



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**ESTUDIO *IN VITRO* DEL MECANISMO DE ACCIÓN INDUCTOR  
DE LA APOPTOSIS DE LA 7-HIDROXICUMARINA EN LÍNEAS  
DE ADENOCARCINOMA PULMONAR HUMANO**

**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**

**MARIBEL SOTO NÚÑEZ**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. JUAN A. MOLINA GUARNEROS**

México, D.F.

Mayo, 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. Juan A Molina Guarneros, Dr. Luis Felipe Jimenez y Dr. José Sullivan López González, gracias por su tutoría para el desarrollo del presente trabajo, el cual se desarrolló en el Laboratorio de Inmunofarmacología del Departamento de Farmacología en la Facultad de Medicina UNAM.

Agradezco a los miembros del jurado: Dr. Juan José Mandoki Weitzner, Dra. Isabel Soto Cruz, Dr. Juan A. Molina Guarneros, Dr. Luis Felipe Jimenez García, Dr. Marco Antonio Velasco Velazquez por sus observaciones para la elaboración y presentación de esta tesis.

**Apoyos recibidos:**

- ❖ PAPIIT IN213707-2
- ❖ CONACYT 56289

## Agradecimientos

A el Dr. Juan Molina por la confianza depositada en mi persona y en mi trabajo. Por permitirme ser parte de su proyecto y porque con su guía voy avanzando otro escalón en este trayecto académico.

A mis padres por siempre estar ahí, compartiendo mis preocupaciones, buscando la manera de apoyarme y alegrarse con mis logros. Han sido un gran apoyo pues en este tiempo solo debí preocuparme por sacar adelante mi maestría. Y en especial a mamá pues siempre se ha preocupado por que tenga todo lo necesario para salir adelante.

A mi hermana porque con sus ocurrencias y visitas alegraba mis días pesados y su apoyo incondicional en cualquier momento.

A mi sensei Nohemí porque en verdad me sacaba de mil y un apuros y con su amistad y paciencia también fue una guía para mi.

Al Dr Marco Tulio por sus visitas que alegraban el día, por sus platicas, consejos y por los reactivos y equipo que me presto para que mis resultados fueran los mejores.

Al Dr. Sullivan por su paciencia, enseñanzas y por dedicarme varias horas de su tiempo con el fin de que aprendiera las cosas como debían ser.

A Paty Cuautle por ser una excelente compañera de laboratorio, que esta siempre dispuesta a brindar su ayuda y que fue mi salvación cuando llegaba a enfermar.

A Carolina y Youssef que estuvieron al pendiente de este proceso y que siempre me enviaban animos y buena vibra para que salieran los experimentos y terminara bien mi trabajo

Dedico este trabajo a:

Rafael Omar Avila Ferreira, el amor de mi vida, porque definitivamente no lo hubiera logrado sin ti; pues cada que la desesperación o la frustración me invadía, tuviste las palabras exactas para levantarme. Gracias por todos estos fines de semana que me acompañaste a ver a mis celulas, por todas las veces que resolviste algun problema en mi computadora para que pudiera seguir trabajando, gracias por que con una simple sonrisa o un abrazo me diste las fuerzas para llegar al final y no me dejaste llegar sola, sino que elegiste caminar junto a mi.

Te amo

## INDICE

CONTENIDO	Página.
1. Resumen.....	1
Summary.....	2
2. Introducción.....	3
2.1 Epidemiología del cáncer pulmonar.....	3
2.2 Cáncer Pulmonar.....	3
a) Cáncer Pulmonar de células pequeñas.....	3
b) Cáncer Pulmonar de células no pequeñas.....	4
2.3 Cumarinas.....	4
2.4 Cumarinas y cáncer.....	8
2.5 Cumarinas y cáncer pulmonar.....	8
2.6 Apoptosis.....	9
2.7 La familia proteica Bcl-2.....	12
2.8 Caspasas.....	12
2.9 Justificación del estudio.....	13
3. Objetivos.....	14
4. Hipótesis.....	14
5. Material y Métodos.....	15
5.1 Reactivos.....	15
5.2 Anticuerpos.....	15
5.3 Cultivo celular.....	16
5.4 Estudio de los cambios morfológicos.....	16
5.5 Lisado celular.....	16
5.6 Cuantificación de proteína.....	17
5.7 Ensayos de viabilidad (MTT).....	17
5.8 Electroforesis.....	18
5.9 Transferencia.....	18
5.10 Western Blot.....	19
5.11 Análisis Cuantitativo de Western Blot.....	19
5.12 Inducción de apoptosis por exposición a cumarina.....	20
a) En placas de 6 pozos.....	20
b) En cajas de cultivo.....	20
5.13 Ensayos de actividad de caspasa 8 y caspasa 3.....	20
a) Cinéticas de caspasa 3 y caspasa 8.....	20
b) Análisis Estadístico.....	21
c) Determinación del índice de actividad de caspasa 3.....	21

6. Resultados.....	22
6.1 Cambios morfológicos característicos de apoptosis en líneas celulares A-549 y A-427.....	22
6.2 Determinación de la actividad de caspasa 8 y 3 en lisados celulares de las líneas A-549 y A-427 tratadas con cumarina ó 7-hidroxicumarina.....	32
6.2.1 Determinación de la cantidad de proteína necesaria para determinar la actividad de caspasas en los lisados celulares	32
6.2.2 Determinación de la actividad de Caspasa 8 en lisados celulares de A-549 y A-427 .....	34
6.2.3 Determinación de la actividad de Caspasa 3 en lisados celulares de A-549 y A-427 .....	35
6.2.4 Determinación de la actividad de Caspasa 3 en lisados de A-549 y A-427 expuestas a cumarina o 7-hidroxicumarina	37
a) Células A-549 expuestas durante 6 horas.....	38
b) Células A-549 expuestas durante 12 horas.....	39
c) Células A-549 expuestas durante 24 horas.....	39
d) Células A-427 expuestas durante 12 horas.....	42
e) Células A-427 expuestas durante 24 horas.....	43
6.3 Estimación de la viabilidad celular por exposición de las células a la 7-hidroxicumarina.....	46
6.4 Detección de proteínas involucradas en el proceso apoptótico mediante electroforesis y western blot.....	47
6.4.1 Detección de Bcl-2 y Bax.....	47
6.4.2 Detección de Caspasa 3.....	49
6.4.3 Detección de PARP.....	50
7. Discusión.....	52
8. Bibliografía.....	57

## 1. RESUMEN

Se han descrito propiedades citostáticas y apoptóticas a varios derivados cumarínicos simples en varias líneas celulares humanas. El objetivo del presente estudio fue identificar el mecanismo de acción inductor de la apoptosis en células de adenocarcinoma pulmonar humano. Células de las líneas celulares A-549 y A-427 de la ATCC, fueron expuestas a cumarina (CUM) ó 7-hidroxicumarina (7-OHC), el metabolito principal de biotransformación en humanos, en su disolvente (etanol al 3%). *Metodología:* se realizaron ensayos para determinar, *a)* curvas concentración-respuesta y curso temporal de los cambios morfológicos característicos de apoptosis, mediante microscopia de contraste de fase y microfotografía; *b)* de la actividad enzimática de las caspasa 8 y 3, en lisados de células tratadas con las cumarinas, empleando sustratos y sus inhibidores específicos; *c)* se estudió mediante electroforesis, electrotransferencia y western blot, la expresión de la proteínas: Bax, Bcl-2, Caspasa 3 y PARP. *Resultados:* ambas líneas celulares muestran cambios morfológicos característicos de apoptosis desde las 12 horas y hasta las 24 horas de exposición a 300 µg/mL de cada cumarina. La actividad enzimática de la caspasa 3 se observó incrementada en 25 y 40% por exposición a la cumarina ó la 7-OHC con 300 µg/mL en la línea A-549 durante 24 horas, y de 10% en las células A-427 tratadas con la 7-OHC en las mismas condiciones. Se observó un incremento en la expresión de Bax en estas condiciones de 25% y 48.5% en las células A-427 y A-549 expuestas a 7-OHC respectivamente en relación a su control, y se observó una disminución en la expresión de Bcl-2. También se identificó un desdoblamiento de la banda de la procaspasa 3 en la de la caspasa 3 y otro en PARP en las células A-549 por la exposición a 7-OHC. Estos resultados indican que existe un claro efecto inductor de la apoptosis por la 7-OHC, más notable que con la cumarina, que es concentración y tiempo dependiente y que unas estirpes celulares pueden ser más sensibles que otras al efecto. Esta mediado por la activación de la caspasa 3, como resultado de cambios en la relación de la expresión de dos proteínas mitocondriales (Bax y Bcl-2), por lo que aparentemente utiliza la activación de la vía intrínseca de la apoptosis. (Apoyado por PAPIIT IN213707-2 Y CONACYT 56289).



## SUMMARY

Simple coumarins and their derivatives have previously shown to be anti-proliferative and apoptotic agents in human carcinomas cell lines. In this study we investigated whether coumarin (CUM) or 7-hydroxycoumarin (7-OHC) the main human biotransformation metabolite of coumarin caused apoptosis in two cell lines of human lung adenocarcinoma A-549 and A-427, and if so, by what mechanism. *Methods:* We perform assays to determine a) The dose- and time-dependent apoptotic effect of the coumarin compounds determined by morphological changes characteristic of apoptosis, by phase contrast microscopy and microphotography; b) The enzymatic activity of caspase 8 and 3, in whole cell lysates from cells exposed to CUM or 7-OHC using specific substrates and inhibitors; c) The immunolocalization of: Bax, Bcl-2, Caspase 3 and PARP by western blotting. *Results:* Both cell lines showed morphological changes characteristic of apoptosis after the exposition to 300 µg/mL coumarin compounds for 12-24 hours. Also as a result of 24 h exposition for 24 hours, the enzymatic activity of caspase 3 increased 25% (with CUM) and 40% (with 7-OHC) in A-549 cells, and 10% (with 7-OHC) in A-427 cells. We observed an increase of 25% and 48.5% in the Bax expression in the same conditions, for A-427 and A-549 respectively, compared to cells exposed to the dissolvent, and a decrease in the Bcl-2 expression. We also identified the cleaved products from Procaspase 3 and PARP in A-549 cells as a result of the exposition to 300 µg/mL of 7-OHC. This results show that the proapoptotic effect of 7-OHC stronger than coumarin, that is dose- and time-dependent, and that different type cells are more sensitive than others to this compounds. The apoptotic effect exerted by this coumarin compounds is mediated by caspase 3 activation, as a result of impaired relationship of two mitochondrial proteins, reduced Bcl-2 and high Bax, concluding that the most probable mechanism of induction of apoptosis by CUM and 7-OHC is the intrinsic pathway. (Supported by PAPIIT IN213707-2 and CONACYT 56289)

## 2.-INTRODUCCION

### 2.1 Epidemiología del cáncer pulmonar

La tasa de mortalidad en México para las neoplasias malignas del pulmón, tráquea y bronquios en el año 2004 fue en total de 6.5 (defunciones/100,000 hab.). De los cuales 42 % fueron mujeres y 58 % hombres (SSA, México). En México, el adenocarcinoma es el tipo de cáncer pulmonar más frecuente (40 %). El cáncer de células escamosas (38.4 %) es el que produce la mayor frecuencia de metástasis al cerebro (Medina-Morales F, 2000)

### 2.2 Cáncer Pulmonar

El cáncer pulmonar es la manifestación fenotípica de la acumulación de cambios genéticos y moleculares que conducen a la activación de proto oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumor en células epiteliales pulmonares y que resultan en una proliferación celular sin restricción. (Litzky LA, 1998)

Antes del siglo XX, el cáncer pulmonar era una entidad patológica muy rara. A partir de 1930, su frecuencia ha aumentado. Se estima que para el año 2025 se incrementará el número de muertes en más de 80%. A partir de 1970, ha habido un incremento en la frecuencia de muertes por cáncer pulmonar en las mujeres y un cambio en el tipo histológico de carcinoma de células escamosas a adenocarcinomas. (Medina-Morales F, 2000).

