



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

**ANÁLISIS DEL EFECTO ANTIMETASTÁSICO *IN VIVO*
DE LA 4-HIDROXICUMARINA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

NOHEMÍ SALINAS JAZMÍN

DIRECTOR DE TESIS: DR. MARCO ANTONIO VELASCO VELAZQUEZ

México, D.F.

Enero, 2008.



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.

Reconocimientos:

Dr. Marco Antonio Velasco Velásquez, Dra. María Isabel Soto Cruz y Dr. Juan Arcadio Molina Guarneros, gracias por su tutoría para el desarrollo del presente trabajo, el cual se desarrolló en los siguientes Laboratorios de la Facultad de Medicina de la UNAM: i) Laboratorio de Farmacología molecular, Departamento de Farmacología y ii) Laboratorio de inmunología comparada de piel y mucosas, Departamento de Biología Celular y Tisular. Dicho trabajo fue parcialmente financiado por el proyecto PAPIIT-UNAM IN223806.

Agradezco al los miembros del Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por su infinito apoyo y calidad.

Apoyos recibidos:

- CONACYT (Becario No. 203595)
- PAEP (El Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado, proporcionó el sustento para la presentación de los avances del presente proyecto en el IV Congreso Internacional de Melanoma en la ciudad de New York., bajo el nombre de: "Preclinical Studies of 4-ydroxycoumarin in a Murine Melanoma Model".)

Miembros del Comité tutorial:

Dra. María Isabel Soto Cruz

Dr. Juan Arcadio Molina Guarneros

Por medio de las siguientes líneas quiero agradecer a las maravillosas personas que me apoyaron moral y académicamente durante el desarrollo de este trabajo (Diana, Juanita, Mabel, Roco y Armando). Por otro lado también quiero agradecer a mi familia por haberme ayudado a crecer.

Agradezco a mi tutor y al comité tutorial por sus consejos a lo largo de este proyecto y por mostrarme las diferentes caras que tienen la vida para cada persona.

Dedico este trabajo a la persona que me esperó hasta la una de la madrugada mientras organizaba a mis ratones. Alan gracias por tu comprensión y apoyo.

Í N D I C E

Contenido.	Página.
I. Resumen.....	6
Summary.....	8
II. Antecedentes.....	10
1. Cáncer.....	10
1.1. Generalidades.....	10
1.1.1. Definición.....	10
1.1.2. Epidemiología.....	11
1.1. 3. Carcinogénesis.....	12
1.1.4. Metástasis.....	16
1.1.5 Cáncer de Piel.....	18
1.1.5.1 Generalidades.....	18
1.1.5.2. Melanoma.....	19
1.1.6. Cumarinas.....	22
1.1.6.1 Generalidades.....	22
1.1.6.2. Actividad antineoplásica de la cumarina.....	25
1.1.6.3. Metabolismo de la cumarina.....	27
1.1.6.4. Actividad de 4-hidroxicumarina	32
III. Objetivos.....	34

IV. Hipótesis	34
. Material y métodos	35
VI. Resultados.....	46
VII. Discusión.....	73
VIII. Conclusiones.....	85
Perspectiva.....	85
X. Bibliografía... ..	86

I. RESUMEN

El cáncer constituye uno de los principales problemas de salud pública en todo el mundo. En gran proporción, las muertes causadas por esta enfermedad se deben a la formación de metástasis, que implica la formación de tumores secundarios y comprende una serie de eventos en los que se requiere que las células tumorales modifiquen su adhesión a otras células. Por lo tanto, los receptores de adhesión y las moléculas intracelulares que regulan el proceso de adhesión han sido señalados como blancos farmacológicos para disminuir la invasividad de las células cancerosas.

La cumarina es un producto natural que tiene actividad antineoplásica *in vivo* en melanoma maligno, carcinoma renal metastásico y carcinoma prostático y actividad antimetastásica en modelos animales. Se han identificado muchos compuestos estructuralmente relacionados con la cumarina que presentan actividad biológica. A diferencia de otros compuestos cumarínicos, la cumarina carece de efecto anticoagulante y es muy poco tóxica. En humanos se han tolerado hasta 7 g diarios con efectos adversos de poca importancia y reversibles al suspender el tratamiento. La cumarina metabolizada *in vivo* da lugar a metabolitos hidroxilados con mayor actividad biológica, por lo que se ha planteado que la cumarina podría actuar como un profármaco. Por ejemplo, la 7-hidroxicumarina es un inhibidor de la proliferación *in vitro* de líneas tumorales más potente que la cumarina misma. La 4-hidroxicumarina (4-HC), *in vitro*, en células B16-F10 de melanoma murino induce alteraciones en la: i) organización del citoesqueleto de actina, ii) adhesión a moléculas de matriz extracelular, iii) migración y iv) expresión y activación de proteínas que participan en los procesos de adhesión, como paxilina, Rac y Rho. Dado que la 4-HC *in vitro* modifica procesos celulares que son necesarios en el desarrollo de metástasis, es posible que este compuesto disminuya la capacidad metastásica de células B16-F10 *in vivo*.

En este trabajo, para estudiar el efecto de la 4-HC sobre la formación de metástasis *in vivo*, utilizamos un modelo de metástasis experimentales en el que se inoculan células B16-F10 vía intravenosa a ratones C57BL/6. La inoculación vía intravenosa de células B16-F10 tratadas *in vitro* con 4-HC (500 μ M) disminuyó el número de nódulos metastásicos en pulmón en un 85%. Utilizando este mismo modelo se observó que en ratones tratados con 4-HC (10, 20 ó 40 mg/Kg/día) vía oral durante los siete días previos a la inyección de las células de melanoma, el número de nódulos metastásicos en pulmón disminuyó en un 80% con respecto a los ratones del grupo control, a los que se les administró metilcelulosa.

Por otro lado, en ratones C57BL/6 implantados subcutáneamente con células B16-F10 se evaluó el efecto antimetastásico y antineoplásico de la 4-HC determinando: i) tamaño del tumor; ii)

número de metástasis espontáneas en pulmón; y iii) tiempo de supervivencia. En este modelo estudiamos dos protocolos distintos; el primero consistió en administrar vía oral la 4-HC (10, 20 ó 40 mg/Kg/día) y el segundo consistió en administrar de forma conjunta la 4-HC (10, 20 ó 40 mg/Kg/día) y el antineoplásico ciclofosfamida 200 mg/Kg (CY).

Con el primer protocolo se incrementó el tiempo de supervivencia con la dosis de 10 mg/Kg/día, mientras que con el segundo, la supervivencia se vio aumentada con las dosis de 10 y 20 mg/Kg/día. En ambos casos dicho incremento fue estadísticamente significativo. En cuanto al tamaño del tumor, la 4-HC (10 y 20 mg/Kg/día) disminuyó el tamaño del tumor respecto al control de metilcelulosa. La administración conjunta de la 4-HC con CY no indujo cambios en el tamaño del tumor respecto a los ratones que solo recibieron CY. Adicionalmente, se observó que las dosis de 10 y 20 mg/Kg/día disminuyen la formación de metástasis espontáneas en pulmón y que sólo la dosis de 40 mg/Kg/día administrada de forma conjunta con CY reduce la formación de metástasis espontáneas de forma significativa.

Finalmente, se estudio el posible efecto tóxico de la 4-HC en ratones sanos a los que se les administró 4-HC por vía oral durante ochos semanas. En la evaluación bioquímica de la función renal se encontró que la 4-HC aumentó en un 50% los niveles de nitrógeno ureico en sangre y disminuyó los niveles de N-acetil- β -glucosamidasa en orina, pero no modificó la tasa de filtración glomerular de creatinina ni los niveles de proteína en orina.

En el estudio histológico del riñón se encontró que la 4-HC induce: i) metaplasia cúbica con microvellosidades en las células de la capa parietal del glomérulo y ii) disminución de las microvellosidades, desorganización intracelular, picnosis y degeneración lipídica en las células del túbulo proximal.

En la evaluación bioquímica de daño hepático se encontró que la 4-HC no modificó los niveles de γ -glutamilttransaminasa en suero; sin embargo, se observó necrosis en los hepatocitos centrolobulillares en el estudio histológico con las dosis de 20 y 40 mg/Kg/día.

Adicionalmente, se observó que la 4-HC en pulmón indujo hiperplasia y citotoxicidad citoplasmática en las células de Clara, así como vacuolización en los neumocitos tipo II de forma dependiente de la dosis.

Por medio de este trabajo encontramos que la 4-HC incrementa el tiempo de supervivencia e inhibe la formación de metástasis experimentales y espontáneas en un modelo de melanoma murino, a pesar de los efectos tóxicos que induce. Los resultados sugieren que la 4-HC podría ser útil como adyuvante en la terapia contra el melanoma, aunque se requieren más estudios para dilucidar los mecanismos mediante los cuales la 4-HC ejerce su efecto antimetastásico, antineoplásico y tóxico.

SUMMARY.

Coumarin is a natural product that has *in vivo* antineoplastic activity in malignant melanoma, metastatic renal carcinoma and prostatic carcinoma as well as antimetastatic activity in animal models. In addition, many compounds structurally related with coumarin possess biological activities. Unlike other coumarin-related compounds, coumarin lacks anticoagulant effect and has very low toxicity. In humans, the administration of 7 g of coumarin/ day is well tolerated and shows only minor side effects that are reversible after discontinuation of therapy. Coumarin is metabolized *in vivo* generating hydroxylated derivatives with greater biological activity, which has led to the proposal that coumarin may act as a prodrug. For example, 7-hydroxycoumarin is more potent as an inhibitor of *in vitro* proliferation of tumor cell lines than coumarin. Similarly, *in vitro* treatment of B16-F10 melanoma cells with 4-hydroxycoumarin (4-HC) alters: i) the organization of the actin cytoskeleton ii) adhesion to extracellular matrix molecules, iii) migration, and iv) expression and activation of proteins involved in the adhesion process, such as paxillin, Rac and Rho. Since 4-HC modifies cellular processes that are necessary in the development of metastasis *in vitro*, it is possible that this compound decrease the metastatic potential of B16-F10 cells *in vivo*.

In this work, to study the effect of 4-HC on the formation of metastasis *in vivo*, we used a model of experimental metastases in which B16-F10 cells were inoculated intravenously to C57BL/6 mice. The intravenous inoculation of B16-F10 cells treated *in vitro* with 4-HC (500 μ M) decreased the number of metastatic nodules in the lung by 85%. Using this same model, we observed that in mice treated with 4-HC (10, 20 or 40 mg/Kg/day) orally during seven days prior to the injection of melanoma cells, the number of metastatic nodules in the lung decreased by 80% compared with the control group, which received methylcellulose.

Moreover, the antineoplastic and antimetastatic effect of 4-HC was evaluated in C57BL/6 mice implanted subcutaneously with B16-F10 cells by measuring: i) tumor size, ii) survival time, and iii) the number of spontaneous metastases in the lung. With this model we carried out two different protocols: in the first one 4-HC (10, 20 or 40 mg/Kg/day) was administered orally and in the second 4-HC (10, 20 or 40 mg/Kg/day) was co-administered with the antineoplastic drug cyclophosphamide (CY; 200 mg/Kg).

In the first protocol survival time was increased with the dose of 10 mg/Kg/day, while in the second survival time augmented with the doses of 10 and 20 mg/Kg/day. The administration of 4-HC (10 and 20 mg/Kg/day) decreased the tumor size with respect to the methylcellulose control, but the administration of the 4-HC together with CY did not modify tumor size in comparison with mice that only received CY. Additionally, it was observed that the doses of 10 and 20 mg/Kg/day reduced

the formation of spontaneous pulmonary metastases and that only the dose of 40 mg/Kg/day administered with CY reduced significantly the formation of spontaneous metastases.

Finally, we study the possible toxic effect of 4-HC in healthy mice that were given 4-HC orally for eight weeks. The biochemical assessment of renal function showed that 4-HC increased by 50% the levels of blood urea nitrogen and decreased urine levels of N-acetyl- β -glucosamidase, but it did not modify the glomerular filtration rate of creatinine or the levels of protein in urine. In the histological study of the kidney it was found that 4-HC induces: i) metaplasia cubique microvilli of glomerule's epithelial cells and ii) a decrement of microvilli, intracellular disorganization, picnosis, and lipid degeneration in the proximal tubule cells.

The biochemical assessment of liver damage showed that 4-HC does not change the levels of serum γ -glutamyl transaminase, but histological study indicated that the doses of 20 and 40 mg/Kg/day produce necrosis in centrolobulillar hepatocytes. Additionally, it was observed that the 4-HC induced hyperplasia and cytotoxicity of cytoplasmic in Clara cells of the lung, as well as vacuolization in type II pneumocytes in a dose-dependent manner.

Through this study we found that the 4-HC increases survival time and inhibits the formation of experimental and spontaneous metastases in a mouse model of melanoma, despite its toxic effects. The results suggest that the 4-HC could be useful as an adjuvant in melanoma therapy, although further studies are required to elucidate the mechanisms by which 4-HC exerts its antimetastatic, antineoplastic, and toxic effects.

I. ANTECEDENTES

1. CÁNCER

1.1. Generalidades.

1.1.1. Definición.

El término cáncer se utiliza para describir una anomalía genética que implica la mutación de genes, algunos de los cuales actúan normalmente suprimiendo o favoreciendo la continuidad del ciclo celular, por lo que su alteración da lugar a una división celular descontrolada y a la formación de tumores. Las células transformadas generalmente presentan la capacidad de invadir y proliferar en tejidos diferentes al de origen (Ruddon 1995). La presencia de células con capacidad invasiva, es diagnóstico suficiente para indicar malignidad (Loberg 2007). Sin embargo, el pronóstico y tratamiento de esta enfermedad depende de la localización anatómica en la que se encuentre, del tipo celular o histológico del que provenga y del avance de la enfermedad (Loberg 2007).

1.1.2. Epidemiología.

El cáncer constituye uno de los principales problemas de salud pública en todo el mundo, por tanto es una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad. Según el informe anual de la OMS (Organización Mundial de la Salud), en el año 2005 se registraron 7,6 millones de muertes a causa del cáncer. Más del 70% de las muertes por cáncer registradas en 2005 se produjeron en países de bajos y medianos ingresos. Se prevé que el número mundial de muertes por cáncer siga aumentando en todo el mundo y alcance los 9 millones en 2015 y los 11,4 millones en 2030. La OMS registró que en México en el 2005 el cáncer ocasionó la muerte de aproximadamente 64,000 personas, es decir, las muertes por cáncer correspondieron al 12.5% del total de defunciones y se estima que para el 2030 incremente al 13.8%.

Las metástasis tumorales son responsables de una gran proporción de las muertes por cáncer. 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.

1.1.3. Carcinogénesis.

La carcinogénesis es un proceso de múltiples etapas que culminan en la transformación de una célula normal en una célula cancerosa. Esta conversión requiere de múltiples mutaciones, principalmente en:

- Oncogenes, que son generados a partir de protooncogenes que codifican proteínas que controlan el crecimiento y diferenciación celular. Entre estos genes se encuentran *K-ras*, *N-ras*, *erb-B-2*, *erb-A*, *myc*, *c-fos*, *bcl-2*, etc. (Loberg 2007, Hanahan 2000).
- Genes supresores de tumor, cuyos productos están normalmente encargados de detener la división celular y de inducir apoptosis. Cuando se mutan estos genes la célula se divide sin control, tales el caso con mutaciones donde se pierde la función de: p53, p63, p73, pRb, p16 etc. (Loberg 2007, Hanahan 2000, Bourdon 2007).

Los factores que promueven la carcinogénesis pueden ser: i) externos, que incluyen a carcinógenos químicos, biológicos ó físicos; ii) internos, como defectos en el sistema inmune, predisposición genética (Loberg 2007, Hanahan 2000) o cambios epigenéticos (Jones 2007).

Sin importar cómo se originó el daño al genoma, los cánceres son el resultado de las mutaciones. Dichas mutaciones ocasionan que las células cancerosas compartan características en común como: i) inestabilidad genética; ii) potencial replicativo ilimitado (inmortalidad); iii) estimulación de la invasión y metástasis; iv) evasión de la muerte programada de la célula (apoptosis); y v) capacidad de crecer independientemente del estímulo por factores del crecimiento (Hanahan 2000). Pero debido a que existen diferentes mecanismos que promueven la carcinogénesis y que las estirpes celulares son diferentes, las neoplasias generadas varían en: a) tiempo de

Análisis del efecto antimetastásico *in vivo* de la 4-hidroxicumarina crecimiento; b) grado de diferenciación celular; c) detectabilidad; d) invasividad y potencial metastático; e) respuesta a tratamientos y pronóstico (Hanahan 2000).

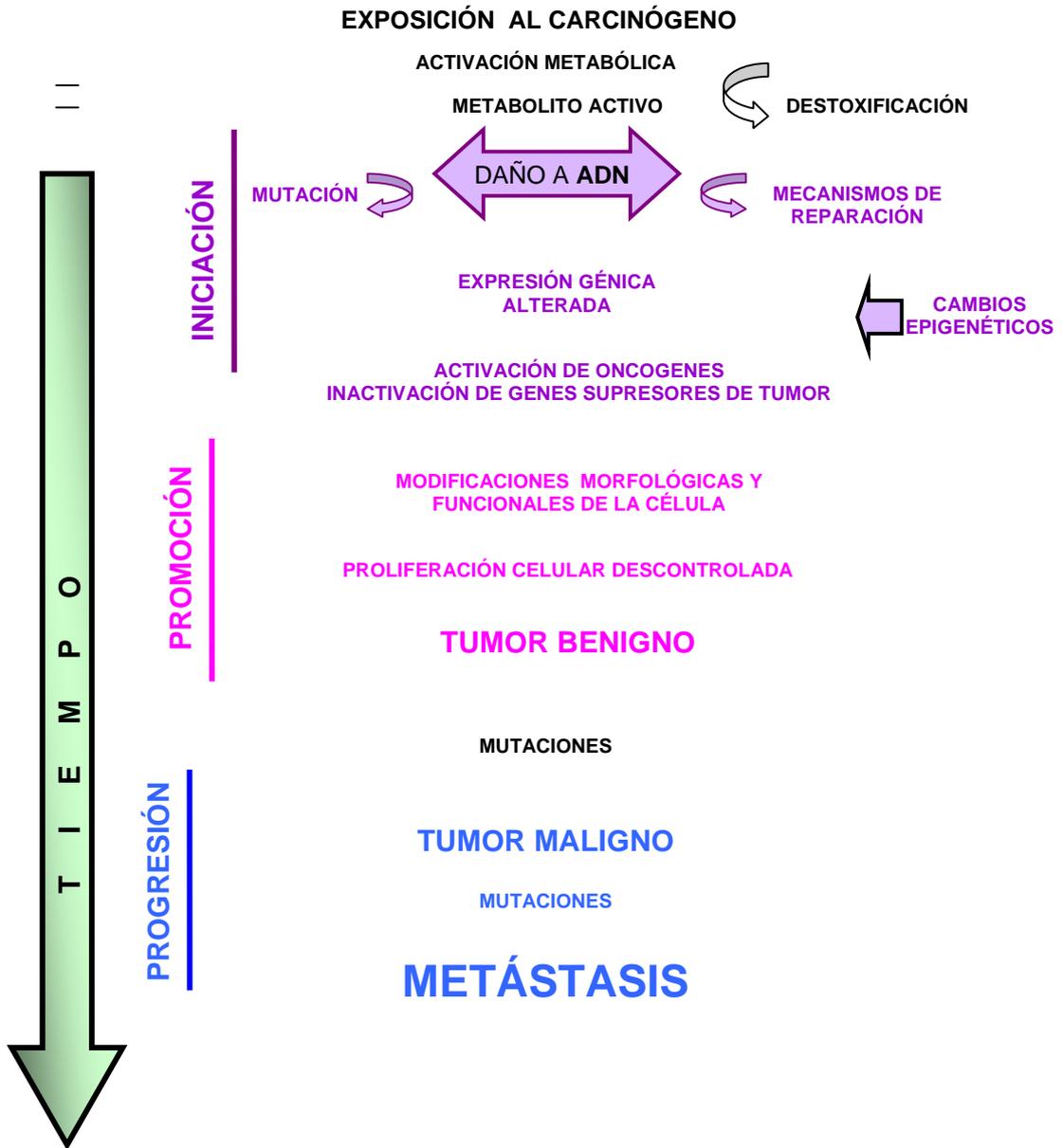
Diferentes trabajos experimentales han demostrado que existe una relación inversa entre la dosis del carcinógeno y el periodo de latencia, y al que algunos agentes pueden producir un tumor tras una administración única mientras otros requieren múltiples aplicaciones (Anisimov 2007). Esta variabilidad depende, no sólo de la potencia carcinogénica de los compuestos, sino también de la especie y naturaleza genética del individuo que padece la exposición (Anisimov 2007). El tiempo transcurrido tras la exposición al agente carcinogénico y el desarrollo de un tumor se ha dividido en las siguientes etapas (Esquema 1):

1. Iniciación. Es un proceso rápido mediante el cual el carcinógeno produce cambios permanentes en genes susceptibles de la célula diana. Se ha sugerido que los agentes promotores de la proliferación pueden interferir con el proceso de diferenciación que se lleva a cabo normalmente cuando una célula pasa de un estadio no divisorio a otro en el cual está lista para dividirse. Estos estímulos promotores del crecimiento actúan sobre células que aún pueden ser sensibles a factores inhibidores de crecimiento normal. Esto explica por qué algunas neoplasias presentan un carácter reversible, aún cuando los cambios moleculares sean irreversibles y permanezcan latentes hasta que otro estímulo induzca la proliferación (Anisimov 2007).

2. Promoción. Esta etapa se caracteriza por un estado de hiperproliferación o hiperplasia. Esta proliferación es selectiva sobre células iniciadas por un estímulo promotor y da origen a lesiones premalignas o tumores benignos. Los promotores generalmente son sustancias químicas exógenas, aunque también pueden ser

agentes endógenos como las hormonas. Cabe mencionar que además de la proliferación excesiva, la descendencia de células transformadas presenta una morfología, comunicación célula-célula y diferenciación anormal, que da lugar a una displasia. (Anisimov 2007).

3. Progresión. Durante esta etapa las lesiones premalignas se convierten en tumores malignos con la capacidad de invadir tejidos vecinos o distantes. En la progresión, las células neoplásicas adquieren gradualmente un fenotipo invasivo y eventualmente metastásico. Dicho fenotipo se genera tanto como consecuencia de alteraciones en la proliferación, adhesión y motilidad celular como del microambiente que rodea a las células transformadas (Anisimov 2007).



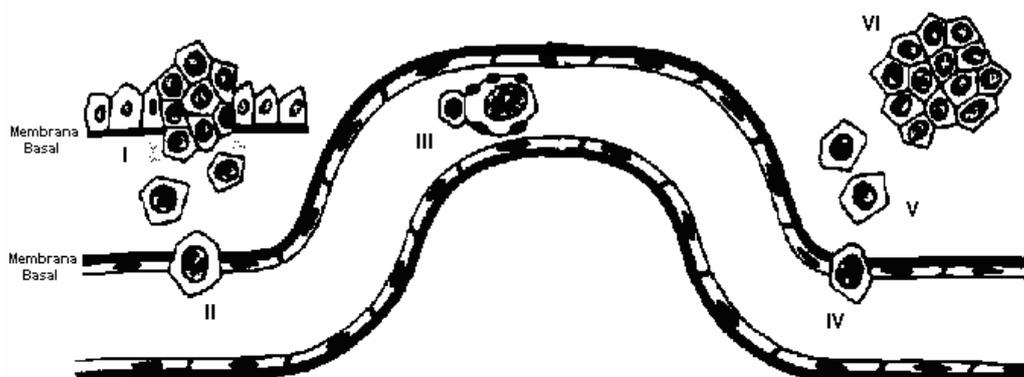
Esquema 1. Etapas del proceso de Carcinogénesis.

1.1.4. Metástasis.

Como ya se mencionó, los cambios genéticos inducen fenotipos diferentes. Una de las características que definen la malignidad de un tumor es la capacidad de invadir otros tejidos y formar metástasis. Las células tumorales son capaces de diseminarse a través del cuerpo mediante dos mecanismos: invasión y metástasis.

La invasión se refiere a la migración y penetración directa de células cancerosas en los tejidos vecinos. Las metástasis ó formación de tumores secundarios ocurre gracias a una serie de pasos consecutivos, los cuales deben ser completados eficientemente. En cada uno de estos pasos existe una cascada compleja de eventos de adhesión que pueden involucrar tanto células normales como células tumorales.

Para que se lleve a cabo la formación de tumores secundarios o metastásicos las células cancerosas, deben entrar a la circulación invadiendo 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 (Chambers 2002) (Esquema 2).



