.7.2	Inmunotransferencia Western para ciclinas.....	24
3.8	Análisis de pRB por inmunotransferencia Western.....	25
4	Resultados.....	26
4.1	Exposición individual a fármacos.....	26
4.2	Exposición simultánea a etopósido y dafnetina.....	26
4.3	Exposición secuencial a etopósido y dafnetina.....	27
4.4	Efecto de la dafnetina en la expresión de ciclinas en células MCF-7.....	28
4.5	Efecto de la dafnetina en las formas fosforiladas de pRB en células MCF-7.....	28
4.6	Efecto en el ciclo celular estimado por citometría de flujo.....	29

4.6.1 Histogramas de ADN en la línea celular MCF-7.....	30
5 Resumen de resultados y discusión.....	31
5.1 Exposiciones a etopósido y dafnetina.....	31
5.2 Efecto de la esculetina y dafnetina en la expresión de ciclinas y la fosforilación de pRB	32
5.3 Efecto de la dafnetina en las fases del ciclo celular.....	33
6 Conclusiones.....	34
7 Perspectivas futuras de este trabajo.....	35
8 Referencias.....	36
Anexo A. Ciclo celular.....	42
A.1 Ciclo celular.....	42
A.1.1 Control del ciclo celular.....	43
A.1.2 Puntos de control.....	44
Anexo B. Funciones transcripcionales de la ciclina D1.....	45
Anexo C. Reactivos y soluciones.....	47

1 INTRODUCCIÓN

1.1 CÁNCER

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, y en México es la tercera causa de mortalidad en la población general, después de las enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus. Este padecimiento agrupa varios tipos de cáncer que se caracterizan por la formación de tumores malignos (INEGI).

El desarrollo del cáncer es un proceso complejo y multifactorial que implica la acumulación progresiva de mutaciones en el ADN que inducen inestabilidad genómica. Las mutaciones pueden ser heredadas o adquiridas debido a varios factores, como son: las radiaciones ionizantes, la acción hormonal, carcinógenos y virus. Por lo tanto, las características malignas se manifiestan en grados variables a medida que se desarrolla el padecimiento. Las mutaciones pueden producir proteínas alteradas que ganan o pierden funciones, como:

- La activación de protooncogenes a oncogenes.
- Inactivación o pérdida de genes supresores de tumores.
- Defectos en la apoptosis.
- Defectos en la maquinaria de reparación celular.

Otras causas genéticas que contribuyen a la malignización celular son: (i) Amplificación genética: puede ocurrir cuando se replica varias veces un mismo gen, ya sea como copias cromosómicas secuencialmente repetidas o como partículas extra cromosómicas. Este fenómeno puede dar lugar a la sobre-expresión de oncogenes. (ii) Rearreglos cromosómicos: involucra variaciones en la estructura y en la ordenación de los cromosomas, por ejemplo translocaciones e inversiones. Esto da lugar a que un oncogen pueda ser transcrito inapropiadamente cuando se encuentra bajo control de una secuencia reguladora extraña. (iii) Mutaciones en la región promotora del gen y pérdida del control de su transcripción (Alberts et al., 2002).

Como consecuencia de todas las alteraciones arriba mencionadas, las células malignizadas adquieren progresivamente las siguientes características:

- Desregulación de las vías de señalización celular.
- Proliferación desregulada, debido a anormalidades del ciclo celular y la apoptosis.
- Invasividad a tejidos adyacentes.
- Metástasis, las cuales son tumores secundarios originados por células que se han liberado desde el tumor inicial o primario y que han alcanzado otras localizaciones.

En el anexo 1 se presenta una breve revisión de la progresión del ciclo celular, así como algunas de las proteínas cuyas anormalidades redundan en la proliferación desregulada y en la malignización.

1.1.1 CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama se encuentra situado en los primeros tres lugares de mortalidad en mujeres entre 25 y 54 años. En el 2005 se incremento la mortalidad por cáncer de mama, de 3500 a 3600 defunciones por año. Además, en el país se registraron 11,288 casos nuevos de cáncer de mama en el año 2005 (IMSS, boletín 066 2006).

En México en el 2005 destaca, que pese a haberse estabilizado en los últimos cinco años, el número de muertes por cáncer de mama igualó ya la cifra de decesos por el cérvico uterino (más de diez cada día) y se prevé que en los próximos cinco años asumirá plenamente su posición como el cáncer más frecuente entre las mujeres (Instituto Nacional de Salud Pública, página web). Se ha reportado que el tiempo de sobrevivencia en pacientes de cáncer de mama es de 13.5 años (Hoening et al., 2006).

Entre los factores de riesgo para esta enfermedad están no haber tenido embarazos, que la primera gestación a término (nueve meses promedio) sea después de los 30 años de edad, no haber amamantado, haber iniciado la menstruación antes de los 11 años y la menopausia después de los 50 años, y presentar obesidad (IMSS boletín 066, 2006).

El cáncer de mama es una afección en la cual se forman células malignas en los tejidos de la mama. El tipo más común de cáncer de mama es el carcinoma ductal (80% de los casos), seguido por el carcinoma lobular (10-15%) (National Cancer Institute, página web). Se han identificado diversos genes que presentan anomalías y cuyos productos proteicos participan en la patología del cáncer de mama. En la tabla 1.1 se muestran las principales anomalías que se presentan en los genes y proteínas en el desarrollo del cáncer de mama.

Tabla 1.1. Anomalías en el cáncer de mama.

Genes	Función de la proteína.	Anormalidad	Referencia
<i>BCRA1</i>	Reparación de ADN.	Deleciones. Mutaciones puntuales.	Hedenfalk et al., 2001
<i>BCRA2</i>	Reparación de ADN.	Deleciones. Mutaciones puntuales.	Hedenfalk et al., 2001
<i>P27</i>	p27 es un inhibidor del complejo ciclina E/CDK2.	Decremento de la proteína.	Traub et al., 2006
<i>TP53</i>	p53 es un supresor de tumores, causa arresto celular o apoptosis.	Mutación.	Hortobagyi et al., 1998
<i>BCL2</i>	Bloquea liberación de citocromo c de la mitocondria. Promueve la apoptosis a través de la activación de procaspasa.	Mutación.	Hortobagyi et al., 1998
<i>MYC</i>	c-myc estimula el crecimiento celular y la proliferación.	Mutación. Amplificación del gen. Sobreexpresión de la proteína.	Hortobagyi et al., 1998 Alberts et al., 2002
<i>PTEN</i>	Fosfatasa del fosfatidil inositol Inhibe crecimiento.	Mutación.	Gutmacher et al., 2003 Alberts et al. 2002
<i>CHEK2</i>	Reconoce y repara ADN dañado.	Delección. (1100 del C)	Gutmacher et al. 2003
<i>ATM</i>	Reparación de ADN.	Mutación.	Gutmacher et al., 2003
<i>HER2</i>	Receptor tirosina cinasa, relacionado con el receptor EGF	Amplificación. Sobreexpresión de la proteína.	Hortobagyi et al., 1998
<i>CCND1</i>	Ciclina D1 forma complejo con CDK4 estimulando la progresión del ciclo celular.	Amplificación del gen. Sobreexpresión de la proteína.	Hortobagyi et al., 1998
<i>CCNE1</i>	Ciclina E forma complejo con CDK2 estimulando la progresión del ciclo celular.	Sobreexpresión de la proteína.	Kim et al., 2001

1.2 TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA Y QUIMIOTERAPIA

Los métodos más empleados en el tratamiento del cáncer de mama son: resección quirúrgica, radioterapia, hormonoterapia y la quimioterapia. El uso de cada uno de ellos depende del estadio, tipo de tumor y de la resistencia que el tumor presente a los tratamientos (Rang et al., 2003).

Para poder dirigir el tratamiento se deben identificar inmunohistoquímicamente marcadores biológicos con el fin de obtener la mejor respuesta antineoplásica, los marcadores biológicos determinados son: receptores de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR), la proteína del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico (Her-2), la proteína supresora de tumores p53, y el antígeno Ki-67 que identifica las células proliferantes dentro de un tumor (Learn et al., 2005).

Los estrógenos han sido implicados como el mayor factor etiológico en el proceso tumorigénico del cáncer de mama. Del total de las pacientes diagnosticadas con cáncer de mama, del 60 al 70% son positivas para receptores hormonales. La mitad de los tumores con receptor de estrógenos α positivos, no responden a la terapia antiestrogénica, lo que sugiere una resistencia al tratamiento y la importancia de utilizar otros compuestos antiestrogénicos (Butt et al., 2005).

La quimioterapia se aplica; si el tumor no presenta receptores hormonales, tiene gran volumen tumoral, hay enfermedad visceral y si el crecimiento tumoral es rápido (NOM - 041-SSA2-2002). Este procedimiento puede ser utilizado individualmente o como complemento adyuvante de otras formas de tratamiento. Para incrementar la eficacia de la quimioterapia se emplean fármacos en forma combinada que actúan en distintas fases del ciclo celular para disminuir el riesgo a la resistencia de los tumores al tratamiento (Johnson et al., 1999).

Después de la quimioterapia inicial las células tumorales pueden desarrollar distintos tipos de resistencia, lo que restringe la eficacia de los tratamientos. Además, la acción de varios de los agentes antineoplásicos es poco selectiva y dañan a las células sanas que se encuentran en proliferación (Shah et al., 2001), por lo que se busca desarrollar agentes con mayor selectividad.

En la tabla 1.2 se muestran los agentes antineoplásicos que se emplean actualmente en el tratamiento del cáncer de mama.

Tabla 1.2. Agentes utilizados en el tratamiento de cáncer de mama. (Bruton et al., 2006).

Categoría	Agentes	Mecanismo de acción	Efecto en el ciclo celular
Alquilantes	Ciclofosfamida	Formar enlaces covalentes con el ADN.	Arresto en S
	Melfalan		Arresto en S
Antimetabolitos	5-Fluorouracilo	Inhibidor de la síntesis de ADN, compite por las enzimas que sintetizan timidina 5' - monofosfatasa.	Arresto en S
	Metotrexato	Antagonista del ácido fólico.	Arresto en S
Alcaloides vegetales	Vinblastina (Alcaloide de la vinca)	Se unen a la tubulina impidiendo su polimerización a microtúbulos, lo que impide la formación del uso mitótico.	Arresto en M
	Paclitaxel (Taxanos)		Arresto en M
	Etopósido (Epidofilotoxinas)		Arresto en S
Hormonales	Tamoxifeno	Inhibidor del receptor de estrógenos.	
	Aminoglutetimida	Inhibidor de la aromatasa.	
Diversos	Trastuzumab	Anticuerpo monoclonal contra la proteína Her-2.	Arresto en G ₂ /M
	Doxorubicina	Agente intercalante del ADN e inhibidor de la topoisomerasa II.	Arresto en S

1.3 CICLINA D1

Las ciclinas del tipo D (D1, D2, D3) son las primeras que se sintetizan al inicio de la fase temprana de G₁ en respuesta a señales mitogénicas, por lo que estas ciclinas funcionan como sensores de señales extracelulares (Hanahan et al., 2000). Una célula inicia su ciclo cuando factores de crecimiento, hormonas y otras señales se unen a sus receptores y activan a proteínas transductoras como Ras (Guille H et al., 1999).

La proteína Ras transduce la señal al núcleo activando varios genes necesarios para la proliferación, entre los que se encuentran las ciclinas tipo D (Ewen et al., 2000). Las vías activadas por Ras mejor descritas son: RAF/MEK/MAPK, RHO/ RAC y PI3K/AKT/PKB (figura 1.1) (Ewen et al., 2000; Sahai et al., 2002).

Las ciclinas D2 y D3 se expresan en células del sistema hematopoyético, mientras que la ciclina D1 se expresa en células dependientes de adhesión (Ajchenbaun et al., 1993). De los genes que codifican para estas ciclinas, el gen de la ciclina D1 (*CCND1*; antes conocido como *BCL-1* o *PRAD1*), que se localiza en el cromosoma humano 11q13, es el más conocido y estudiado (Motukura et al., 1991; Xiong et al., 1991).

El gen *CCND1* tiene sitios de unión para varios factores de transcripción como la proteína activadora-1 (AP1), ets-2, el transductor de señales y activador de la transcripción 3 (STAT3), factor nuclear κ B (NF κ B), la proteína de unión a CCAAT (CREBP) (Amanatullah et al. 2001); factores de crecimiento epidermal (EGF) y factores de crecimiento pseudoinsulínico (IGF-I y IGF-II), además de la activación de vías como c-MYC, MAPK y PI-3 (Butt et al., 2005). Otras señales que inducen la expresión de la ciclina D1 son la estimulación de integrinas, β catenina (Tetsu et al., 1999) y los receptores de estrógenos (Foster et al., 2001).