### Tipos de cáncer de pulmón

Hay dos tipos principales de cáncer del pulmón:

- **Cáncer pulmonar de células pequeñas (SCLC, por sus siglas en inglés)**
- **Cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC, por sus siglas en inglés).**

Si el cáncer tiene características de ambos tipos, se le denomina *cáncer mixto de células pequeñas y grandes*.

#### a) **Cáncer pulmonar de células pequeñas**

Representa alrededor del 20% de todos los casos de cáncer de pulmón. Aunque las células cancerosas son pequeñas, pueden multiplicarse rápidamente y formar tumores grandes que se pueden propagar hasta los ganglios linfáticos y otros órganos como el

cerebro, el hígado y los huesos. Otros nombres para el cáncer pulmonar de células pequeñas es *cáncer de células en avena* y *carcinoma indiferenciado de células pequeñas*. La causa de este tipo de cáncer casi siempre es el hábito de fumar; es muy raro que una persona que jamás haya fumado padezca de cáncer pulmonar de células pequeñas (Johnson DH, 1998).

**b) Cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC)** es el tipo más común de cáncer del pulmón y representa casi el 80% de los casos. En este grupo hay tres subtipos.

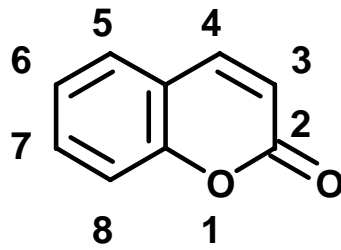
- *El carcinoma de células escamosas*, que está relacionado con el hábito de fumar y tiende a aparecer, cerca de un bronquio.
- *El adenocarcinoma* que generalmente se encuentra en la región más periférica del pulmón. Ocupa el primer lugar en frecuencia epidemiológica y surge de células mucoproducidas.
- *El carcinoma indiferenciado de células grandes* que puede aparecer en cualquier parte del pulmón y tiende a crecer y propagarse rápidamente, lo cual tiene como consecuencia que el pronóstico del paciente sea malo.

### **Adenocarcinoma Pulmonar**

Es el subtipo más frecuente en mujeres, se presenta en fumadores y no fumadores, surge en la periferia del pulmón y tiene configuración glandular y producción de mucina. La metástasis aparece en etapas tempranas y la supervivencia luego de resección quirúrgica es muy baja. Ni la quimioterapia ni otros regímenes terapéuticos logran incrementar la supervivencia a 5 años en más del 5 al 10% de los pacientes (Mayoral-Chávez MA., 2004)

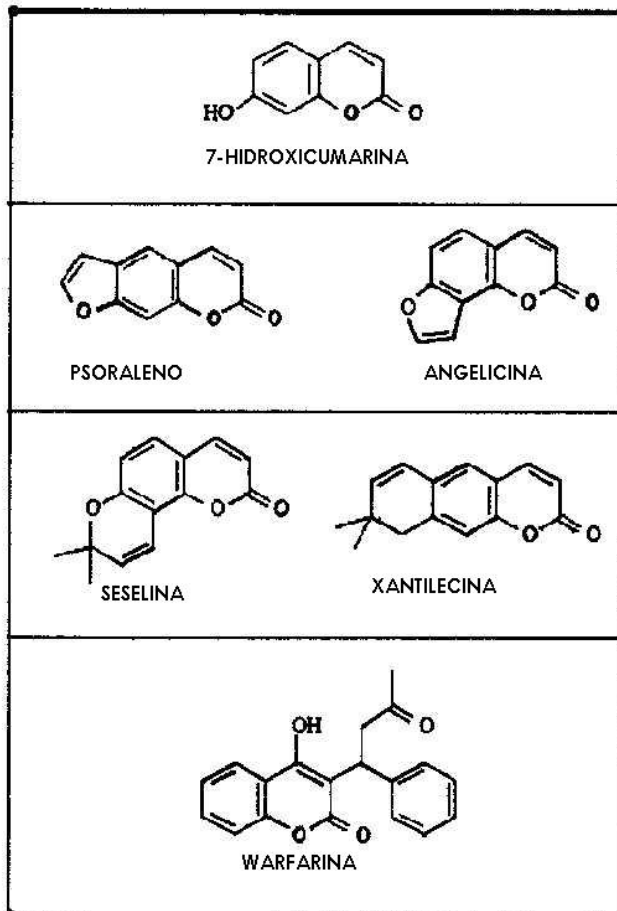
### **2.3 Cumarinas**

El nombre de estos compuestos deriva de la planta caribeña “coumarou” para el árbol de tonka cuyo nombre científico es *Coumarouna odorata* (Murria RD, 1982). La cumarina (1,2-benzopirona) es el compuesto estructuralmente más sencillo de las sustancias genéricamente conocidas como cumarinas y que tienen como estructura básica la fusión de anillos benceno y alfa-pirona (Fig I).



**Figura I.** Estructura química de la cumarina (1,2 benzopirona). Los números indican las posiciones donde pueden presentarse sustituyentes (Thornes 1997).

Las cumarinas son compuestos aromáticos naturales que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal y presentan actividad inhibitoria del crecimiento y esporulación de hongos y otros microorganismos patógenos en las plantas (Keating G, 1997). Las cumarinas se clasifican en 4 subtipos: las simples, furanocumarinas, piranocumarinas y las cumarinas sustituidas en pirona (Lacy A, 2004) (Fig II).

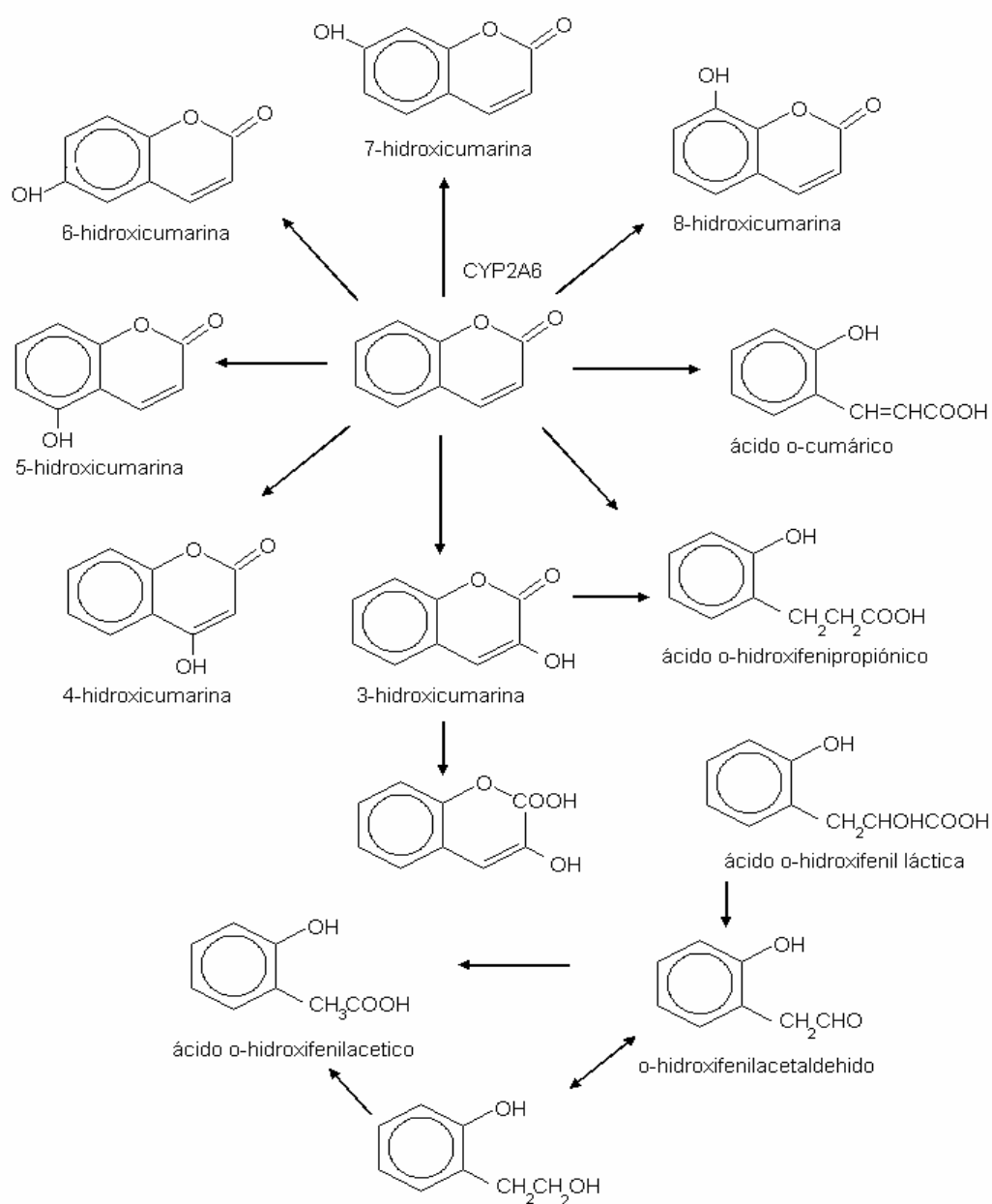


**Figura II.** Los 4 tipos de cumarinas: De arriba hacia abajo. Cumarinas simples, Furanocumarinas, Piranocumarinas y Cumarinas sustituidas en pirona.

Se estima que la máxima exposición diaria por fuentes alimentarias a cumarina para una persona es de 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , mientras que por exposición a cosméticos es de 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Para una persona de 60 kg este total diario sería de 3.6 mg/día y no se han reportado efectos adversos de la cumarina en respuesta a una dosis 100 veces mayor (Lake BG, 1999).

La administración de la cumarina en animales y en el humano, indica que es completa y rápidamente absorbida en el tracto gastrointestinal, metabolizada rápidamente en el hígado, su vía metabólica más importante es la hidroxilación en el carbono 7 catalizada por la enzima CYP2A6, del citocromo P450 (Fig III). Además, este metabolito es excretado en la orina en forma de glucurónido (Pelkonen O, 1997). El tiempo de vida media de la cumarina en la circulación sistémica es una hora y es independiente de la vía de administración.

Estudios realizados indican que la cumarina no es tóxica a concentraciones menores a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para células totipotenciales humanas, y concentraciones superiores a 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  disminuyen significativamente su actividad (Gallichio VS, 1989). Por otro lado, Roskopf y cols, indican que la cumarina, a concentraciones superiores a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  presenta un efecto antiproliferativo en células mononucleares de sangre periférica (PBMC), debido a la acción citotóxica del compuesto (Roskopf F, 1992).



**Figura III.** Diversidad de metabolitos de la cumarina al ser biotransformada por la enzima CYP2A6 del citocromo P450. (modificada de Thornes 1997)

## 2.4 Cumarinas y cáncer

Existen diversos reportes del uso de la cumarina y algunos de sus metabolitos en la prevención y tratamiento de diversos modelos de cáncer en ratones y de carcinomas humanos. En modelos animales se ha utilizado como agente protector contra carcinógenos, agentes químicos principalmente, mientras que en humanos se han hecho estudios en cáncer de próstata (Mohler J,1994) y melanoma (Thornes RD, 1994 ). Por otra parte, un estudio clínico sobre el tratamiento del melanoma metastático recurrente empleando cumarina, sugiere que la adición de cimetidina favorece la respuesta de los pacientes hacia la cumarina, produciendo una rápida mejoría clínica y regresión del tumor (Marshall ME,1989). A partir de éste reporte, grupos de investigación han realizado estudios clínicos en los que se ha administrado la cumarina sola o en combinación con cimetidina. En ellos se ha demostrado que la cumarina tiene efectos significativos en contra de carcinomas renales metastáticos y que en melanoma maligno previene su recurrencia (Thornes RD,1989 Marshall ME,1994). También se han reportado respuestas favorables en el tratamiento del carcinoma prostático, observando beneficios principalmente en pacientes con tumores en estadios tempranos (Mohler J,1994).