Esquema 2. Etapas del proceso de metástasis. I) Crecimiento tumoral y separación de células cancerosas a partir del tumor primario. II) Migración hacia la vasculatura. III) Interacciones con células plaquetarias y componentes celulares de 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.

Los sitios secundarios más comunes para la proliferación de metástasis de cualquier tipo de cáncer son los pulmones, el hígado, nódulos linfáticos, médula 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 tumorales después de haber sido liberadas del tumor primario (Hoon 2006; Loberg 2007). Sin embargo, las explicaciones hemodinámicas no aclaran totalmente la predilección de las células tumorales por un órgano específico, por lo que se ha propuesto la existencia de interacciones selectivas entre la célula tumoral y el microambiente del órgano hospedero (Hoon 2006).

Aunque las células tumorales pueden adquirir un fenotipo invasivo el proceso de metástasis es altamente ineficiente; ya que sólo el 0.1 % de las células cancerosas que entran a la circulación tienen la capacidad de formar un tumor secundario (Weiss

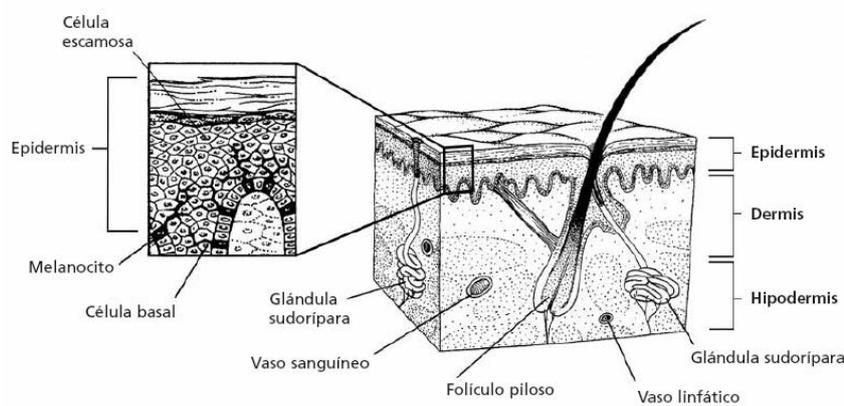
Análisis del efecto antimetastásico *in vivo* de la 4-hidroxycumarina 1990). Por lo tanto, encontrar células cancerosas en el torrente sanguíneo, no es indicativo de la formación de metástasis.

En la actualidad aún no se han identificado todos los cambios genéticos y moleculares que las células tumorales requieren para poder invadir y metastatizar, pero se ha encontrado que las células tumorales presentan alteraciones en la adhesión célula-célula, en la adhesión célula-sustrato y/o en la motilidad celular (Eccles 2007; Hoon 2006). El estudio de los receptores celulares que median dichos eventos de adhesión son importantes en la búsqueda de terapias que inhiban la diseminación tumoral, es decir, la inhibición de la capacidad invasiva constituye un blanco para la generación de nuevos tratamientos para el cáncer (Eccles 2007).

1.1.5. Cáncer de Piel.

1.1.5.1. Generalidades.

La piel es la cubierta externa del cuerpo que se encarga de proteger todos los órganos de agresiones físicas, químicas y biológicas. Está formada de tres capas principales llamadas: epidermis, dermis e hipodermis (Esquema 3). La epidermis está compuesta de células escamosas (ó queratinocitos), células basales y melanocitos, dichas células se reemplazan continuamente y las más viejas se desplazan y eliminan hacia el exterior de la piel. Las células escamosas y los melanocitos producen sustancias que contribuyen a la protección que da la piel al cuerpo; queratina y melanina respectivamente. La dermis contiene folículos pilosos, glándulas sudoríparas, vasos sanguíneos y nervios. La hipodermis esta compuesta por fibroblastos que producen colágena y por lipocitos (Ross 1992).



Esquema 3. Representación de las capas de la piel.

(Fuente: Melanoma. Guías de tratamiento para los pacientes. ACS y NCCN. 2005.)

Los cánceres de la piel se dividen en dos tipos: melanoma y no-melanoma. El cáncer no-melanoma es el más común de los cánceres de piel y se llama así por que se produce de células de la piel que no son melanocitos, es decir se origina a partir de la transformación de células escamosas o basales. El melanoma se origina de la transformación de melanocitos principalmente de piel y en menor cantidad de mucosas y otros sitios en donde existen melanocitos viscerales (Melnikova 2005).

1.1.5.2. Melanoma.

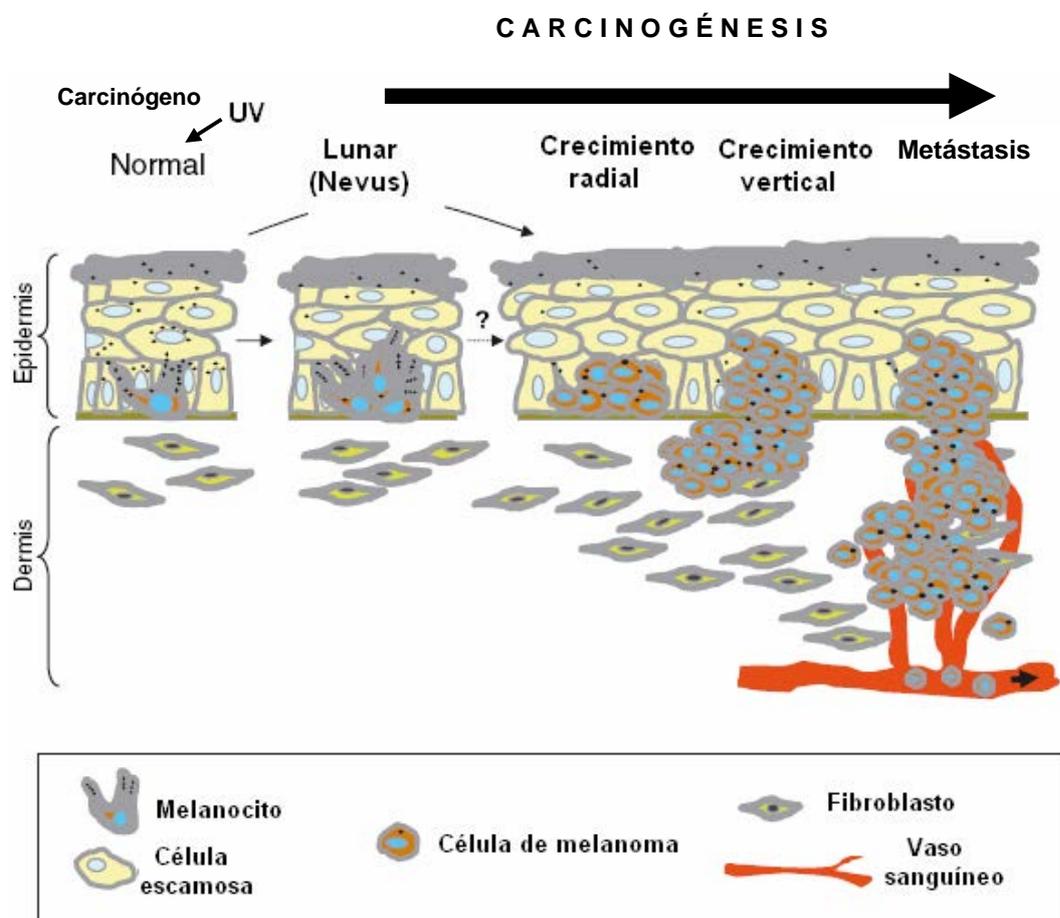
La causa del melanoma es multifactorial pero la radiación ultravioleta es el principal factor etiológico. La incidencia por la radiación ultravioleta ha crecido a nivel mundial, debido a la mayor exposición solar en las playas, a la moda en el vestir y la destrucción de la capa de ozono (Melnikova 2005). Como fuente del melanoma también participa la herencia, habiéndose identificado un locus de susceptibilidad en el cromosoma 9, el cual tiene relación con los cambios tempranos en la transformación

Análisis del efecto antimetastásico *in vivo* de la 4-hidroxicumarina maligna. Por otro lado, se han encontrado correlaciones con la exposición a la luz y deleciones en el brazo largo del cromosoma 11 y el corto del cromosoma 1 (Franks 1998; Ichihashi 2003). Otros cambios que se han reportado que dan lugar al melanoma, son mutaciones en los genes que codifican proteínas que participan en la regulación de: i) el ciclo y crecimiento celular (p16, p14^{ARF}, INK4a, p53, Bcl-2, TGF- β) y ii) en la adhesión y motilidad celular (E-cadherina, N-cadherina, integrinas (α V β 3), proteínas G pequeñas (RhoC, RhoA, ROCK1-2), ERK1, FAK y metaloproteasas) (Gaggioli 2007). Por esto, se ha propuesto que la capacidad metastásica de los melanocitos transformados es consecuencia de los cambios en la expresión y activación de las proteínas que participan en la regulación de la adhesión y migración celular (Gaggioli 2007, Melnikova 2005).

Los melanocitos transformados presentan dos patrones de crecimiento como consecuencia de los cambios acumulados durante el proceso de carcinogénesis; es decir, los melanocitos transformados pueden crecer de forma radial (intraepidérmica) y posteriormente, crecer de forma vertical (intradérmica) (Esquema 4) (Gaggioli 2007).

En la fase de crecimiento radial, que puede durar meses o incluso años, la tumoración está limitada a la epidermis sin presentar capacidad de producir metástasis, en esta situación la extirpación quirúrgica es curativa. En la fase de crecimiento vertical, la tumoración invade la dermis con la capacidad de producir metástasis.

Dependiendo de la forma y el avance de crecimiento del melanoma, esta enfermedad presenta diferentes estadios o etapas clínicas (0, I, II, IIIA, IIIC Y IV). La determinación de la etapa en que se encuentra el melanoma ayuda a establecer un mejor diagnóstico y tratamiento (Gaggioli 2007).



Esquema 4. Carcinogénesis del melanoma. Los melanomas se inician con la transformación maligna de los melanocitos, que puede apreciarse como un lunar. En la epidermis los melanocitos transformados proliferan de forma intraepidérmica (crecimiento radial) y de forma gradual pueden presentar un crecimiento intradérmico (crecimiento vertical). La invasión de la dermis por los melanocitos es el primer paso para la formación de metástasis. (Fuente: Gaggioli 2007.)

La extirpación del melanoma cuando está limitado a la epidermis y no sobrepasa la membrana basal supone una supervivencia del 100%. Cuando el melanoma rompe la membrana basal e inicia su fase de crecimiento vertical la presencia o no de metástasis tiene un valor pronóstico en relación a la supervivencia.

Desafortunadamente, de los tumores malignos, el melanoma es el que mayor tendencia tiene a metastatizar a tejidos vecinos o ganglios, por vía linfática; o a otros órganos vía torrente sanguíneo, principalmente al pulmón e hígado (Ortega 2003).

La fundación de investigación del melanoma de los Estados Unidos de América en el 2007, reportó que si el melanoma se diagnostica oportunamente en etapas avanzadas, el 100% de la población tiene la posibilidad de sobrevivir de 5 a 10 años. Sin embargo, debido a su difícil diagnóstico solo del 15 al 69% llegan a sobrevivir de 5 a 10 años en etapas avanzadas. Desafortunadamente, en etapas metastásicas solo del 3 al 9% sobreviven hasta 5 años. La fundación también declaró que, a pesar de los avances en el manejo del cáncer, el melanoma es el responsable del 71% de las muertes originadas por cáncer de piel.

El melanoma metastásico en México constituye el 2% de todas las neoplasias malignas y el 11% de todos los canceres de piel (Rosas 2003). La OMS reportó en el 2005 que el melanoma ocasionó 2060 muertes en México y que esta cifra se incrementará al doble en los próximos 10 años.

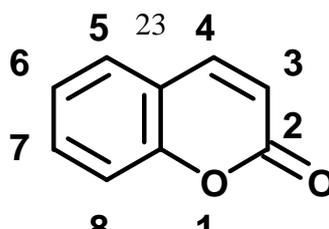
Dado que el melanoma metastásico es por lo general incurable, la finalidad de los tratamientos es paliativa. Las técnicas utilizadas incluyen la quimioterapia, la radioterapia, la cirugía y la inmunoterapia. Los objetivos de la quimioterapia son retardar e incluso evitar la proliferación, propagación y metástasis de células neoplásicas.

La quimioterapia más utilizada para el tratamiento del melanoma consiste en la administración de un solo agente quimioterapéutico (dacarbazina) que consigue respuestas parciales en el 15-25% de los pacientes, pero que generalmente suelen ser de corta duración (Eggermont 2004). Por lo cual, además de recurrir al uso de diferentes terapias simultáneamente, se ha optado por utilizar antineoplásicos (Cisplatino, Tamoxifen, Carmustina, Vinblastina, Ciclofasamida, Lomustina, Procarbazina, etc.) y adyuvantes como interleucinas (Interferón α , IL-2) (Eggermont 2004; Mandará 2006). Sin embargo, a pesar del incremento en la respuesta, potenciada por el uso de adyuvantes, hasta el momento, no se ha encontrado un fármaco específico para el tratamiento efectivo del melanoma, debido principalmente a que las diferencias metabólicas entre las células normales y las cancerígenas son mínimas, lo cual origina que la mayoría de los tratamientos antineoplásicos sean altamente tóxicos para células normales (Mandará 2006). Debido a lo anterior, es necesario buscar tratamientos más efectivos y con menos efectos adversos para el tratamiento de ésta enfermedad.

1.1.6. Cumarinas.

1.1.6.1. 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 5). La cumarina tiene un peso molecular de 146.15 g/mol, punto de fusión



Análisis del efecto antimetastásico *in vivo* de la 4-hidroxycumarina es de 68-70°C, punto de ebullición de 303°C y es soluble en etanol, cloroformo y aceites (Egan 1990).

Las cumarinas se encuentran libres en la naturaleza como metabolitos secundarios de una gran cantidad de microorganismos y plantas como el haba de tonka, el clavo, el trébol dulce, y en algunos aceites esenciales como el de lavanda (Nair 1991). Hasta la fecha se han encontrado más de 800 especies de plantas y microorganismos que producen cumarinas y en el Programa Nacional de Toxicología de los Estados Unidos de América de 1993 se describieron más de 100 derivados cumarínicos diferentes. 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, virustáticos e incluso como citostáticos (Scheel 1972), se extrapoló del conocimiento de su capacidad en plantas para inhibir la germinación de las semillas y el crecimiento de la raíz (Riordan 1954). Se ha encontrado que la cumarina presenta efectos sedativos-hipnóticos, antipiréticos y anti-inflamatorios por lo que se ha utilizado en el tratamiento de enfermedades reumáticas (Casley 1973).

1.1.6.2. Actividad antineoplásica de la cumarina.

Derivados cumarínicos como la warfarina y el dicumarol con actividad anticoagulante, comenzaron a utilizarse en el tratamiento de neoplasias para prevenir la formación de estroma de fibrina alrededor del tumor. Debido a que se ha descrito cierta asociación de la fibrina con los tumores y su importancia en la producción de metástasis. En protocolos clínicos se encontró que la warfarina, en combinación con otros tratamientos, alarga al doble la supervivencia de pacientes con carcinoma pulmonar (Zacharski 1984). 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 (Hilgard 1978) como experimentales (Matt 1981; Maucher 1993; von Angerer 1994).

Sin embargo, el efecto antineoplásico de los derivados cumarínicos no se debe a sus propiedades anticoagulantes. Ya que la administración de vitamina K, que antagoniza la acción anticoagulante de derivados cumarínicos como la warfarina, no antagoniza el efecto antineoplásico (Donati 1986). La cumarina, aún cuando carece de efecto anticoagulante, presentó actividad antitumoral en protocolos clínicos de melanoma (Thornes 1982; Zänker 1984), carcinoma renal (Dexeus 1990) y carcinoma prostático (Mohler 1994). En estudios *in vitro* se observó que la cumarina inhibe el crecimiento de diferentes líneas tumorales (Marshall 1994a; López 2004; Jiménez 1999).

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 un incremento en los niveles de transaminasas en suero, efecto que se revirtió al suspender el tratamiento (Marshall 1994b). Los mecanismos 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 células tumorales; y 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 cambios en la expresión de oncogenes. La 7-hidroxicumarina, un metabolito de la cumarina disminuye los niveles de ARNm de los oncogenes *ras* y *myc* en células transfectadas con dichos genes (Nakayasu 1988). De manera similar, la 7-hidroxicumarina disminuye la expresión de la ciclina D1 en células A427 de carcinoma pulmonar humano sin alterar significativamente la expresión de las ciclinas A y E, induciendo el arresto del ciclo celular en G1/S (Jiménez 2001). Respecto a la acción inmunoestimulante, se ha reportado que la cumarina estimula la actividad fagocítica de macrófagos (Piller 1978; Hardt 1983) y sinergiza la secreción de $TNF\alpha$, IL-1 β e IL-6 inducida *in vitro* por LPS (Stuhlmeier 1991). En la cepa C57BL/6 la cumarina a la dosis de 80 mg/Kg, incrementa la actividad fagocitaria de macrófagos peritoneales hasta en un 160 % respecto a los controles (Orozco 2000).

1.1.6.3. 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 en humanos es la hidroxilación en la posición 7 (Ritschel 1977; Lake 1999). Sin embargo, la cantidad de 7-hidroxicumarina formada

Análisis del efecto antimetastásico *in vivo* de la 4-hidroxicumarina muestra una gran variabilidad interindividual e interespecie (Rautio 1992; Ujji 2002; Xu 2002; Cohen 1979, Wood 1974).

Dicha variación en parte es atribuida al polimorfismo genético de la enzima responsable de la 7-hidroxilación en el hígado: el citocromo P450 (CYP) 2A6 (Ujji 2002; Xu 2002). Además, otras enzimas de la familia CYP 2A (como CYP 2A13) podrían incrementar la variabilidad, al participar en el metabolismo extra-hepático de la cumarina (Von Weymarn 2003). Otras cumarinas hidroxiladas han sido detectadas *in vivo* (Ritschel 1979, Shilling 1969, Moran 1987) e *in vitro* (Cohen 1979, Egan 1990, Fentem 1993, Lake 1999; Rautio 1992; Ujji 2002; Xu 2002; Von Weymarn 2003) como metabolitos minoritarios; sin embargo, no se conocen las enzimas involucradas en su formación, ni si tienen actividad biológica (Von Weymarn 2001).

En la tabla 1 se describen los metabolitos de la cumarina reportados tanto *in vivo* como *in vitro* en diferentes especies y en el esquema 6 se ejemplifican las principales vías metabólicas de la cumarina.

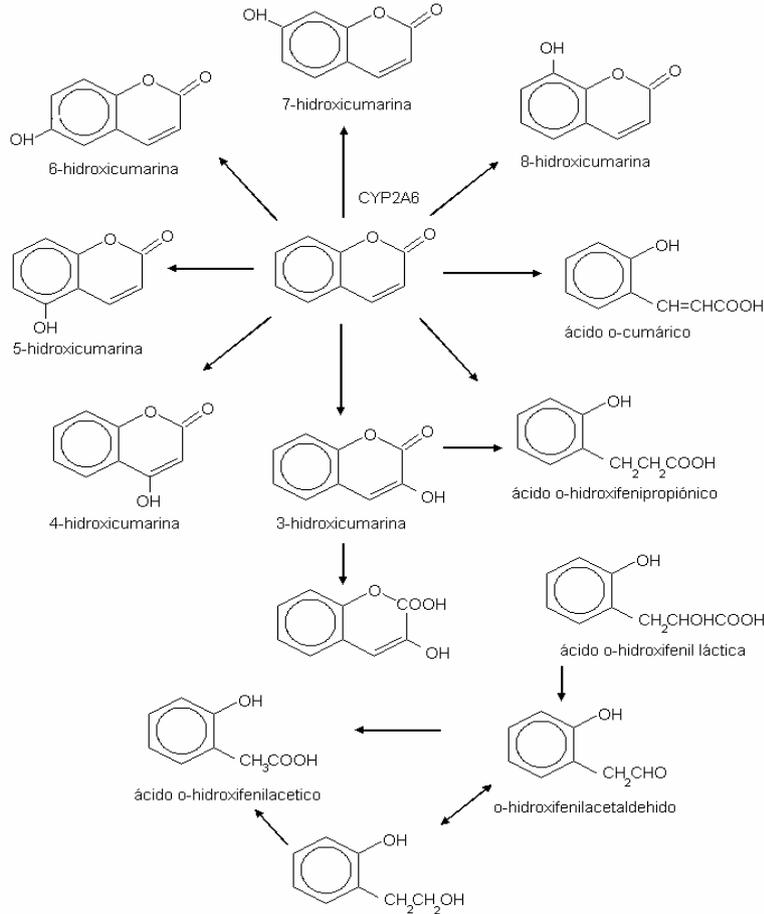
Tabla 1. Metabolitos de la cumarina de diferentes especies determinados a partir de muestras de orina y metabolitos determinados a partir de estudios con microsomas de hígado *in vitro*.

		7-hidroxicumarina	Otros metabolitos
Humano	<i>in vivo</i>	98.6-36 %	o-HPLA; o-HPAA; 3-HC
	<i>in vitro</i>	79%	3-HC; 4-HC; 6-HC
Ratón	<i>in vivo</i>	0.9-12.5%	ND
	<i>in vitro</i>	2-40%	3-HC; 4-HC; 6-HC
Rata	<i>in vivo</i>	0.3-0.5%	3-HC; 4-HC; 6-HC
	<i>in vitro</i>	0.4%	3-HC; 4-HC; 5-HC; 6-HC; 8-HC; 6,7-DHC

Análisis del efecto antimetastásico *in vivo* de la 4-hidroxicumarina

Conejo	<i>in vivo</i>	10-16%	3-HC; 4-HC; 5-HC; 6-HC; 8-HC; o-HPLA; o-HPAA
	<i>in vitro</i>	12%	3-HC; 4-HC; 5-HC; 6-HC; 8-HC; o-HPLA; o-HPAA
Gato	<i>in vivo</i>	19%	ND
	<i>in vitro</i>	19%	ND

HC= Hidroxicumarina; DHC= Dihidroxicumarina; o-HPLA= ácido o-hidroxifenil láctico; o-HPAA= ácido o-hidroxifenil acético; ND= No determinado. (Modificado de Thornes 1997, Cap1 y 3)



Esquema 6. La cumarina puede ser metabolizada a diferentes derivados monohidroxilados (Modificada de Thornes 1997).

En el ratón aún no se conocen todos los metabolitos de biotransformación de la cumarina. Se ha descrito que una de las principales rutas metabólicas lleva a la formación de o-hidroxifenilacetaldehído a partir de la 3,4 epoxidación de la cumarina (Aoki 2006). Como ya se mencionó, en humanos la 7-hidroxilación de la cumarina es metabolizada por CYP2A6, mientras que en ratón es CYP2A5. Estas dos isoformas comparten una identidad del 80% en su secuencia de aminoácidos (Aoki 2006). Las

Análisis del efecto antimetastásico *in vivo* de la 4-hidroxicumarina
diferencias entre las dos isoformas explican parcialmente por que en ratones la 7-
hidroxilación no es la principal vía metabólica de la cumarina. Por otro lado, se ha
observado gran variabilidad interespecie y una alta inconstancia en la 7-hidroxilación
de la cumarina en estudios con diversas cepas de ratones (Tabla 2) (Lush 1978; Wood
1974). Las diferencias en las concentraciones de 7-hidroxicumarina entre las cepas de
ratón que se observa en la tabla 2, se explica parcialmente a las diferencias en: i) la
actividad de la hidroxilasas, ii) síntesis o inducción del CYP450, y iii) mecanismos de
excreción (Wood 1974).

Tabla 2. Actividad de la 7-hidroxilación de la cumarina en preparaciones de hígado y la excreción de 7-hidroxicumarina en orina de diferentes cepas de ratón.

Cepa	Producción <i>in vitro</i> de 7-hidroxicumarina (pmol/mg hígado/min)	Excreción <i>in vivo</i> de 7-hidroxicumarina (nmol/22h)
C57BL/6	60	77
C57L	451	304
DBA/1	267	782
DBA/2	246	735

Análisis del efecto antimetastásico *in vivo* de la 4-hidroxicumarina

129	415	499
AKR	38	32
CBA/Ca	146	416
C3H/He	45	93

(Modificada de Thornes 1997, Capítulo 3)

En ratas, tanto *in vivo* como *in vitro* (utilizando microsomas de hígado de rata), se ha demostrado que la 3-hidroxilación es la principal vía metabólica, seguida de la formación del ácido o-hidroxifenilacético (o-HPAA) y el o-hidroxifenilacetaldehído (o-HPA) (Zhuo 1999; Vassallo 2004a). La gran cantidad de 3-hidroxicumarina producida en ratas se ha relacionado con la hepatotoxicidad que desarrolla esta especie tras el tratamiento con cumarina (Zhuo 1999; Vassallo 2004b).