La ciclina D1 se sobre-expresa en el cáncer de mama. La ciclina D1 activa el receptor de estrógenos mediante transcripción en forma independiente de CDKs y en ausencia de

estrógenos. Se ha reportados que el receptor de estrógenos α ($ER\alpha$) induce su expresión, mientras que por medio de $ER\beta$ se inhibe su expresión (Liu et al., 2002).

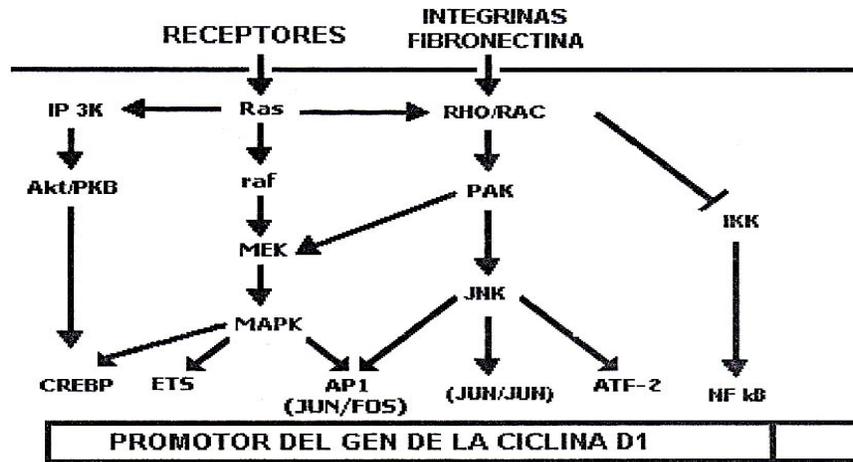


Figura 1.1. Principales vías de señalización que regulan al promotor del gen de la ciclina D1 a través de receptores y de moléculas de adhesión. Fosfatidil inositol 3 cinasa (IP 3K); proteína cinasa B (AKT/ PKB); proteína de unión a elemento de respuesta a AMP cíclico (CREBP); cinasa de N-terminal de c-Jun (JNK), cinasa de proteínas de activación mitogénica (MAPK); cinasa de cinasa de integrinas (IKK); proteína de activación 1(AP1); factor de activación transcripcional 2(ATF-2); factor nuclear κ B(NF κ B). (Jiménez-Orozco FA, 2003).

1.3.1 CICLINA D1 Y TRANSICIÓN DE LA FASE G_1 A LA FASE S (VÍA pRB)

Las células que no proliferan se encuentran en la fase G_0 y cuando entra a la fase G_1 se inicia la proliferación. El inicio del ciclo celular y la progresión a través de la fase G_1 se regula por un sistema de control que se conoce como punto de restricción o “vía de la proteína RB” (p16-ciclinas D-CDK4/6-pRB-E2F). Para que la célula inicie el ciclo, requiere de un contexto celular favorable y de señales mitogénicas que induzcan la expresión de la ciclina D1 y active a CDK4.

El complejo “ciclina D1/ CDK4” fosforila a la familia de las proteínas de bolsillo (*pocket protein*), entre las que se encuentran pRB (proteína del retinoblastoma), p107 y p130. En la fase G_1 temprana del ciclo, estas proteínas se encuentran hipofosforiladas (forma activa) y

regulan negativamente la progresión del ciclo en la fase G₁ a través del secuestro del factor transcripcional E2F (Jonson et al., 1999; Mittnacht et al., 2005).

La fosforilación de pRB en G₁ por los complejos ciclina D/CDK4 constituye el paso crucial que permite la proliferación celular, ya que libera a los factores E2F. Las proteínas de la familia E2F (E2F 1-5) son factores de transcripción que forman heterodímeros con las proteínas DP (DP 1-3) y activan la transcripción de un banco de genes cuyos productos proteicos regulan el ciclo celular y participan en la síntesis de ADN (figura 1.2) (Mittnacht et al., 2005).

Una vez que se liberan los factores E2F, permitiendo la síntesis de las proteínas dependientes de estos factores, y así, la consecuente progresión del ciclo celular a la fase S. Algunas de las proteínas que se sintetizan en respuesta a los factores E2F son las ciclinas E y A, CDK1, dihidrofolato-reductasa, timidina cinasa, entre otros (Kaelin et al., 1999).

En tumores humanos donde pRB está mutada o no se encuentra, pRB no se fosforila y pierde la capacidad de suprimir la proliferación celular, esta mutación produce anomalías en el punto de restricción, por lo que las células continúan su progresión a la fase S en forma descontrolada (Bartek et al., 2001, Mittnacht et al., 2005). El complejo ciclina E/CDK2 también fosforila a pRB al final de la fase G₁ y durante la fase S del ciclo celular.

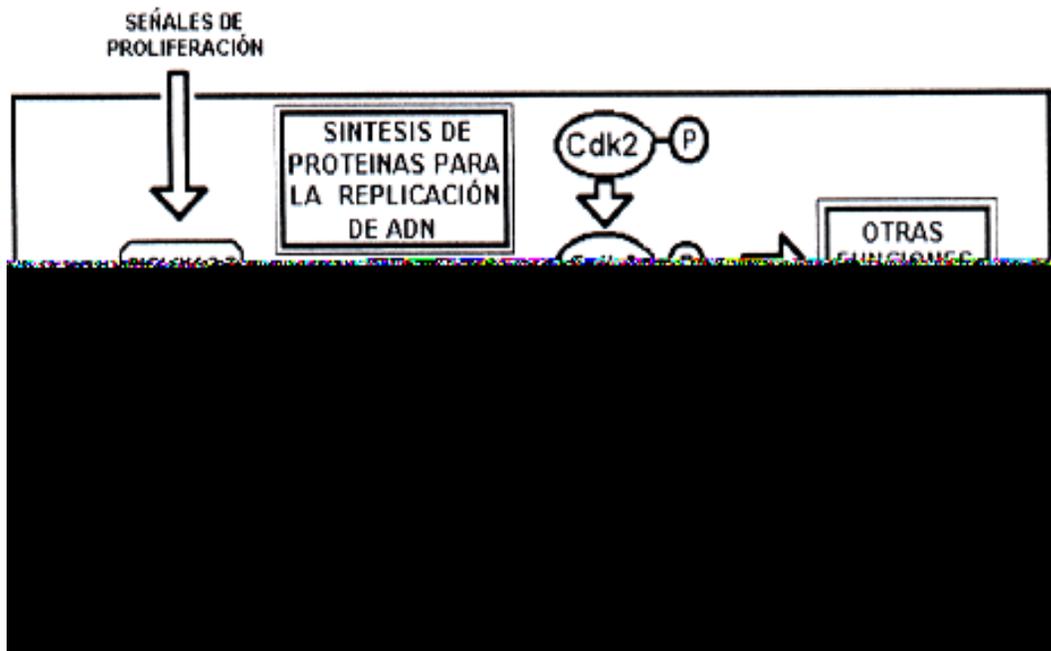


Figura 1.2. Transcripción secuencial de los genes de las ciclinas D, E y A.
(Jiménez-Orozco FA, 2003).

1.3.2 FUNCIONES DE LA CICLINA D1

Además de sus acciones en la progresión del ciclo celular, la ciclina D1 tiene otras funciones biológicas como las siguientes: (i) migración y adhesión celular de macrófagos (Neumeister et al., 2003), (ii) apoptosis, (iii) regeneración neuronal, (iv) ayudar a secuestrar a p27 (Tong et al., 2001), (v) tiene funciones metabólicas mitocondriales, (vi) inhibe 2 productos génicos [CREBP- β y PPAR γ (receptor proliferador del peroxisoma)] que intervienen en la ruta de diferenciación de adipositos (Wang et al., 2003), (vii) regula la función de acetilasas y desacetilasas de histona para modular la estructura local de la cromatina de los genes que están implicados en la regulación de la proliferación celular y la diferenciación (Wang et al., 2004) y (viii) regulación positiva del receptor de estrógenos α (Lamb et al., 2000). En los últimos años se han observado un gran número de interacciones entre la ciclina D1 y otras proteínas, algunas de estas interacciones se pueden observar en la tabla 1.3 (se amplía la información de esta tabla en el anexo B) (Sutherland et al., 2004).

Tabla 1. 3. Funciones transcripcionales de la ciclina D1. (Sutherland et al., 2004).

Proteína	Función
CDK4/6	Progresión en ciclo celular.
CDK2	Progresión en ciclo celular.
ER, C/EBP β	Activación transcripcional.
AR, Beta2/neuro D, DMP1, Myb, MyoD, SP1, STAT3, TR	Represión transcripcional.
AIB-1, GRIP-1, SRC1a	Coactivación.
CBP/p300, P/CAF	Remodelación de cromatina.
TAF _{II} 250	Formación del complejo de iniciación y recluta a la ARN polimerasa II.

1.3.3 DEGRADACIÓN DE LA CICLINA D1

La ciclina D1 al igual que las otras ciclinas, se degradan a través de poliubiquitinación por la vía del proteosoma. En todas las ciclinas se ha localizado una secuencia señal (caja de destrucción) formada por 9 aminoácidos (RAALGNISN) que se encuentra presente entre los residuos 13 y 66 de la proteína. Para la poliubiquitinación del complejo ciclina D1/CDK4 se requiere de la fosforilación en treonina 286 por glucógeno sintasa cinasa 3 β (GSK-3 β) (Diehl et al., 1998). La ciclina ya fosforilada, es reconocida en la caja de destrucción por el complejo SCF (Skp - Cullin - F box), que tiene actividad de ligasa ubiquitina y está activo durante todo el ciclo celular (Rusell et al., 1999). Este complejo se encarga de la degradación de diversas proteínas, como los inhibidores de CDKs (p21, p27, Sic1), las ciclinas D y la ciclina E. La unión de la ubiquitina al sustrato (la ciclina) requiere de una serie de pasos catalizados por tres enzimas: primero se produce la activación de la ubiquitina por la enzima E1, seguidamente la enzima E2 (proteína transportadora de ubiquitina) se encarga de transferir la ubiquitina activada desde E1 hasta el sustrato que está ligado a la enzima E3 (ubiquitina-proteína ligasa) este proceso se puede observar en la figura 1.3 (Alberts et al., 2002).

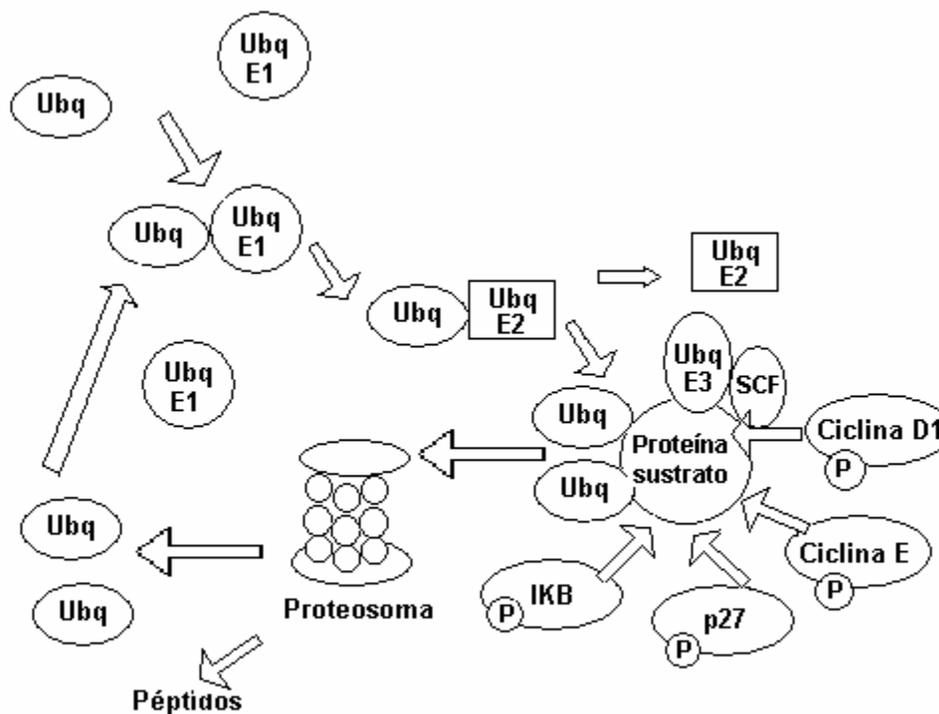


Figura 1.3. Vía de degradación de ciclinas G₁ por vía del proteosoma.