## 2.5 Cumarinas y Cáncer Pulmonar

Zacharski *et al*, en 1981 reportaron en un estudio aleatorizado de pacientes con carcinoma de pulmón de células pequeñas, tratados con una combinación de quimioterapia más radioterapia (control), que la mediana en la sobrevida de este grupo (25 semanas), se duplicaba (50 semanas), si se agregaba al tratamiento warfarina.

Marshall en 1994, reportó los efectos inhibidores del crecimiento *in vitro* de varias líneas celulares tumorales humanas, por la cumarina y la 7-hidroxycumarina en el rango de concentraciones de 250-300 µg/mL, incluidas las células A-549 de adenocarcinoma pulmonar humano.

Kawaii en 2001, reportó que la  $CI_{50}$  de la cumarina en las células A-549 es  $>400 \mu M$  (58.4 µg/mL).

Jiménez-Orozco *et al*, en 2001, reportaron que en las células A-427 de adenocarcinoma pulmonar humano expuestas durante 72 horas, la  $CI_{50}$  de la cumarina fue de 257  $\mu\text{g/mL}$  y la de la 7-hidroxicumarina de 100  $\mu\text{g/mL}$  (estimada mediante reducción de MTT). Estos compuestos inhiben la transición de la fase  $G_1/S$  del ciclo celular a 160  $\mu\text{g/mL}$  (1 mM) y describió el mecanismo de acción para éste evento, la disminución de la ciclina D1, sin afectar su RNAm, por lo que sugirió que la disminución de esta ciclina se da a nivel post-transcripcional.

López-González *et al* en 2004, reportaron que para las células A-427 de adenocarcinoma pulmonar humano expuestas durante 24 horas la  $CI_{50}$  de la cumarina >160  $\mu\text{g/mL}$  y la de la 7-hidroxicumarina de 121  $\mu\text{g/mL}$  (estimada mediante la incorporación de timidina tritiada) y que cuando se expusieron a concentraciones mayores, se presentó el proceso de apoptosis.

## **2.6 Apoptosis**

La apoptosis es un proceso regulado que involucra la activación de una cascada de eventos moleculares que derivan en la muerte celular.

En la apoptosis, el contenido citosólico no se libera al medio intercelular por lo que no se induce un proceso inflamatorio, como en el caso de la necrosis. Las células sufren profundos cambios en la distribución de los fosfolípidos y la externalización de fosfatidilserina (PS) parece ser una característica general del proceso apoptótico. Dentro de los tejidos, las células y cuerpos apoptóticos son reconocidos y fagocitados rápidamente por los macrófagos o las células vecinas. (Chia-Yih 2001)

Existen dos tipos de muerte celular la necrosis y la apoptosis o muerte celular programada. La apoptosis es un proceso característico de todos los organismos multicelulares y una falla en la regulación de este proceso puede derivar en cáncer. El proceso apoptótico se caracteriza por varios cambios morfológicos como son: Las células encogen (shrinkage) y se vuelven circulares; se producen cambios en la distribución de fosfolípidos y externalización de fosfatidilserina; la cromatina y sus proteínas asociadas se condensan en el núcleo y se degradan, la cromatina se empaqueta alrededor de la envoltura nuclear; blebbing de membrana (zeiosis); degradación del ADN en el núcleo mediante endonucleasas específicas formando los cuerpos



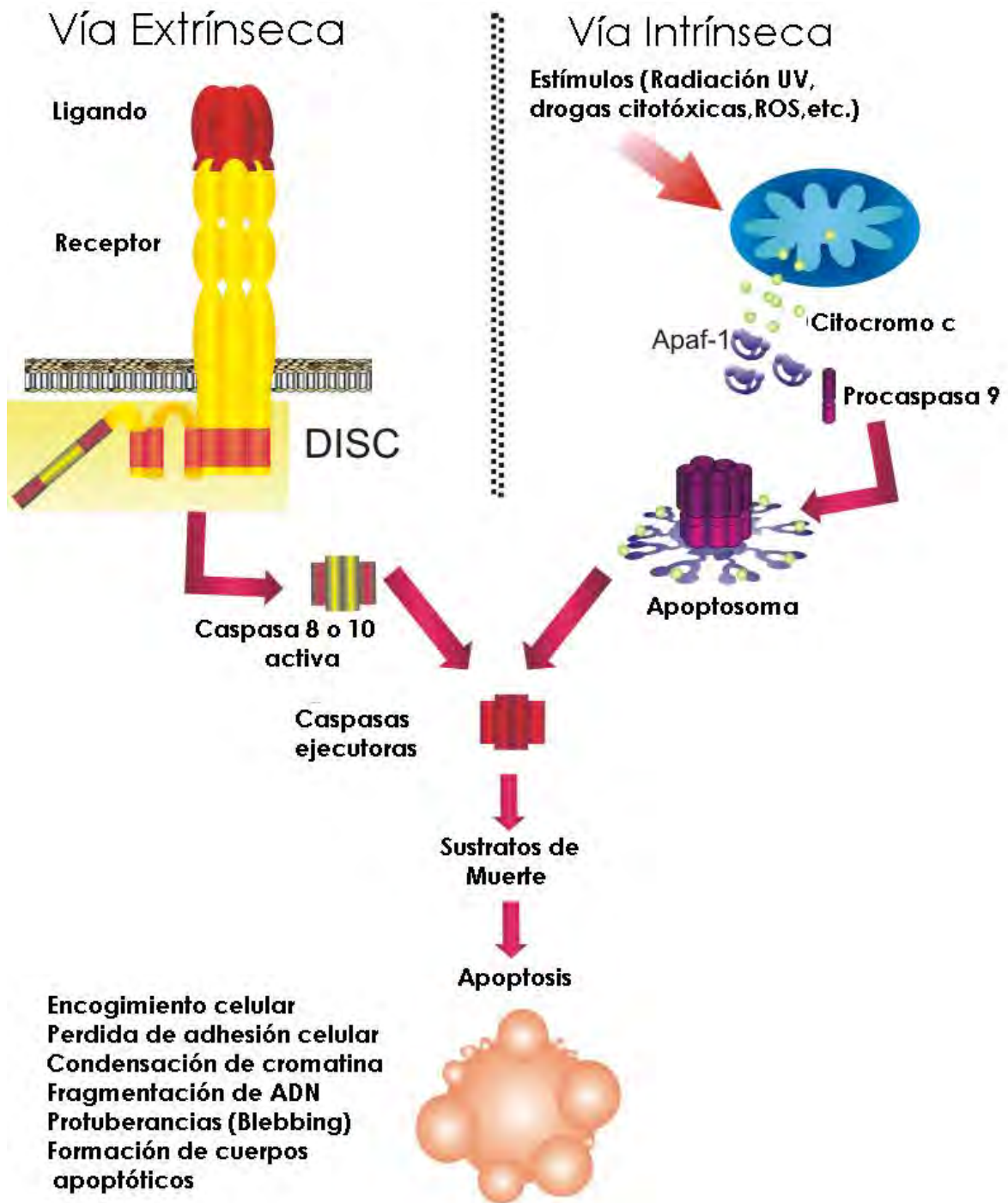
nucleosomales y finalmente la ruptura de la célula en pequeñas vesículas llamadas cuerpos apoptóticos, que son fagocitados por macrófagos o células dendríticas.

En contraste con la necrosis la fagocitosis se caracteriza por un mínimo de reacciones inflamatorias. ( Schulze-Bergkamen H & Krammer P, 2004)

La apoptosis puede ser inducida por varios estímulos como irradiación UV, drogas citotóxicas o ligandos a receptores de muerte. En general, el proceso puede ser iniciado por dos vías:

**la vía extrínseca**, se activa a través de ligandos que se unen a receptores de muerte en la superficie celular y pertenecen a la superfamilia de receptores de Factor de necrosis tumoral (TNF) (Peter & Krammer, 1998); estos receptores comparten un dominio de muerte intracelular de 80 aminoácidos, el cual es esencial para la transducción de la señal apoptótica; una vez que se ha unido el ligando a un receptor con dominio de muerte, el receptor se trimeriza, se forma el complejo multimérico inductor de la señal de muerte (DISC) y se recluta FADD (Proteína con dominio de muerte asociada a Fas), se asocia la pro-caspasa 8 para la formación de caspasa 8 activa mediante autoproteólisis. (Walczak H, 2001; Chen M, 2002).

**La vía intrínseca**, se activa a través de la mitocondria. La mitocondria juega un papel crítico en la regulación de los procesos apoptóticos incluida la apoptosis inducida por fármacos. La vía intrínseca está regulada por miembros de la familia de Bcl-2 incluyendo las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub> y las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bid. (Fig. IV)



**Figura IV.** Vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis.

## 2.7 La familia protéica Bcl-2

La presencia de Bcl-2 en la mitocondria regula su homeostasis e integridad. Cuando Bcl-2 está sobre expresada, se evitan los disturbios mitocondriales asociados a la apoptosis, como el cambio en el pH, la permeabilidad de la membrana y la ruptura de la integridad de la membrana externa tal vez bloqueando los poros a través de los cuales el citocromo *c* se transporta; aunque el mecanismo de Bcl-2 aun no es claro se postula que Bcl-2 ayuda a mantener la integridad mitocondrial y bloquea la cascada de activación de las caspasas que llevan a la apoptosis.

Por el lado contrario, se ha postulado que los miembros como Bax que tienen los dominios BH1 y BH2 pueden formar poros en las membranas permitiendo, en el caso de la mitocondria, la salida de moléculas apoptogénicas (Castro-Obregon *et al* 2003). Por lo tanto, Bax es una de las proteínas pro-apoptóticas que reside en el citoplasma y se transloca a la mitocondria una vez que se ha inducido la apoptosis (Wolter KG, 1997). El espacio intermembranal de la mitocondria alberga a estas proteínas apoptogénicas y su escape desencadena la muerte celular. Se ha demostrado que Bax induce la salida del citocromo *c* (*in vitro*), su liberación depende de un cambio en la permeabilidad de la membrana externa de la mitocondria. La primer molécula identificada fue el citocromo *c*, que es un cofactor necesario para que Apaf-1 sirva como plataforma de oligomerización, el apoptosoma, se de el ensamble y la activación autoproteolítica de caspasa 9 y posteriormente la activación de la caspasa 3 (Jeong-Yeh Y, 2006).

## 2.8 Caspasas

Las caspasas son proteasas de cisteína-aspartato, cuyos blancos son diferentes sustratos intracelulares. Se expresan en las células constitutivamente como precursores inactivos (zimógenos) y se activan por proteólisis en residuos aspartato. La enzima activa es un heterotetrámero, compuesto de dos subunidades largas y dos cortas. Las caspasas iniciadoras tales como caspasa-8,-10 y -9 son reclutadas a otros complejos proteicos tales como DISC ó el apoptosoma para la activación de las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis respectivamente. Estas caspasas cortan y activan a las caspasas ejecutoras, principalmente a las caspasas-3, -6 y -7.

La actividad de estas caspasas ejecutoras deriva en la degradación de sustratos intracelulares, que dan como resultado los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis.

La degradación de la lamina nuclear, participa en la condensación y encogimiento nuclear; la degradación de ICAD (Inhibidor de la DNasa activada por caspasa-3) libera a CAD (deoxiribonucleasa activada por caspasa) que posteriormente fragmenta el DNA del núcleo, en múltiples fragmentos de 180-200 pb derivados de la ruptura internucleosomal (Steller, 1995). Finalmente, la degradación de proteínas del citoesqueleto, como actina y plectina, por las caspasas deriva en la fragmentación celular (Shulze-Bergkamen H, 2004).