A pesar de que se ha identificado que en ratones (Zhuo 1999) y humanos (van Iersel 1994) se produce 3-hidroxicumarina, esta no es la principal vía metabólica. Aunado a la baja cantidad de 3-hidroxicumarina producida en ratones y humanos también se ha relacionado la poca hepatotoxicidad, con el elevado metabolismo de detoxificación que presentan estas dos especies en comparación con la rata (Lake 1999).

Se ha propuesto que la cumarina sea un profármaco, ya que algunos de los productos de biotransformación de la cumarina pueden tener actividad inmunoestimulante, antineoplásica y antimetastásica mayor que la cumarina misma. Por ejemplo, la 7-hidroxicumarina es un inhibidor de la proliferación *in vitro* de líneas tumorales, más potente que la cumarina misma (Marshall 1994a; Jiménez 1999). A concentraciones iguales, la 7-hidroxicumarina es un inductor más efectivo de la apoptosis que la cumarina en células de cáncer pulmonar (López 2004).

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 (Marshall 1994b; Egan 1990).

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 (eventos esenciales para la formación de metástasis). Por ejemplo, el tratamiento *in vitro* con 7-hidroxicumarina inhibe la adhesión de células de melanoma a colágena tipo I (Velasco 1998) y la migración de células de adenocarcinoma de rata en una matriz de colágena (Lü 1996). En particular, en nuestro laboratorio hemos estudiado la actividad *in vitro* de la 4-hidroxicumarina utilizando células B16-F10 de melanoma murino.

1.1.6.4. Actividad de la 4-hidroxicumarina.

Estudios *in vitro* con la 4-hidroxicumarina han descrito que induce alteraciones morfológicas en la línea celular de melanoma murino B16-F10, sin producir alteraciones en las líneas celulares no malignas de fibroblastos B82 (Velasco 2003) ó L929 (Salinas 2005). Dichas modificaciones morfológicas correlacionan con la desorganización del citoesqueleto de actina y la disminución del contenido de fibras de estrés, lamelipodios y filipodios. También se reportó que el tratamiento con 4-hidroxicumarina induce en células B16-F10 disminuciones en: i) la adhesión a moléculas de matriz extracelular, ii) la migración celular y iii) la fosforilación en residuos de tirosinas de diversas proteínas (Velasco 2003).

La adhesión y migración celular son fenómenos coordinados por la activación de GTPasas, complejos multimoleculares (complejos de adhesión focal) y segundos mensajeros, mediante diferentes vías de transducción de señales (Lodish 2000; Pawlak 2001). Tratando de esclarecer el mecanismo por el cual la 4-hidroxicumarina produce dichos efectos sobre la adhesión y migración, se observó que el tratamiento con 4-hidroxicumarina (500 μ M) en células B16-F10 disminuye tanto la expresión de paxilina (Salinas 2005) como la de su mRNA (Salinas 2006). Paxilina es una proteína adaptadora que se activa de acuerdo a su estado de fosforilación y se recluta en los complejos de adhesión focal como resultado del reconocimiento de las moléculas de matriz extracelular por las integrinas, para regular la organización del citoesqueleto de actina y la motilidad celular (Turner 1994; Schaller 1995). Además, la 4-hidroxicumarina modifica la distribución de paxilina en las placas de adhesión focal, lo cual se correlaciona con la disminución en su estado de activación inducido tras el tratamiento (Salinas 2005). También se encontró que en células B16-F10 la 4-hidroxicumarina disminuye la cantidad de las GTPasas Rho y Rac activas (Salinas 2006).

Los efectos reportados de la 4-hidroxicumarina sobre proteínas que participan en la regulación de la adhesión y migración, pueden ser parcialmente responsables de afectar la formación de metástasis.

Aun no se conocen todos los mecanismos por los cuales la 4-hidroxicumarina produce los efectos reportados. Pero, debido a que la organización del citoesqueleto de actina y la adhesión controlan la migración celular, es posible que los efectos inducidos por la 4-hidroxicumarina resulten en la disminución o pérdida de la capacidad metastásica de las células B16-F10. Por lo tanto, es importante analizar *in*

vivo si la 4-hidroxicumarina tiene un efecto antineoplásico y/o anitmetastásico. Los antecedentes sugieren que algunos de los productos de biotransformación de la cumarina, tales como la 4-hidroxicumarina pueden complementar terapias antineoplásicas que permitan incrementar la supervivencia y la calidad de vida.

I. OBJETIVOS.

a) OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto antimetastásico, antineoplásico y la posible toxicidad de la 4-hidroxicumarina *in vivo*, utilizando un modelo murino de melanoma.

b) OBJETIVOS PARTICULARES

- i) Analizar el número de metástasis experimentales en ratones C57BL/6, al implantar células B16-F10 tratadas *in vitro* con 4-hidroxicumarina.
- ii) Analizar el número de metástasis experimentales en ratones C57BL/6 previamente tratados vía oral con 4-hidroxicumarina, al administrar células B16-F10 sin tratamiento *in vitro*.
- iii) Estudiar si la 4-hidroxicumarina es capaz de incrementar el tiempo de supervivencia de ratones C57BL/6 y disminuir el tamaño de un tumor implantado subcutáneamente.
- iv) Estudiar el efecto de la 4-hidroxicumarina sobre el número de metástasis espontáneas en el modelo murino utilizado.
- v) Analizar los efectos adversos que podrían presentarse tras el tratamiento crónico con la 4-hidroxicumarina, evaluando daño renal y hepático.

II. HIPÓTESIS

El tratamiento *in vivo* con la 4-hidroxicumarina disminuirá el número de metástasis y aumentará el tiempo de supervivencia de ratones C57BL/6 implantados con células tumorales B16-F10.

I. MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO.

Cultivo Celular.

Las células de melanoma murino B16-F10 y los fibroblastos no malignos L929 (ATCC) que se utilizaron en este estudio se cultivaron en cajas de cultivo de 80 cm² de área (Nunc) con medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco) y una mezcla de antibióticos (penicilina 50 µg/mL, estreptomina 50 µg/mL y neomicina 100 µg/mL, Gibco). Se incubaron en una atmósfera de 5% de CO₂ y temperatura constante de 37 °C (Incubadora Nuair). Las células se cosecharon con Tripsina/EDTA (0.05%/0.5 mM, Gibco) y se contaron con un hematocitómetro donde se evaluó simultáneamente la viabilidad por exclusión de azul tripán. Para los ensayos se utilizaron cultivos con viabilidad mayor o igual al 95%.

Animales de experimentación.

Para la evaluación del efecto antimetastásico de las células B16-F10 se utilizaron ratones macho de la cepa singénica C57BL/6 de 7-9 semanas de edad (Harlan). Los ratones se alimentaron *ad libitum* con nutricubos (Purina Ralston) y agua desionizada acidificada (pH 2.5).

TRATAMIENTOS CON LA 4-HIDROXICUMARINA

Tratamiento in vitro.

En el tratamiento *in vitro* las células B16-F10 se expusieron a 4-hidroxicumarina (SIGMA) 500 μ M ó al vehículo (etanol 0.75%), durante 24 h. Como diluyente se utilizó medio RPMI sin suero.

Tratamientos in vivo.

Para la evaluación del efecto de la 4-hidroxicumarina (4-HC) se siguieron dos protocolos. Primero se evaluó el efecto de diferentes dosis de 4-HC, posteriormente se evaluó el efecto de la administración conjunta de la 4-HC con ciclofosfamida (CY).

Los tratamientos *in vivo* solo con 4-HC consistieron en administrar diariamente por vía oral 0.1 mL de 4-HC (40, 20 ó 10 mg/Kg)/10 g de peso de ratón/día ó 0.1 mL metilcelulosa al 0.2% en agua /10 g de peso de ratón, mediante agujas de acero inoxidable calibre 18X1-1/2 pulgadas de longitud con punta en bola de 2.25 mm (Popper & sons, Inc).

Los tratamientos con 4-HC suministrados conjuntamente con CY, consistieron en administrar una dosis única de CY (0.1 mL de CY 200 mg/Kg/10 g de peso de ratón) vía intraperitoneal y diariamente por vía oral 0.1 mL de 4-HC (40, 20 ó 10 mg/Kg)/10 g de peso de ratón/día. Como control de la administración conjunta de la 4-HC y la CY se suministraron los respectivos vehículos 0.1 mL de

metilcelulosa al 0.2% en agua/10 g peso de ratón/día y 0.1 mL de solución salina isotónica/10 g peso de ratón/dosis única.

EVALUACION DEL EFECTO ANTIMETASTÁSICO Y ANTINEOPLÁSICO DE LA 4-HIDROXICUMARINA.

a) Ensayo de metástasis experimentales a pulmón con células tratadas in vitro con 4-hidroxicumarina.

La capacidad metastásica fue evaluada utilizando el modelo de metástasis experimental, el cual consiste en inyectar en la vena lateral de la cola de ratones singénicos C57BL/6, 0.1 mL de una suspensión conteniendo 10^6 células B16-F10 previamente tratadas *in vitro* con 4-hidroxicumarina 500 μ M ó etanol 0.75 %. Después de tres semanas de la inyección intravenosa se sacrificaron los ratones por dislocación cervical y se extrajeron los pulmones. Se cuantificaron los nódulos metastásicos macroscópicos en el pulmón con un microscopio estereoscópico. Los datos experimentales se analizaron con el software GraphPad Prism 3, utilizando t de Student con corrección de Welch para varianzas heterogéneas y se consideraron diferencias significativas de $p < 0.05$ con respecto al control.

b) Ensayo de metástasis experimentales a pulmón en ratones con administración oral de 4-hidroxicumarina.

Utilizando el modelo de metástasis experimentales descrito arriba, se evaluó la capacidad metastásica de las células B16-F10 en ratones que recibieron 4-hidroxicumarina. Los ratones fueron tratados vía oral con 4-hidroxicumarina (10, 20 ó 40 mg/Kg/día) ó el vehículo (0.1 mL de metilcelulosa 0.2%/10 g de peso de ratón) durante los 7 días previos a la inoculación vía intravenosa de células sin tratar. Después de tres semanas, se cuantificaron los nódulos metastásicos macroscópicos en los pulmones con un microscopio estereoscópico. Para evaluar diferencias entre los grupos, los datos experimentales se analizaron con el software GraphPad Prism 3, utilizando el análisis de varianza de una vía y la prueba de Bonferroni. Se consideraron diferencias significativas de $p < 0.05$ con respecto al control.

c) *Ensayo de supervivencia y metástasis espontáneas con administración oral de 4-hidroxicumarina.*

Se utilizaron ratones con implantación subcutánea de células B16-F10 para evaluar el número de metástasis espontáneas, el tamaño del tumor y la supervivencia. Ratones singénicos C57BL/6 fueron inoculados por vía subcutánea (s.c.) con 0.2 mL de una suspensión conteniendo 2×10^5 células B16-F10. Después de tres semanas de la inyección s.c. se midió el tamaño del tumor con ayuda de un vernier. Se seleccionaron los ratones que presentaron un tumor de entre 3 y 6 mm de diámetro y se distribuyeron en grupos por estratos balanceados de acuerdo a su peso (Tabla 3). Los grupos experimentales se describen en la tabla 3.

Tabla 3. Tratamientos administrados a cada grupo de ratones para realizar el ensayo de supervivencia, tamaño de tumor y metástasis espontáneas a pulmón.

Grupo	n	Tratamiento
I	25	Control (0.1 mL de metilcelulosa 0.2%/10 g de peso/día y 0.1 mL de solución salina isotónica /10 g de peso/dosis única)
II	6	4-hidroxicumarina 10 mg/Kg/día
III	6	4-hidroxicumarina 20 mg/Kg/día
IV	7	4-hidroxicumarina 40 mg/Kg/día
V	24	Ciclofosfamida 200 mg/Kg/ dosis única
VI	13	4-hidroxicumarina 10 mg/Kg/día y Ciclofosfamida 200 mg/Kg/ dosis única
VII	14	4-hidroxicumarina 20 mg/Kg/día y Ciclofosfamida 200 mg/Kg/ dosis única
VIII	14	4-hidroxicumarina 40 mg/Kg/día y Ciclofosfamida 200 mg/Kg/ dosis única

El efecto de los tratamientos sobre la supervivencia se estudió llevando un control del día de muerte de cada ratón y se graficaron los decesos de cada grupo en gráficos de Kaplan-Meier. Los datos se analizaron estadísticamente con el método de Mantel-Cox estableciendo un α de 0.05.

Para analizar el efecto de los tratamientos sobre el tamaño del tumor se midió el diámetro del tumor dos veces por semana con ayuda de un vernier. Cuando el tumor no adquirió una forma circular se tomaron mediciones de los ejes mayor y menor y su promedio se tomó como el valor del diámetro para calcular el volumen del tumor. Los datos se analizaron a través del análisis de varianza para determinar si había diferencias estadísticas entre los tratamientos estableciendo

un α de 0.05. Posteriormente se identificó las diferencias entre los grupos mediante la prueba de Bonferroni.

El efecto de los tratamientos sobre el número de metástasis espontáneas se evaluó cuantificando con ayuda de un microscopio estereoscópico el número de nódulos metastásicos macroscópicos en los pulmones de ratones que fallecían a lo largo del experimento. Los datos se analizaron con análisis de varianza de una vía y la prueba de Dunett para determinar si había diferencias estadísticas entre los tratamientos y se consideraron diferencias significativas de $p < 0.05$ con respecto al control.

EVALUACION DE LA TOXICIDAD DE 4-HIDROXICUMARINA.

Para evaluar el posible efecto tóxico de la 4-hidroxicumarina en riñón, pulmón e hígado; se formaron cuatro grupos de ratones C57BL/6 sanos (sin implantación de células B16-F10) distribuidos por estratos balanceados de acuerdo a su peso corporal. A los cuatro grupos se les administró diariamente 4-hidroxicumarina vía oral durante 8 semanas (Tabla 4).

Tabla 4. Tratamientos administrados a cada grupo de ratones para analizar el efecto tóxico de la 4-hidroxicumarina.

Grupo	n	Tratamiento
i	6	0.1mL de metilcelulosa 0.2% /10 g de peso/día
ii	6	4-hidroxicumarina 10 mg/Kg/día
iii	6	4-hidroxicumarina 20 mg/Kg/día

Con el fin de llevar un seguimiento semanal del funcionamiento renal, los ratones se colocaron cada 7 días en jaulas metabólicas (Nalgene) para recolectar muestras de orina de 24 h. Por otro lado también se tomaron muestras de sangre cada semana para complementar el análisis funcional del riñón y del hígado. Con las muestras de sangre y orina se evaluó la funcionalidad renal y hepática, por medio de determinaciones de parámetros bioquímicos. Con los datos obtenidos de las determinaciones bioquímicas de los diferentes grupos se realizó una curva temporal para cada parámetro. Posteriormente, se realizó el análisis de varianza de una vía para determinar si había diferencias estadísticas entre los tratamientos a lo largo del tiempo estableciendo un valor de α de 0.05; y finalmente se identificaron las diferencias entre los grupos mediante la prueba de Bonferroni.

Para realizar el estudio histológico de hígado, riñón y pulmón, a la cuarta y octava semana de que los ratones fueron sometidos a los tratamientos se sacrificaron tres animales de cada grupo.

a) Evaluación bioquímica de daño renal

Determinación de la tasa de filtración glomerular (TFG) de creatinina.

Para determinar la TFG de creatinina se midieron los niveles de creatinina en suero y en orina por medio de un estuche comercial de reactivos basado en la reacción colorimétrica de Jaffe (Creatinine Assay Kit, BioAssay Systems).

Los valores temporales de la TFG de creatinina se obtuvieron de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{TFG de creatinina} = \frac{\text{Cp creatinina} * \text{mL orina}}{\text{Co creatinina} * 1440 \text{min} * \text{g de peso}}$$

Cp creatinina= Concentración de creatinina en suero.
Co creatinina= Concentración de creatinina en orina.
mL orina= volumen de orina en mL en 24 h.
1440 min= tiempo en minutos de recolección de orina.
g de peso= Peso en gramos del ratón.

Posteriormente se realizó una curva temporal de la TFG de creatinina.

Determinación de proteína en orina.

Los niveles de proteína urinaria se determinaron por medio de un estuche comercial de reactivos basado en el método colorimétrico de Lowry (Dc Protein Assay, Biorad). Posteriormente se realizó una curva temporal de la cantidad de proteína secretada en orina de 24 h.

Determinación de nitrógeno ureico en suero (BUN).

Los niveles de nitrógeno ureico en suero (BUN) se determinaron por medio de un estuche comercial de reactivos basado en el método colorimétrico de Jung

(Urea Assay kit, BioAssay Systems). Los datos de BUN se graficaron con respecto al tiempo.

Determinación N-acetil- β -glucosamidasa en orina.

Debido a la importante función del túbulo proximal dentro de la reabsorción del filtrado glomerular se determinaron los niveles del enzima tubular N-acetil- β -glucosamidasa (NAG) en orina. La actividad de NAG se determinó por medio de un estuche comercial de reactivos basado en la actividad enzimática de NAG (β -N-Acetylglucosaminidase Assay kit, SIGMA). Después se realizó una curva temporal del NAG.

b) Evaluación bioquímica de daño hepático

Determinación γ -glutamyltransaminasa en suero (γ -GT).

Los niveles de γ -GT en suero se determinaron por medio de un estuche comercial de reactivos basado en una reacción enzimática catalizada por la γ -GT que consiste en la transferencia de un grupo γ -glutamilo de la γ -glutamyl-p-nitroanilida al péptido glicilglicina (kit γ -GT, SPINREACT).

c) Evaluaciones histológicas

Histología de riñón, hígado y pulmón.

Los ratones tratados con 4-hidroxicumarina durante cuatro u ocho semanas se anestesiaron con pentobarbital sódico 0.2 ml (Sedal-Vet[®] 6.3 g/100mL), por vía intraperitoneal. Se sujetó cada ratón en una plancha y se hizo una incisión desde

el abdomen hasta el cuello. Posteriormente, se realizó una incisión en el atrio derecho. A través del ventrículo izquierdo se perfundió solución salina fisiológica (pH 7.4) hasta que dejó de salir sangre por la incisión realizada en el atrio derecho. Inmediatamente después, con el fin de fijar los órganos se perfundió por la misma vía con el fijador de Zamboni (0.3% de ácido pícrico y 6.2% de formol en amortiguador de fosfatos), a razón de 50 mL por ratón. Se disecó y canuló la tráquea para introducir el fijador Zamboni hasta la capacidad pulmonar total. Luego se ligó la tráquea para la extracción del bloque cardiopulmonar y se continuó con la fijación por inmersión durante 24 h. Asimismo, se extrajeron los riñones e hígado para su posterior procesamiento.

Para el análisis de los órganos extraídos con la técnica de microscopía electrónica de transmisión, las muestras fueron cortadas en fragmentos de 1 mm³ y fijados por inmersión en Zamboni durante 2 h a 4°C. Posteriormente, los especímenes fueron lavados con solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M (pH 7.4) durante 15 min y luego fueron posfijados con tetróxido de osmio (OsO₄) al 1% (diluido en el mismo amortiguador), durante 2 h a temperatura ambiente. Nuevamente, se hizo un lavado con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, 3 veces de 5 min cada una. Los fragmentos de los órganos fueron deshidratados con etanol de gradación creciente (desde 60% a 100%) para terminar en óxido de propileno absoluto y se infiltraron e incluyeron en la resina Araldita 6005. Se hicieron cortes semifinos de 1 µm de espesor, teñidos con azul de toluidina para elegir los sitios de interés en pulmón (bronquiolos) y en riñón (corpúsculo renal y túbulo proximal) y de allí realizar cortes finos de 60 nm de grosor. Estos fueron

contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo para ser observados en el microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM-10 (Carl Zeiss).

Para el análisis histológico con microscopía fotónica, las muestras fueron fragmentadas en bloques de 1 cm³, aproximadamente, y fijados en formol amortiguado al 10% durante 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente, los fragmentos de los órganos fueron lavados durante 2 h a chorro de agua de la llave y procesados para su inclusión y corte en parafina. Los cortes de 4 a 6 µm de grosor fueron teñidos con hematoxilina/eosina (HE) ó azul de toluidina. Posteriormente, se montaron para su observación en el microscopio Olympus BH2-RFCA.

I. RESULTADOS

EVALUACION DEL EFECTO ANTIMETASTÁSICO Y ANTINEOPLÁSICO DE LA 4-HIDROXICUMARINA.

Ensayo de metástasis experimentales a pulmón con células tratadas *in vitro* con 4-hidroxicumarina.

Con el objetivo de evaluar si los efectos inducidos por la 4-HC *in vitro* son suficientes para modificar el potencial metastático de las células B16-F10 se utilizó un modelo murino de metástasis experimental. En dicho modelo células B16-F10 fueron tratadas *in vitro* previamente a su inyección por vía intravenosa a ratones C57BL/6. Tres semanas después de la inoculación intravenosa se extirparon los pulmones y se cuantificaron los tumores macroscópicos.

En los ratones a los que se les inyectaron células control tratadas solo con el vehículo (etanol 0.75 %), se formaron 55 ± 13 (promedio \pm desviación estándar) nódulos metastáticos en pulmón (figura 1 A). En contraste, el número de nódulos formados en los pulmones de ratones a los que se les inyectaron células pretratadas con 4-HC 500 μ M fue de 8.7 ± 3.0 (promedio \pm desviación estándar) (figura 1 B). Es decir, el número de nódulos metastáticos formados en pulmón disminuyó un 85% (figura 1 C) ($p < 0.01$; t de Student con corrección de Welch para varianzas heterogéneas). Con este sistema experimental, se demostró que el tratamiento *in vitro* con la 4-HC disminuye el potencial metastático de las células B16-F10 en un modelo murino.

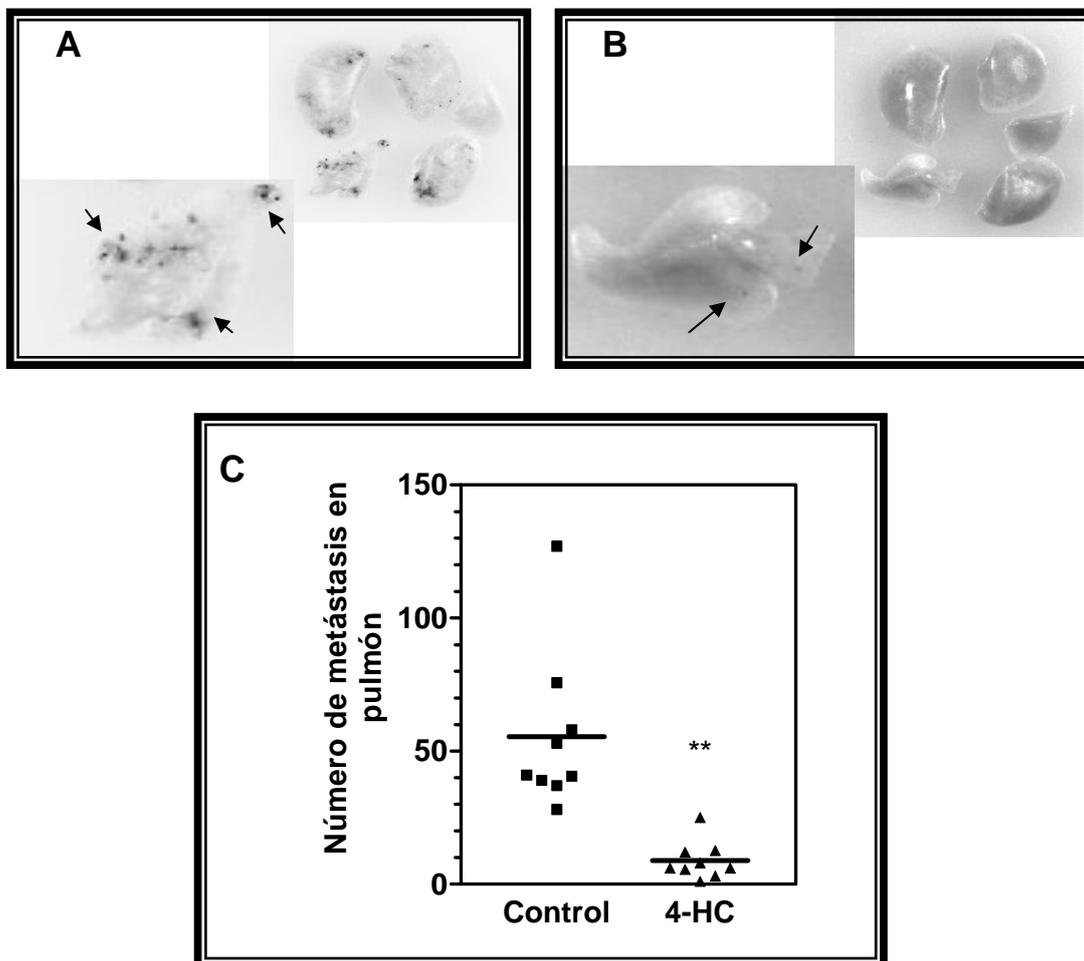


Figura 1. Evaluación del potencial metastásico de células B16-F10 tratadas *in vitro* con 4-hidroxycumarina. Tres semanas después de implantar las células se evaluó el número de nódulos metastásicos en pulmón. El tratamiento *in vitro* con 4-HC 500 μ M disminuyó el número de nódulos metastásicos formados en pulmón (B) con respecto al control (A). La cuantificación (C) de los nódulos macroscópicos indico una disminución estadísticamente significativa del 85% (** $p < 0.01$; t de Student con corrección de Welch para varianzas heterogéneas).