En el caso de las ciclinas A y B, que participan en fase G₂ y M, son degradadas por un complejo distinto, llamado APC (anafase promoting complex) que también tienen actividad de ligasa de ubiquitina (den Elzen et al. 2001). Todas las ciclinas fosforiladas y ubiquitinadas van al proteosoma para su degradación. El proteosoma 26S es un complejo multicatalítico constituido por el proteosoma 20S y dos subunidades 19S. El proteosoma 20S tiene una estructura cilíndrica compuesta por numerosas subunidades de bajo peso molecular ensambladas en cuatro anillos. Cada subunidad 19S contiene cinco ATPasas diferentes y un sitio de unión para las cadenas de ubiquitina (Alberts et al., 2002).

1.3.4 ANORMALIDADES DE LA CICLINA D1 Y CÁNCER DE MAMA

Aproximadamente la mitad de los carcinomas mamarios sobre-expresan la ciclina D1 (Bartkova et al., 1994), así como todos los carcinomas lobulares y ductales con receptor de estrógenos positivo (Zwijssen et al., 1997). Se ha sugerido que la ciclina D1 puede ser un marcador pronóstico (Caputi et al., 1999) y su inhibición se ha propuesto como un blanco farmacológico y terapéutico para el desarrollo de nuevos agentes antitumorales (Q Yu et al., 2001; Hardcastle et al., 2002).

La sobre-expresión de la ciclina D1 puede ocurrir debido a anomalías genéticas, mecanismos transcripcionales y postranscripcionales, como los siguientes:

- Amplificación del gen *CCND1* en un 13-20 % (Courjal et al., 1997).
- Estabilización del ARN mensajero de la ciclina D1 (Lebwohl et al., 1994).
- Anormalidades de las vías de señalización que regulan la transcripción del gen *CCND1* (descritas en el inciso 1.3.1 y en la figura 1.1).
- Disminución de la degradación de la ciclina D1 (Russell et al., 1999).

Se han reportado isoformas de la Ciclina D1 cuya degradación es menor. Una señal para la degradación de la ciclina D es su fosforilación en el residuo de treonina 286 (Thr286) por la enzima glucogéno sintasa cinasa 3β (GSK-3β). Se ha reportado que la sustitución de treonina por alanina disminuye la velocidad de degradación (Diehl et al., 1998).

En la carcinogénesis, la ciclina D1 juega un papel importante y su presencia puede ser un marcador histológico, especialmente en cáncer de mama por lo que puede ser considerado un marcador oncológico. Los ratones *knock-out* (ciclina D1^{-/-}) deficientes de ciclina D1 son resistentes al cáncer de mama inducido por los oncogenes *neu* y *ras*). Pero estos ratones son sensibles a otras rutas oncogénicas conducidas por *c-myc* o *Wnt-1*. Reportándose la ciclina D1 como un marcador pronóstico (Q Yu et al., 2001).

En la línea celular de adenocarcinoma mamario humano MCF-7 se han descrito la sobre-expresión de la ciclina D1 por dos mecanismo: el gen *CCND1* está amplificado (Han EK et al., 1995) y por una mutación en el complejo SCF, obstruye la eficiencia en la proteólisis de la proteína (Russell et al., 1999).

Los estrógenos tienen un rápido efecto inductor en la expresión de la ciclina D1 (Wilcken et al., 1997). La expresión de la ciclina D1 en células de cáncer de mama ha sido consistentemente encontrada y asociada con la positividad de ER (Utsumi et al., 2000). Por otra parte se ha observado que la sobre-expresión de la ciclina D1 puede activar a los receptores de estrógenos de una forma independiente de CDKs y en ausencia de estrógenos (Zwijssen et al., 1998). Este efecto de la ciclina D1 sobre los ER no es inhibido por antiestrógenos como el tamoxifén, de manera que su sobre-expresión indica una resistencia a este tratamiento de primera línea (Zwijssen et al., 1998).

1. 4 ASPECTOS GENERALES DE LAS CUMARINAS

La cumarina (figura 1.4) fue aislada del haba del tonka (*Coumarouna odorata*) por Vogel en 1820 (Murria et al., 1982). Su peso molecular es de 146 g/mol y está formada por un anillo bencénico unido a una pirona (un anillo heterocíclico que contiene un átomo de oxígeno y cinco carbonos con orbitales sp^2). Existen numerosos derivados de la cumarina (α -benzopironas) que están ampliamente distribuidos en las plantas, y se encuentran abundantemente en los aceites de lavanda y acacia (Cohen et al., 1978).

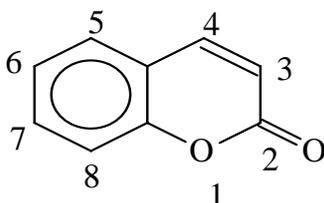


Figura 1.4. Estructura química de la cumarina.

En el humano, la cumarina es poco tóxica (Cox et al., 1989), tiene una vida media breve (1-1.5 h) y del 68 a 92 % de ella es biotransformada a 7-hidroxycumarina (Shilling et al., 1969). Esta hidroxilación es catalizada por la isoforma CYP2A del citocromo P450 (Pelkonen et al., 2000). *In vivo*, se ha observado que la cumarina inhibe la progresión de varios tipos de tumores humanos como el de próstata (Marshall et al., 1990; Mohler et al., 1992), carcinoma renal (Kokron et al., 1991) y previene la recurrencia de melanoma maligno (Thornes et al., 1994). Egan y colaboradores (1990) han propuesto que la cumarina es un pro-fármaco, siendo su forma activa la 7-hidroxycumarina.

1.4.1 ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE ALGUNOS COMPUESTOS CUMARÍNICOS Y SENSIBILIDAD DE LÍNEAS CELULARES

In vitro, la 7-hidroxycumarina tiene un mayor efecto antiproliferativo que la cumarina en células de melanoma murino B16 y la línea de adenocarcinoma de pulmón humano A-427 (Jiménez-Orozco et al., 1999, 2001). Este efecto citostático también ha sido observado en otras líneas celulares de carcinomas pulmonares y carcinomas epidermoides. También se ha observado que la 7-hidroxycumarina produjo apoptosis sólo en los carcinomas epidermoides de pulmón (López et al., 2004).

Las cumarinas monosustituidas producen sus efectos citostáticos en concentraciones milimolares, en cambio, los derivados cumarínicos disustituidos inhiben la proliferación en concentraciones micromolares. Kolodziej y col (1997) reportaron que la adición de grupos polares en las posiciones 6, 7 y 8 del anillo aromático de la cumarina, incrementa la actividad antiproliferativa de la molécula. Las dos cumarinas simples con mayor actividad antiproliferativa son la esculetina y la dafnetina (Finn et al., 2002, 2003; Lacy et al., 2004).

Distintos grupos de investigación, han estudiado *in vitro* los efectos antiproliferativos de derivados cumarínicos en varias líneas celulares. Sin embargo, los resultados publicados por cada uno de ellos tienen aparentes inconsistencias. Tales diferencias se deben principalmente a la sensibilidad de las líneas celulares utilizadas y a los tiempos de exposición en que se evaluó la respuesta. Las cumarinas son más activas en líneas celulares de leucemia que en líneas de células tumorales derivadas de epitelios (Hoffmanova et al., 2002). En células de leucemia, los efectos antiproliferativos de cumarinas han sido observados a 24 horas de exposición, mientras que en células tumorales epiteliales, los efectos se observan a exposiciones de 72 horas o más (Kolodziej et al., 1997; Jiménez-Orozco et al., 1999, 2001; Kawai et al., 2001; Finn et al., 2002, 2003, 2004; Wang et al., 2002; Hofmanova et al., 2002; Kawase et al., 2003; López et al., 2004).

1.4.2 ESCULETINA

La esculetina (6,7-dihidroxicumarina) tiene un peso molecular de 178.14 g/mol (figura 1.5). En forma natural se encuentra como metabolito secundario glicosilado en varias plantas; algunas de ellas son *Artemisia scoporia* y *Citrus limonia* (Chang et al., 1996).

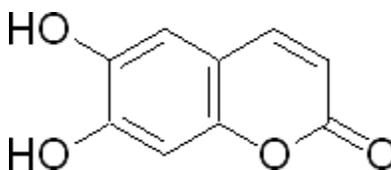


Figura 1.5. Estructura de la esculetina.

Se ha descrito que la esculetina tiene propiedades antioxidantes (Marinova et al., 1994) y es un inhibidor de: la lipoxigenasa (Neichi et al., 1983), de la xantina oxidasa (Egan et al., 1990) y la activación de Ras (Lin Pan et al., 2003). Inducen apoptosis y arresto en la fase S en células de leucemia promielocítica humana HL60 (Chu et al., 2001; Chau-Jong et al., 2002) y tiene un efecto de sinergismo con el ácido retinóico en la diferenciación de células HL60 (Hofmanova et al., 1998). La esculetina inhibe la proliferación de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 debido a la disminución de leucotrieno B y prostaglandina B (Noguchi et al., 1995).

Varios reportes confirman que la esculetina tiene una importante actividad antiproliferativa (Kolodzied et al., 1997; Kawaii et al., 2001; Kawase et al., 2003). La esculetina disminuye los niveles de ciclina D1, p27 y CDK4, e incrementa los niveles de la forma hipofosforilada de pRB (Wang et al., 2002). Sin embargo, en trabajos previos de nuestro grupo observamos que a exposiciones de 48 horas, la esculetina sólo inhibe a la línea de melanoma murino B16 y a la línea de adenocarcinoma pulmonar humano A-427. En las mismas condiciones no se observó efecto antiproliferativo en la línea de carcinoma epidermoide humano CALU-1 y en la de adenocarcinoma mamario humano MCF-7 (García, 2003).

1.4.3 DAFNETINA

La dafnetina (7,8-dihydroxicumarina) tiene un peso molecular de 178.14 g/mol (figura 1.6). Se puede obtener de algunas plantas de la familia de las Thymelaeaceae, como lo son *Daphne odora* y *Daphne gnidium* (Zang et al., 2005).

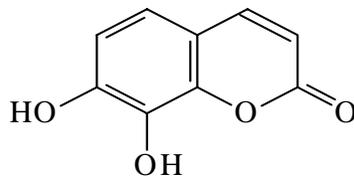


Figura 1.6. Estructura de la dafnetina.

Su actividad citostática es 20 veces mayor respecto a la cumarina, e inhibe a un mayor número de líneas celulares que la esculetina (García, 2003).

La dafnetina inhibe la actividad cinasa de las proteínas PKA, PKC y el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF) (Yang et al., 1999). Finn y col (2002) reportó que a diferencia de otros agentes antineoplásicos que activan los puntos de control del ciclo celular y que son tóxicos, se ha descrito que la dafnetina no causa daño al ADN, no es mutagénica y no es sustrato para la glicoproteína P. Además, en otro trabajo del mismo grupo (Finn et al. 2004), en la línea de carcinoma renal humano A-498, se reportó que: (i) a bajas concentraciones, la dafnetina activa la proteína cinasa p38, induce diferenciación e incremento la fase G₂; (ii) en contraste, a altas concentraciones, la dafnetina inhibe la fosforilación de ERK1 y ERK2, produciendo un arresto en la fase G₁ del ciclo celular.

Por todas estas propiedades, recientemente se elaboró un estudio para evaluar las posibles interacciones de la dafnetina con otros agentes antineoplásicos que actualmente se utilizan en la clínica y que actúan en distintas fase del ciclo celular. Como fármacos prototipos se utilizaron cisplatino que actúa en la fase S y paclitaxel que actúa en la fase M (Razo, 2005). En dicho estudio, se observó que en exposiciones simultáneas, la dafnetina incrementó el efecto de cisplatino, pero no el del paclitaxel. Además, en exposiciones secuenciales donde la dafnetina fue preincubada con las células MCF-7, se observó que: (i) a bajas concentraciones, la dafnetina producía un antagonismo con respecto al efecto producido por los fármacos prototipo expuestos en forma individual. (ii) A altas concentraciones se observó un efecto de sumación entre la dafnetina y los fármacos prototipo. Los resultados de nuestro grupo concuerdan con los dos mecanismos reportado por Finn y col (2004).

En el trabajo de Razo (2005) quedó pendiente la evaluación del efecto de otros agentes, como el etopósido, que inhibe la topoisomerasa tipo II, actúa en la fase G₂ del ciclo celular y se emplea en la quimioterapia para prevenir la metástasis de tumores primarios.