Después de la liberación del citocromo *c* de la mitocondria y la formación del apoptosoma, la caspasa 9 activa escinde proteolíticamente a la caspasa 3 de 35 kDa, formando un heterodímero activo de 20 y 10 kDa (Nicholson DW, 1995). Esta caspasa 3 activa es la responsable de la degradación proteolítica de la poli-ADP-ribosa-polimerasa, PARP, que ocurre durante la apoptosis. (Tewari M, 1995)

Existe evidencia de que la muerte celular puede ocurrir de manera programada; pero en completa ausencia y de manera independiente a la activación de caspasas, denominada paraptosis y que esta mediada por proteína cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y que puede ser desencadenada por miembros de la familia de receptores al factor de necrosis tumoral (TNFR). (Bröker, 2005)

## 2.9 Justificación del estudio

Con todos estos antecedentes, es claro que la cumarina y la 7-hidroxycumarina tienen efecto citostático *in vitro* en las células de adenocarcinoma pulmonar humano y a concentraciones mayores que las utilizadas al observar citostásis, se desencadena el proceso de apoptosis. Sin embargo, no queda claro el mecanismo de acción que esta involucrado en este proceso, por lo que el presente trabajo tuvo el propósito de ahondar en el conocimiento de la inducción de la apoptosis en las dos líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar humano A-549 y A-427.

### **3. OBJETIVOS**

- 1. Identificar la vía inductora de la apoptosis que produce la cumarina y la 7-hidroxicumarina en dos líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar humano.**
- 2. Identificar la(s) proteína(s) blanco de las cumarinas en estas vías.**
- 3. Determinar si hay una relación concentración-respuesta para este efecto.**
- 4. Estudiar el curso temporal del efecto.**

### **4. HIPÓTESIS**

**La cumarina y la 7-hidroxicumarina inducen un efecto apoptótico en líneas de adenocarcinoma pulmonar humano a través de la activación de la vía intrínseca de la apoptosis y este efecto es concentración y tiempo-dependiente.**

## 5. METODOLOGIA

### 5.1 Reactivos

Cumarina y 7-hidroxycumarina con 99% de pureza fueron obtenidos de Aldrich Chemical Co. La cumarina y la 7-hidroxycumarina fueron disueltas en etanol absoluto (Merck, Alemania).

### 5.2 Anticuerpos

Fueron utilizados los siguientes anticuerpos:

PRIMARIOS (Zymed)	Anti-Bcl-2	Monoclonal	5 µg/mL
		Clona: Bcl-2-100	
	Anti-Bax	Monoclonal	5 µg/mL
		Clona 2D2	
	Anti-Caspasa 3	Monoclonal	1.5 µg/mL
	Anti-PARP	Monoclonal	µg/mL
SECUNDARIOS (Sigma)	Cabra-anti-ratón	Suero	1:10 000
	IgG /Conjugado con biotina		
	Cabra-anti-conejo	Suero	1:1000
	IgG / Fosfatasa Alcalina		
ENZIMA (Sigma)	Extravidina-Fosfatasa alcalina	Solución	0.15 µg/mL

### **5.3 Cultivo Celular**

Las líneas celulares de la ATCC, A-549 y A-427 (adenocarcinoma pulmonar humano); Jurkat (leucemia de linfocitos T humanos) y HeLa (cáncer cervical humano), fueron mantenidas en medio RPMI-1640 (Sigma) suplementado con Suero Fetal Bovino inactivado (Hyclone) al 10%, 100 U/mL penicilina-estreptomicina (Sigma) y 2 mM L-glutamina. A 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>.

### **5.4 Estudio de los cambios morfológicos**

En cajas de cultivo de 6 pozos Nunc, se sembraron  $2.5 \times 10^5$  células de cada línea celular y se dejaron adherir toda la noche. Al día siguiente se les añadió la cumarina ó la 7-hidroxycumarina a diferentes concentraciones (50, 100, 150 y 300 µg/mL) y se apartaron dos pozos uno de los cuales fue el control absoluto ya que permaneció con medio RPMI durante todo el ensayo y otro correspondió al control del solvente de las cumarinas (etanol al 3%). Fueron observadas en un microscopio invertido Nikon TSF-100, en contraste de fases para identificar los cambios morfológicos, se fotodocumentaron los cambios a los diferentes tiempos de exposición de los compuestos, correspondientes a 0, 2, 4, 6, 8 y 24 hrs.

### **5.5 Lisado Celular**

De una caja de cultivo con células a confluencia se removió el medio celular y se tripsinizaron las células. Se colectaron las células y se centrifugó durante 5 min a 420 XG, se decantó el sobrenadante y se desechó, se resuspendió el pellet en 1 mL de medio con suero y se cuantificaron las células en una cámara de Neubauer. Posteriormente se centrifugó 5 min a 420 XG y se resuspendió el pellet en 5 ml de PBS estéril, se centrifugó nuevamente 5 min. a 420 XG y se resuspendió el pellet en amortiguador de lisis (Tris 20mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, NaOH 1 mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, Tritón X-100 1% ). Se utilizaron 500 µL del amortiguador de lisis por cada  $1 \times 10^6$  células y se añadieron 10 µL de inhibidor de proteasas [2.5 mM pirofosfato de sodio, 1 mM β-glycerolfosfato, 1 mM ortovanadato de sodio, 1 µg/mL aprotinina, 1 µg/mL

leupeptina y 100 µg/ml PMSF (fenilmetilsulfonil fluoruro)] por cada mL de amortiguador.

Se transvasó la solución a tubos eppendorf de 1 mL y se incubó 30 min. en hielo con agitación constante. Se centrifugó durante 15 min. a 13, 000XG y se removió el sobrenadante donde se encuentran disueltas las proteínas que se mantuvieron en congelación hasta su análisis.

## **5.6 Cuantificación de proteína**

La concentración de proteína total fue determinada por el método de Lowry utilizando albúmina sérica bovina como estándar.

Solución A: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2%, NaOH 0.4%, Tartrato de sodio 0.02%, H<sub>2</sub>O. Solución B: Cu<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> 0.5%. Se prepara una mezcla de la solución A y B en una proporción de 50:1. En una placa de 96 pozos se colocaron 20 µL de la muestra diluida 1:10 a cuantificar por triplicado y también de la curva de albúmina sérica bovina a diferentes concentraciones preparada en una dilución 1:10 del amortiguador de lisis (curva patrón) y se añadieron 100 µL la mezcla de A:B a cada pozo. Se agitó vigorosamente. Transcurridos 10 min. se añadió 10 µL de folín-agua 1:1. se agitó vigorosamente y se dejó reaccionar por 30 min. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro a 595 nm. Las densidades ópticas obtenidas se relacionan con la curva patrón para calcular la concentración de proteína correspondiente a cada muestra y finalmente se multiplicaron por el factor de dilución para obtener la concentración real de proteína de cada muestra.

## **5.7 Ensayos de viabilidad (MTT)**

El efecto de la 7-hidroxicumarina sobre la viabilidad de las células fue estimado mediante la prueba de MTT (Bromuro de (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolio)) (Mossmann T, 1983). Este ensayo se basa en la reducción de la sal de tetrazolio soluble por las mitocondrias de las células viables. El producto de la reducción, es el formazan que es colorido e insoluble. El formazan es disuelto en dimetilsulfoxido (DMSO) y se realizan mediciones en un espectrofotómetro. La cantidad de formazan formado es proporcional al número de células viables.



$5 \times 10^5$  células fueron sembradas en cajas de cultivo de 96 pozos. Fueron expuestas a  $300 \mu\text{g}/\text{mL}$  de 7-hidroxycumarina durante 0, 2, 4, 8, 12 y 24 horas; el número de células viables fue estimado para cada tiempo de exposición y se graficaron los cursos temporales de la disminución en la viabilidad con los promedios de las D.O. obtenidas ( $n=8$ ) correspondientes a cada tiempo.

## **5.8 Electroforesis**

Se prepararon geles desnaturalizantes al 16 y 17% de acrilamida-bisacrilamida para separar Bcl-2, Bax, caspasa 3 y PARP respectivamente. Se cargó entre 20 y 25  $\mu\text{g}$  de proteína por carril. Las muestras se preparan en amortiguador de la muestra (0.125M Tris-Cl, 4% SDS, 20% v/v Glicerol, 0.2M DTT, 0.02% Azul de bromofenol, 1:20  $\beta$ -mercaptoetanol, pH 6.8). Se calentó a  $90^\circ\text{C}$  por 1 min. Se corren en buffer de Tris-SDS (0.025M Tris, 0.192 M Glicina, 0.1% SDS, pH8.3). A 250 V y 14 mA.

Algunos carriles del gel obtenido se tiñen con azul de Coomassie (0.25% en metanol al 40% y ácido acético al 7%) para observar la correcta separación de las proteínas.

## **5.9 Transferencia**

El resto del gel se transfiere a una membrana PVDF en una cámara semi-seca. Utilizando amortiguador de transferencia (25 mM Tris, 192 mM Glicina, 20% MetOH), en el que se equilibró el gel y la membrana antes de someterse a la transferencia. La transferencia se llevó a cabo a 25 V y 300 mA durante 2 horas.

Una vez transferidas las proteínas a la membrana, se realizó una tinción con Rojo de Ponceau como control de la transferencia. Se destiñe con agua y posteriormente con NaOH 0.1N.

## **5.10 Western Blot**

La membrana se bloqueó durante 1 hora con leche descremada al 5% en PBS-Tween 3%. Posteriormente se retiró esta solución bloqueadora y se añadió el anticuerpo primario en PBS-Tween y se dejó incubar a 5°C toda la noche. Posteriormente se realizaron lavados con PBS y se adicionó el anticuerpo secundario en PBS-Tween; se incubó en agitación a temperatura ambiente durante 1 hr. Se realizaron lavados con PBS y si el anticuerpo secundario estaba biotinilado se adicionó Extravidina-Fosfatasa alcalina durante 1 hr en agitación a temperatura ambiente. Se realizaron los lavados necesarios con PBS. Las proteínas de interés se revelaron con 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato/ nitroazul de tetrazolio (BCIP/NBT) un sustrato de la fosfatasa alcalina que precipitó formando bandas de color púrpura donde se localiza la proteína de interés.

## **5.11 Análisis Cuantitativo de Western blot**

Se midió la intensidad de señal sobre las membranas PVDF después de realizar los respectivos western blots con diferentes anticuerpos usando un fotodocumentador (Molecular Imager® Gel Doc™ and ChemiDoc™ Systems) y analizando las imágenes con un software (ImageJ). Para Bax, Bcl-2, caspasa-3 y PARP se calcularon los valores de densidad de la banda de proteína específica.

## 5.12 Inducción de apoptosis por exposición a la cumarina

### a) En placas de 6 pozos

Se sembraron  $2.5 \times 10^5$  células por pozo. Siguiendo el siguiente esquema:

IA	IIA	IIIA
IVA	OA	A

Donde

- IA Cumarina o 7-hidroxicumarina 50 $\mu$ g/mL + EtOH
- IIA Cumarina o 7-hidroxicumarina 100 $\mu$ g/mL +EtOH
- IIIA Cumarina o 7-hidroxicumarina 150 $\mu$ g/mL +EtOH
- IVA Cumarina o 7-hidroxicumarina 300 $\mu$ g/mL +EtOH
- OA Solo EtOH
- A Sin tratamiento

Para las diluciones de la cumarina y la 7-hidroxicumarina se preparó un stock de 10 mg/mL de EtOH filtrado. Se hicieron diluciones 1:1 para obtener las concentraciones de 300, 150, 100 y 50  $\mu$ g/mL y de esa manera añadir el mismo volumen a todos los pozos.

### b) En cajas de cultivo

Se sembraron cajas de cultivo de 83 cm<sup>2</sup> y cuando se encontraron a confluencia se les adicionó 300  $\mu$ g/mL de 7-OH cumarina y se incubó durante 24 hrs. Pasadas las 24 hrs. de la exposición se tripsinizaron las células y se lisaron en el buffer anteriormente descrito. Se cuantificó la proteína y se realizaron las electroforesis y western blot correspondientes para la detección de proteínas de interés.