Ensayo de metástasis experimentales a pulmón en ratones con administración oral de 4-hidroxicumarina.

Para evaluar el efecto del tratamiento *in vivo* con la 4-HC sobre el potencial metastásico de las células B16-F10, se administró 4-HC (10, 20 ó 40 mg/Kg/día) por vía oral durante siete días previos a la inoculación intravenosa de células B16-F10. Tres semanas después se evaluó la presencia de metástasis en pulmón. En la figura 2 se observa que las tres dosis de 4-HC evaluadas disminuyeron significativamente ($p < 0.001$) el número de nódulos metastásicos en pulmón con respecto a los que se les administró metilcelulosa al 0.2% (vehículo).

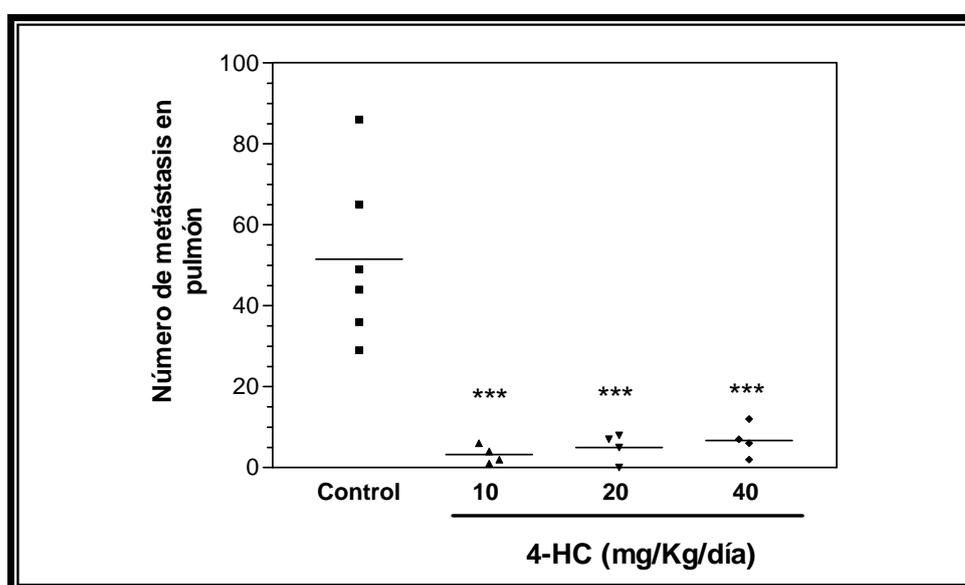


Figura 2. Efecto de 4-hidroxicumarina administrada vía oral sobre el potencial metastásico de células B16-F10 en un modelo *in vivo*. Tres semanas después de inocular las células B16-F10, el tratamiento vía oral con 4-HC disminuyó el número de nódulos metastásicos formados en pulmón con respecto al vehículo. (** $p < 0.001$; Bonferroni).

Ensayo de supervivencia, tamaño de tumor y metástasis espontáneas a pulmón con administración oral de la 4-hidroxicumarina.

Con el objetivo de evaluar el efecto de la 4-HC sobre el tiempo de supervivencia, el tamaño del tumor y el número de metástasis espontáneas, se utilizaron ratones C57BL/6 con células B16-F10 implantadas subcutáneamente (s.c.). Se siguieron dos protocolos: el primero consistió en administrar sólo 4-HC (10, 20 ó 40 mg/Kg/día), mientras que en el segundo se administró 4-HC (10, 20 ó 40 mg/Kg/día) en conjunto con una dosis única de ciclofosfamida (200 mg/Kg) administrada por vía intraperitoneal el día que se iniciaron los tratamientos. Como control se administraron los vehículos de cada fármaco, metilcelulosa al 0.2% por vía oral (0.1 mL/10 g de ratón/día) y solución salina isotónica por vía intraperitoneal (0.1 mL /10 g de ratón).

A continuación se describen los resultados del primer protocolo. La figura 3 corresponde al gráfico de Kaplan-Meier que representa la fracción de ratones vivos conforme avanzó el experimento. El tratamiento con la dosis de 10 mg/Kg/día de 4-HC incrementa el tiempo de supervivencia con respecto al control ($p < 0.0328$; Mantel-Cox log-rank).

La dosis de 20 mg/Kg/día presentó el mismo comportamiento sobre la supervivencia que el control por lo que las dosis de 10 y 20 mg/Kg/día no fueron diferentes entre sí estadísticamente. Por otro lado, la dosis de 40 mg/kg presentó una tendencia a disminuir el tiempo de supervivencia con respecto al control, pero dicha disminución no resultó ser significativa estadísticamente.

En la figura 3 podemos observar que el efecto de la 4-HC sobre el tiempo de supervivencia es inversamente proporcional a la dosis. Es decir, el tiempo medio de supervivencia para las dosis de 10, 20 y 40 mg/Kg/día fue de 36 días, 26 y 18 días respectivamente, mientras que para el control fue de 24 días.

Respecto al efecto de la 4-HC sobre el tamaño del tumor se encontró que la dosis de 10 mg/Kg/día disminuye el tamaño del tumor ($p < 0.01$; Bonferroni) con respecto al control a partir del día 16 de tratamiento (figura 4); mientras que la dosis de 20 mg/Kg/día disminuye ($p < 0.05$; Bonferroni) el tamaño del tumor con respecto al control a partir del día 32 de tratamiento. El tratamiento con la dosis de 40 mg/Kg/día no disminuye el tamaño del tumor respecto al control.

El número de nódulos metastásicos en el pulmón de los ratones que recibieron células B16-F10 en forma subcutánea se determinó conforme fueron muriendo durante el experimento. En la figura 5 se observa que el tratamiento con 4-HC 10 mg/Kg/día tendió a disminuir el número de metástasis, pero solo disminuyeron el número de nódulos metastásicos de forma significativa las dosis de 20 y 40 mg/Kg/día ($p < 0.05$; Dunett).

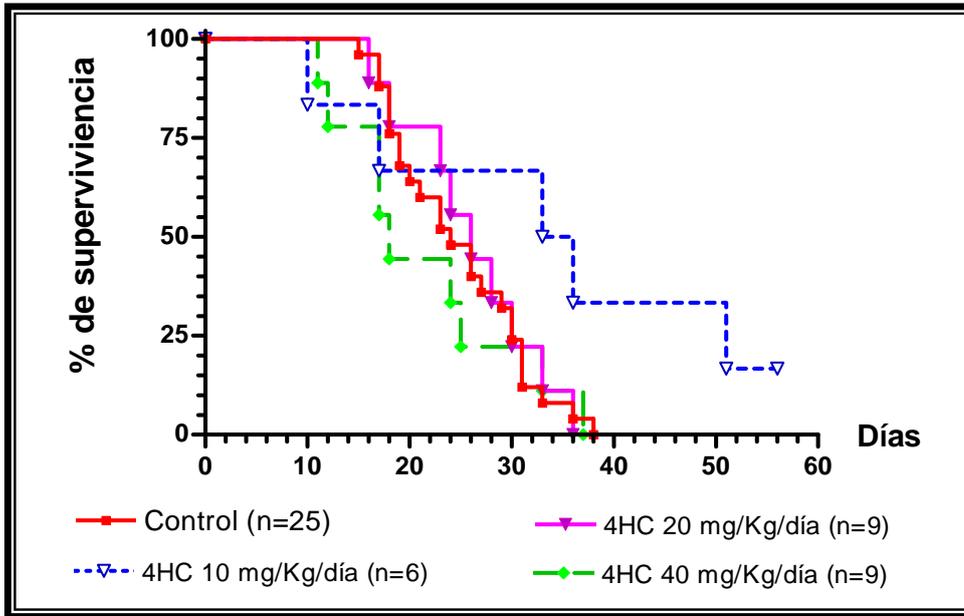


Figura 3. Curva de supervivencia Kaplan-Meier de ratones implantados vía subcutánea con células B16F10. El tratamiento con 4-HC incrementó la supervivencia con la dosis de 10 mg/Kg/día ($p < 0.0328$) con respecto al control (Mantel-Cox log-rank).

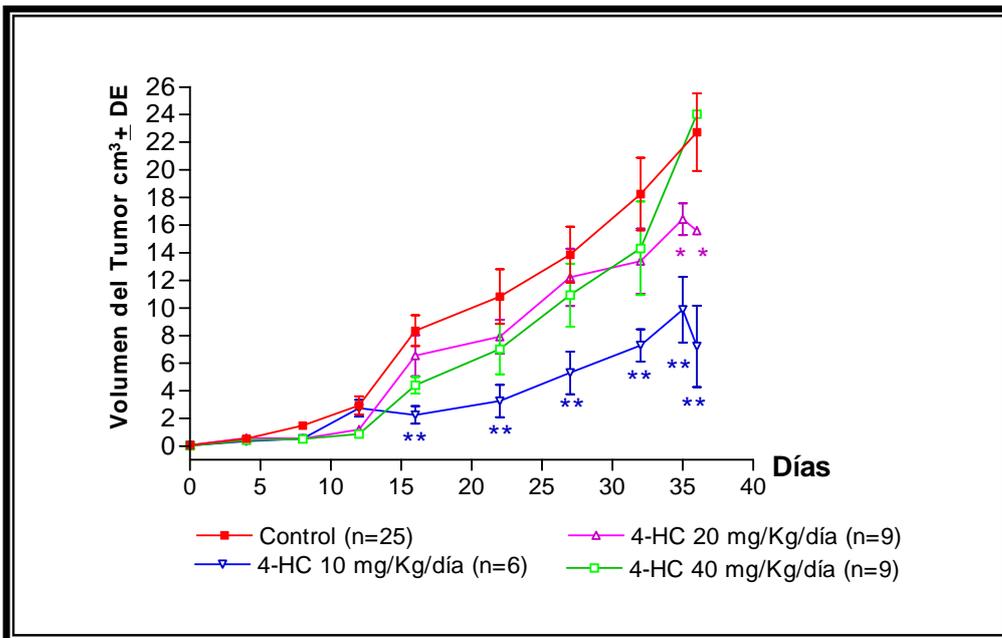


Figura 4. Curso temporal del tamaño del tumor de ratones implantados con células B16-F10 por vía subcutánea. El tratamiento con 4-HC 10 mg/Kg/día disminuyó (** $p < 0.01$) el tamaño del tumor con respecto al control a partir del día 16 y con la dosis de 20 mg/Kg/día disminuyó (* $p < 0.05$) el tamaño del tumor a partir del día 32 de recibir el tratamiento (Bonferroni). DE: Desviación estándar.

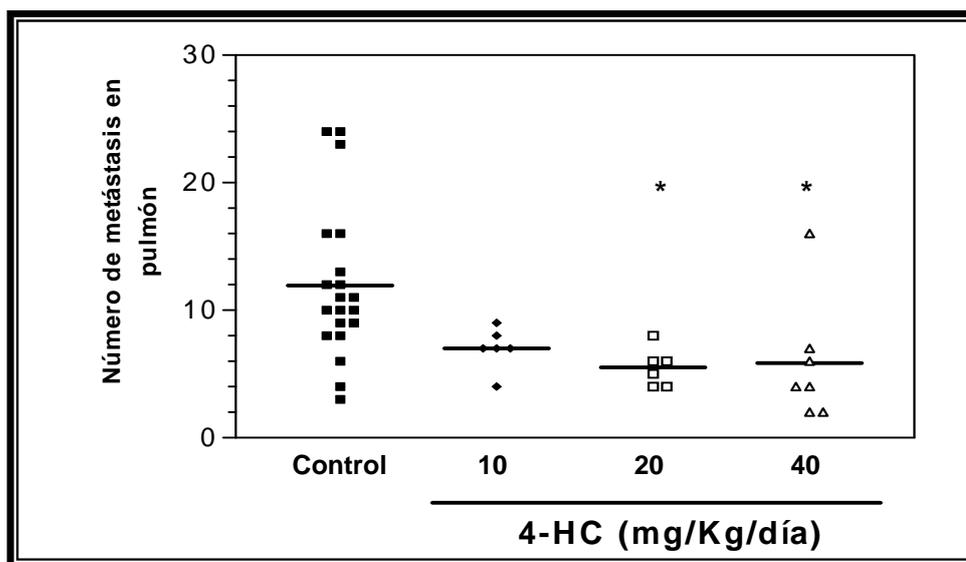


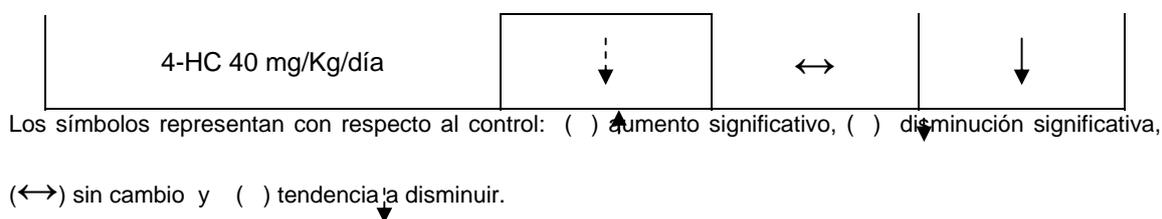
Figura 5. Evaluación del número de metástasis espontáneas en pulmón de ratones implantados con células B16-F10 por vía subcutánea. Los tratamientos con 4-HC 20 ó 40 mg/Kg/día disminuyeron (* $p < 0.05$) con respecto al control el número de nódulos metastásicos en pulmón (Dunnett).

En la siguiente tabla se muestra un resumen de los datos de supervivencia obtenidos, tamaño de tumor y de la formación de nódulos metastásicos en pulmón del primer protocolo en donde se evaluó el efecto de la 4-HC sola (Tabla 5).

Tabla 5. Resumen de las evidencias encontradas del efecto de la 4-hidroxicumarina sobre la supervivencia, tamaño de tumor y metástasis espontáneas.

Tratamiento	Supervivencia	Tamaño de tumor	Metástasis espontáneas
4-HC 10 mg/Kg/día	↑	↓	↓
4-HC 20 mg/Kg/día	↔	↓	↓

Análisis del efecto antimetastásico *in vivo* de la 4-hidroxicumarina



A continuación se muestran los resultados del protocolo que involucró la administración vía oral de la 4-HC (10, 20 ó 40 mg/Kg/día) de forma conjunta con una dosis única de ciclofosfamida (200 mg/Kg).

En la gráfica de Kaplan Meier de la figura 6 se observa que la administración de 4-HC 10 mg/kg/día ($p < 0.0098$; Mantel-Cox log-rank) ó 20 mg/Kg/día ($p < 0.0196$) de forma conjunta con ciclofosfamida incrementó la supervivencia con respecto a los ratones que solo fueron tratados sólo con ciclofosfamida. En la figura 6 podemos ver que el tratamiento conjunto de la 4-HC con la ciclofosfamida también presentó un efecto sobre la supervivencia inversamente proporcional a la dosis de 4-HC, como ya se había observado en los resultados anteriores. Es decir, el tiempo medio de supervivencia para las dosis de 10, 20 y 40 mg/Kg/día administradas con la dosis única de ciclofosfamida fue de 41 días, 35 y 25 días respectivamente, mientras que para los ratones tratados solo con ciclofosfamida fue de 26 días.

En la figura 7 se observa que la administración de ciclofosfamida retrasa el crecimiento del tumor con respecto al control. Sin embargo, la administración conjunta de 4-HC y ciclofosfamida no reduce el tamaño del tumor mas allá de lo que lo hace la ciclofosfamida sola. El número de nódulos metastásicos en pulmón se cuantificó conforme los ratones fueron muriendo en el experimento. En la figura 8 se observa que el tratamiento con 4-HC mas ciclofosfamida disminuyó el número de metástasis con respecto a los ratones que solo fueron tratados con ciclofosfamida. Pero la disminución

del número de metástasis solo fue significativa a la dosis de 40 mg/Kg/día ($p < 0.001$; Dunnett). Por otro lado, podemos observar que el tratamiento con ciclofosfamida favorece la formación de metástasis con respecto al control (figura 8).

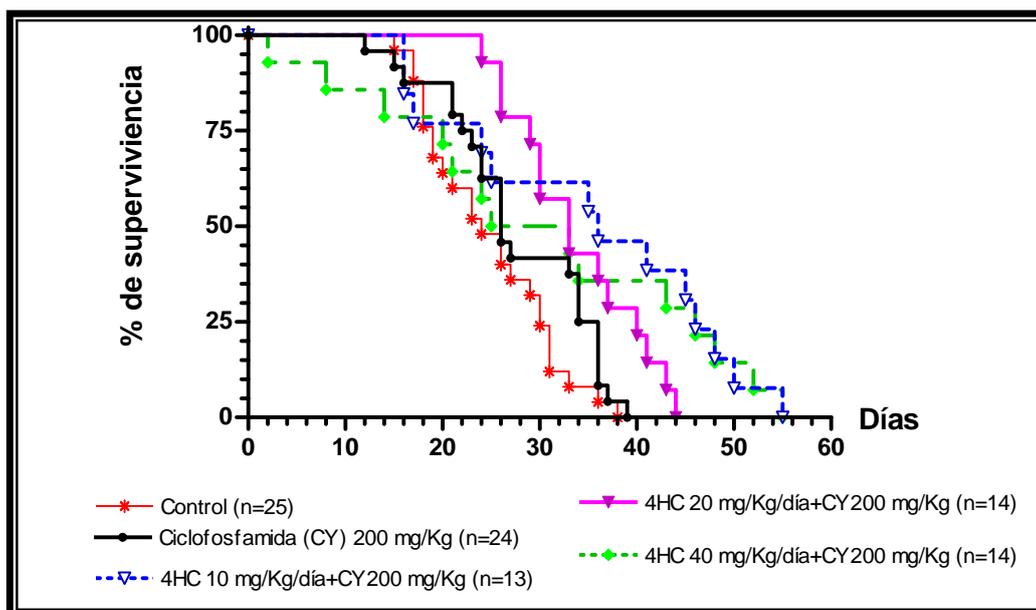


Figura 6. Curva de supervivencia Kaplan-Meier de ratones implantados vía subcutánea con células B16F10. La administración conjunta de CY y 4-HC a las dosis de 10 mg/Kg/día ($p < 0.0098$) y 20 mg/Kg/día ($p < 0.0196$) incrementó el tiempo de supervivencia con respecto a los ratones tratados solo con CY (Mantel-Cox log-rank).

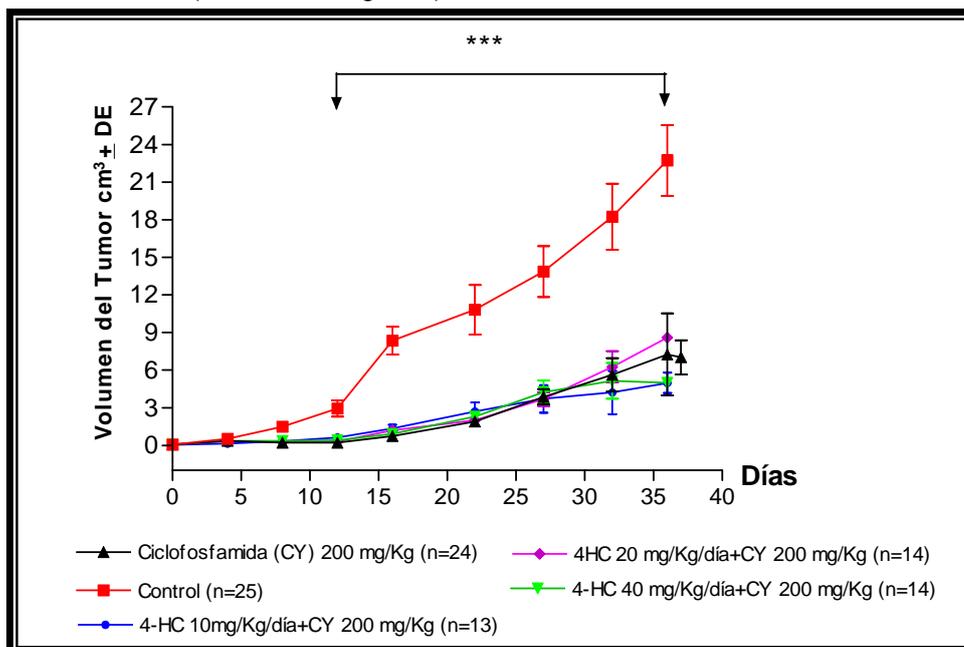


Figura 7. Curso temporal del tamaño del tumor de ratones implantados con células B16-F10 vía subcutánea. El tratamiento con 4-HC administrado conjuntamente con ciclofosfamida no disminuyó el tamaño con respecto a CY (Bonferroni). Sin embargo los tratamientos con CY disminuyen el tamaño del tumor respecto al control (Bonferroni; *** $p < 0.001$). DE: Desviación estándar.

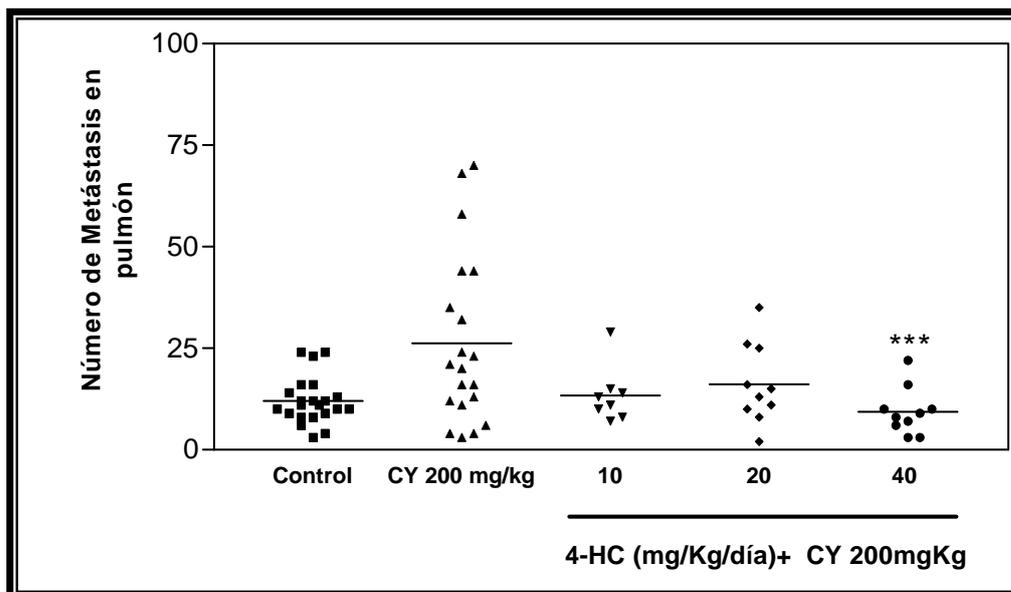


Figura 8. Evaluación del número de metástasis espontáneas en pulmón de ratones implantados con células B16-F10 vía subcutánea. El tratamiento con 4-HC mas CY disminuyó el número de nódulos metastásicos en pulmón con la dosis de 40 mg/Kg/día (** $p < 0.001$) con respecto a los ratones que recibieron solo ciclofosfamida (Dunnett).

En la siguiente tabla se muestra un resumen de los datos obtenidos de supervivencia, tamaño de tumor y de la formación de nódulos metastásicos en pulmón en el segundo protocolo, en el que solo se evaluó el efecto de la administración conjunta de la ciclofosfamida y de la 4-HC (Tabla 6).

Tabla 6. Resumen de las evidencias encontradas del efecto de la administración conjunta de Ciclofosfamida y 4-hidroxicumarina, sobre la supervivencia, el tamaño del tumor y el número de metástasis espontáneas.