1.5 ETOPÓSIDO

El etopósido es un compuesto antineoplásico derivado de la podofilotoxina vegetal y tiene un peso molecular de 588.56 g/mol (figura 1.7). Su mecanismo de acción es como inhibidor de la topoisomerasa II formando un complejo ternario con el ADN.

Durante la replicación de la hélice de ADN, debe tener lugar un desdoblamiento reversible alrededor de la horquilla de replicación para impedir que la molécula hija de ADN se enrede durante la segregación mitótica. La topoisomerasa II (convierte el ADN de una forma topológica a otra) produce este desenrollamiento del ADN, hace unos cortes en las dos hebras de ADN y posteriormente sella las roturas (Hande et al., 1998).

El etopósido inhibe la síntesis de la oncoproteína Mdm2 e induce apoptosis en las líneas tumorales que sobre expresan *MDM2* (Arriola et al., 1999). Los agentes prototipo que inhiben a la topoisomerasa II producen un arresto en las fases S y G₂ del ciclo celular (Chow et al., 1987). Se administra en leucemia, linfomas no - Hodgkin, en cáncer de pulmón y testículo e induce apoptosis en células normales y tumorales (Bruton et al., 2006).

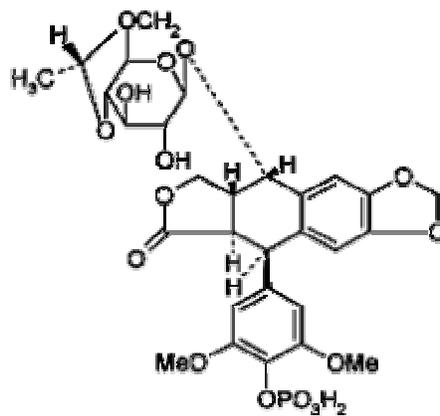


Figura 1.7. Estructura del etopósido.

1 JUSTIFICACIÓN

Uno de los principales tipos de tumores malignos en mujeres es el cáncer de mama en el que se observa frecuentemente la sobre-expresión de la ciclina D1. Dicha sobre-expresión es el resultado de diversas anormalidades como son: (i) la amplificación del gen *CCND1*; (ii) la desregulación de las vías de señalización que regulan la expresión de dicho gen; (iii) la estabilización del ARN mensajero de esta proteína; (iv) defectos en la vía de degradación de la ciclina D1. Para varios tipos de cáncer, la sobre-expresión de ciclina D1 se ha propuesto como un marcador de pronóstico y su inhibición, como un blanco farmacológico y terapéutico.

Los compuestos cumarínicos inhiben la proliferación de varias líneas celulares y se ha reportado que dos de estos compuestos, la esculetina y la 7-hidroxicumarina, disminuyen los niveles de ciclina D1 e inhiben la progresión del ciclo celular en la fase G₁. Sin embargo, existe otra cumarina, la dafnetina que tiene mayor potencia que las anteriores e inhibe un mayor número de líneas celulares, incluyendo la línea de adenocarcinoma mamario humano MCF-7 (García, 2003). Actualmente no se cuenta con información de las acciones de dafnetina en la vía pRB.

En un trabajo reciente se evaluó las interacciones de dafnetina con otros agentes antineoplásicos que se emplean actualmente en la clínica y que actúan en la fase S (cisplatino) y en la fase M (Paclitaxel) del ciclo celular (Razo, 2005). La asociación de dafnetina con cisplatino y paclitaxel, en altas concentraciones, tiene un efecto de suma que podría ser el resultado de la inhibición de la vía pRB. Sin embargo, en este estudio quedó pendiente la evaluación de la asociación de agentes antineoplásicos que actúa en la fase G₂, como el etopósido.

2.1 HIPÓTESIS

La 7-hidroxicumarina y la esculetina disminuyen los niveles de la ciclina D1, sin alterar los niveles de las ciclinas A y E, lo que produce un incremento en el número de células en la fase G₁ del ciclo celular. La dafnetina podría disminuir la expresión de la ciclina D1 e inhibir la vía pRB, produciendo un arresto en la fase G₁ del ciclo celular por esta vía.

El efecto de sumación producido por altas concentraciones de dafnetina al asociarse con otros agentes neoplásicos podría ser el resultado de acciones en la vía de pRB.

La asociación de dafnetina con etopósido podría incrementar la eficacia de los actuales tratamientos antineoplásicos. La adecuada administración secuencial de compuestos cumarínicos podría prevenir la resistencia a drogas mediada por ciclo celular y potenciar la actividad citotóxica de agentes antineoplásicos que ya se emplean en la quimioterapia.

2.2 OBJETIVOS GENERALES

- Evaluar los efectos de asociación de dafnetina y etopósido en exposiciones secuenciales. Con esto se completará un estudio previo.
- Determinar en la línea celular de adenocarcinoma mamario MCF-7, el efecto de la dafnetina en la expresión de ciclinas D1, A y E. Se empleará la esculetina como control interno del sistema.
- Evaluar las posibles modificaciones en los estados de la fosforilación de pRB por dafnetina.
- Evaluar, en células MCF-7, el efecto de la dafnetina en la progresión del ciclo celular.

2.3 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar las concentraciones inhibitorias 50 de dafnetina y etopósido en la línea MCF-7.
- Estudiar los efectos de la asociación secuencial de la exposición a dafnetina (previa y simultánea) con etopósido.
- Determinar el efecto de la dafnetina y esculetina en la fosforilación de pRB en la línea celular MCF-7.
- Construir los histogramas de ADN de la línea de adenocarcinoma mamario MCF-7 y sus modificaciones en respuesta a la exposición a diferentes concentraciones de dafnetina.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 REACTIVOS

La dafnetina (7,8-dihidroxicumarina), esculetina (6,7-dihidroxicumarina) y el etopósido se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St Lois, MO). El medio Eagle modificado de Dulbecco's (DMEM) y los compuestos MTT (bromuro 3-(4,5- dimetiltizol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio), dimetil sulfóxido (DMSO), yoduro de propidio (PI), RNAsa A y la glicina se obtuvieron de Sigma Chemical (St Lois, MO). El suero fetal bovino se obtuvo de Hyclone.

La solución stock 1:10000 de cada fármaco fue preparada en dimetil sulfóxido y almacenada a -20 °C previo a su uso.

3.2 ANTICUERPOS

El anticuerpo Monoclonal (aM) de ratón anti-ciclina D1 (Clona HD11), anticuerpo policlonal de ratón anti-ciclina A (Clona H432) y el anticuerpo policlonal de ratón anti-ciclina E (Clona C119) se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology; el anticuerpo policlonal de ratón anti-RB humano (Clona 14001A) se obtuvo de PharMingen.

3.3 LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA MAMARIO HUMANO MCF-7

La línea de adenocarcinoma mamario humano MCF-7 fue obtenida del American Type Culture Collection (ATCC Número HTB-22). Esta línea celular es positiva para el receptor de estrógenos ER α (van Dijk et., 1997) y sobre-expresa la ciclina D1 por un defecto en su proteólisis (ver inciso 1.3.4). Además se ha reportado que esta línea celular es deficiente en la caspasa 3 (Makin et al., 2001), es heterocigota para una mutación en *TP53* (Shah et al., 2001) y positiva para el oncogen *WNT7H*, cuya proteína WNT, inicia la vía de señalizaciones que transcriben a genes como *MYC* (ATCC).

3.4 MEDIO Y CONDICIONES DE CULTIVO

Las líneas celulares se crecieron en un medio de cultivo suplementado, con 10% de suero fetal bovino con complemento inactivado por calor, adicionado con antibiótico (100 U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomicina) en cajas de cultivo de 25 cm² (Nunc). Se utilizó medio DMEM alto en glucosa para la línea celular MCF-7. Las células se incubaron en atmósfera húmeda a 37 °C y con 5% de inyección de CO₂. La viabilidad celular, se determinó por exclusión del azul tripán, la cual siempre excedió el 98 %.

3.5 ENSAYOS DE ASOCIACIÓN DE FÁRMACOS

3.5.1 ENSAYOS DE MTT

El microensayo de reducción MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) es un método colorimétrico que se utiliza para medir la viabilidad celular. Se basa en la capacidad de las células vivas de reducir el MTT (una sal hidrosoluble y de color amarillo), mediante la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, a formazán de MTT (1-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 3-3,5-difenilformazan), el cual es un compuesto hidrofóbico y de color púrpura.

Al terminar el periodo de exposición a los fármacos, las células son incubadas con MTT (10% v/v) por dos horas a 37 °C en la oscuridad; al finalizar este periodo, el sobrenadante es retirado. Los cristales de formazán formados, son disueltos con dimetil sulfóxido (DMSO) y su absorbancia es leída en un lector de microplacas Biotek EK11 a una longitud de onda de 570 nm. La absorbancia del formazán de MTT es proporcional al número de células vivas.

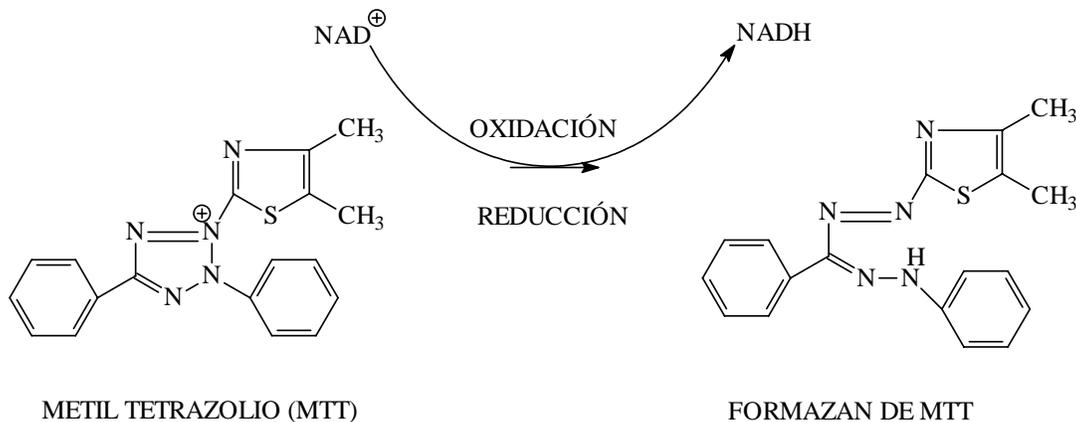


Figura 3.1. Reacción del MTT.

3.5.2 CONDICIONES EXPERIMENTALES

Las células fueron sembradas en microplacas de 96 pozos, en 200 μ L de medio a una densidad de 2000 células por pozo, con un tiempo de 5 días de exposición a los fármacos. Nota: en el estudio realizado por Razo (2005) los efectos se evaluaron a 6 días de exposición; las condiciones se modificaron debido a la mayor proliferación de las células, probablemente debido al suero fetal bovino que se empleó en el presente estudio. La concentración final de DMSO en el medio fue de 0.1 % (v/v), éste fue incorporado al control y no afectó el crecimiento de las células respecto a un control absoluto. Al término de cada ensayo, se leyó por la técnica de MTT y cada ensayo se realizó por triplicado.

3.5.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental, que se empleó en el presente estudio se basa en los protocolos de Talay (1984) y Berenbaum (1989). Se determinó la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) de cada fármaco en la línea celular, empleando concentraciones en escala geométrica. Para estudiar los esquemas de administración de dos fármacos, se emplearon concentraciones en proporciones fijas que corresponden a $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, 1, 2 y 4 veces la CI_{50} individual de cada fármaco.

EXPOSICIÓN INDIVIDUAL (CI_{50})

En esta línea celular, la CI_{50} de cada fármaco se determinó empleando rangos geométricos de concentraciones como se especifica a continuación:

- a) Para dafnetina: 12.5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M y 200 μ M
- b) Para etopósido: 0.8 μ M, 4 μ M, 20 μ M, 100 μ M y 500 μ M

EXPOSICIÓN SIMULTÁNEA Y SECUENCIAL

En base a las CI_{50} obtenidas en la exposición individual, las células fueron expuestas a los dos fármacos en proporciones constantes ($\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, 1, 2 y 4 veces la CI_{50}) en la siguiente forma:

a) Para dafnetina: 15 μ M, 30 μ M, 60 μ M, 120 μ M y 240 μ M

b) Para etopósido: 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M y 80 μ M

En los ensayos de exposición simultánea, después de la adhesión de las células a la microplaca (12 horas), se adicionaron los dos fármacos en las concentraciones descritas. En los ensayos de exposición secuencial, después de la adhesión de las células a la microplaca (12 horas), se adicionó la dafnetina en las concentraciones descritas y al tercer día se agregó el etopósido. Al término del quinto día se leyó el ensayo con la técnica de MTT. Las CI_{50} de estos ensayos se presentan en la tabla 4.1 de resultados.