## 5.13 Ensayos de actividad de Caspasa 8 y Caspasa 3

### a) Cinéticas de caspasa 3 y caspasa 8

Para determinar la activación de la caspasa 3 y caspasa 8 en los lisados celulares se utilizó un método colorimétrico basado en la hidrólisis de un péptido sustrato de las caspasas acoplado a p-nitroanilida (Ac-DEVD-pNA), si el péptido es hidrolizado por la caspasa se libera al medio la p-nitroanilina que puede ser detectada a 405nm en un

lector de ELISA. Por lo tanto la cantidad de p-nitroanilina liberada (absorbancia) puede ser relacionada con la actividad de la caspasa.

Utilizando la caspasa recombinante y su inhibidor (Ac-DEVD-CHO) se realizaron cinéticas de la actividad de la caspasa para verificar el buen funcionamiento de todos los reactivos y posteriormente utilizando lisados de A-549 y A-427 sin tratamiento y determinar la actividad basal de caspasa 8 y 3 si es que estuviera presente.

Se realizó la determinación de la actividad de caspasa 8 y 3 en lisados de las dos líneas celulares de estudio A-549 y A-427 inicialmente se utilizaron concentraciones de 100 y 200 µg/mL determinadas a las 24 horas post-tratamientos y finalmente se utilizó una concentración de 300 µg/mL determinando la actividad de caspasa 3 a las 6, 12 y 24 horas post-tratamiento.

#### **b) Análisis Estadístico**

Para determinar si existían diferencias en la actividad de caspasa 3 en las muestras de lisados de células de adenocarcinoma pulmonar: A-549 y A-427 se realizó la prueba de análisis de varianzas (ANOVA) y posteriormente la prueba de Dunnett (SigmaStat V. 3.1) respecto a células únicamente expuestas a etanol al 3% ya que este es el disolvente de los compuestos cumarínicos. Se consideró una significancia de  $p \leq 0.05$  y un poder de 0.8. Se elaboraron las gráficas con el software SigmaPlot V. 9.0).

#### **c) Determinación del índice de actividad de caspasa 3.**

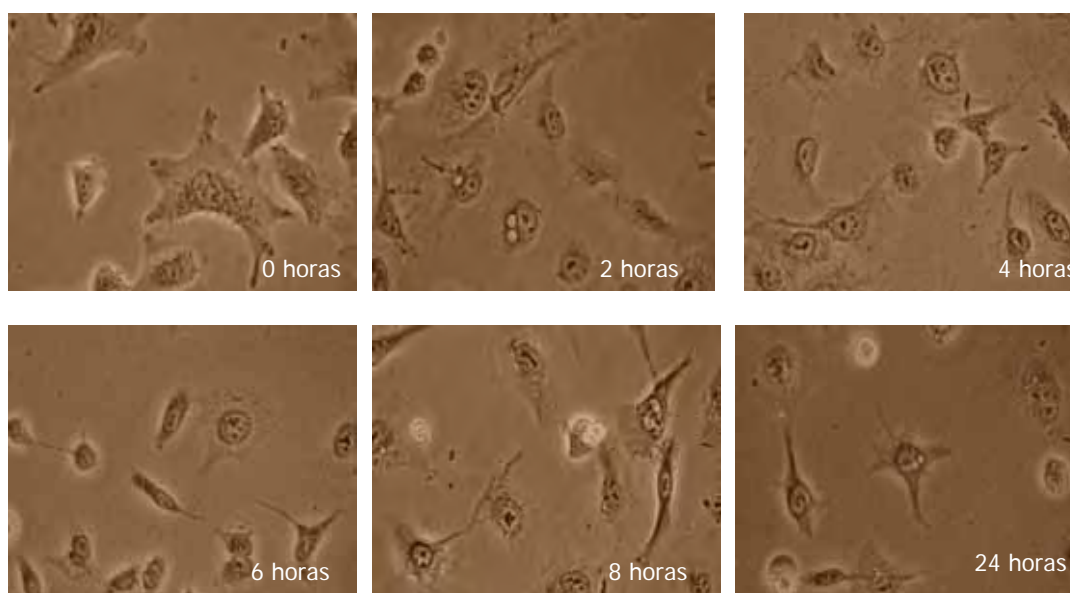
Se realizaron las determinaciones de la actividad de caspasa 3 en las líneas celulares A-549 y A-427 por triplicado (como se describió en el punto 5.13, inciso a). El promedio de las absorbancias de los ensayos de células expuestas a el disolvente únicamente, fue tomado como referencia (valor de 100%), se determino el porcentaje de incremento con cada tratamiento con respecto a su control y se restó del control; al valor resultante lo denominamos índice de actividad de caspasa 3.

## 6. RESULTADOS

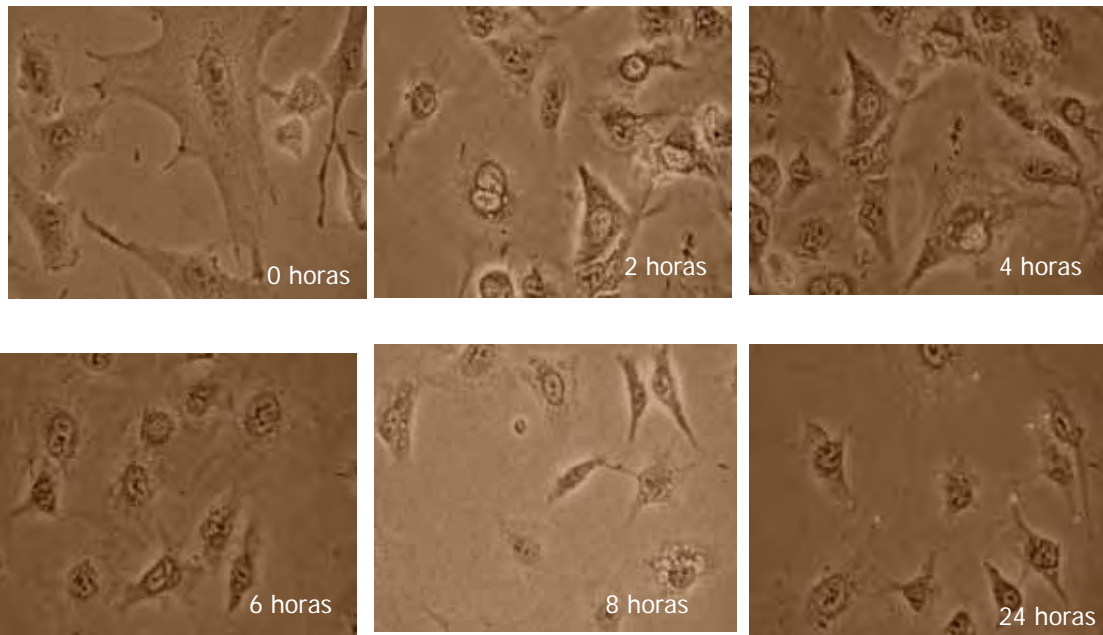
### 6.1 CAMBIOS MORFOLÓGICOS CARACTERÍSTICOS DE APOPTOSIS EN LAS LINEAS CELULARES A-549 Y A-427

INDUCCION DE APOPTOSIS POR EXPOSICIÓN A 50, 100, 150 Y 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DE CUMARINA O DE 7- HIDROXICUMARINA, DURANTE 0, 2, 4, 6, 8 Y 24 hrs.

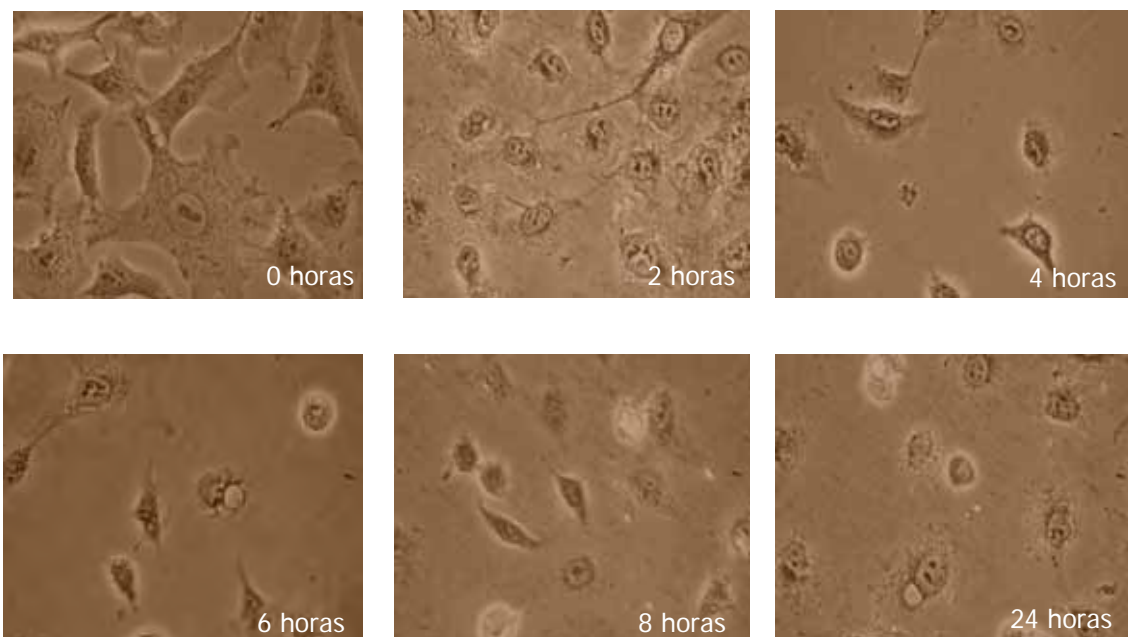
Para evaluar la inducción de apoptosis con los compuestos cumarínicos en ambas líneas celulares, se expusieron a diferentes concentraciones, tomando microfotografías a diferentes tiempos con el fin de identificar cambios morfológicos característicos de apoptosis (figuras 1-12).



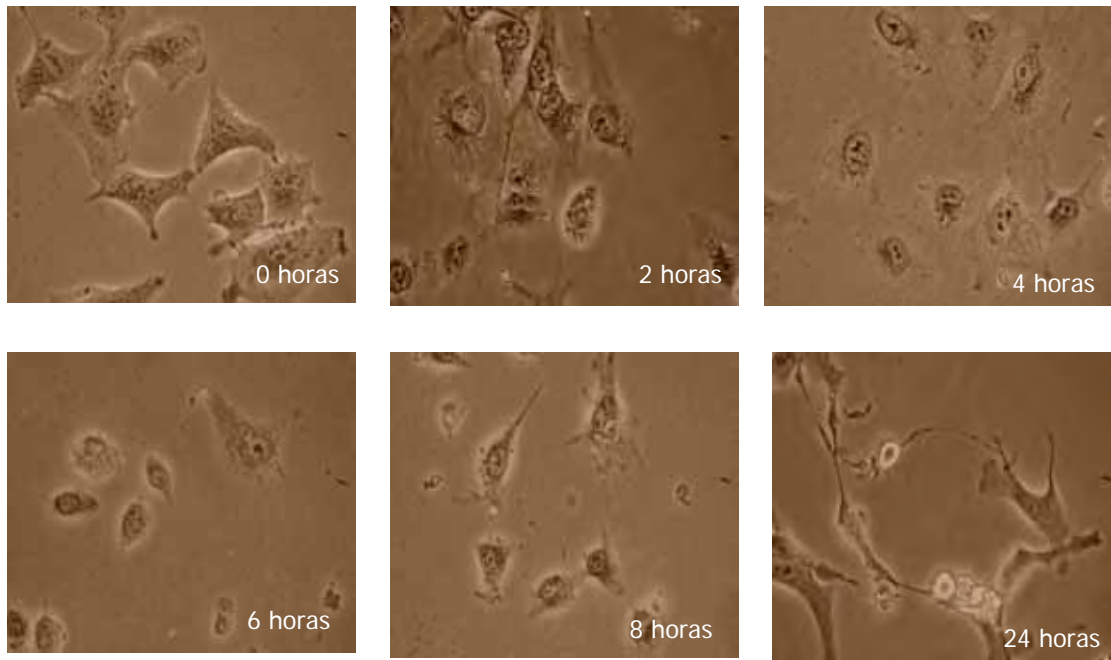
**Figura 1.** Células A-549 expuestas a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cumarina. No se observaron cambios morfológicos característicos de apoptosis a ningún tiempo de exposición. (200X)