Tratamiento	Supervivencia	Tamaño de tumor	Metástasis espontáneas
4-HC 10 mg/Kg/día y CY 200 mg/Kg	↑	↔	↓

Análisis del efecto antimetastásico *in vivo* de la 4-hidroxicumarina

4-HC 20 mg/Kg/día y CY 200 mg/Kg	↑	↔	↓
4-HC 40 mg/Kg/día y CY 200 mg/Kg	↓	↔	↓

Los símbolos representan con respecto a ciclofosfamida: ↑ () aumento significativo, () disminución significativa, (↔) sin cambio y (↓) tendencia a disminuir.

EVALUACION DE LA TOXICIDAD DE LA 4-HIDROXICUMARINA.

Los resultados obtenidos con las curvas de supervivencia (figuras 3 y 6) sugieren que la 4-HC además de tener efecto terapéutico también podría presentar efectos tóxicos. El posible efecto toxico se infirió debido a que la dosis de 40 mg/Kg/día administrada tanto de forma conjunta con la ciclofosfamida como sola no alarga el tiempo de supervivencia. Por el contrario, esta dosis provocó que los ratones murieran antes que los ratones control, lo cual no sucedió con las dosis de 10 ó 20 mg/Kg/día en donde se observó el efecto terapéutico esperado.

Para evaluar el posible efecto toxico renal, hepático o pulmonar de la 4-HC (10, 20 ó 40 mg/Kg/día) se administró vía oral durante ocho semanas a ratones C57BL/6 sanos, es decir sin implantación vía subcutánea de células B16-F10. Como control se utilizó metilcelulosa 0.2% (0.1 mL/10 g de peso). Debido a que en el ensayo de supervivencia los ratones llegaron a vivir hasta 60 días, se decidió realizar el ensayo de toxicidad abarcando este periodo de tiempo.

a) Evaluación bioquímica de daño renal

La evaluación del daño renal se determinó midiendo marcadores renales tales como: i) la tasa de filtración glomerular, ii) los niveles de nitrógeno ureico en sangre, iii) los niveles de proteína urinaria y iv) los niveles de N-acetil- β -glucosamidasa.

En la curva temporal de la figura 9 se observa que la administración crónica de las diferentes dosis de 4-HC no modificaron la tasa de filtración glomerular de creatinina respecto al control (metilcelulosa 0.2%) durante los 60 días de administración. Por otro lado, en la figura 9 se puede observar que los valores obtenidos cayeron dentro de los valores ya reportados (1.14-17.8 μ L/min g de ratón) (Qi, 2004).

La evaluación de los niveles de nitrógeno ureico en suero (BUN) se llevó a cabo por medio de la cuantificación de urea en sangre. Dicha determinación se realizó a través de un ensayo colorimétrico basado en el método de Jung. En la figura 10, la curva temporal del BUN muestra un incremento del 50% ($p < 0.05$; Bonferroni) en los niveles de nitrógeno ureico a partir de la tercera semana de administración de 4-HC a las dosis de 20 y 40 mg/Kg/día. La dosis de 10 mg/Kg/día incrementó ($p < 0.05$; Bonferroni) en la misma proporción que las dosis mencionadas a la cuarta semana. Por otro lado se observó que el incremento en los niveles de BUN inducidos por la 4-HC respecto al control, también sobrepasó a los niveles de referencia (7-30 mg/dL) (Mohr 1996).

El funcionamiento renal también se evaluó a través de la capacidad del glomérulo para filtrar proteínas. Para esto, se midió proteína urinaria por medio de un ensayo colorimétrico basado en el método de Lowry. Ninguno de los tratamientos incrementó los

niveles de proteína secretada en orina (figura 11) de forma significativa con respecto al control (Bonferroni). La cantidad de proteína secretada en orina de los ratones tanto control como tratados caen dentro del rango de referencia (<100mg/día) (Mohr, 1996).

Debido a la importante función del túbulo proximal dentro de la reabsorción del filtrado glomerular se determinó la actividad de N-acetil-β-glucosamidasa (NAG) en orina. La actividad de NAG se determinó por medio de un ensayo enzimático basado en la hidrólisis del sustrato de NAG. Aunque esta enzima está presente en bajos niveles de forma normal en orina, el tratamiento crónico con la dosis de 20 mgKg/día de 4-HC disminuyó los niveles de NAG en orina a partir de la sexta semana (p<0.05; Bonferroni) respecto al control (figura 12).

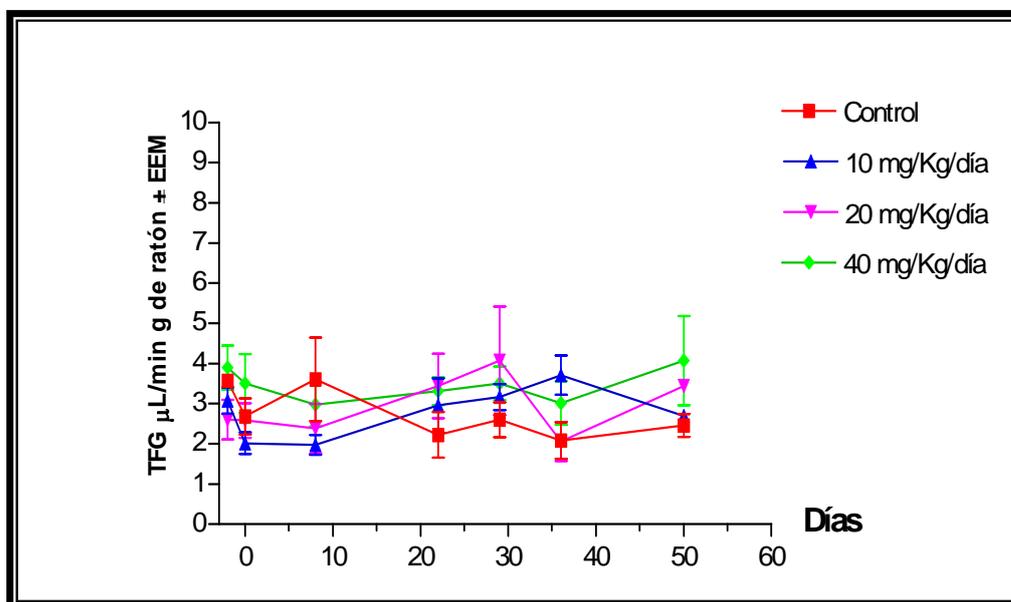


Figura 9. Curva temporal del efecto de la 4-hidroxicumarina sobre la tasa de filtración glomerular de creatinina. Los tratamientos con 4-HC no modificaron de forma significativa la tasa

de filtración glomerular con respecto al control (Bonferroni; n=3). Los valores obtenidos caen dentro de los niveles normales reportados (1.14-17.8 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{g}$ de ratón). EEM: Error estándar de la media.

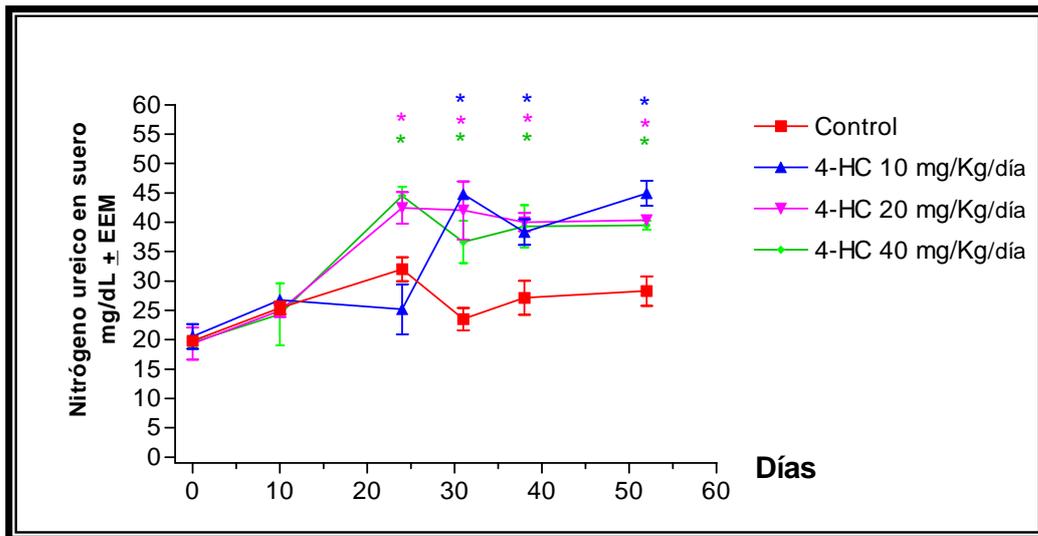


Figura 10 Curva temporal del efecto de la 4-hidroxicumarina sobre los niveles de nitrógeno ureico en suero. Las dosis de 20 mg/Kg/día y 40 mg/Kg/día de 4-HC incrementaron los niveles de nitrógeno ureico en suero (* $p < 0.05$; Bonferroni) respecto al control a partir de la tercera semana de administración. La dosis de 10 mg/kg/día incrementó los niveles de nitrógeno ureico (* $p < 0.05$; Bonferroni) a partir de la 4 semana de administración (Referencia 7-30 mg/dL). (n=3). EEM: Error estándar de la media.

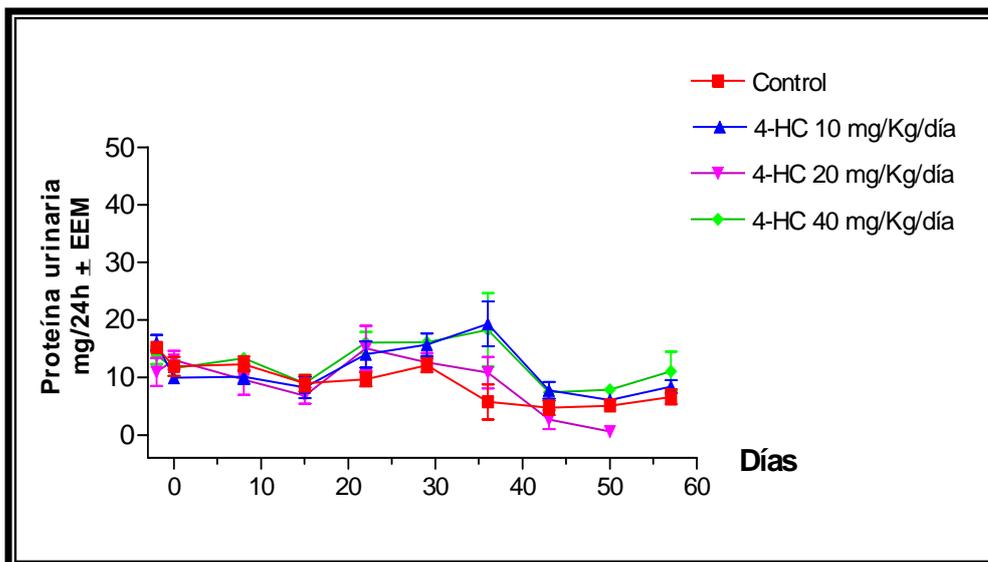


Figura 11. Curva temporal del efecto de la 4-hidroxicumarina sobre los niveles de proteína total urinaria. Los tratamientos con 4-HC no modificaron los niveles normales de proteínas secretadas en orina respecto al control (Referencia <100 mg/día). (Bonferroni; n=3). EEM: Error estándar de la media.

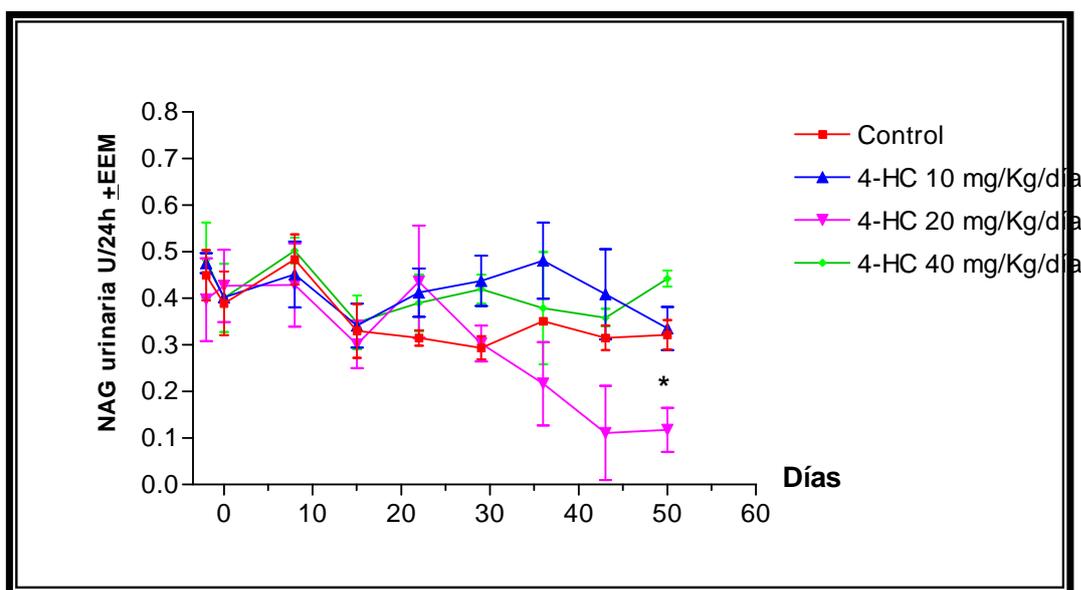


Figura 12. Curva temporal del efecto de la 4-hidroxicumarina sobre los niveles de N-acetil- β -glucosamidasa (NAG) urinaria. La dosis de 20 mg/Kg/día de 4-HC disminuyó los niveles de NAG en orina (* $p < 0.05$; Bonferroni) respecto al control, a partir de la sexta semana de tratamiento (n=3). EEM: Error estándar de la media.

b) Evaluación histológica de daño renal

La evaluación de cortes histológicos de riñón (teñidos con hematoxilina/eosina o con azul de toluidina) de ratones tratados diariamente con 4-HC (10, 20 ó 40 mg/Kg/día) y estudiados por microscopia de luz se reveló cambios importantes (metaplasia) en las células planas de la capa parietal de la cápsula de Bowman (flechas negras en las fotomicrografías es de las figuras 13 y 14), tanto en las primeras cuatro semanas como

después de ocho semanas de tratamiento con todas las dosis de 4-HC. En dichos cortes también se observó una importante disminución de las microvellosidades y desorganización intracelular de los túbulos proximales (Las puntas de flecha en las figuras 13 y 14, señalan el espacio en blanco en los túbulos proximales que se forma tras la pérdida de las microvellosidades).

El estudio del riñón por microscopía electrónica de transmisión mostró que las células planas de la capa parietal presentan una transformación metaplásica cúbica con microvellosidades (flechas negras en los insertos de la figura 14). Adicionalmente a la disminución de las microvellosidades (puntas de flecha en los insertos de la figura 14) y de la desorganización celular de los túbulos proximales, la 4-HC indujo de forma dosis-dependiente: i) picnosis y pérdida de los núcleos; ii) presencia de mitocondrias con crestas tubulares; iii) incremento en el retículo endoplásmico liso; y iv) degeneración lipídica (solo con la dosis de 40 mg/Kg/día). Además, se observó que a pesar de la pérdida de las microvellosidades, el sistema endocítico se observa íntegro con todas las dosis de 4-HC utilizadas.

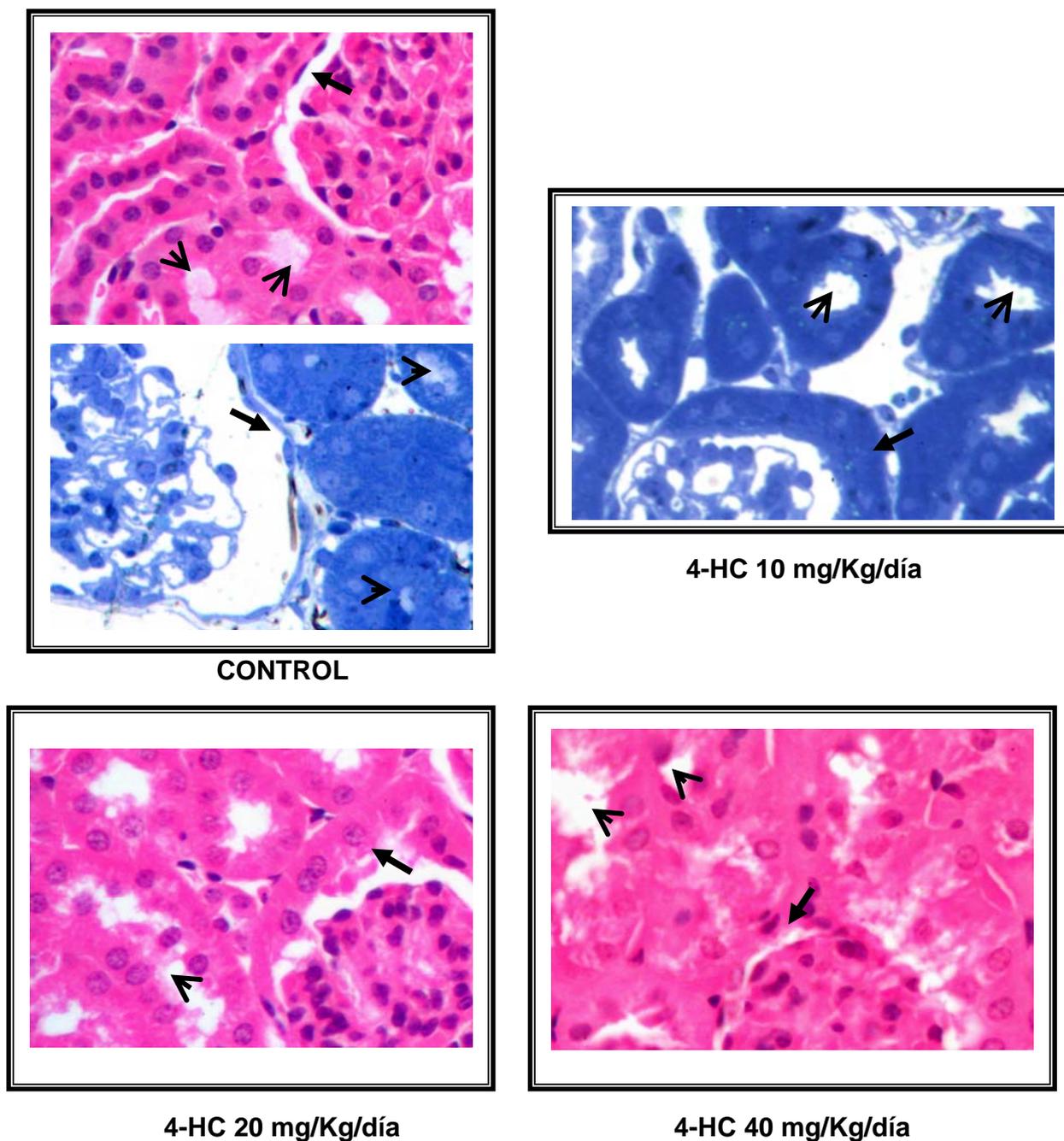


Figura 13. Fotomicrografías de cortes histológicos de riñón de ratones sometidos a cuatro semanas de tratamiento con 4-hidroxicumarina. En las fotomicrografías se muestra que la 4-HC (10, 20 y 40 mg/Kg/día) provoca una metaplasia cúbica con microvellosidades en las células planas de la cara parietal de la capsula de Bowman (flechas negras), una desorganización celular y una pérdida de microvellosidades de los túbulos proximales (puntas de flechas negras), 1000X.

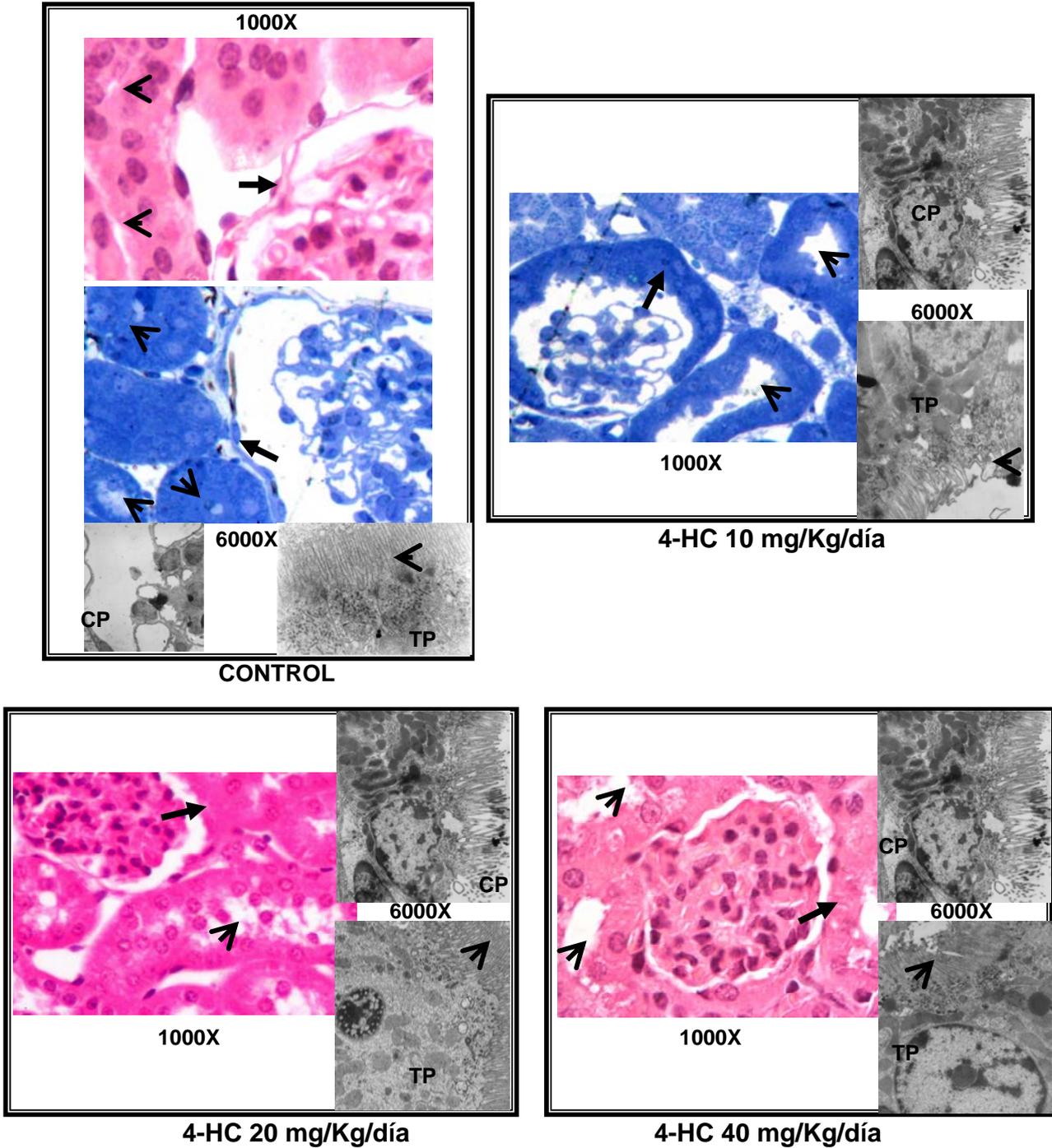


Figura 14. Fotomicrografías de cortes histológicos de riñón de ratones sometidos a ocho semanas de tratamiento con 4-hidroxicumarina. En la fotomicrografía se muestra que la 4-HC

(10, 20 y 40 mg/Kg/día) provoca metaplasia cúbica en la células planas de la capa parietal de la capsula de Bowman (Flechas negras; capa parietal (CP) en inserto), una desorganización celular y una pérdida de microvellosidades de los túbulos proximales (Puntas de flechas negras; túbulo proximal (TP) en inserto).

c) Evaluación bioquímica de daño hepático.

Debido a que el hígado es el principal órgano donde se metabolizan la mayoría de los fármacos, se evaluó su funcionalidad por medio de la determinación de los niveles de γ -glutamiltansaminasa (γ -GT) en suero.

En la curva temporal del efecto de la 4-HC sobre los niveles de GGT, se observó que ninguna de las dosis modificó los niveles con respecto al control durante los dos meses de tratamiento, ni sobrepasó los niveles de referencia (8-38 mU/mL) (figura 15).