3.6 ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO

3.6.1 CONDICIONES EXPERIMENTALES

Para ensayos de citometría de flujo, se sembraron 2×10^6 células en 10 mL de medio, en cajas petri de 100 cm^2 (Nunc, Denmark) y se crecieron asincrónica y exponencialmente. Las células se incubaron con el compuesto 48 horas. El control de células tenía una concentración final de DMSO en el medio de cultivo de 0.1 % (v/v), éste no afectó el crecimiento de las células respecto a un control absoluto. Cada ensayo se realizó por triplicado. Se utilizaron las siguientes concentraciones para el análisis del ciclo celular:

a) Para dafnetina: 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M

3.6.2 PROCEDIMIENTO DEL ANÁLISIS

Al término de la exposición al fármaco, las células se cosecharon usando 0.25% de tripsina y se lavaron como se describe a continuación: el botón celular fue resuspendido en 5 mL de PBS (solución amortiguadora de fosfatos), se centrifugó a 1000 rpm (revoluciones por minuto) por 3 minutos y el sobrenadante se eliminó.

Para estabilizar el ADN, las células se fijaron en una solución de 3:7 (v/v) de 50 mM de glicina y etanol al 70% y se incubaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.

Al término de la fijación, las células fueron centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos, el botón de células se lavó con PBS y fue resuspendido en una solución al 0.1% de RNAsa A en 100 μ L de solución FACS (solución fisiológica para el citómetro) durante una hora de incubación a 37 °C. Después de adicionaron 300 μ L de solución FACS con 1 μ g/mL de PI y se mantuvieron en la oscuridad 20 minutos a 4 °C. Las muestras se analizaron por citometria de flujo con el FACScalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

3.7 ANÁLISIS DE CICLINAS POR INMUNOTRANSFERENCIA WESTERN

3.7.1 CONDICIONES EXPERIMENTALES

Para los ensayos de inmunotransferencia Western, se sembraron 2×10^6 células en 10 mL de medio de cultivo, en cajas petri de 100 cm² (Nunc, Denmark) y se crecieron asincrónica y exponencialmente. Las células se incubaron con el compuesto 48 horas. El control de células tenía una concentración final de DMSO de 0.1 % (v/v) en el medio, este no afectó el crecimiento de las células respecto a un control absoluto. Cada ensayo se realizó por triplicado. Se utilizaron las siguientes concentraciones para el análisis por inmunotransferencia Western.

a) Para dafnetina: 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M

b) Para esculetina: 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M

3.7.2 INMUNOTRANSFERENCIA WESTERN PARA CICLINAS

Las células fueron lavadas dos veces con PBS frío, se cosecharon utilizando tripsina al 0.25% y se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos. Después de eliminar el sobrenadante, el botón celular se resuspendió en 20 μ l en buffer de lisis suplementado con 1 mM de ácido etileno diamino tetracético (EDTA), 1 mM ácido etilenglicol tetracético (EGTA), 1mM vanadato de sodio, 1 mM fenilmetilsulfonil floruro (PMSF), 2 μ g/mL leupeptina y 2 μ g/mL aproptinina.

La suspensión se colocó en hielo 15 minutos, se resuspendieron hasta obtener un lisado homogéneo que fue centrifugado a 8000 rpm por 15 minutos a 4 °C.

Del lisado, se recolectó el sobrenadante y se determinó la concentración total de proteína a través del método Bradford. La albúmina sérica bovina se utilizó para elaborar la curva estándar de calibración. Del lisado, 40 µg de proteína se diluyeron en 10 µL de solución Lamli y se desnaturalizó por calor durante 3 minutos.

Cada muestra se colocó en un pozo de geles de poliacrilamida (PAGE) al 12% (p/v) y se corrieron utilizando una cámara de electroforesis Mighty Samm™ SE 250 de Hoefer Pharmacia Biotech Inc. (San Francisco, EUA) a 180 Voltios por una hora a temperatura ambiente. Después se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa de Hybond ECL, Amersham, Life Science (Buckinghamshire, Inglaterra) con una cámara de transferencia Mighty Small™ TE 22 de Hoefer ® Pharmacia Biotech Inc. (San Francisco, EUA) a 14 voltios/ampere durante 45 min.

La membrana de nitrocelulosa fue lavada con PBS por una hora y se incubó toda la noche a – 4° C, con el primer anticuerpo diluido 1:2000 en solución de bloqueo de leche en polvo al 5% (Svelty, Nestle). Al término de la incubación, la membrana fue lavada con PBS por una hora y se incubó a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo (conjugado con peroxidasa) diluido 1:3500 en solución de bloqueo por 1 hora. Después la membrana fue lavada abundantemente con PBS y se reveló con la mezcla de Luminol (PharMingen®).

3.8 ANÁLISIS DE pRB POR INMUNOTRANFERENCIA WESTERN

Las condiciones experimentales fueron las que se utilizaron en el punto 3.7.1 al igual que el procedimiento de estudio por inmunotransferencia Western en 3.7.2, con la variante del anticuerpo ya que se utilizó un anticuerpo policlonal de anti-pRB humano y la muestra se corrió en un gel de poliacrilamida (PAGE) al 6 % (p/v) a 90 Voltios por 4 horas.

4 RESULTADOS

4.1 EXPOSICIÓN INDIVIDUAL A FÁRMACOS

La dafnetina inhibió la proliferación de las células sólo a partir de la concentración de 50 μM y mayores. Su CI_{50} promedio fue de $60 \pm 3.6 \mu\text{M}$ ($n=3$). El etopósido inhibió la proliferación de las células en forma gradual. Su CI_{50} promedio fue de $20 \pm 1.4 \mu\text{M}$ ($n=3$). Ver figura 4.1.

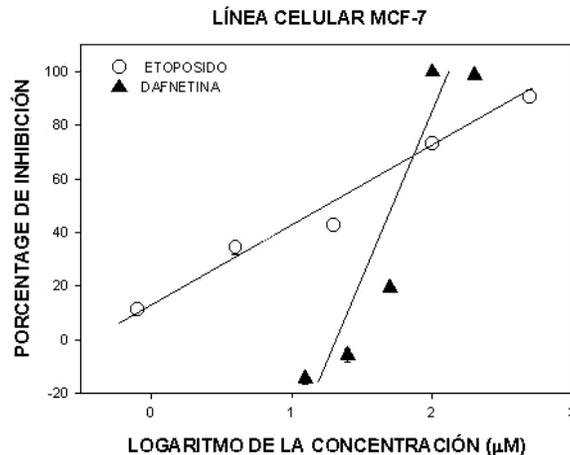


Figura 4.1. Gráficas de las exposiciones individuales de dafnetina y etopósido.

4.2 EXPOSICIÓN SIMULTÁNEA A ETOPÓSIDO Y DAFNETINA

La asociación de etopósido y dafnetina, en casi todas las concentraciones estudiadas, incrementó significativamente el efecto antiproliferativo respecto a la exposición individual del etopósido (ver figura 4.2).

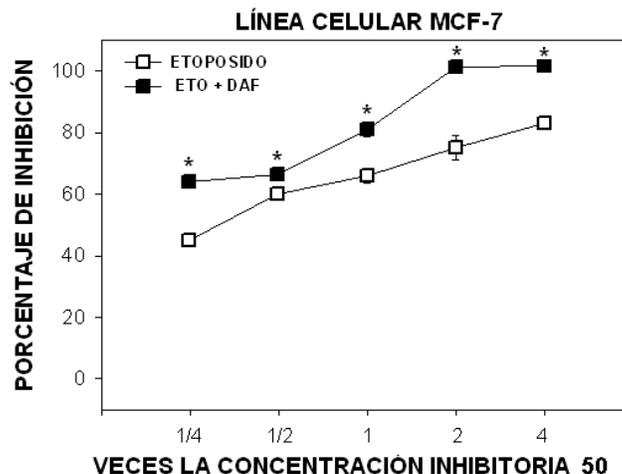


Figura 4.2. Efecto de la asociación simultánea de fármacos en la línea celular MCF-7.

4.3 EXPOSICIÓN SECUENCIAL A ETOPÓSIDO Y DAFNETINA

En la línea celular MCF-7 se observó que a bajas concentraciones ($1/4$, $1/2$ y 1 de la CI_{50} , como se especifica en el punto 3.5.3) se presentó un antagonismo significativo con la exposición secuencial de dafnetina seguida de etopósido ($p < 0.05$). A concentraciones mayores (2 y 4 veces la CI_{50}), la exposición secuencial de dafnetina seguida de etopósido presentó un efecto antiproliferativo mayor respecto al obtenido con la exposición individual de etopósido ($p < 0.05$) observar figura 4.3.

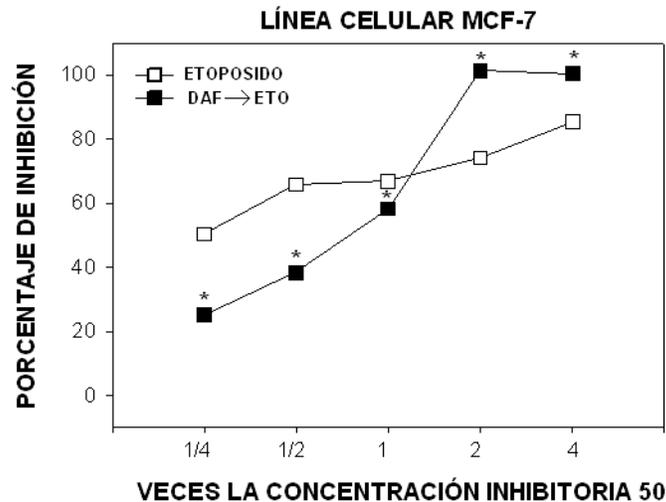


Figura 4.3. Efecto de la asociación secuencial de fármacos en la línea celular MCF-7.

Tabla 4.1. CI_{50} de dafnetina y etopósido solos y sus asociaciones en la línea celular MCF-7.

TRATAMIENTO	$CI_{50}(\mu M) \pm EEM$
Dafnetina	60 ± 3.6
Etopósido	20 ± 1.4
Etopósido (daf + eto)	14 ± 0.2
Etopósido (daf → eto)	23 ± 2.7
Dafnetina (daf + eto)	30 ± 2.8
Dafnetina (daf → eto)	40 ± 3.4

4.4 EFECTO DE LA DAFNETINA EN LOS NIVELES DE CICLINAS EN CÉLULAS MCF-7

A las 48 horas de exposición, la dafnetina disminuyó los niveles de ciclina D1 a partir de la concentración de 50 μM y mayores mientras que, la esculetina sólo los disminuyó sus niveles a partir de la concentración de 200 μM . Ambos compuestos no modificaron los niveles de las ciclinas E y A.

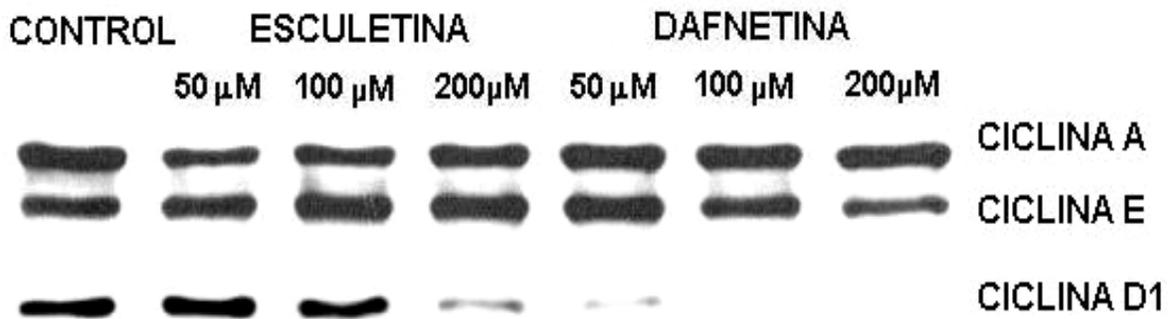


Figura 4.4. Inmunotransferencia Western de ciclinas en la línea celular MCF-7 en respuesta al efecto de esculetina y dafnetina, a 48 horas de exposición con tres concentraciones.

4.5 EFECTO DE LA DAFNETINA EN LAS FORMAS FOSFORILADAS DE pRB EN CÉLULAS MCF-7

A 48 horas de exposición, la dafnetina disminuyó los niveles de la forma hiperfosforilada de pRB (pRB-PP), mientras que la forma hipofosforilada (pRB-P) aumentó. A la concentración de 200 μM , se observaron efectos tóxicos. En el caso de la esculetina no se observó ningún cambio.