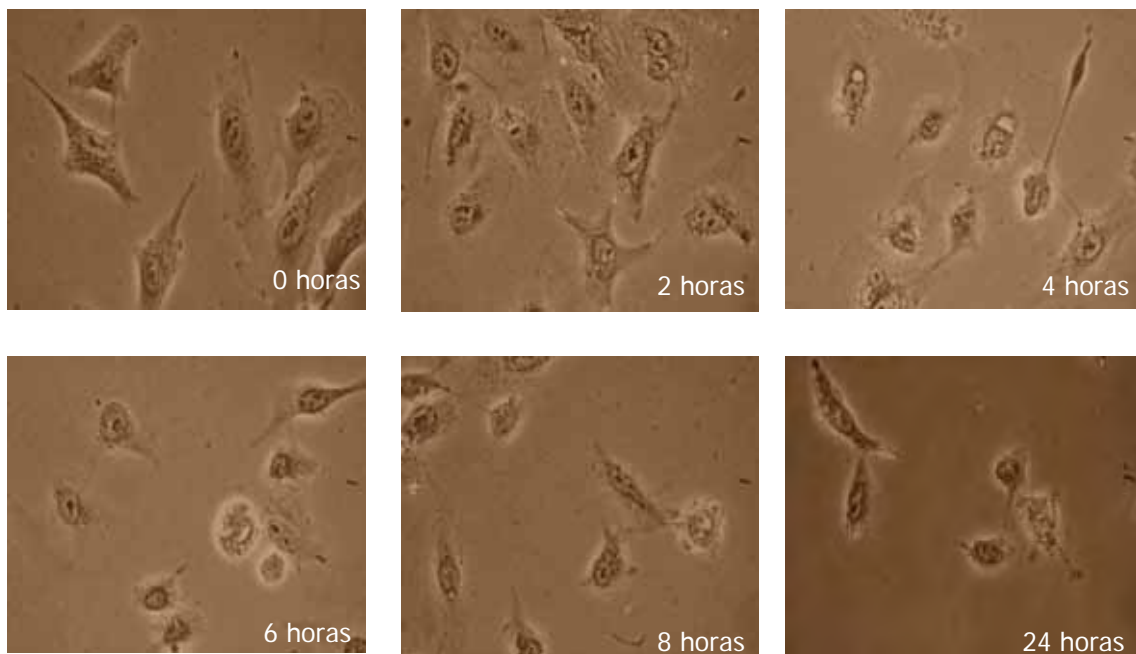
**Figura 2.** Células A-549 expuestas a 100 µg/ mL de cumarina. No se observaron cambios morfológicos característicos de apoptosis a ningún tiempo de exposición. (200X)



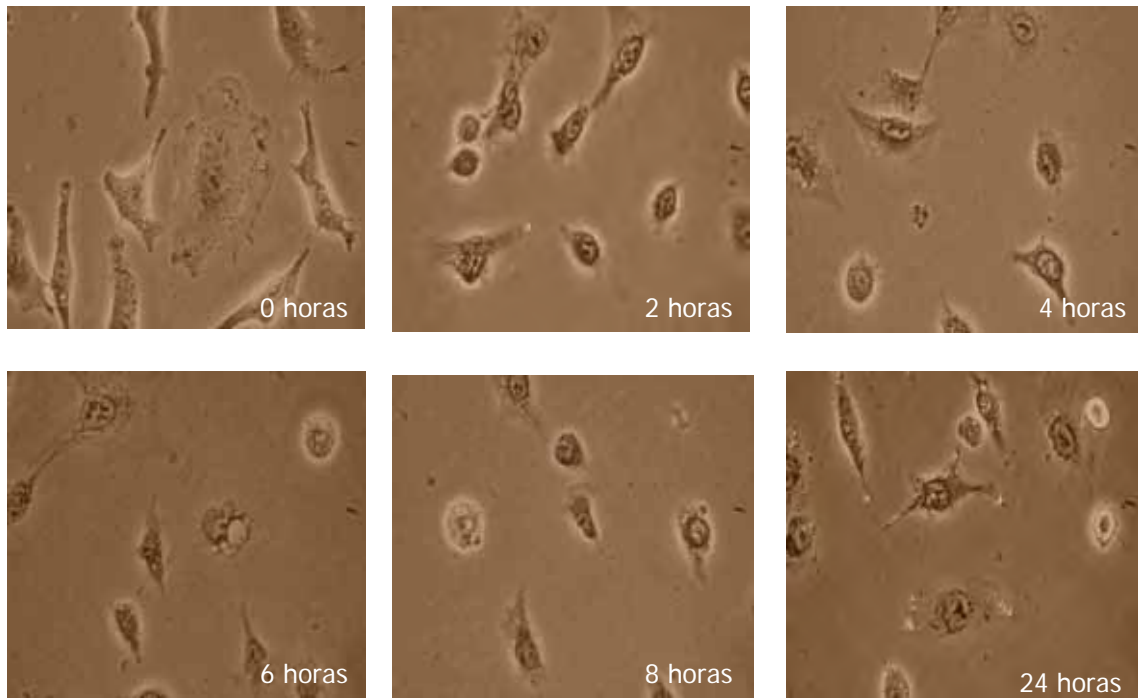
**Figura 3.** Células A-549 expuestas a 150 µg/ mL de cumarina. No se observaron cambios morfológicos característicos de apoptosis a ningún tiempo de exposición. (200X)



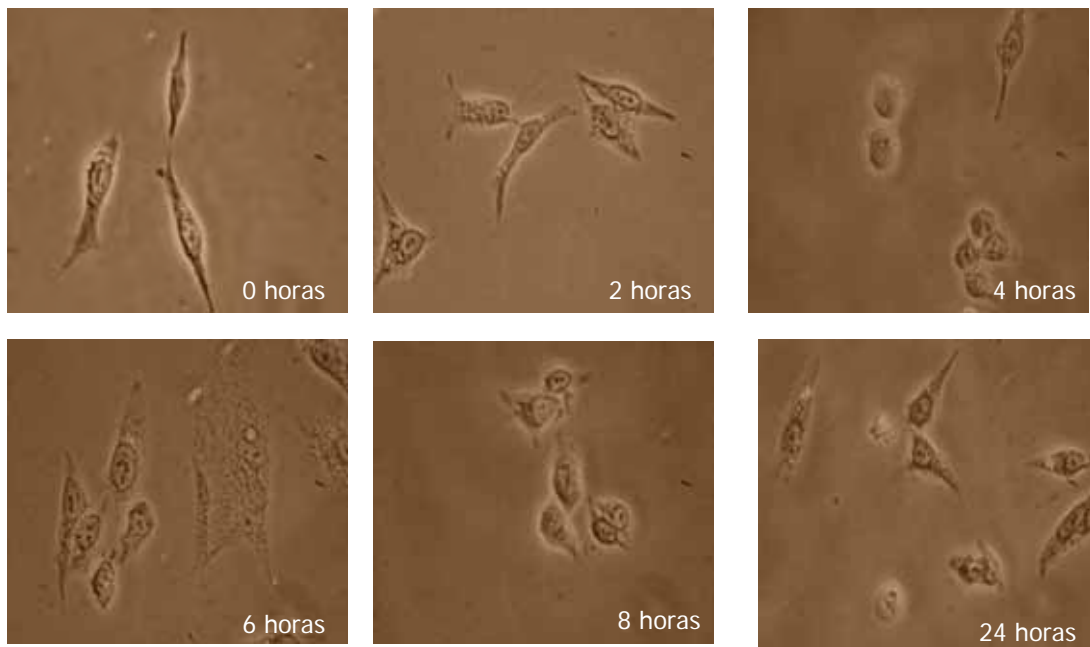
**Figura 4.** Células A-549 expuestas a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de 7-hidroxycumarina. No se observaron cambios morfológicos característicos de apoptosis a ningún tiempo de exposición.(200X)



**Figura 5.** Células A-549 expuestas a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de 7-hidroxycumarina. No se observaron cambios morfológicos característicos de apoptosis a ningún tiempo de exposición. (200X)

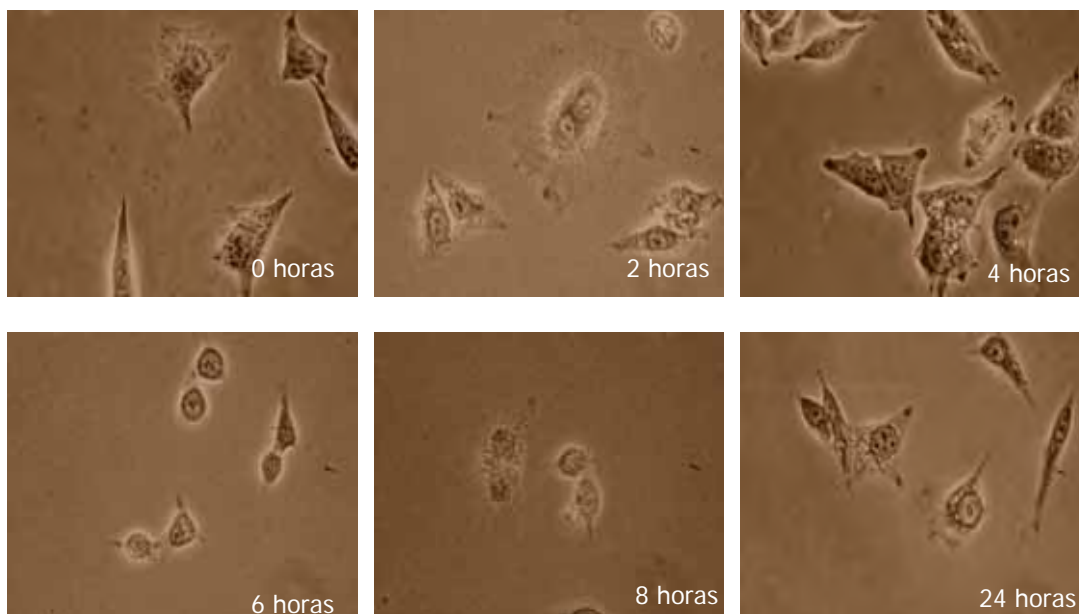


**Figura 6.** Células A-549 expuestas a 150 µg/ mL de 7-hidroxycumarina. No se observaron cambios morfológicos característicos de apoptosis a ningún tiempo de exposición. (200X)



**Figura 7.** Células A-427 expuestas a 50 µg/ mL de cumarina. No se observaron cambios morfológicos característicos de apoptosis a ningún tiempo de exposición. (200X)