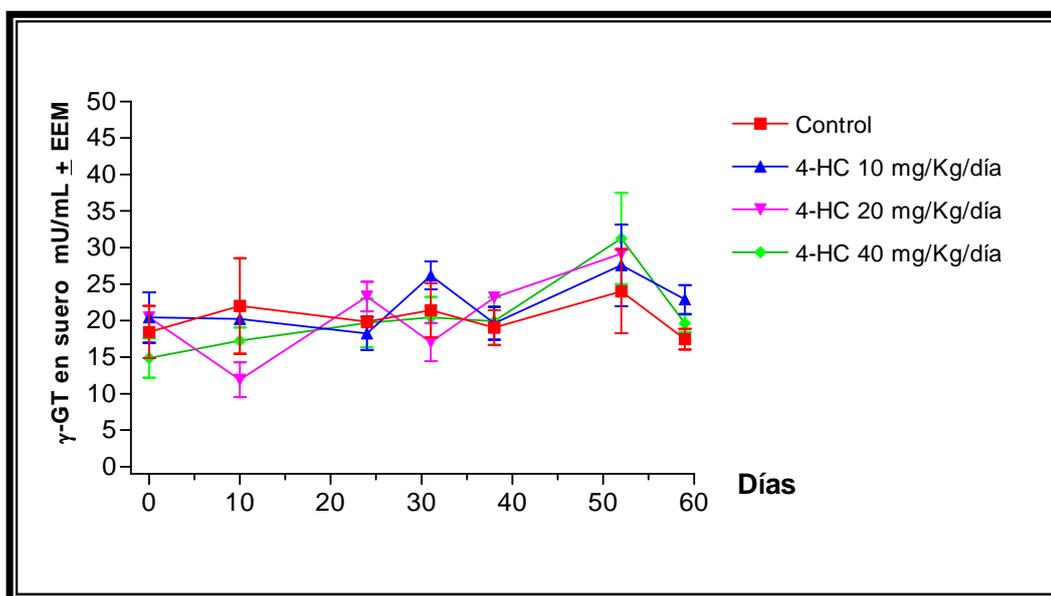


Figura 15. Curva temporal del efecto de la 4-hidroxicumarina sobre los niveles γ -glutamiltansaminasa (γ -GT) en suero. Los tratamientos con 4-HC no modificaron los niveles de γ -GT sérica durante su administración crónica (Bonferroni; n=3). Niveles normales de referencia 8-38 mU/mL. EEM: Error estándar de la media.

d) Evaluación histológica de daño hepático

El estudio histológico de cortes de hígado (teñidos con hematoxilina/eosina) de ratones tratados con 4-HC muestra que la dosis 40 mg/Kg/día induce cambios citoplasmáticos en la hepatocitos periféricos a la triadas portales (vena porta, conducto biliar y arteria hepática), en ratones sometidos a cuatro semanas de tratamiento (flechas negras en la figura 16). Mientras que en la dosis de 20 mg/Kg/día se presenta este mismo efecto en ratones sometidos a ocho semanas de tratamiento con la 4-HC (flechas negras en la figura 17). Como dato importante tenemos que la dosis de 10 mg/Kg/día no provocó cambios en los hepatocitos durante las ocho semanas de tratamiento (figuras 16 y 17).

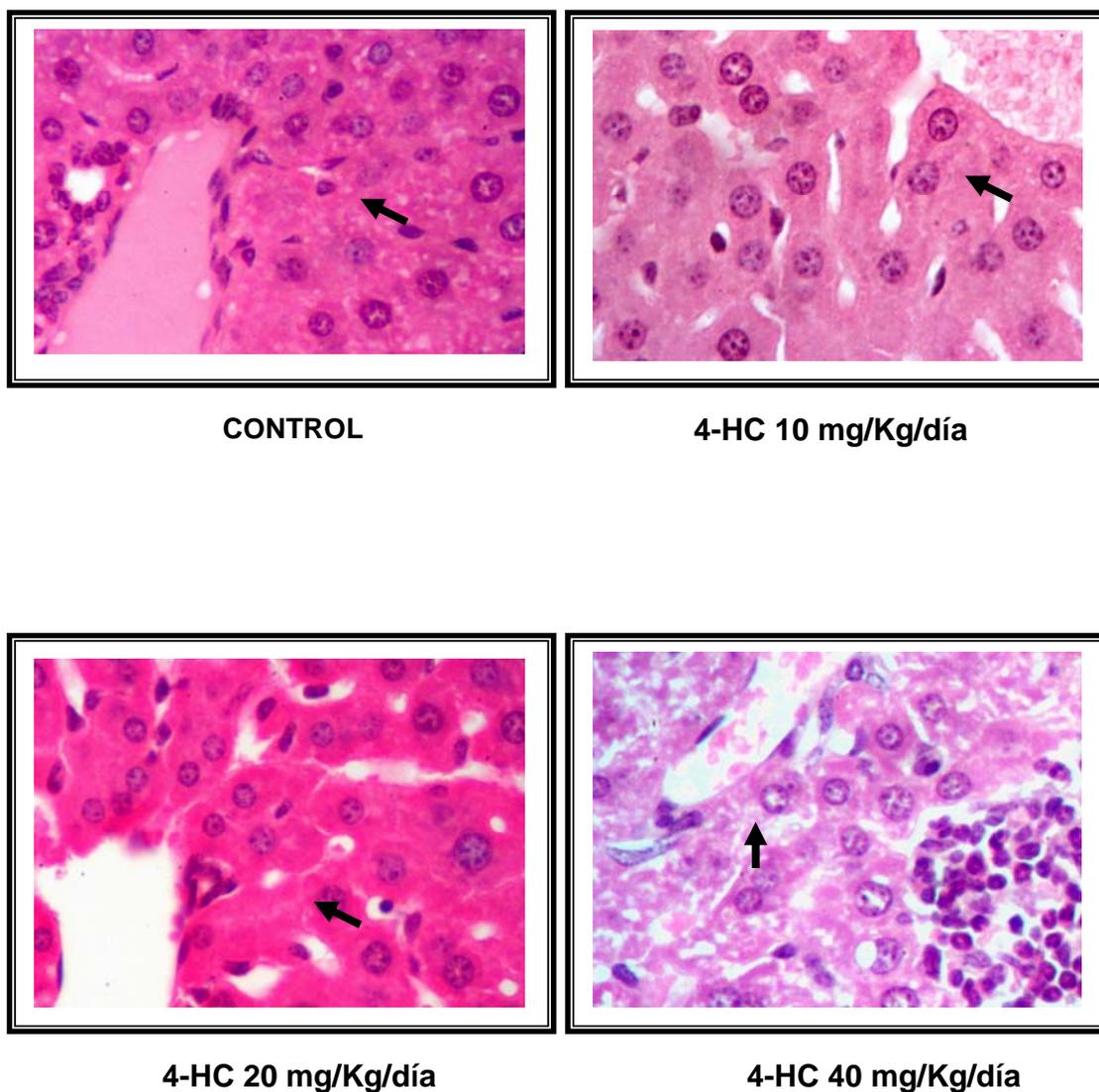


Figura 16. Fotomicrografías de cortes histológicos de hígado de ratones sometidos a cuatro semanas de tratamiento con 4-hidroxicumarina. En la fotomicrografía del tejido hepático muestra que a dosis de 40 mg/Kg/día se produce un cambio citoplasmático en hepatocitos cercanos a las triadas portaes (flechas negras), mientras que con las dosis de 10 y 20 mg/Kg/día no se produce cambio alguno. 1000X

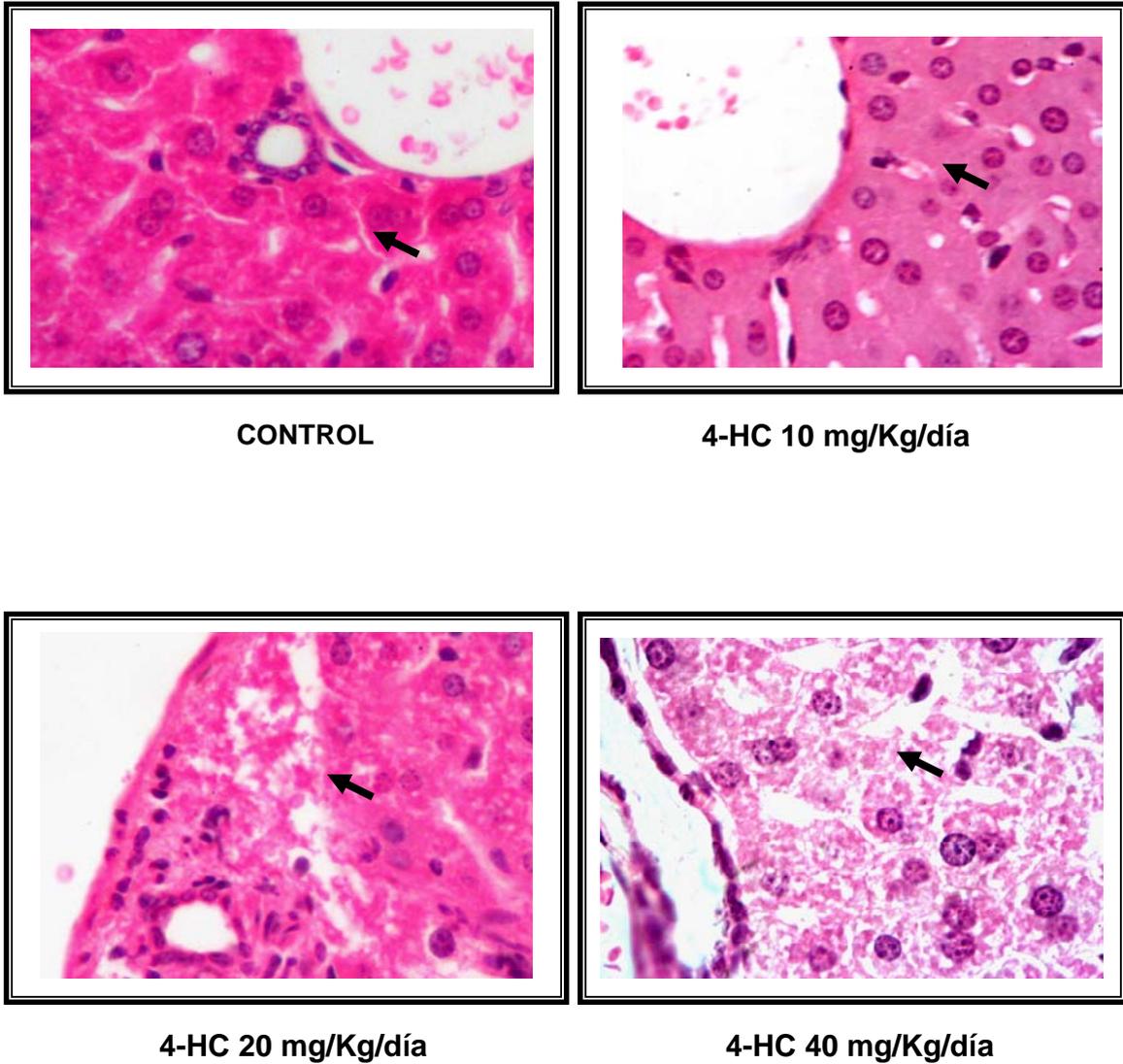


Figura 17. Fotomicrografías de cortes histológicos de hígado de ratones sometidos a ocho semanas de tratamiento con 4-hidroxicumarina. En las fotomicrografías del tejido hepático muestran que las dosis de 20 y 40 mg/Kg/día se produce un cambio citoplasmático en hepatocitos (flechas negras) cercanos a las triadas portales. La dosis de 10 mg/Kg/día no provoca cambio alguno. 1000X

e) Evaluación histológica de daño pulmonar

El estudio histológico de cortes de pulmón (teñidos con hematoxilina-eosina o azul de toluidina) con microscopía de luz mostró que todas las dosis de 4-HC inducen citotoxicidad citoplasmática e hiperplasia (flechas negras en las figuras 18 y 19) en las células de Clara bronquiolares. La citotoxicidad citoplasmática se observó con la disminución de la proyección apical de las células de Clara.

En la figura 19 se observó que con la dosis de 40 m/Kg/día administrada durante ocho semanas disminuyó la hiperplasia de las células de Clara (flechas negras) respecto a las células de Clara de los ratones sometidos a cuatro semanas de tratamiento con esta misma dosis. Con las dosis de 10 y de 20 mg/Kg/día no disminuye la hiperplasia de las células de Clara (flechas negras) con respecto a las células de Clara de los ratones sometidos a las cuatro semanas de tratamiento con estas mismas dosis.

Con ayuda de la microscopía electrónica (Inserto de la figura 19) se observó que las células de Clara presentaron un incremento en gránulos citoplasmáticos con la dosis de 20 mg/Kg/día. Con la dosis de 40 mg/Kg/día se observó una menor cantidad de gránulos citoplasmáticos, respecto a las dosis de 10 y 20 mg/Kg/día. Por otro lado, el estudio con microscopía electrónica de cortes de pulmón permitió observar que en los neumocitos tipo II, se formaron vacuolas en el citoplasma de forma dosis-dependiente de la 4-HC (figura 19a).

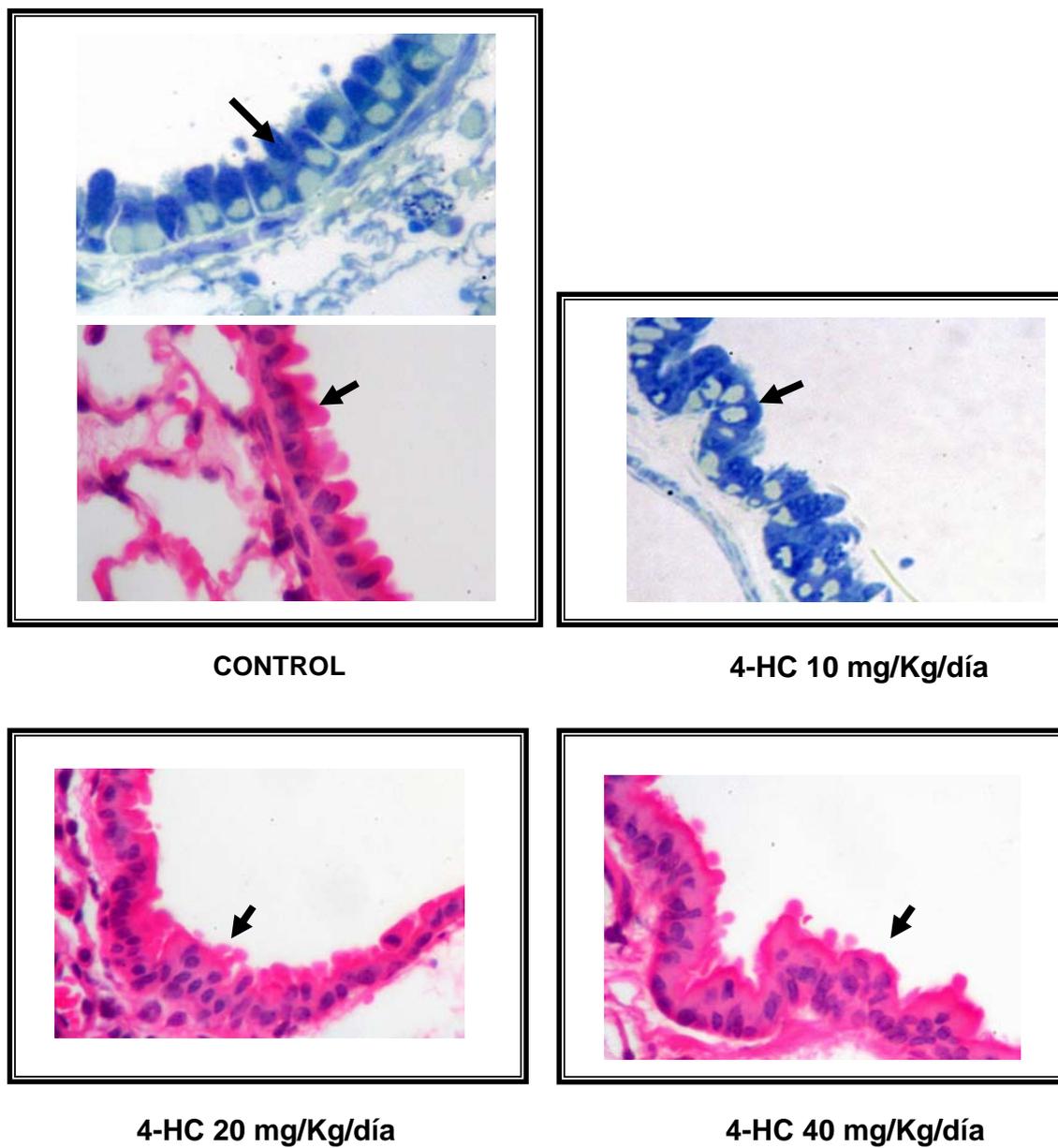


Figura 18. Fotomicrografías de cortes histológicos de pulmón de ratones sometidos a cuatro semanas de tratamiento con 4-hidroxicumarina. En las fotomicrografías se muestra que la 4-HC (10, 20 y 40 mg/Kg/día) induce de forma dosis dependiente citotoxicidad citoplasmática e hiperplasia en las células de Clara (flechas negras). 1000X.

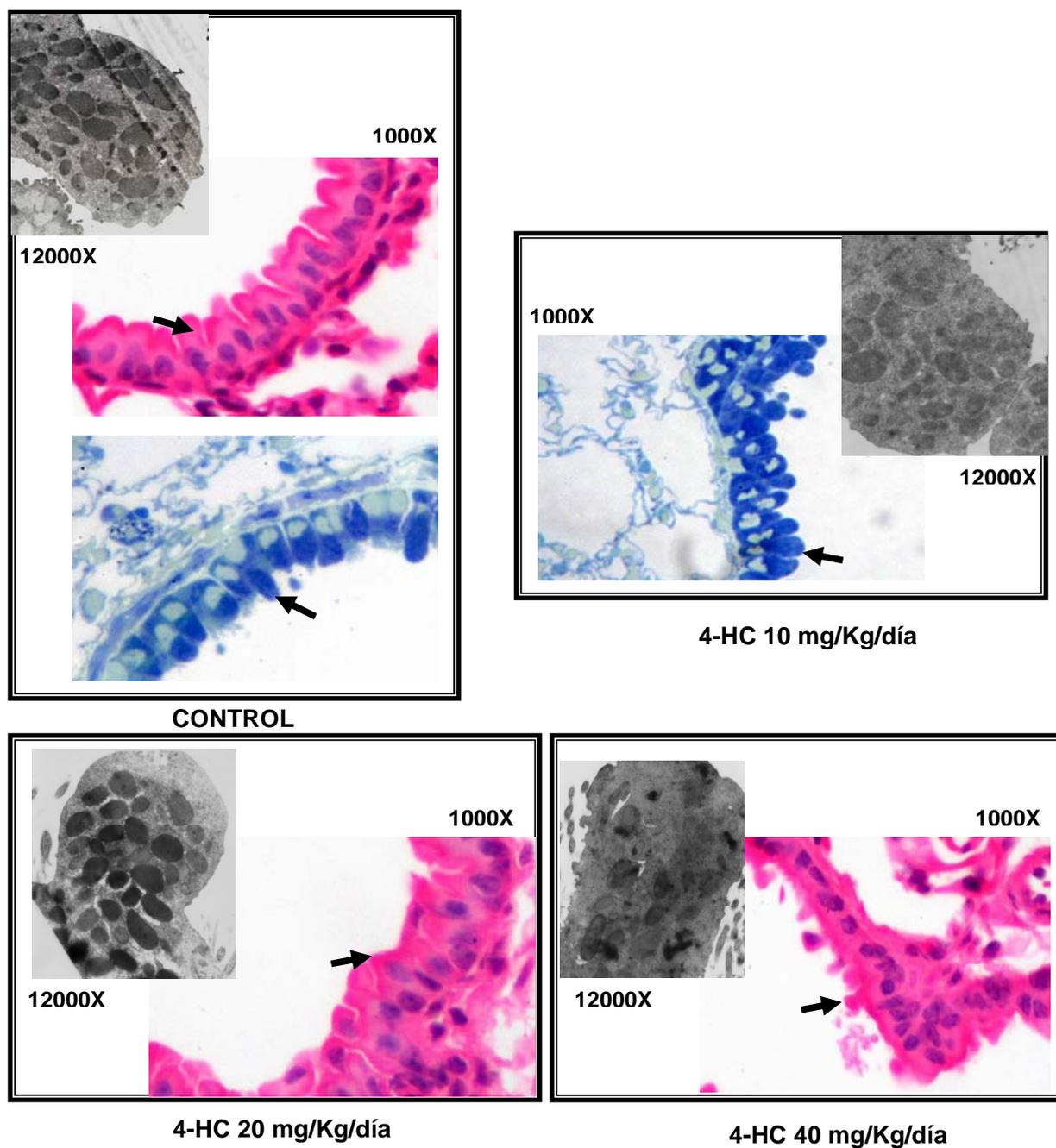


Figura 19. Fotomicrografías de cortes histológicos de pulmón de ratones sometidos a ocho semanas de tratamiento con 4-hidroxicumarina. En las fotomicrografías se muestra que la 4-HC (10, 20 y 40 mg/Kg/día) indujo citotoxicidad citoplasmática. También se observa que con las dosis de 40 m/Kg/día disminuyó la hiperplasia (flechas negras) respecto a las células de Clara de los ratones tratados por cuatro semanas de tratamiento con esta misma dosis. Mientras que con las dosis de 10 y de 20 mg/Kg/día no disminuye la hiperplasia (flechas negras) con respecto a las

Análisis del efecto antimetastásico *in vivo* de la 4-hidroxicumarina

células de Clara de los ratones sometidos a las cuatro semanas de tratamiento con sus correspondientes dosis. En los insertos se observa el efecto de la 4-HC sobre la densidad y número de gránulos citoplasmáticos.

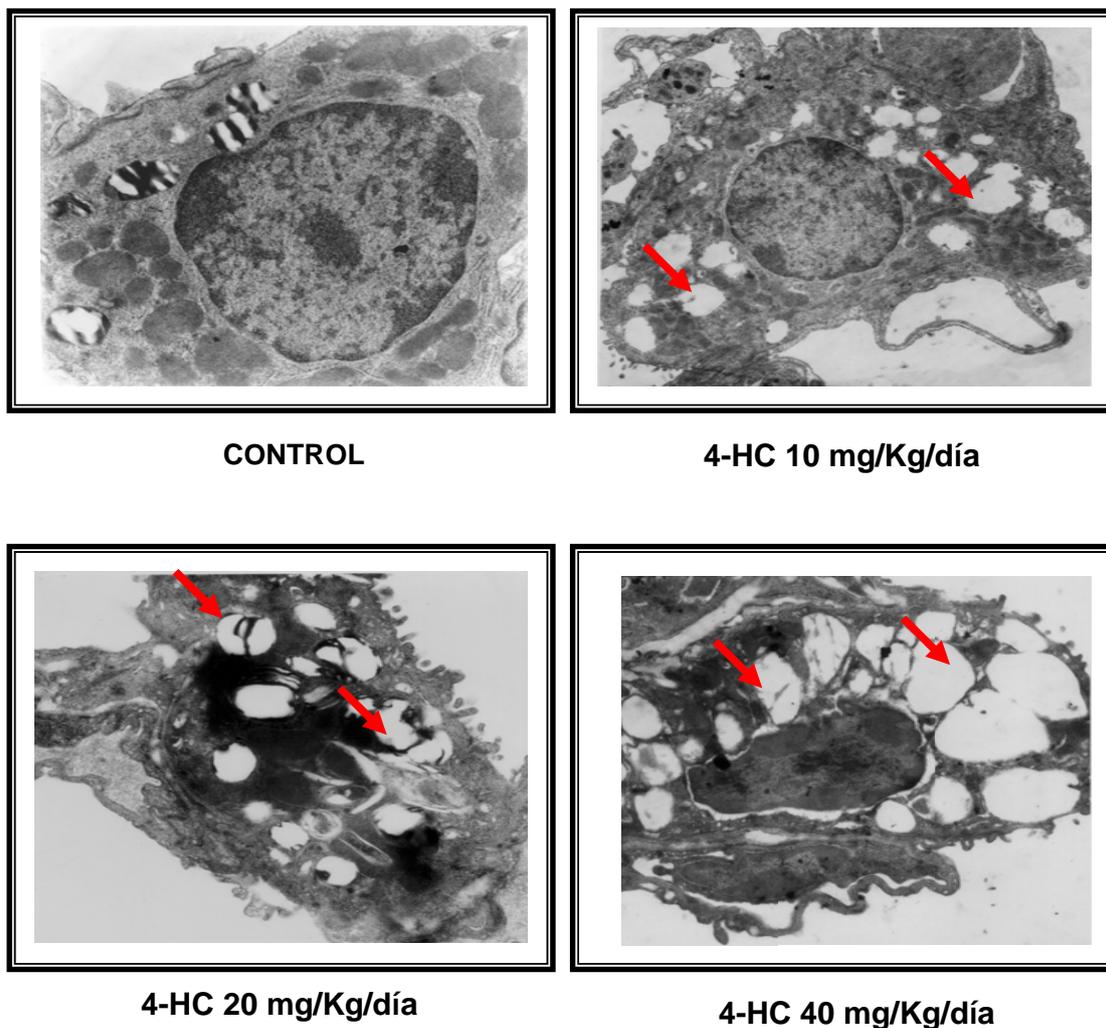


Figura 19a. Fotomicrografías de cortes histológicos de pulmón de ratones sometidos a ocho semanas de tratamiento con 4-hidroxicumarina. En las fotomicrografías se muestra la presencia

de vacuolas (flechas rojas) en los neumocitos tipo II, inducidas de forma dosis-dependiente por tratamiento con la 4-HC.