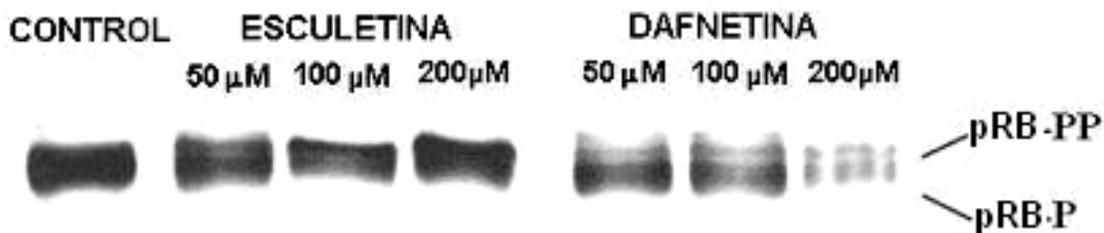


Figura 4.5. Inmunotransferencia Western del estado de fosforilación de pRB en la línea celular MCF-7 en respuesta al efecto de esculetina y dafnetina, a 48 horas de exposición con tres concentraciones diferentes.

4.6 EFECTO EN EL CICLO CELULAR ESTIMADO POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Con base en los resultados anteriores, se evaluaron las acciones de dafnetina en la progresión del ciclo celular. Estos estudios se realizaron a 48 horas de exposición y sólo a concentraciones de 25, 50 y 100 μM , debido a los efectos tóxicos observados a la concentración de 200 μM .

En una población heterogénea de células, la citometría de flujo cuantifica el contenido del ADN por célula y permite identificar el porcentaje de células que se encuentran en una determinada fase del ciclo celular. Cada célula evaluada es considerada como un evento que se grafica en un histograma (figura 4.6). El primer pico corresponde a las células en la fase sub- G_0 , el segundo pico corresponde a las células en la fase G_0/G_1 , el tercer pico corresponde a la fase G_2/M y la meseta entre el segundo y tercer picos corresponde a las células en la fase S. Los porcentajes de cada una de las fases del ciclo celular fueron determinados analizando al menos 10 000 eventos por muestra (número de eventos versus el contenido de ADN).

El yoduro de propidio se incorpora al ADN de una población de células y ayuda a evaluar de manera general los cambios de porcentaje (perfil del histograma) en respuesta a la exposición de diferentes fármacos antineoplásicos y sus efectos en el ciclo celular.

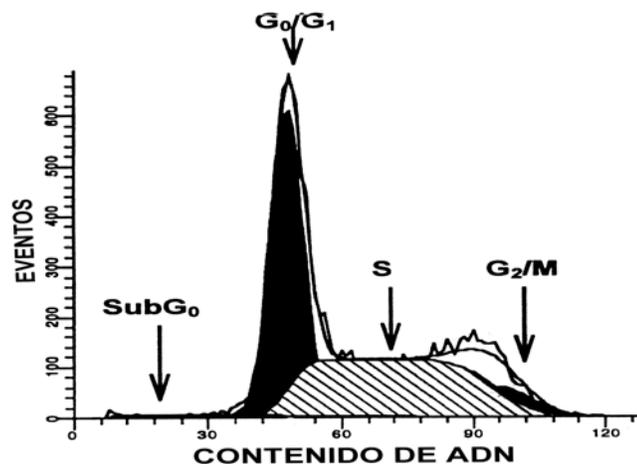


Figura 4.6. Histograma de las fases del ciclo celular.

4.6.1 HISTOGRAMAS DE ADN EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7

En general, bajo las condiciones experimentales de este estudio, la dafnetina no produjo efectos de gran magnitud en la progresión del ciclo celular, como se observa en los perfiles de los histogramas (ver figura 4.7). La fase sub-G₀ tuvo pequeños incrementos a concentraciones de 25 y 50 μM, pero sólo a la concentración de 100 μM, las diferencias fueron estadísticamente significativas, lo que podría sugerir eventos apoptóticos. De manera análoga, a esta misma concentración, la dafnetina sólo produjo pequeños incrementos en las fases G₀/G₁ y S que también fueron estadísticamente significativos. No se observaron cambios en la fase G₂/M.

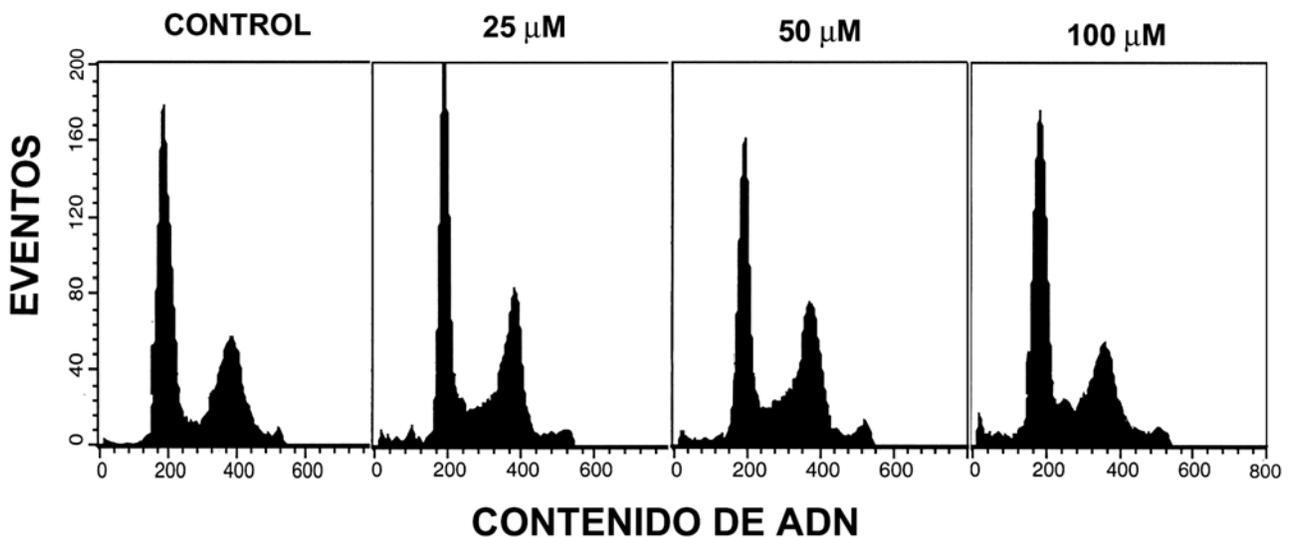


Figura 4.7. Histogramas del ciclo celular a diferentes concentraciones de dafnetina en la línea celular MCF-7, después del tratamiento a 48 h.

Tabla 4.2. Porcentaje de células de adenocarcinoma mamario MCF-7 en las fases de ciclo celular. * Diferencias significativas con respecto al control ($p < 0.05$).

Tratamiento	Pico sub G ₀	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Control	1.8 ± 1.5	54 ± 1.9	22 ± 3.2	12 ± 0.4
25 μM	2.1 ± 0.6	58 ± 2.3	24 ± 2.4	11 ± 1.3
50 μM	2.4 ± 0.4	57 ± 1.9	24 ± 1.3	12 ± 0.6
100 μM	5.8 ± 1.9 *	58 ± 0.8 *	26 ± 1.7 *	12 ± 1.3

6 CONCLUSIONES

A diferencia de otras cumarinas, la dafnetina disminuye los niveles de ciclina D1 a través de la inhibición de señales proliferativas que regulan la transcripción del gen *CCND1*.

La disminución de la ciclina D1 producida por la dafnetina en las células MCF-7, no es suficiente para detener el ciclo celular en la fase G₁ ya que otros complejos pueden fosforilar a la proteína RB.

La administración simultánea de etopósido con dafnetina produce un incremento en el efecto antiproliferativo con respecto al etopósido administrado individualmente.

La administración secuencial de dafnetina seguida de etopósido tiene efectos bifásicos, lo que denota que hay diferentes mecanismos de acción dependientes de la concentración.

Además de su papel en el ciclo celular, la ciclina D1 funciona como un regulador de factores transcripcionales que participan en distintos procesos metabólicos. La inhibición farmacológica de esta proteína constituye una herramienta para estudiar otros procesos en que la ciclina D1 participa.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS DE ESTE TRABAJO

La ciclina D1 es una proteína central de regulación en la transcripción de receptores nucleares hormonales y sus coactivadores (Anexo B). Aún se desconocen las funciones y relaciones de la ciclina D1 con otras enfermedades y no cabe duda que este tópico será objeto de numerosos estudios en un futuro cercano.

Se han encontrado isoflavonas provenientes de la soya (compuestos similares a las cumarinas) que tienen comportamiento antiestrogénico que compiten por el receptor de ER (Xu et al., 2000). La ciclina D1 puede interactuar directamente con un dominio de unión a ligando de ER y puede activarlo (Zwijssen et al. 1997). Sería interesante estudiar la interacción de la dafnetina con el receptor de estrógenos, o bien la interacción de esta cumarina con antagonistas de estrógenos.

El efecto de diferenciación de la dafnetina podría hacer de esta cumarina, un eficaz agente para el tratamiento de leucemias.

8 REFERENCIAS

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 4th ed. New York: Garland Publishing, pp: 1338-1342. 2002.
- Ajchenbaun F, Anda K, De Caprio JA, Griffin JD. Independent regulation of human D-type cyclin expression during G1 phase in primary human T lymphocytes. *J Biol Chem* 268: 4113-4119. 1993.
- Amanatullah DF, Zafonte BT, Albanese C, Fu M, Messiers C, Pestell R. Ras regulation of cyclin D1 promoter. *Methods Enzymol.* 33:116-127. 2001.
- Arriola E, Rodríguez A. Differential regulation of p21^{waf-1/cip-1} and Mdm2 by etoposide: etoposide inhibits the p53-Mdm2 autoregulatory feedback loop. *Oncogene* 18: 1081-1091. 1999.
- Barkova J et al. Cyclin D1 protein expression and function in human breast cancer. *Int. J. Cancer* 57, 353 -361. 1994.
- ATCC. American Cell Biology Collection. www.atcc.org.
- Barkova J, Lukas J, Bartek J. Aberrations of the G1- and G1/S-regulating genes in human cancer. *Prog Cell Cycle Res.* 3: 211-220. 1997.
- Bartek J, Bartkova J, Lukas J. The retinoblastoma protein pathway and the restriction point. *Curr Opin Cell Biol* 8: 805-814. 2001.
- Berenbaum MC. What is synergy?. *Pharmacol Rev.* 41(2):93-141. 1989.
- Bruton LL, Lazo JS, Parker KL. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 11th ed. USA. pp. 1315 – 1404. 2006.
- Butt AJ, Mcneil CM, Musgrove EA, Sutherland RL. Downstream targets of growth factor and oestrogen signaling and endocrine resistance: the potential roles of c-Myc, cyclin D1 and cyclin E. *Endocrine- Rel Cancer.* 12:S47-S59. 2005.
- Calabrese EJ. Estrogen and Related Compounds: biphasic dose Responses. *Crit Rev Toxicol* 31(4):503-515. 2001.
- Caputi M, Groeger AM, Muller MR, Wolner E, Giordano A. Prognostic role of cyclin D1 in lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 20:746-750. 1999.
- Cenni B, Picard D. Ligand independent activation of steroid receptor: new roles for old players. *TEM.* 10(2). 41-46. 1999.
- Chang WS, Lin CC, Chuang SC, Chiang HC. Superoxide anion scavenging effect of coumarin. *Am J Chin Med.* 24:11-17. 1996.
- Chau-Jong W, Yu - Jin Hsieh, Chia – Yih Chu. Inhibition of cell cycle progression in human leukemia HL – 60 cells by esculetin. *Cancer Lett.* 183: 163-168. 2002.
- Chow KC. and Ross, WE. Topoisomerase-specific drug sensitivity in relation to cell cycle progression. *Mol Cell Biol.* 7: 3119-3123. 1987.
- Chu CY, Tsai YY, Wang CJ, Lin WL. Induction of apoptosis by esculetin in human leukemia cells. *Eur J Pharmacol.* 416:25-32. 2001.

Cohen AJ. Critical review of the toxicology of coumarin with special reference to interpecies differences in metabolism and hepatotoxicity response and their significance to man. *Food and Chem Toxicol.* 17:277-289.1978.

Courjal F, Cuny M, Simonlafontaine J. Mapping of DNA amplifications at 15 chromosomal localizations in 1875 breast tumors: definition of phenotypic groups. *Cancer Res.* 57:4360-4367. 1997.