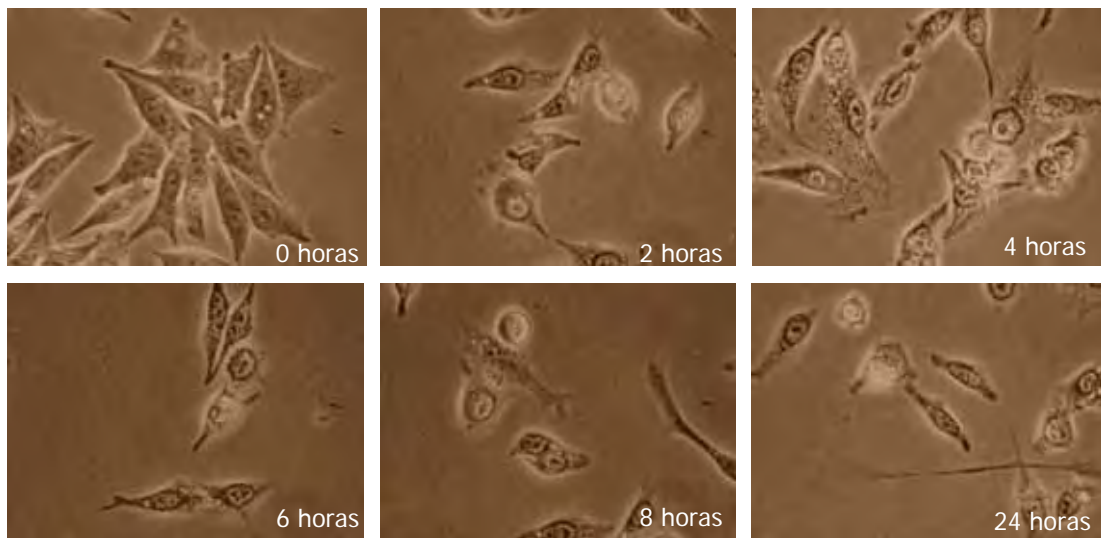




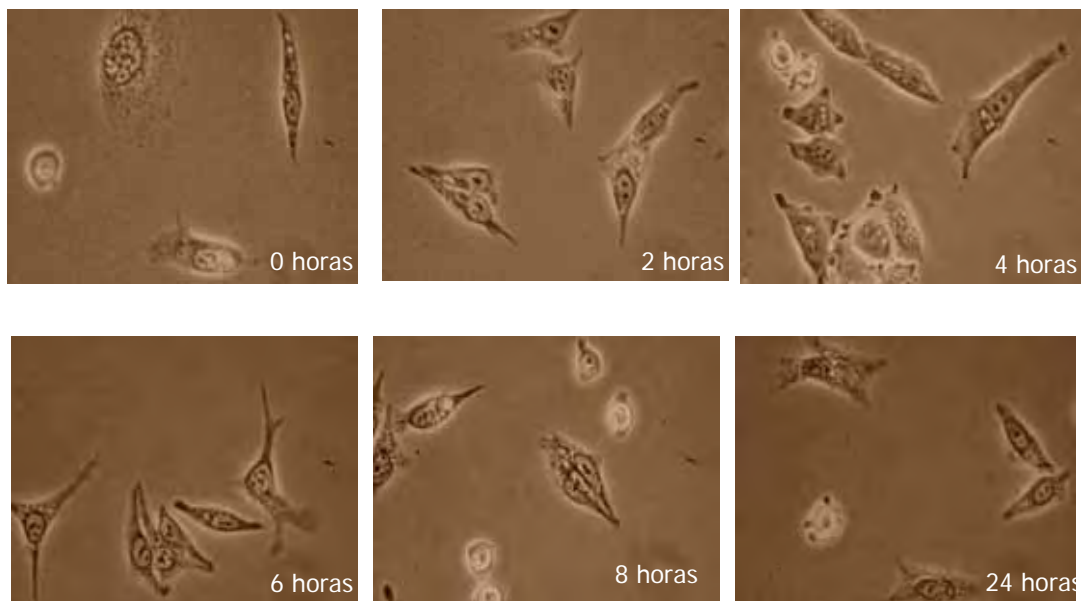
**Figura 8.** Células A-427 expuestas a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cumarina. No se observaron cambios morfológicos característicos de apoptosis a ningún tiempo de exposición. (200X)



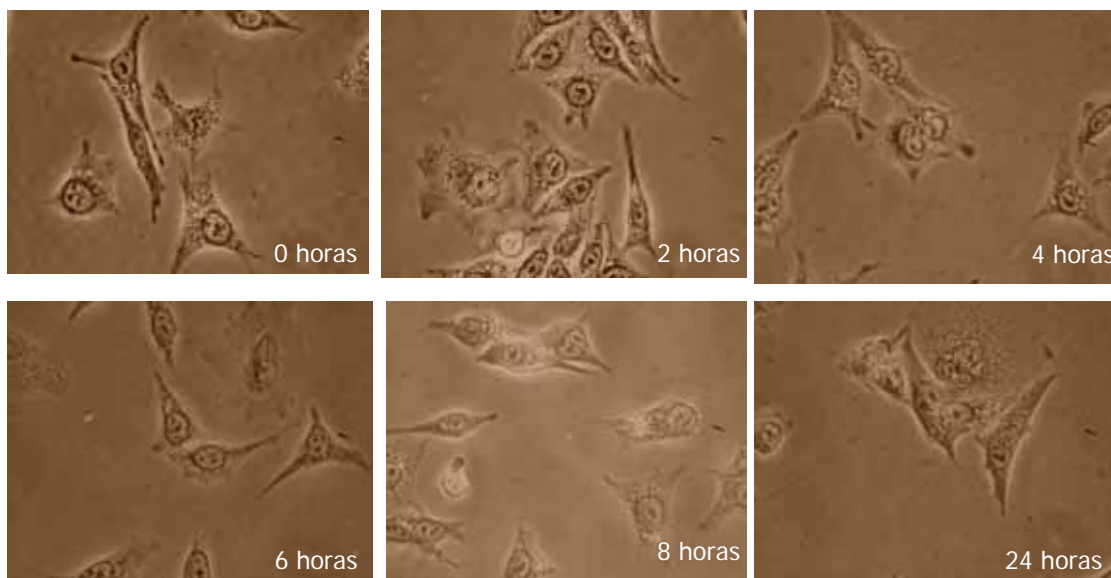
**Figura 9.** Células A-427 expuestas a 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cumarina. No se observaron cambios morfológicos característicos de apoptosis a ningún tiempo de exposición. (200X)



**Figura 10.** Células A-427 expuestas a 50 µg/ mL de 7-hidroxycumarina. No se observaron cambios morfológicos característicos de apoptosis a ningún tiempo de exposición. (200X)



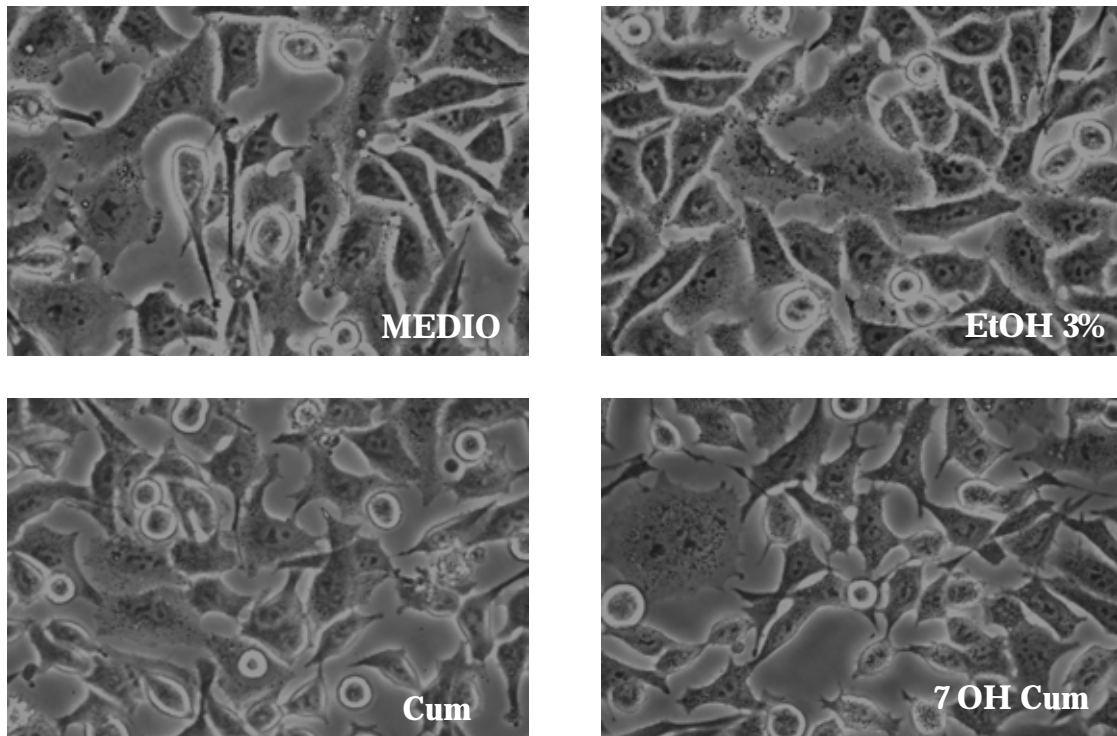
**Figura 11.** Células A-427 expuestas a 100 µg/ mL de 7-hidroxycumarina. No se observaron cambios morfológicos característicos de apoptosis a ningún tiempo de exposición. (200X)



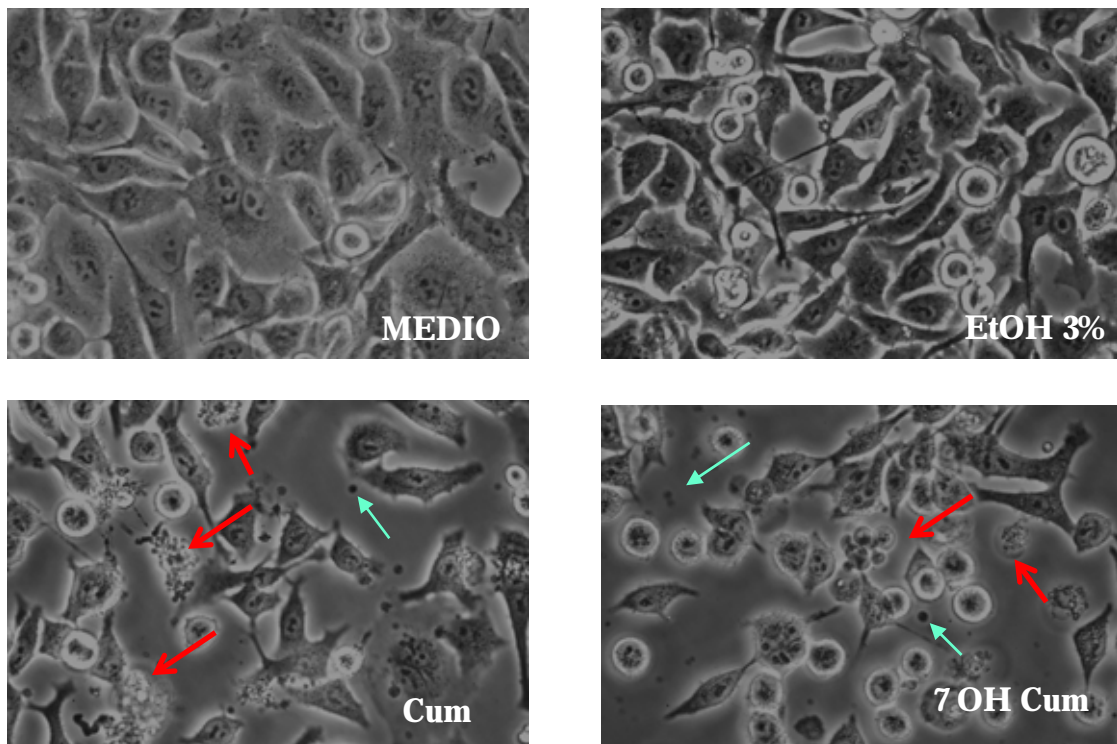
**Figura 12.** Células A-427 expuestas a 150 µg/ mL de 7-hidroxycumarina. No se observaron cambios morfológicos característicos de apoptosis a ningún tiempo de exposición. (200X)

No se observaron cambios morfológicos característicos de apoptosis en ambas líneas celulares, tratadas con 50, 100 y 150 µg/ mL de cumarina ó de 7-hidroxycumarina a los diferentes tiempos de exposición (2, 4, 6, 8 ó 24 horas).