En la siguiente tabla se muestra el resumen de los resultados obtenidos de las determinaciones bioquímicas e histológicas realizadas para evaluar la toxicidad de la 4-HC (Tabla 7).

Tabla 7. Resumen de las evaluaciones realizadas en el ensayo de toxicidad de la 4-hidroxicumarina.

Tratamiento	Bioquímica					Histología		
	TFG	BUN	Proteína	NAG	γ -GT	Riñón	Hígado	Pulmón
CONTROL	N	N	N	N	N	M N	M N	M N
4-HC 10 mg/Kg/día	N	A	N	N	N	DR++	M N	HP+ VC+
4-HC 20 mg/Kg/día	N	A	N	D	N	DR++	NC+	HP++ VC++
4-HC 40 mg/Kg/día	N	A	N	N	N	DR+++	NC+++	HP+ VC+++

En la tabla la letra (N) indica que los valores bioquímicos son normales, la letra (A) que aumentaron ó (D) que disminuyeron. Los resultados histológicos se indican de la siguiente forma: morfología normal con M N, daño renal DR, necrosis hepática NC, hiperplasia de células de Clara HP, y la vacuolización de neumocitos II VC. Los signos +, ++ ó +++ corresponden a la magnitud del efecto.

I. DISCUSIÓN.

Debido a que la principal causa de muerte por cáncer es la formación de metástasis, es importante encontrar nuevos fármacos que la inhiban. Se ha demostrado que el tiempo de supervivencia del paciente correlaciona inversamente con la capacidad invasiva del tumor. Para el caso del melanoma metastásico, la Fundación de Investigación del Melanoma de los Estados Unidos en el 2007, publicó que la supervivencia a cinco años está entre el 3-9%. Actualmente, las terapias para el tratamiento del melanoma disminuyen el número de células cancerosas pero no son eficientes una vez que el paciente presenta metástasis. Por lo cual este trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto antimetastásico, antineoplásico y los posibles efectos adversos de la 4-hidroxicumarina utilizando un modelo murino de melanoma.

En este trabajo encontramos que la 4-hidroxicumarina disminuye el número de metástasis experimental a pulmón tras la inoculación de células B16-F10 tratadas *in vitro*.

Estudios *in vitro* con la 4-hidroxicumarina han reportado que en células B16-F10 induce alteraciones en procesos celulares involucrados en la formación de metástasis tales como: i) la adhesión a moléculas de matriz extracelular (Velasco 2003); ii) migración (Velasco 2003); y iii) expresión y fosforilación de proteínas involucradas en la adhesión celular (Salinas 2005). Al disminuir la capacidad de adhesión y migración celular, la 4-hidroxicumarina podría afectar las siguientes etapas del proceso de metástasis: i) la intravasación; ii) la extravasación; y iii) la migración en el tejido conectivo. Por lo tanto, los resultados encontrados en este trabajo sobre la disminución de las metástasis

experimentales sugieren que los cambios que induce la 4-hidroxicumarina *in vitro* son suficientes para producir un efecto antimetastásico.

De manera similar, la administración de 4-hidroxicumarina por vía oral a ratones C57BL/6 también disminuye el número de metástasis experimentales a pulmón. Esto sugiere que la 4-hidroxicumarina tiene actividad al ser administrada por vía oral y que con las dosis utilizadas (10, 20 ó 40 mg/Kg/día) se alcanza una concentración plasmática suficiente para modificar el potencial metastásico de las células B16-F10. Sin embargo, dado que la farmacocinética de la 4-hidroxicumarina no se conoce, no podemos especificar cuál es el rango de concentraciones plasmáticas en el que observamos el efecto antimetastásico. A través del reporte de Velasco y colaboradores con células B16-F10 tratadas *in vitro* con la 4-hidroxicumarina (Velasco 2003), podemos especular que el rango de concentración plasmática de la 4-hidroxicumarina podría estar entre 160-500 μ M, debido a que con estas concentraciones se ha observado que la hidroxicumarina induce alteraciones en procesos celulares involucrados en la formación de metástasis.

Cuando tratamos ratones implantados subcutáneamente con células B16-F10, observamos que el tratamiento con 4-hidroxicumarina (20 ó 40 mg/Kg/día) disminuye la formación de metástasis espontáneas. Adicionalmente, la 4-hidroxicumarina (10 mg/Kg/día) incrementa el tiempo de supervivencia y disminuye el tamaño del tumor, lo cual sugiere que este compuesto podría tener efecto antineoplásico. La administración conjunta de la 4-hidroxicumarina con ciclofosfamida también incrementa el tiempo de supervivencia (10 y 20 mg/Kg/día), pero no disminuye el tamaño del tumor respecto al tratamiento con ciclofosfamida, lo cual significa que el efecto sobre el tamaño del tumor de la ciclofosfamida no es aditivo ni potencia el efecto con la 4-hidroxicumarina.

Estudios con ciclofosfamida han descrito que su administración conjunta con interleucinas, antineoplásicos y péptidos potencian el efecto antineoplásico de estos últimos (D'Agostini 2005; Jazowiecka-Rakus 2006; Mitrus 2006). En este trabajo encontramos que la ciclofosfamida potencia el efecto de la 4-hidroxicumarina sobre la supervivencia con las dosis de 10 y 20 mg/Kg/día.

El hecho de que la dosis de 40 mg/Kg/día de la 4-hidroxicumarina en lugar de incrementar la supervivencia la disminuyera, sugiere un efecto tóxico. Por lo que, con el fin de aclarar si la 4-hidroxicumarina tiene efectos adversos evaluamos la inducción de posibles efectos tóxicos sobre hígado, riñón y pulmón

Se sabe que la cumarina administrada de 5 a 7000 mg/día no presenta efectos teratogénicos (Cox 1989). Estudios con humanos han demostrado la tolerancia de hasta 7 g diarios de cumarina con un incremento en los niveles de transaminasas, que se revierte al suspender el tratamiento (Marshall 1991; Marshall 1994b).

La cumarina es metabolizada por la familia de enzimas del citocromo P450. La isoforma CYP2A6 en humanos y la CYP2A5 en ratón metaboliza la biotransformación de la cumarina a un metabolito no tóxico, la 7-hidroxicumarina. Estas dos isoformas de P450 comparten una identidad del 80% en su secuencia de aminoácidos (Aoki 2006) y las diferencias entre ellas explican parcialmente por que en ratones la 7-hidroxilación no es la principal vía metabólica de la cumarina (Lush 1978; Wood 1974). En ratas se ha demostrado que la 3-hidroxilación es la principal vía de biotransformación de la cumarina.

Se ha observado que la biotransformación de la cumarina vía citocromo P450 presenta una gran variabilidad interespecie e intraespecie, pero que es un requisito previo para el desarrollo de toxicidad en diversas especies (Lake 1999, Born 1998). Se piensa

que el 3,4-epóxido de la cumarina es un intermediario altamente reactivo que induce toxicidad por si mismo y/ó a través de su conversión al o-hidroxifenilacetaldehído (Lake 1989; Vasallo 2004a; Vasallo 2004b).

En este estudio se observa que la 4-hidroxicumarina induce de forma dependiente de la dosis y del tiempo de administración, necrosis en los hepatocitos periféricos a las triadas portales (vena porta, conducto biliar y arteria hepática). Pero, dichos cambios morfológicos no son suficientes para inducir un incremento en los niveles γ -glutamyltransaminasa en suero.

Efectos hepatotóxicos de la cumarina ya se han reportado previamente en ratas y ratones. Por ejemplo, la administración prolongada ó única de cumarina (200 mg/Kg), en ratas F344 produce necrosis hepática centrolobulillar (Cohen 1979; Lake, 1984; Evans 1989; Lake 1989; Vassallo 2004a) y eleva los niveles de transaminasas en suero (Siest 1988; Lake 1994; Fentem 1992; Lake, 1984; Lake 1993; Lake 1989). En ratones B6C3F1 la cumarina induce hiperplasia y necrosis hepática centrolobulillar de forma dependiente de la dosis y del tiempo de administración, mientras que la administración única de cumarina (200 mg/Kg) sólo produce hipertrofia hepática (Born 1998).

La toxicidad localizada en hepatocitos periféricos a las triadas portales encontrada en este trabajo, se explica parcialmente por la hemodinámica del flujo sanguíneo en el hígado. El flujo sanguíneo que lleva los compuestos y nutrientes absorbidos en el tracto gastrointestinal llega al hígado por la vena porta. En el área portal el flujo de la vena porta se mezcla con el flujo sanguíneo proveniente de la arteria hepática y se inicia el metabolismo de lípidos, carbohidratos y compuestos nitrogenados, así como de los compuestos absorbidos (xenobióticos). Conforme la sangre fluye desde las tríadas a la

vena central de forma centrípeta, se metabolizan sus componentes. La distribución en el hígado de las enzimas de fase I y II que metabolizan a los xenobióticos así como la del glutatión, también ha sido ligada por Lake y colaboradores para explicar la hepatotoxicidad localizada inducida por la cumarina (Lake 1999).

A pesar de que el 3,4-epóxido de la cumarina no se ha aislado y no se ha identificado en incubaciones de cumarina en presencia microsomal de hígado de rata, el papel tóxico del epóxido ha sido apoyado por los estudios realizados con 3,4-dihidrocumarina (DHC) y con 3,4-dimetilcumarina (Lake 1989; Lake 1994). En donde tanto la 3,4-dihidrocumarina como la 3,4-dimetilcumarina no inducen hepatotoxicidad en ratas, a diferencia de las que fueron sometidas a la cumarina. Estos resultados sugieren que existe un impedimento estérico que obstaculiza la formación del 3,4-epóxido de la cumarina. (Lake 1989; Lake 1994).

En la evaluación del efecto tóxico de la 4-hidroxicumarina en pulmón realizada este trabajo, observamos que en células de Clara se induce: i) daño citoplasmático (perdida de la proyección apical); ii) incremento de gránulos citoplasmáticos (ricos en lípidos y mucopolisacáridos) e iii) hiperplasia. Por otra parte encontramos que el tratamiento induce la formación de vacuolas en los neumocitos tipo II.

Diversos estudios han descrito que la cumarina induce necrosis en las células de Clara e incrementa la incidencia de adenomas alveolo/bronquiolares y carcinomas en pulmón de ratones B6C3F1, mientras que en ratas F344 no se presentan dichos efectos. (Vallaso 2004b; Zhuo 1999; Born 1998). Por otro lado, en estudios con ratones se ha observado que la cumarina puede inducir tolerancia en las células de Clara tras exposiciones repetidas (Carlton 1996, Born 1997b; Fix 1998). Después de dos semanas

de tratamiento con 200 mg/Kg de cumarina, las células de Clara histológicamente se observan normales (Born 1997b; Fix 1998; Lake 1999). Se ha reportado que una exposición a la cumarina es capaz de reducir los niveles enzimáticos de CYP450 en microsomas de pulmón de ratón y que esta disminución no se observa después de dos semanas de tratamiento (Born 1997; Fix 1998). Por lo cual se planteó la hipótesis de que existen otros factores distintos a los niveles de las isoformas del CYP50 que son responsables de los mecanismos por los cuales la cumarina induce tolerancia en las células de Clara de pulmón de ratón (Lake 1999). Uno de los factores que también se ha relacionado con la adquisición de la tolerancia es el cambio en la regulación de glutatión (West 2000). Born sugiere que la tolerancia desarrollada por las células de Clara a diferencia de la toxicidad no se debe a una disminución en la formación del 3,4-epóxido de la cumarina, sino a que se puede estar incrementando la habilidad de detoxificación por conjugación con glutatión (Born 1999).

La toxicidad selectiva sobre células de Clara de pulmón de ratón, inducida por la cumarina, se explica parcialmente por que en ratones esta estirpe celular es más abundante que en pulmón de ratas, y en estos dos roedores su abundancia es aún mayor que en pulmón humano (Lumsden 1984; Plopper 1980b, Lake 1999). Por otro lado, las células de Clara presentes tanto en ratones como en ratas presentan un abundante retículo endoplásmico liso, el cual está prácticamente ausente en las células de Clara de pulmón humano (Plopper 1980a). El abundante retículo endoplásmico liso sugiere una alta actividad metabólica de las monooxigenasas y de las isoformas del CYP450 en las células de Clara de ratón, que podrían estar dando lugar a metabolitos tóxicos (Lake 1999).

Por otro lado, la toxicidad que se observa en las células de Clara como en los neumocitos tipo II probablemente se debe a que estas dos estirpes celulares comparten características metabólicas y funcionales que los hacen más susceptibles (Devereux 1984; Hynes 1999; Born 2002). Tanto los neumocitos tipo II como las células de Clara tienen una gran cantidad de retículo endoplasmático liso con alta actividad metabólica de las enzimas del citocromo P450 que dan lugar a la regulación y producción del surfactante y/o a la detoxificación de sustancias nocivas que llegan al pulmón por inhalación o circulación sanguínea (Devereux 1984, Charles 1991).

Diversos estudios sugieren que las diferencias en los efectos tóxicos que se observan entre especies, no solo dependen de las características de la estirpe celular sino también de las diferencias en la cantidad y actividad de las isoformas del CYP450 (Born 1998; Vallaso 2004b; Zhuo 1999). En ratón se ha descrito que la isoforma CYP2F2 del CP450 está presente abundantemente en las células de Clara y que es la responsable de la formación del 3,4-epóxido de la cumarina a partir de la cumarina (Vasallo 2004b). Los efectos tóxicos que se encontraron en este trabajo sobre las células de Clara, sugieren que la 4-hidroxicumarina puede ser ó formar un metabolito intermediario que CYP2F2 tome como sustrato para la formación del 3,4-epóxido de la cumarina.

En pulmón de humanos se ha identificado que CYP2F1 es un enzima ortóloga y con una identidad del 80 % a el CYP2F2 de ratón (Nhamburo 1990). Sin embargo, en estudios con preparaciones microsomales de pulmón de humano se ha observado que la cumarina no es metabolizada al 3,4-epóxido de la cumarina. Dichos resultados llevaron a plantear la hipótesis de que estas diferencias podían deberse a que CYP2F1 es poco

abundante en pulmón o a que la actividad catalítica sea baja en humano y por lo tanto la formación del epóxido sea insignificante (Vasallo 2004b).

Estudios han atribuido que en ratones el metabolismo del estireno y del naftaleno se lleva a cabo por CYP2F2 causando necrosis en las células de Clara, tal como sucede con la cumarina (Buckpitt 1995; Hynes 1999; Nagata 1990). Estos estudios plantearon que la abundancia y la actividad de CYP2F2 en células de Clara en el ratón predisponen a esta especie de la toxicidad de xenobióticos como la cumarina, el naftaleno y el estireno (Born 2002; Buckpitt 1995; Hynes 1999). Ahora, con los resultados de este trabajo dilucidamos que la 4-hidroxicumarina es un nuevo xenobiótico que induce toxicidad a las células de Clara y en los neumocitos tipo II en ratones C57BL/6.

En preparaciones microsomales de pulmón humano se ha observado que así como no se biotransforma eficientemente la cumarina (Vasallo 2004b), tampoco el naftaleno ni el estireno (Buckpitt 1986), lo cual sugiere que la ausencia ó baja actividad de la enzima CYP2F1 no permite la biotransformación a metabolitos tóxicos; tal como lo hace la enzima CYP2F2 en ratón. Es decir, posiblemente la enzima CYP2F1 no catalice la formación del 3,4-epóxido cumarina y por lo tanto no se desarrolle el efecto tóxico observado en este trabajo.

En la evaluación toxicológica de la 4-hidroxicumarina sobre el riñón realizada en este trabajo, se demuestra que el tratamiento induce metaplasia cúbica con microvellosidades en las células planas de la capa parietal de la capsula de Bowman. En células del túbulo proximal, la 4-hidroxicumarina induce modificaciones morfológicas severas tales como: i) disminución de las microvellosidades; ii) desorganización celular; iii) picnosis y pérdida de los núcleos; iv) presencia de mitocondrias con crestas tubulares; v)

incremento en el retículo endoplásmico liso; y vi) degeneración lipídica. A pesar de que dichas modificaciones sugieren la existencia de un proceso de muerte celular de las células del túbulo proximal, la evaluación funcional del riñón a través de los parámetros bioquímicos, indican que la existencia del daño morfológico en el riñón no modifica la función renal.

A pesar de que en las células del túbulo proximal se observan varios cambios morfológicos, la presencia íntegra del sistema endocítico (sistema encargado de la reabsorción de nutrientes) explica parcialmente el por que los parámetros funcionales del riñón determinados en este trabajo se encuentran dentro de los valores normales a excepción de los niveles de nitrógeno ureico en sangre. La excreción renal (por difusión pasiva o por transporte activo) que sufren algunos fármacos y sus metabolitos, se ha correlacionado con el incremento de nitrógeno ureico en sangre (Guyton 2005). Dicha excreción puede modificar la osmolaridad entre el espacio intersticial y el tubular, creándose un gradiente de concentración entre la urea tubular y la intersticial; que provoca que la urea no se elimine y se acumule en sangre (Guyton 2005). Esto sugiere que la acumulación de nitrógeno ureico en sangre puede deberse a los cambios en la osmolaridad y no por que exista daño funcional en los riñones. Fármacos como el ácido p-aminohipúrico y la penicilina son excretados en un solo recorrido del flujo sanguíneo por el riñón, sin modificar la osmolaridad tubular ni los niveles de nitrógeno ureico en sangre (Guyton 2005, Klaassen 1999). Sin embargo, antiinflamatorios no esteroides (naproxen, indometacina y diclofenado), amino-glucósidos (kanamicina, amikacina y gentamicina), antineoplásicos (cisplatino, oxaliplatino) y otros fármacos, modifican la osmolaridad y/o inducen necrosis tubular, dando lugar al incremento de los niveles de nitrógeno ureico en

sangre (Guyton 2005, Klaassen 1999). Actualmente no se conoce si los metabolitos de la 4-hidroxicumarina o la misma 4-hidroxicumarina son eliminados rápidamente por difusión pasiva ó por algún transportador. Pero el incremento de nitrógeno ureico en sangre que induce el tratamiento con 4-hidroxicumarina sugiere cambios en la osmolaridad tubular e intersticial.

La presencia de la 4-hidroxicumarina y posiblemente de sus metabolitos tóxicos en el flujo sanguíneo aunado a la hemodinámica del flujo sanguíneo por el riñón, puede explicar parcialmente los cambios inducidos sobre las células planas de la capa parietal de los glomérulos. Por otro lado, los severos cambios morfológicos que sufren las células tubulares, además de explicarse parcialmente por la hemodinámica, también pueden deberse a que la alta actividad metabólica en las células de túbulo proximal podría favorecer la producción de metabolitos más tóxicos ó difíciles de eliminar, que los que llegaron inicialmente en el flujo sanguíneo.

In vitro, empleando células LLCPK-1 de túbulo proximal de cerdo, se ha descrito que tanto la alta actividad metabólica de las enzimas del CYP450 (CYP3A y CYP2B6), así como la disminución del glutatión, están implicadas en la nefrotoxicidad causada por la ifosfamida (Aleksa, 2005). Este estudio muestra que la presencia de enzimas del CYP450 y la disminución de los componentes de los mecanismos de detoxificación en el túbulo proximal predispone a esta estirpe celular a la toxicidad de fármacos.

Actualmente se ha descrito que la isoforma CYP2F2, causante de la toxicidad en células de Clara, se encuentra presente en el riñón aunque en baja cantidad (Nhamburo 1990; Ye 1997; Baldwin 2004). Pero, a pesar de que sabemos que la isoforma CYP2F2 está presente en el riñón, no podemos dilucidar si la toxicidad que observamos en el

túbulo proximal se debe a: i) la producción del 3,4-epóxido de la cumarina ó de metabolitos tóxicos no descritos, formados por otras enzimas de la familia CYP450; ii) la disminución de los mecanismos de defensa contra la toxicidad; ó iii) la acumulación de metabolitos de la 4-hidroxicumarina ó de esta misma.

La presencia de mitocondrias con crestas tubulares y el incremento del retículo endoplásmico liso en células de túbulo proximal, que observamos en este trabajo tras el tratamiento con 4-hidroxicumarina, correlacionan con un incremento en la actividad metabólica y esto a su vez muy posiblemente con la generación de metabolitos tóxicos y/ó difíciles de eliminar.

La disminución de las microvellosidades y el desarreglo intracelular de los túbulos proximales inducido por la 4-hidroxicumarina en este trabajo, correlacionan con las modificaciones en el arreglo del citoesqueleto de actina reportado previamente *in vitro* en células B16F10 (Velasco 2003). Con base a estos resultados puede contemplarse la posibilidad de que la polimerización de la actina sea un blanco susceptible a los efectos de la 4-hidroxicumarina, debido a que tanto el arreglo intracelular como las microvellosidades están dados por filamentos de actina. Dicho efecto sobre la actina podría aclararse en parte, si se realizara una tinción con faloidina en células de túbulo proximal tratadas *in vitro* con 4-hidroxicumarina.

A pesar de que no se han aclarado los mecanismos por los cuales la cumarina tiene efecto tóxico en el riñón. El Programa Nacional de Toxicología de los Estados Unidos en 1993 describió que la cumarina en ratas, induce necrosis del túbulo proximal e incremento de la incidencia de tumores en riñón. Este programa también sugiere que el

efecto tóxico de la cumarina posiblemente involucre la formación de metabolitos electrofílicos como el 3,4-epóxido de la cumarina.

A pesar de que no sabemos claramente que metabolito (s) de la 4-hidroxicumarina induce la toxicidad en este trabajo, las características de los diferentes órganos tales como: i) la cantidad, actividad e inducibilidad de las isoformas del CYP450; ii) los mecanismos de detoxificación; y iii) la capacidad regenerativa del tejido, explican parcialmente por que observamos diferentes niveles de toxicidad en los órganos evaluados.

Cox y colaboradores, observaron en humanos que tras la administración crónica de 100 mg/día de cumarina se incrementan los niveles de transaminasas en suero y que al suspender el tratamiento los niveles disminuyen a los valores normales (Cox 1989). Este estudio sugiere que posiblemente si se retira el tratamiento con la 4-hidroxicumarina los efectos tóxicos observados podrían revertirse. Esta hipótesis puede apoyarse con lo reportado en células B16-F10, en donde los efectos inducidos por la 4-hidroxicumarina se revierten al retirar el tratamiento (Velasco 2003). Para aclarar si el efecto tóxico de la 4-hidroxicumarina es reversible, podría realizarse un estudio en donde se administre 4-hidroxicumarina a ratones C57BL/6 vía oral, tal como se hizo en este estudio. Posteriormente, se retiraría el tratamiento y se realizaría un estudio histológico, para observar si los órganos estudiados vuelven a presentar una morfología normal.

Dada la importancia de los procesos adhesivos en la generación de metástasis, la identificación de fármacos como la 4-hidroxicumarina que alteren la adhesión y migración celular de células cancerosas puede ser importante para el pronóstico y generación de nuevas terapias

I. CONCLUSIONES.

- La 4-HC inhibe la formación de metástasis experimentales y espontáneas, disminuye el tamaño del tumor e incrementa el tiempo de supervivencia en el modelo de melanoma murino utilizado en este trabajo.
- La administración conjunta de la 4-HC con la ciclofosfamida incrementa el tiempo de supervivencia e inhibe la formación de metástasis espontáneas, pero no disminuye el tamaño del tumor con respecto al tratamiento solo con ciclofosfamida.
- La administración crónica de la 4-HC no modifica la función renal o hepática, pero induce daño histológico en el riñón, hígado y pulmón.

II. PERSPECTIVA.

Considerando que la 4-hidroxicumarina *in vivo* presenta efectos antimetastásico, antineoplásico y tóxico, deben realizarse estudios posteriores para encontrar un esquema de administración y una dosis en que se observe el efecto terapéutico y se minimice el efecto tóxico. Esto con la finalidad de proponer a la 4-hidroxicumarina como un fármaco para complementar las terapias contra el melanoma.