Cox D, O'Kennedy R, Thornes D. The rarity of liver toxicity in patients treated with coumarin (1,2- benzopyrone). *Human Toxicol.* 8: 501-506. 1989.

den Elzen N, Pines J. Cyclin A is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase. *J. Cell Biol.* 153: 121–135. 2001.

Diehl JA, Zindy F, Sherr CJ. Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.*11(8):957-72.1997.

Dragnev KH, Freemantle SJ, Spinella MJ. Cyclin Proteolysis as a retinoid cancer prevention mechanism. *Ann NY Acad Sci.* 952:13-22. 2001.

Egan D, O'Kenney PM, Wang M, Trushin N. The pharmacology, metabolism, analysis and applications of coumarin and coumarin-related compounds. *Drug Metab Rev.* 22: 503-529.1990.

Ewen ME. Relationship between Ras pathways and cell cycle control. *Prog Cell Cycle Res*4:1-17. 2000.

Finn GJ, Kenealy E, Creaven B, Egan DA. In vitro cytotoxic potential and mechanism of action of selected coumarins, using human renal cell lines. *Cancer Lett.* 183: 61-68. 2002.

Finn GJ, Creaven B, Egan DA. Modulation of mitogen-activated protein kinases by 6 - nitro -7- hydroxycoumarin mediates apoptosis in renal carcinoma cells. *Eur J Pharm Sci.* 481: 159-167. 2003.

Finn GJ, Creaven B, Egan DA. Daphnetin induced differentiation of human renal carcinoma cells and its mediation by p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem Pharmacol.* 67: 1779-1788. 2004.

Foster JS, Henley DC, Ahamed S, Wimalasena J. Estrogens and cell- cycle regulation in breast cancer. *Trends Endocrinol Metab.* 12:320-327. 2001.

Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG. Minireview: Cyclin D1: Normal and abnormal functions. *Endocrinology.* 145: 5439 – 5447. 2004.

García SA. Relación estructura actividad citotóxica y citostática de derivados cumarínicos en cuatro líneas tumorales humanas. Facultad de Química UNAM. 63 páginas (tesis de licenciatura). 2003.

Gutmacher AE, Collins FS. Breast and ovarian cancer. *N Engl J Med.* 348(23): 2339-2347. 2003.

Han EK, Jiang W, Sgambato W. Stable overexpression of cyclin D1 in human mammary epithelial cell line. *Oncogen.* 9(2):145-150.1995.

Hardcastle IR, Golding BT, Griffin RJ. Designing inhibitors of cyclin – dependent kinases. *Annu. Rev Pharmacol Toxicol.* 42:325-348. 2002.

Hande KR. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer.* 34: 1514-1521.1998.

Hanahan D, Weinberg RA. The hall mark of cancer. *Cell.*100:57-70. 2000.

Hendenfalk I, Duggan D. Gene-expression profiles and hereditary breast cancer. *N Engl J Med.* 344(8): 539-548. 2001.

Hilakivi-Clarke L, Wang C, Kalil M, Riggins R and Pestell G. Nutritional modulation of the cell cycle and breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 11: 603–622. 2004.

Hofmanova J, Soucek K, Pachernik J, Kovarikova M, Hoferova Z, Minksova K, Netikova J, Kozubik A. Lipoxygenase inhibitors induce arrest of cell in S-phase of cell cycle. *Neoplasma*. 49: 362-367. 2002.

Hooning MJ, Aleman BM, van Rosmalen AJ, Kuenen MA, Klijn JG. Cause-specific mortality in long-term survivors of breast cancer: A 25-year follow-up study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 64(4):1081-91. 2006.

Hooper-ML. The role of the p53 and Rb-1 genes in cancer, development and apoptosis. *J Cell Sci Suppl*. 18:13-17. 1994.

Hortobagyi GN. Treatment of breast cancer. *N Engl J Med*. 339(14):974-984. 1998.

INEGI. Estadísticas Vitales, Base de datos 2004. www.inegi.gob.mx.

Instituto Mexicano del Seguro Social. Boletín de prensa 066. 9 febrero del 2006.

Jiménez-Orozco FA. Cytostatic activity of coumarin metabolites and derivatives in the B16 F10 murine melanoma cell line. *Melanoma Res*. 9: 243-247. 1999.

Jiménez-Orozco FA, López JS, Molina J, Velasco MA, Mendoza N, Mandoki JJ. Decrease of cyclin D1 in the human lung adenocarcinoma cell line A-427 by 7-hydroxycoumarin. *Lung Cancer*. 34:185-194. 2001.

Jiménez –Orozco FA. Estudio de las acciones de cumarina y 7-hidroxycumarina en el ciclo celular y en la expresión de la ciclina “D1”, “E” y “A” de células de cáncer humano. Tesis de doctorado. Facultad de Medicina UNAM. 55 páginas. 2003

Johnson DG, Walker CL. Cyclin and cell cycle checkpoints. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*. 39: 295-312. 1999.

Kaelin WG Jr. Functions of retinoblastoma protein. *Bioessays*. 21:950-958. 1999.

Kawaii S, Tomono Y, Ogada K. The antiproliferative effect of coumarins on several cancer cell lines. *Anticancer Res*. 21:917-924. 2001.

Kawase M, Sakagami H, Hashimoto K, Tani S, Hauer H, Chatterjee SS. Structure-cytotoxic activity relationships of simple hydroxylated coumarins. *Anticancer Res*. 23(4):3243-6. 2003.

Kim HK, Park IA, Heo DS, No DY, Choe KJ. Cyclin E overexpression as an independent risk factor of visceral relapse in breast cancer. *Eur J Surg Onc*. 27:464-271. 2001.

Kokron O, Maca S, Gasser G, Schmidt PR. Cimetidine and coumarin therapy of renal cell carcinoma. *Oncol*. 48:102-106. 1991.

Kolodziej H, Kayser O, Woerdenbag H, van Uden W. Structure-cytotoxicity relationships of a series of natural and semi-synthetic simple coumarins as assessed in two human tumor cell lines. *Verlag der Zeitschrift fur Naturforschung*. 52c: 240-244. 1997.

Kornbluth S. Cell cycle checkpoints. In: Conn PM, Means AR, O'Malley BW (eds). *Principles of molecular regulation*. Human Press, New Jersey, pp: 407-413. 2000.

Kuo HC, Kuo WH, Lee YJ, Wang CJ, Tseng TH. Enhancement of caffeic acid phenethyl ester on all-trans retinoic acid-induced differentiation in human leukemia HL-60 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006.

Lacy A, O'Kennedy R. Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. *Curr Pharm Des*. 10(30):3797-811. 2004.

Lamb J, Ladha MH, McMahon C, Sutherland RL, Ewen ME. Regulation of the functional interaction between cyclin D1 and the estrogen receptor. *Mol Cell Biol* 17:5338-5347. 2000.

Lamb J, Ladha MH, McMahon C. Regulation of the functional interaction between cyclin D1 and the estrogen receptor. *Mol Cell Biol*. 20(23): 8667-8675. 2003.

Lavia P, Jansen-Durr P. E2F target genes and cell-cycle checkpoint control. *Bioessays*. 21:221-230. 1999.

Learn PA, Yeh IT, McNutt M, Chisholm GB, Pollock BH, Rousseau DL Jr, Sharkey FE, Cruz AB, Kahlenberg MS. HER-2/neu expression as a predictor of response to neoadjuvant docetaxel in patients with operable breast carcinoma. *Cancer*. 103(11):2252-2256. 2005.

Lebwohl DE, Muise-Helmericks R, Sepp-Lorenzino L, Serve S, Timaul M, Bol R, Borgen P, Rosen N. A truncated cyclin D1 gene encodes a stable mRNA in a human breast cancer cell line. *Oncogene*. 9(7):1925-9. 1994.

Lin HM, Zhao L, Cheng SY. Cyclin D1 is a ligand-independent co-repressor for thyroid hormone receptor. *J Biol Chem*. 4, 4. 2002.

Lin Pan S, Huang YW, Guh JH. Esculetin inhibits *Ras* - mediated cell proliferation and attenuates vascular restenosis following angioplasty in rats. *Biochem Pharmacol*. 65(1): 1897-1905. 2003.

Liu MM, Albanese C, Anderson CM, Hilty K, Webb P, Uht RM, Price RH Jr, Pestell RG, Kushner PJ . Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression. *J Bio Chem*. 277: 24353–24360. 2002.

López GJ, Prado GH, Aguilar CD, Molina GJ. Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxycoumarin on human lung carcinoma cell lines. *Lung cancer*. 43: 275-283.2004.

McMahon C, Suthiphongchai T, Drenzo J, Ewen ME. P/CAF associates with cyclin D1 and potentiates its activation of the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci*. 96:5382-8387. 1999.

Makin G, Dive C. Apoptosis and cancer chemotherapy. *Trends Cell Biol*. 11(11): S22-6. 2001.

Marinova EM, Nedjalka VI, Yanishlieva and Ivanka N. Kostova. Antioxidative action of the ethanolic extract and some hydroxycoumarins of fraxinus ornus bark . *Food Chem*. 51(2): 125 -132. 1994.

Marshall ME, butler k, Hermansen D. Treatment of hormone-refractory stage D carcinoma of prostate with coumarin (1, 2-benzopyrone) and cimetidine: A pilot study. *Prostate*. 17:95-99. 1990.

Marshall ME, Kevin K, Benefield C. Grow inhibitory effects of coumarin (1,2- benzopyrone) and 7 hydroxycoumarin in human malignant cell lines in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol*. 120:3-10. 1994.

McIntosh GG. Determination of the prognostic value of cyclin D1 over expression in breast cancer. *Oncogen*. 11:885-891. 1995.

Mitnach S. the retinoblastoma from bench to bedside. *Eur J Cell Biol*. 84:97-107. 2005.

Mohler JL, Gomilla LG, Crawford ED, Glode LM, Zippe CD, Fair WR. Phase II evaluation of coumarin (1,2-benzopyrone) in metastatic prostatic carcinoma. *The prostate*. 20:123-131. 1992.

MotokuraT , Bloom T, Kim HG. A novel cyclin encode by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature*. 350:512-512.1991.

Murray RDH, Méndez J, Brown AS. The Natural Coumarins, occurrence and biochemistry. Méndez J, Brown SA eds. New York. pp.1-2. 1982.

National Cancer Institute. www.cancer.gov.

Neichi T, Koshihara Y, Murota S. Inhibitory effect of esculetin on 5-lipoxygenase and leukotriene biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*. 753(1):130-132. 1983.

Neumeister P, Pixley FJ, Xiong Y, Xie H, Wu K, Ashton A. Cyclin D1 governs adhesion and motility of macrophages. *Mol Biol Cell* 14:2005-2015. 2003.

Noguchi M, Earashi M, Minami I, Miyazaki M, Tanaka T. Effects of piroxicam and esculetin on the MDA-MB-231 human. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 53:325-329. 1995.

NOM-041-SSA2-2002.

Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. Cyclin D-dependent Kinase, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1602: 73-87. 2002.

O'Connor PM, Fan S. DNA damage check points: implication for cancer therapy. *Prog Cell Cycle Res*. 2:165-173. 1996.

Pelkonen O, Rautio A, Raunio H., Pasanen M. CYP2A6: A human coumarin 7-hydroxylase. *Toxicol*. 144: 139-147. 2000.

Q Yu, Geng Y, Scinski P. Specific protection against breast cancer by cyclin D1 ablation. *Nature*. 411: 1017-1021. 2001.

Rang HP, M.M. Dale, Ritter JM. *Farmacología*. 5ª ed. Madrid. Harcourt, D.L. Páginas: 693-710. 2003.

Razo PR. Estudio de la interacción secuencial de dafnetina (7-8-Dihidroxycumarina) con paclitaxel y cisplatino en las líneas celulares MCF-7 y A-427. Facultad de Química UNAM. 51 paginas (tesis licenciatura). 2005.

Russell A, Thompson A, Hendley J, Trute L, Armes J, Germain D. Cyclin D1 and D3 associate with the SCF complex and are coordinately elevated in breast cancer. *Oncogene*. 18(11):1983-1991. 1999.

Sahai E, Marshall CJ. Rho-GTPase and cancer. *Nature Rev*. 2:133-142. 2002.

Shah MA, Schwartz GK. Cell cycle-mediated drug resistance: an emerging concept in cancer therapy. *Clin Cancer Res*. 7: 2168 -2181. 2001.

Shilling WH, Crampton FR, Langland RC. Metabolism of Coumarin in Man. *Nature*. 221: 664-665. 1969.

Sutherland RL, Musgrove EA. Cyclins and Breast Cancer. *J Mammary Gland Biol Neo*. 9(1):95-103. 2004.