I. BIBLIOGRAFIA

1. Aleksa K, Halachmi N, Ito S and Koren G (2005). A tubule cell model for ifosfamide nephrotoxicity. *Can. J. of Physiol. Pharmacol.* 83:6; 499-508.
2. Anisimov V. (2007). *Biology of Aging and Cancer.* *Cancer control.* 14:1; 24-31.
3. Aoki K, Kashiwagura Y, Horie T, Sato H, Tateno C, Ozawa N and Yoshizato K (2006). Characterization of humanized liver from chimeric mice using coumarin as a human CYP2A6 and mouse CYP2A5 probe. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 21:4; 277-285.
4. Baldwin R, Jewell W, Fanucchi M, Plopper C and Buckpitt A (2004). Comparison of pulmonary/nasal CYP2F expression levels in rodents and rhesus macaque. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 309:1; 127-136.
5. Born S, Caudill D, Fliter K and Purdon M (2002). Identification of the cytochromes P450 that catalyze coumarin 3,4-epoxidation and 3-hydroxylation. *Drug Metab. Dispos.* 30:5; 483-7.
6. Born S, Fix A, Caudill D and Lehman-McKeeman L (1998). Selective Clara cell injury in mouse lung following acute administration of coumarin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 151:1; 45-56.
7. Born S, Fix A, Caudill D and Lehman-McKeeman L (1999). Development of tolerance to Clara cell necrosis with repeat administration of coumarin. *Toxicol. Sci.* 51:2; 300-309.
8. Born S, Rodriguez P, Eddy C and Lehman-McKeeman L. (1997). Synthesis and reactivity of coumarin 3,4-epoxide. *Drug Metab. Dispos.* 25:11; 1318-24.

9. Bourdon J (2007). p53 and its isoforms in cancer. Br. J. Cancer. 97; 277–282.
10. Buckpitt A and Bahnson L (1986). Naphthalene metabolism by human lung microsomal enzymes. Toxicol. 41:3; 333-341.
11. Buckpitt A, Chang A, Weir A, Van Winkle L, Duan X, Philpot R and Plopper C (1995). Relationship of cytochrome P450 activity to Clara cell cytotoxicity. IV. Metabolism of naphthalene and naphthalene oxide in microdissected airways from mice, rats, and hamsters. Mol. Pharmacol. 47:1; 74-81.
12. Carlton B, Aubrun J and Simon G (1996). Effects of coumarin following perinatal and chronic exposure in Sprague-Dawley rats and CD-1 mice. Fundam. Appl. Toxicol. 30:1; 145-151.
13. Casley S, Foldy-Borcksok E and Foldi M (1973). The electron microscopy of effects of treatment with coumarin (Venalot) and by thoracic duct cannulation on thermal injuries. J. Exp. Pathol. 53: 1-5.
14. Chambers A, Naumov G, Vantghem S and Tuck A (2000). Molecular biology of breast cancer metastasis. Clinical implications of experimental studies on metastatic inefficiency. Br. Cancer Res. 2; 400-407.
15. Chambers A, Groom A and MacDonald I (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. Rev. Cancer. 2: 563-573.
16. Cohen A (1979). Critical review of the toxicology of coumarin with special reference to interspecies differences in metabolism and hepatotoxic response and their significance to man. Food Chem. Toxicol. 17; 277–289.
17. Cohen S and Ellwein L (1991). Genetic errors, cell proliferation, and carcinogenesis. Cancer Res. 51:24; 6493-6505.

18. Colville P and Willoughby D (1997). Growth factors in angiogenesis: current interest and therapeutic potential. *Mol. Med. Today.* 3:1; 14-23
19. Cox D, O'Kennedy R and Thornes D (1989). The rarity of liver toxicity in patients treated with coumarin (1, 2-benzopyrone). *Hum. Exp. Toxicol.* 8; 501-506.
20. Devereux T (1984). Alveolar Type II and Clara Cells: Isolation and Xenobiotic Metabolism. *Environ. Health Perspect.* 56; 95-101.
21. D'Agostini C, Pica F, Febbraro G, Grelli S, Chiavaroli C and Garaci E (2005). Antitumour effect of OM-174 and cyclophosphamide on murine B16 melanoma in different experimental conditions. *Int. Immunopharmacol.* 5:7-8; 1205-1212.
22. Dexeus F, Logothetis C, Sella A, Fitz K, Amato R, Reuben J and Dossier N (1990). Phase II study of coumarin and cimetidine in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 8; 325-329.
23. Donati M, Roncaglioni M, Falanga A, Casali B and Semeraro N (1986). Vitamin K-dependent procoagulant in cancer cells: a potential target for the antimetastatic effect of warfarin?. *Haemostasis.* 16:3; 288-294.
24. Eccles A and Welch D (2007). Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet.* 369; 1742-1757.
25. Egan D, O'Kennedy R, Moran E, Cox D, Prosser E and Thornes R (1990). The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarin-related compounds. *Drug Metab. Rev.* 22:5; 503-529.
26. Eggermont A and Kirkwood J (2004). Re-evaluating the role of dacarbazine in metastatic melanoma: what have we learned in 30 years?. *Eur. J. Cancer.* 40:12; 825-836.

27. Evans J, Appleby E, Lake B and Conning D (1989). Studies on the induction of cholangiofibrosis by coumarin in the rat. *Toxicol.* 55; 207–224.
28. Fentem J and Fry J (1993). Species differences in the metabolism and hepatotoxicity of coumarin. *Comp. Biochem. Physiol C.* 104:1; 1-8.
29. Fentem J, Fry J and Thomas N (1992). Species differences in the hepatotoxicity of coumarin: a comparison of rat and Mongolian gerbil. *Toxicol.* 71: (1-2); 129-36.
30. Franks L (1998). Introduction to the cellular and Molecular Biology of Cancer, 3rd. Edition. London. Oxford University Press.
31. Gaggioli C and Sahai E (2007). Melanoma invasion – current knowledge and future directions. *Pigment Cell Res.* 20; 161–172.
32. Guyton A y Hall E (2005). Tratado de Fisiología Médica. Décima Edición. Cap 25. (Sistema Urinario)
33. Hanahan D and Weinberg R (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell.* 100: 57-70.
34. Hardt T and Ritschel W (1983). The effect of coumarin and 7-hydroxycoumarin on in vitro macrophage phagocytosis of latex particles. *Meth. Find Exptl. Clin. Pharmacol.* 5; 39-43.
35. Hilgard P, Schulte H, Wetzig G and Schmitt G (1978). Oral anticoagulation in the treatment of a spontaneously metastasizing murine tumor. *Br. J. Cancer.* 35; 78-85.
36. Hoon D, Kitago M, Kim J, Mori T, Piris A, Szyfelbein K, Mihm M, Nathanson D, Padera T, Chambers A, Vantyghem S, MacDonald I, Shivers S, Alsarraj M, Reintgen D, Passlick B, Sieneel W and Pantel K (2006). Molecular mechanisms of metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 25; 203–220.

37. Hynes D, DeNicola D and Carlson G (1999). Metabolism of styrene by mouse and rat isolated lung cells. *Toxicol. Sci.* 51:2; 195-201.
38. Ichihashi M, Ueda M, Budiyanto A, Bito T, Oka M, Fukunaga M, Tsuru K and Horikawa T (2003). UV-induced skin damage. *Toxicology.* 189; 21-39.
39. Jazowiecka-Rakus J, Jarosz M and Szala S (2006). Combination of vasostatin gene therapy with cyclophosphamide inhibits growth of B16(F10) melanoma tumours. *Acta Biochim. Pol.* 53:1; 199-202.
40. Jemmal A, Clegg L, Ward E, Ries L, Wu X and Jamison P (2004). Annual Report to the Nation on the status of cancer, 1975-2001, with special feature regarding survival. *Cancer.* 101:1; 3-27.
41. Jiménez O, Lopez G, Nieto R, Velasco V, Molina G, Mendoza P, García M, Elizalde G, Leon C and Mandoki J (2001). Decrease of cyclin D1 in the human lung adenocarcinoma cell line A-427 by 7-hydroxycoumarin. *Lung Cancer.* 34; 185-194.
42. Jiménez O, Molina G, Mendoza P, León C, Flores P and Mandoki J (1999). Cytostatic activity of coumarin metabolites and derivatives in the B16-F10 murine melanoma cell line. *Melanoma Res.* 9; 243-247.
43. Jones P and Baylin S (2007). The epigenomics of cancer. *Cell.* 128:4; 683-92.
44. Kahn J, Preis P, Waldman F and Tseng A (1994). Coumarin modulates the cell cycle progression of an MTV-EJras cell line. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 120(Suppl): S19-22.
45. Klaassen C and Watkins III J (1999). Casarett & Doull's Toxicology. The basic science of poisons. 5th. Edition. Companion Handbook.

46. Lake B (1984). Investigations into the mechanism of coumarin-induced hepatotoxicity in the rat. Arch. Toxicol. Suppl. 7; 16-29.
47. Lake B (1999). Coumarin Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity: Relevance for Human Risk Assessment. Food Chem. Toxicol. 37:4; 423-453.
48. Lake B, Gray T, Evans J, Lewis D, Beamand J and Hue K (1989). Studies on the mechanism of coumarin-induced toxicity in rat hepatocytes: comparison with dihydrocoumarin and other coumarin metabolites. Toxicol. Appl. Pharmacol. 97:2; 311-323.
49. Lake B and Evans J (1993). Effect of pretreatment with some mixed-function oxidase enzyme inducers on the acute hepatotoxicity of coumarin in the rat. Food Chem. Toxicol. 31:12; 963-970.
50. Lake B and Grasso P (1996). Comparison of the Hepatotoxicity of Coumarin in the Rat, Mouse, and Syrian Hamster: A Dose and Time Response. Fundam. Appl. Toxicol. 181: 3; 105–117.
51. Lake B (1999). Coumarin Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity: Relevance for Human Risk Assessment. Food Chem. Toxicol. 37: 423-453.
52. Lake B, Evans J, Lewis D and Price R (1994). Comparison of the hepatic effects of coumarin, 3,4-dimethylcoumarin, dihydrocoumarin and 6-methylcoumarin in the rat. Food Chem. Toxicol. 32:8; 743-51.
53. Lake B, Gray T, Evans J, Lewis D and Beamand J (1989). Studies on the mechanism of coumarin-induced toxicity in rat hepatocytes: Comparison with dihydrocoumarin and other coumarin metabolites. Toxicol. Appl. Pharmacol. 97; 311–323.
54. Liotta L (1986). Tumor invasion and metastases-role of the extracellular matrix. Cancer Res. 46: 1-7.

55. Loberg R, Bradley D, Tomlins S, Chinnaiyan A and Pienta K (2007). The lethal phenotype of cancer: The molecular basis of death due to malignancy. CA. Cancer J. Clin. 57; 225–241.
56. Lodish H, Berk A, Zipursky S, Matsudaira P, Baltimore D and Darnel J (2000). Molecular Biology, 4th. Edition. Scientific American Books. USA. 1033-1174.
57. López G, Prado G, Aguilar C, Molina G, Morales F and Mandoki J (2004). Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxycoumarin on human lung carcinoma cell lines. Lung Cancer. 2004 43:3; 275-283.
58. Lü H, Niggemann B and Zänker K (1996). 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: 335-342.
59. Lumsden A, McLean A and Lamb D (1984). Goblet and Clara cells of human distal airways: evidence for smoking induced changes in their numbers. Thorax. 39:11; 844-849.
60. Lush I and Andrews K (1978). Genetic variation between mice in their metabolism of coumarin and its derivatives. Genet. Res. 31:2; 177-86.
61. Mandará M, Nortilli R, Sava T and Cetto G (2006). Chemotherapy for metastatic melanoma. Expert. Rev. Anticancer Ther. 6:1; 121-130.
62. Marshall M, Butler K and Fried A (1991). Phase I evaluation of coumarin (1,2-benzopyrone) and cimetidine in patients with advanced malignancies. Mol. Biother. 3:3; 170-178.

63. Marshall M, Kervin K, Umerani A, Albainy-Jenei J, Zhao Q and Khazaeli M (1994a). Growth-inhibitory effects of coumarin (1, 2-benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin on human malignant cell lines in vitro. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 120 (Suppl); S3—S10.
64. Marshall M, Mohler J, Edmonds K, Williams B, Butler K, Ryles M, Weiss L, Urban D, Bueschen A and Markiewicz M (1994b). An updated review of the clinical development of coumarin (1, 2-benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 120 Suppl; S39-42.
65. Matt B and Hilgard (1981). Anticoagulants and experimental metastases-evaluation of antimetastasis effects in different model systems. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 101; 275-283.
66. Maucher A, Kager M and von Angerer E (1993). Evaluation of the antitumor activity of coumarin in prostate cancer models. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 119; 150-154.
67. Melnikova V and Ananthaswamy H (2005). Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer. Mutation Research. 571; 91–106.
68. Mitrus I, DeliĆ K, Wróbel N, Missol-Kolka E and Szala S (2006). Combination of IL-12 gene therapy and CTX chemotherapy inhibits growth of primary B16(F10) melanoma tumors in mice. Acta Biochim. Pol. 53:2; 357-360.
69. Mohler J, Williams B, Thompson I and Marshall M (1994). Coumarin (1, 2-benzopyrone) for the treatment of prostatic carcinoma. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 120 (suppl); S35-S38.
70. Mohr U, Dungworth D, Capen C, Carlton W, Sundberg J and Ward J (1996). Pathology of the Aging Mouse. Vol 1. ILSE Press.

71. Moran E, O'Kennedy R and Thornes R (1987). Analysis of coumarin and its urinary metabolites by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 416; 165-169.
72. Nair R, Fisher P, Safe H, Cortez C, Harvey G and Di Giovanni J (1991). Novel coumarins as potential anticarcinogenic agents. *Carcinogenesis.* 12: 65-69.
73. Nagata K, Martin B, Gillette J and Sasame H (1990). Isozymes of cytochrome P-450 that metabolize naphthalene in liver and lung of untreated mice. *Drug Metab. Dispos.* 18:5; 557-564.
74. Nakayasu M, Shima H, Aonuma S, Nakagama H, Nagao M and Sugimura T (1988). Deletion of transfected oncogenes from NIH 3T3 transformants by inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* 85; 9066-9070.
75. Narod S, Lynch H, Lynch J, Conway T, Watson P, Feunteun J, Lenoir G and Fitzgibbons R (1994). Hereditary breast cancer and family cancer syndromes. *World J. Surg.* 18:1; 21-31.
76. National Toxicology Program. (1993). *Toxicology and Carcinogenesis studies of coumarin in F344/N Rats and B6C3F1 Mice.* U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. NIH Publication No.93-315
77. Nhamburo P, Kimura S, McBride O, Kozak C, Gelboin H and Gonzalez F (1990). The human CYP2F gene subfamily: identification of a cDNA encoding a new cytochrome P450, cDNA-directed expression, and chromosome mapping. *Biochemistry.* 12:29(23); 5491-5499.

78. Orozco A (**2000**). Estudio *in vivo* del efecto antineoplásico de la cumarina en un modelo de melanoma murino. México, D. F. Facultad de Química. UNAM. 120p. Tesis de Licenciatura.
79. Ortega V, Martínez C, Gascón J, Baños M and Jordana M (**2003**). Melanoma metastásico pulmonar. Efectos del etanol y de flavonoides *Rev. Esp. Patol.* 36:4; 425-432.
80. Pawlak G and Helfman M (**2001**). Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11; 41-47.
81. Piller N (**1978**). A morphological assesment of the stimulatory effect of coumarin on macrophages. *Br. J. Exp. Path.* 28; 1407-1410.
82. Plopper C, Mariassy A and Hill L (**1980a**). Ultrastructure of the nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cell of mammalian lung: I. A comparison of rabbit, guinea pig, rat, hamster, and mouse. *Exp. Lung Res.* 1:2; 139-154.
83. Plopper C, Mariassy A and Hill L (**1980b**). Ultrastructure of the nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cell of mammalian lung. III. A study of man with comparison of 15 mammalian species. *Exp. Lung Res.* 1:2; 171-180.
84. Qi Z, Whitt I, Mehta A, Jin J, Zhao M, Harris R, Fogo A and Breyer M (**2004**). Serial determination of glomerular filtration rate in conscious mice using FITC-inulin clearance. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 286:3; F590-6.
85. Rautio A, Kraul H, Kojo A, Salmela E and Pelkonen O (**1992**). Interindividual variability of coumarin 7-hydroxylation in healthy volunteer. *Pharmacogenetics.* 2; 227-233.
86. Riordan D and Daly I (**1954**). The growth-inhibiting properties of lactones. *Ir. J. Med. Sci.* 6; 157-161.

87. Ritschel W, Brady E and Tan I (1979). First-pass effect of coumarin in man. Int. J. Clin. Pharmacol. Biopharm. 17; 99-103.
88. Ritschel W, Brady M, Tan H, Hoffmann K, Yiu I and Grummich K (1977). Pharmacokinetics of coumarin and its 7-hydroxy-metabolites upon intravenous and peroral administration of coumarin in man. Eur. J. Clin. Pharmacol. 12; 457-461.
89. Rosas S, Baca T, Muñoz D and Muñoz F (2003). Clinical, Epidemiological and Histopathological study of Malignant Melanoma. CIMEL. 8:1; 23-27.
90. Ross M, Reith E and Romrell L (1992). Histología. Texto y atlas color. 2a. Edición. Edit. Panamericana.
91. Ruddon W (1995). Cancer Biology, 3ª Edición.
92. Salinas N (2005). Efecto de 4-hidroxicuamrina sobre la localización, expresión y activación de paxilina en células B16 de melanoma murino. Tesis de Licenciatura. Fac. Química. UNAM. 70p.
93. Salinas N, Velasco V and Mendoza P (2006). Participation of paxillin in the inhibition by 4-hydroxycoumarin of experimental melanoma metastases. Eur. J. Cancer. Suppl. 4:22.
94. Schaller M, Otey C, Hildebrand J and Parsons J (1995). Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. J. Cell Biol. 130; 1181-1187.
95. Scheel L (1972). The biological action of the coumarins. Microbiol Toxins. 8; 47-66.
96. Shilling W, Crampton R and Longland R (1969). Metabolism of coumarin in man. Nature. 221:5181; 664-665.

97. Siest G, Batt A, Fournel-Gigleux S, Galteau M, Wellman-Bednawska M, Minn A and Costesec A (1988). Induction of plasma and tissue enzymes by drugs: significance in toxicological studies. *Xenobiotica* 18(Suppl.1); 21–34.
98. Stuhlmeier K, Theyer G, Baumgartner G and Zlabinger G (1991). Synergistic effect of coumarin (1,2 benzopyrone) and endotoxin in the induction of human interleukin-1. *Clin. Exp. Immunol.* 84:2; 317–323.
99. Thornes D and O’Kennedy R (1997). Coumarins. Biology, applications and mode of action. John Wiley & Sons Ltd.
100. Thornes R, Lynch G and Sheehan M (1982). Cimetidine and coumarin therapy of melanoma. *Lancet.* 1982; 2: 238-241.
101. Turner C (1994). Paxillin: a cytoskeletal target for tyrosin kinases. *BioEssays.* 16; 47-52.
102. Ujjin P, Satarug S, Vanavanitkun Y, Daigo S, Ariyoshi N, Yamazaki H, Reilly P, Moore M and Kamataki T (2002). 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; 241-249.
103. van Iersel M, Henderson C, Walters D, Price R, Wolf C and Lake B (1994). Metabolism of [3-14C] coumarin by human liver microsomes. *Xenobiotica.* 24:8; 795-803.
104. Vassallo J, Hicks S, Daston G and Lehman-McKeeman L (2004a). Metabolic Detoxification Determines Species Differences in Coumarin-Induced Hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* 80; 249–257.

105. Vassallo J, Hicks S, Born S and Daston G (2004b). Roles for epoxidation and detoxification of coumarin in determining species differences in Clara cell toxicity. *Toxicol. Sci.* 82:1; 26-33.
106. Velasco V, Agramonte H, Barrera O, Jiménez O, Mendoza P, Mandoki J, García M and Landa A (2003). 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. *Cancer Lett.* 198; 179-186.
107. Velasco V, Molina G, Orozco A, Leon F, Santos E, Mendoza P and Mandoki J (1998). 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-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 358 (Suppl): R733.
108. von Angerer E, Kager M and Maucher A (1994). Antitumour activity of coumarin in prostate and mammary cancer models. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 120 (Suppl): S14-S16.
109. Von Weymarn L and Murphy S (2001). Coumarin metabolism by rat esophageal microsomes and cytochrome P450 2A3. *Chem. Res. Toxicol.* 14:10; 1386-1392.
110. Von Weymarn L and Murphy S (2003). 2A13-catalysed coumarin metabolism: comparison with CYP2A5 and CYP2A6. *Xenobiotica.* 33:1; 73-81.
111. Weiss L (1990). Metastatic inefficiency. *Adv. Cancer Res.* 54; 159-211.

112. West J, Buckpitt A and Plopper C (2000). Elevated airway GSH resynthesis confers protection to Clara cells from naphthalene injury in mice made tolerant by repeated exposures. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294:2; 516-523.
113. Wood A and Conney A (1974). Genetic variation in coumarin hydroxylase activity in the mouse (*Mus musculus*). *Science.* 16:185(151); 612-614.
114. Xu C, Rao Y, Xu B, Hoffmann E, Jones J, Sellers E and Tyndale R (2002). An *in vivo* pilot study characterizing the new CYP2A6*7, *8, and *10 alleles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290; 318-324.
115. Ye X, Lu L and Gill S (1997). Suppression of cytochrome P450 Cyp2f2 mRNA levels in mice by the peroxisome proliferator diethylhexylphthalate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239:3; 660-665.
116. Zacharski L, Henderson W, Rickles F, Forman W, Forcier J, Edwards R, Headley E, Kim S, O'Donnell J, O'Dell R, Tornyo K and Kwaan H (1984). Effect of Warfarin Anticoagulation on Survival in Carcinoma of the Lung, Colon, Head and Neck, and Prostate. Final report of VA Cooperative Study #75. *Cancer.* 53; 2046-2052.
117. Zänker K, Blümel G, Lange S and Siewert J (1984). Coumarin in melanoma patients: an experimental and clinical study. *Drugs Exptl. Clin. Res.* 11; 767-774.
118. Zhuo X, Gu J, Zhang Q, Spink D, Kaminsky L and Ding X (1999). Biotransformation of coumarin by rodent and human cytochromes P-450: metabolic basis of tissue-selective toxicity in olfactory mucosa of rats and mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288:2; 463-471.



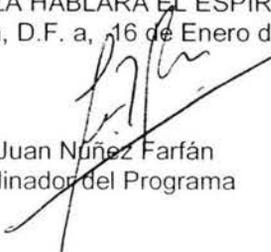
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 22 de Octubre de 2007, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **SALINAS JAZMÍN NOHEMÍ** con número de cuenta **97195890** con la tesis titulada "**Análisis del efecto antimetastásico *in vivo* de la 4-hidroxicumarina**", realizada bajo la dirección del **DR. MARCO ANTONIO VELASCO VELÁZQUEZ**.

Presidente: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Vocal: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
Secretario: DR. MARCO ANTONIO VELASCO VELÁZQUEZ
Suplente: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
Suplente: DR. JUAN ARCADIO MOLINA GUARNEROS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 16 de Enero de 2008.


Dr. Juan Nuñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente de la interesada.

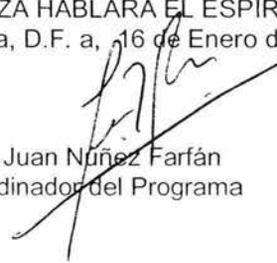
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 22 de Octubre de 2007, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **SALINAS JAZMÍN NOHEMÍ** con número de cuenta **97195890** con la tesis titulada "**Análisis del efecto antimetastásico *in vivo* de la 4-hidroxicumarina**", realizada bajo la dirección del **DR. MARCO ANTONIO VELASCO VELÁZQUEZ**.

Presidente: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Vocal: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
Secretario: DR. MARCO ANTONIO VELASCO VELÁZQUEZ
Suplente: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
Suplente: DR. JUAN ARCADIO MOLINA GUARNEROS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 16 de Enero de 2008.



Dr. Juan Nuñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente de la interesada.

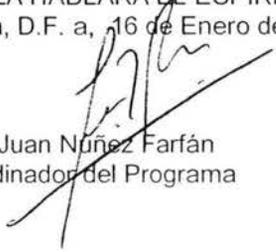
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 22 de Octubre de 2007, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **SALINAS JAZMÍN NOHEMÍ** con número de cuenta **97195890** con la tesis titulada "**Análisis del efecto antimetastásico *in vivo* de la 4-hidroxicumarina**", realizada bajo la dirección del **DR. MARCO ANTONIO VELASCO VELÁZQUEZ**.

Presidente: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Vocal: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
Secretario: DR. MARCO ANTONIO VELASCO VELÁZQUEZ
Suplente: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
Suplente: DR. JUAN ARCADIO MOLINA GUARNEROS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 16 de Enero de 2008.


Dr. Juan Nuñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente de la interesada.