Talalay P, Chou T.C. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul*. 22: 27-55. 1984.

Tetsu O, McCormick. β - Catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cell. *Natures*. 398:422-426. 1999.

Thornes RD, Daly L, Lynch B, Breslin B, Brown H, Corrigan T, Daly P. Treatment with coumarin to prevent or delay recurrence of malignant melanoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 120: S32- S34. 1994.

Tong W, Pollard JW. Genetic evidence for the interactions of cyclin D1 and p27 (kip1) in mice. *Mol Cell Biol*. 21:1319-1328. 2001.

Traub F, Mengel M, Luck HJ, Kreipe HH, von Wasielewski . Prognostic impact of Skp2 and p27 in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 12-15. 2006.

van Dijk MA , et al. A functional assay in yeas for the human estrogen receptor displays wild-type and variant estrogen receptor messenger RNAs present in breast carcinoma. *Cancer Res*. 57: 3478-3485, 1997.

Wan C, Pattabiraman N, Zhou JN. Cyclin D1 repression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and transactivation. *Mol Cell Biol* 23:6159-6173.2003.

Wang C, Li Z, Fu M, Pestell RG. Signal transduction mediated by cyclin D1: from mitogens to cell proliferation: a molecular target with therapeutics potential. *Cancer treat Res.* 119:217-237. 2004.

Yang EB, Zhao YN, Zhang K, Mack P. Daphnetin, one of coumarin derivatives, is a protein kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun.* 260: 682-685. 1999.

Yazdanparast R, Mahdavi M, Moosavi MA. Induction of differentiation and apoptosis in three human leukemia cell lines by a new compound from *Dendrostellera lessertii*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 38(7):477-83. 2006.

Zhang W, Zhang WD, Li TZ, Zhang C, Liu RH, Zhou Y, Su J. Studies on the chemical constituents in roots of *Daphne odora* var. *Atrocaulis*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 7:513-515. 2005.

Zwijsen RM, Bucle RS, Hijmans EM, Bernards R. Ligand-independent recruit of steroid receptor coactivators to estrogen receptor by cyclin D1. *Genes Dev.* 12:3488-3498.1998.

ANEXO A. CICLO CELULAR

A.1 CICLO CELULAR

El ciclo celular es un proceso evolutivamente conservado por el cual todas las células eucariotas controlan su replicación y división. Este proceso involucra numerosas proteínas reguladoras que conducen a la célula a través de una secuencia específica de eventos que culminan en la mitosis y en la producción de dos células hijas (figura A.1).

Una célula que está programada para crecer y dividirse, pasa a través de fases en el ciclo celular: En la fase G_1 , las señales extracelulares de proliferación se transducen al interior del núcleo, se activan los genes cuyos productos son necesarios para la progresión del ciclo y para la síntesis de ADN. La fase S es un periodo de replicación de cromatina. En la fase G_2 , hay duplicación de organelos y finalmente la fase M o mitótica, donde los organelos y el ADN se segregan en dos células hijas. Las células que no proliferan se encuentran en la fase G_0 , donde la maquinaria del ciclo celular se encuentra inactiva (Alberts et al., 2002).

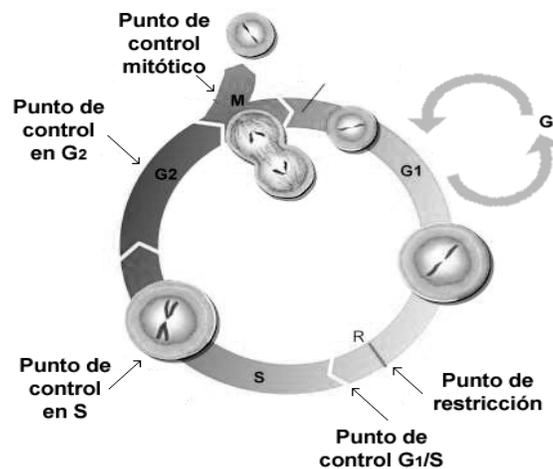


Figura A.1. Ciclo celular y sus puntos de control y de restricción.

A.1.1 CONTROL DEL CICLO CELULAR

El funcionamiento correcto de los procesos del ciclo celular requiere de cambios en los complejos proteicos, entre los que se encuentran las ciclinas, las cinasas dependientes de ciclinas y los complejos que se forman entre ambas (CDK-ciclina).

Las cinasas dependientes de ciclinas (CDK) dirigen la transición de las células, de una fase a la siguiente. Estas proteínas pertenecen a la familia de las cinasas de serina/treonina y por medio de fosforilaciones activan secuencialmente la maquinaria del ciclo celular. Existen diferentes tipos de CDKs (CDK2, CDK4, CDK6, CDK7 principalmente) y aunque sus concentraciones son constantes a lo largo del ciclo, la actividad cinasa de cada una, se inicia en eventos particulares de cada fase (Ortega et al., 2002).

En su estado monomérico las CDKs son inactivas. Su principal forma de activación es la unión a subunidades reguladoras, llamadas ciclinas (ciclina D, ciclina E, ciclina A y ciclina B). La ciclina D se sintetiza en la fase G₁. La ciclina E se sintetiza al final de la fase G₁, alcanza su máxima expresión durante la transición de la fase G₁ a la fase S y se degrada durante la fase S. La ciclina A se sintetiza al inicio de la fase S, alcanza su máxima expresión durante la transición de la fase S a G₂ y se degrada en la fase M (Alberts et al., 2003).

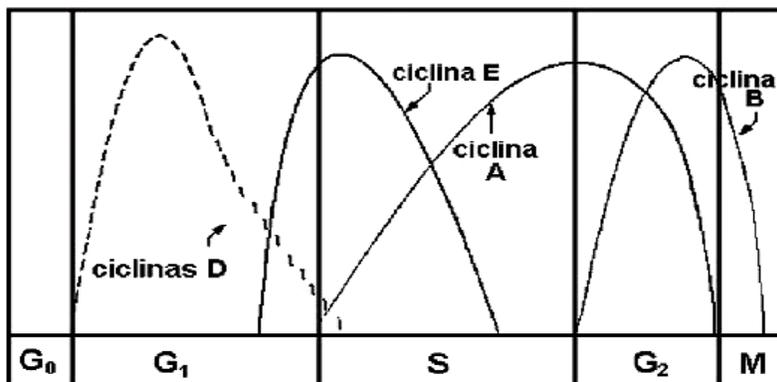


Figura A.2. Expresión de ciclinas en diferentes fases en el ciclo celular.

(Jiménez-Orozco FA, 2003).

La ciclina B se sintetiza al inicio de la fase G_2 , alcanza su máximo en la fase M y disminuye en la transición hacia la anafase. Los niveles de ciclinas varían a lo largo del ciclo y cada ciclina alcanza sus niveles máximos en determinadas fases del ciclo (Ortega et al., 2002) (figura A.2).

La expresión anormal de las ciclinas D, E y A durante todo el ciclo celular se asocia con anomalías genéticas que desregulan el ciclo celular, principalmente la transición de la fase G_1 a la fase S (Barkova et al., 1997; Bartek et al., 2001).

A.1.2 PUNTOS DE CONTROL

Existen sistemas de control posteriores al punto de restricción que pueden inhibir la progresión del ciclo celular en respuesta al estrés genotóxico (O'Connor et al., 1996; Kornbluth et al., 2000). Se han descrito 3 puntos de control, uno en cada fase que pueden ser activados por diversos estímulos o por agentes antineoplásicos (figura A.1).

La fidelidad en la replicación del ADN y su correcta distribución durante la mitosis es una tarea central en el ciclo celular. Esto requiere de sistemas que verifiquen la correcta culminación de eventos como son la síntesis de ADN, la condensación de los cromosomas o la formación del huso mitótico. Los puntos de control son vías bioquímicas de señalización sensibles a varios tipos de defectos estructurales y funcionales del ADN; pueden activar múltiples respuestas celulares cuando detectan daños en los eventos antes mencionados.

En otras palabras, los puntos de control son alarmas de daño genotóxico que detectan errores y activan la maquinaria de reparación del ADN. También se produce inhibición de la progresión del ciclo celular (arresto celular), dando tiempo a la célula a reparar el daño. Si el daño es irreparable, se induce la muerte celular programada (Bartek et al., 2001).

Las células tumorales presentan con frecuencia anomalías en las proteínas que regulan las vías de señalización de los puntos de control. Como resultado, no se producen arrestos en el ciclo celular por daño genómico, lo que favorece la selección de las clonas mutantes resistentes a los tratamientos. El funcionamiento ineficaz de los puntos de control conduce a al desarrollo de neoplasias (Barkova et al., 1997; Bartek et al., 2001).

ANEXO B. FUNCIONES TRANSCRIPCIONALES DE LA CICLINA D1

Tabla B.1. Funciones transcripcionales de la ciclina D1. (Hilakivi-Clark et al., 2004)

Proteínas	Relación funcional con ciclina D1
Maquinaria del ciclo celular	
CDK4/6	Ciclina D1 forma complejos con CDK4/6.
p21(CIP1)	p21 reprime la actividad cinasa del complejo ciclina D1/ CDK4 y promueve la acumulación nuclear de ciclina D1.
p27	p27 reprime la actividad cinasa del complejo ciclina D1/ CDK4.
p57(kip2)	p57 reprime la actividad cinasa del complejo D1/ CDK4.
pRB	Ciclina D1/ CDKs fosforila a pRB y libera E2F.
Hsc70	Hsc70 promueve la ciclina D1.
Hsp90	Hsc90 promueve la acumulación nuclear de la ciclina D1.
MCM3/7	Ciclina D1 promueve la disociación del complejo pRB/MCM7.
GSK-3 β	Fosforila la ciclina D1.
CRM1	Promueve la exportación nuclear de la ciclina D1.
Acetilasa/desacetilasa de Histonas	
P300/CBP	Ciclina D1 reprime la actividad de HAT.
P/CAF	Ciclina D1 reprime la actividad de HAT.
SRC-1	Ciclina D1 recluta SRC-1 a ER α .
HDAC1	Ciclina D1 recluta HDAC a AR.
HDAC3	Ciclina D1 recluta HDAC 3 a TR para formar un complejo ternario.
Factor de transcripción	
ER α	Ciclina D1 recluta SRC-1 a ER α y activa ER α no ligado.
AR	Ciclina D1 reprime la actividad de unión a ligando a AR.
PPAR γ	Ciclina D1 reprime PPAR γ mediante transcripción y diferenciación.
TR	Ciclina D1 reprime la actividad de TR no ligado y TR ligado.
Myb	Ciclina D1 antagoniza la actividad de B-Myb.
DMP1	Ciclina D1 antagoniza la transactivación de DMP1.
MyoD	Ciclina D1 reprime la diferenciación muscular mediante la transcripción de MyoD.
Stat3	Ciclina D1 reprime la activación de STAT.
Sp1	Ciclina D1 reprime Sp1 mediante transactivación.
β 2/neuroD	Ciclina D1 reprime el factor de transcripción de bHLH, β 2/neuroD.
bHLH	Ciclina D1 inhibe la actividad del regulador miogénico bHLH.
Otros	
TAF(II)250	Ciclina D1 reprime Sp1 mediante la transcripción.
DIP1	Ciclina D1 la reprime.
BRCA1	Ciclina D1 rescata a BRCA1 mediante la represión de ER α .
GCIP	Ciclina D1 inhibe la actividad D1/CDK4.

Cinasa dependiente de ciclina 4/6 (CDK 4/6); inhibidor de la ciclina D1/CDK4 (p21); proteína del retinoblastoma (pRB); proteína de choque de calor (Hsc70 y Hsp 90); proteínas de mantenimiento de minicromosomas (MCM3/7); cinasa de la glucógeno-sintasa (GSK-3 β); receptor nuclear de exportación (CRM1); complejo co-activador de transcripción (p300); co-activador de la transcripción con actividad HAT remodeladora de cromatina (P/CAF); co-activador asociado al receptor de esteroides (SRC-1); enzimas desacetilasas de histonas (HDAC1/ HDAC3); receptor de estrógenos (ER); receptor de andrógenos (AR); receptor activador de proliferación del peroxisoma (PPAR γ); receptor de hormonas tiroideas (TR); proteína de oncogén aislado de tumores inducidos por el virus de la mieloblastosis de aves (Myb); proteína 1 de la matriz dentinaria (DMP1); factor de transcripción miogénico (MyoD); transductor de señales y activadores de transcripción 3 (stat3); proteína estimulante (Sp1); proteína del gen del cáncer de mama 1 (BRCA1). (Hilakivi-Clark et al., 2004)