Se estudió en ambas líneas celulares, el efecto de una concentración mayor de los compuestos cumarínicos, 300 µg/ mL y se tomaron microfotografías a las 6, 12 y 24 horas de exposición. A las 6 hrs de haber añadido los compuestos cumarínicos en células A-549 o A-427, no se observaron cambios morfológicos en las células (Fig. 13 y 16). Se observaron cambios morfológicos característicos de apoptosis, a partir de las 12 horas, como la formación de vesículas en la membrana celular (blebbing) y aparición de cuerpos apoptóticos como resultado del fraccionamiento celular en las células A-549 y A-427, (Fig 14 y 17) y continuaron presentándose hasta las 24 hrs de exposición (Fig 15 y 18). A diferencia de las células A-549, las células de la línea A-427 tratadas con el vehículo de las cumarinas (etanol al 3%), presentaron cambios morfológicos característicos de apoptosis desde las 12 horas de exposición.

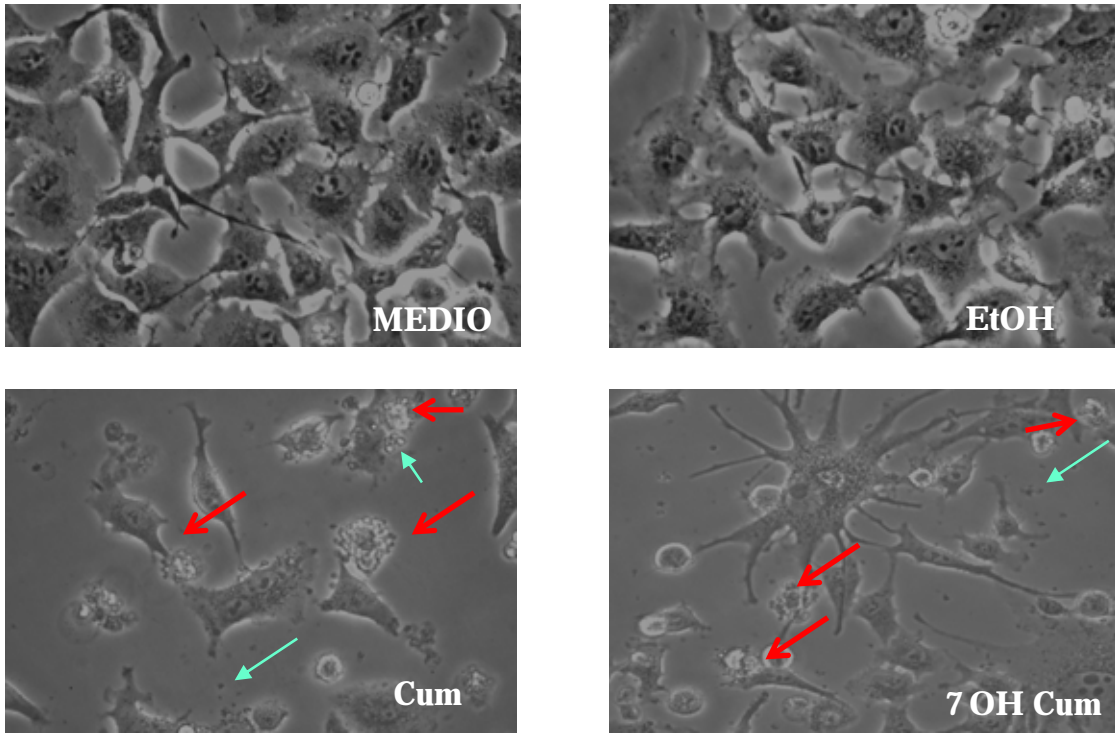


**Figura 13.** Células A-549 expuestas a 300 µg/ mL de cumarina o 7-hidroxycumarina durante 6 hrs. (400X)

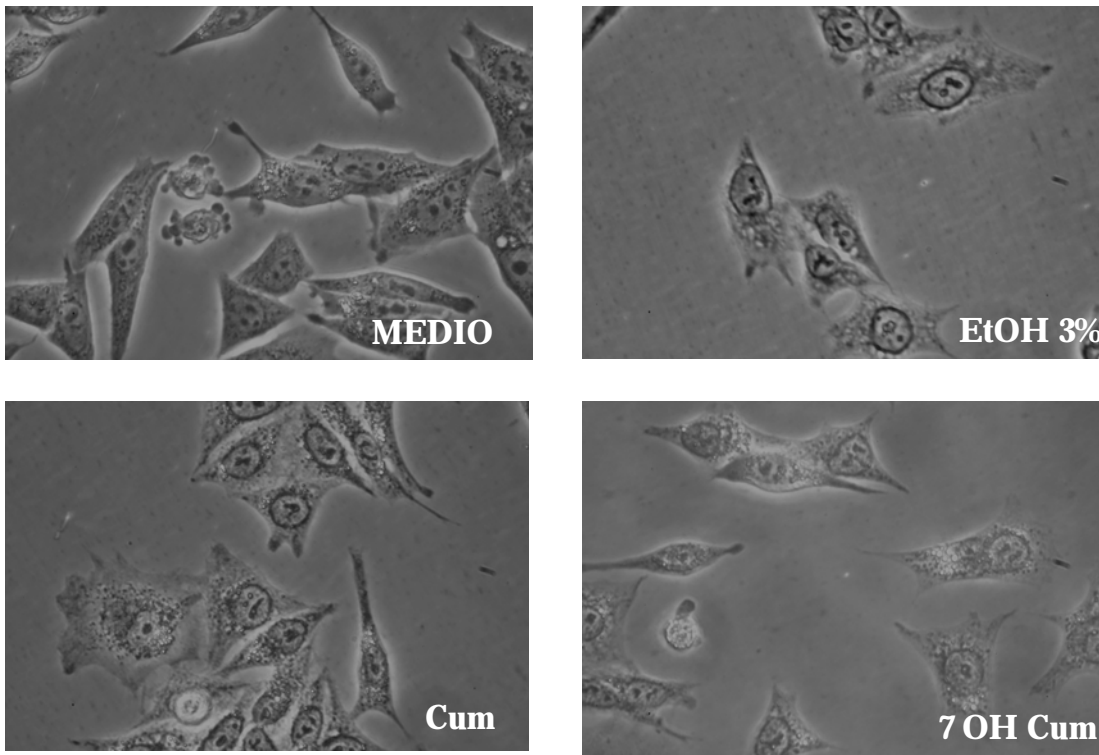


**Figura 14.** Células A-549 expuestas a 300 µg/ mL de cumarina o 7-hidroxycumarina durante 12 hrs . Las flechas **→** corresponden a células con blebbing y las flechas **→** corresponden a los cuerpos apoptóticos. (400X)

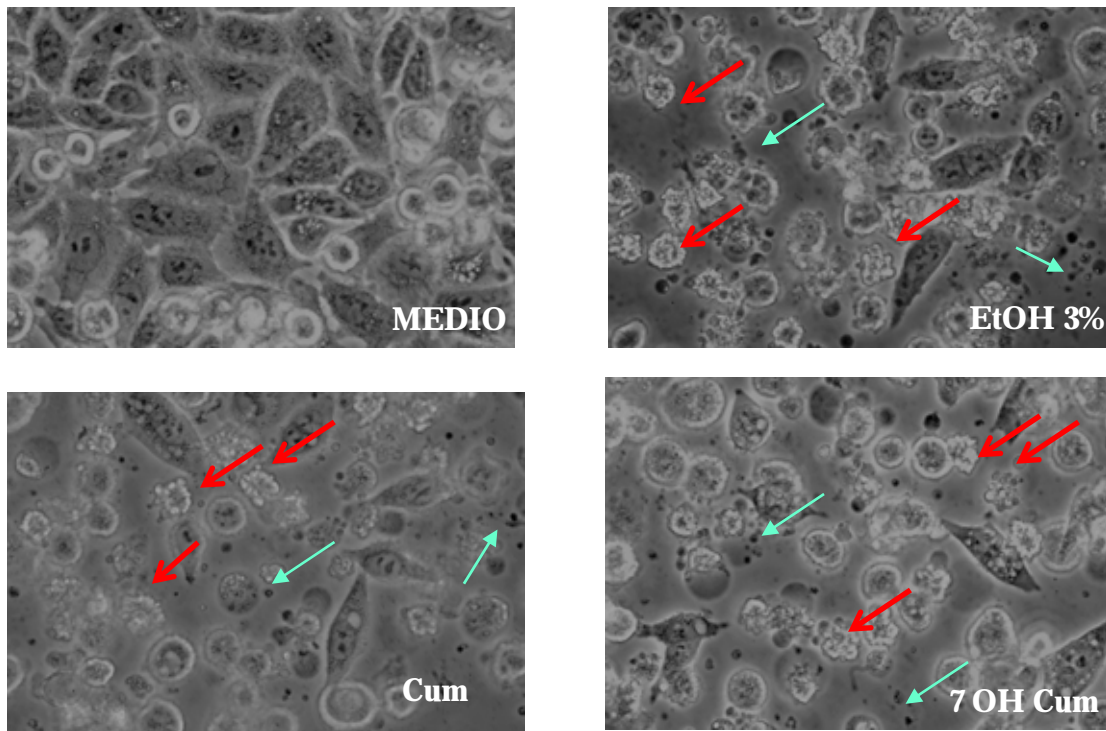




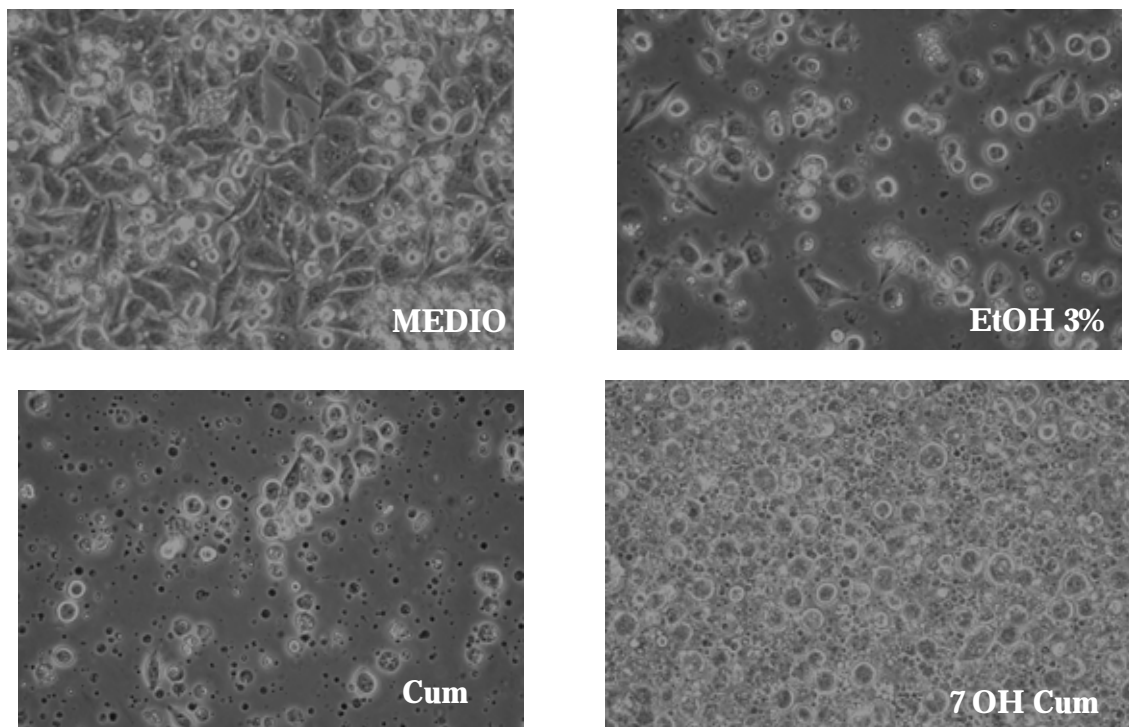
**Figura 15.** Células A-549 expuestas a 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cumarina o 7-hidroxycumarina durante 24 hrs . Las flechas  $\rightarrow$  corresponden a células con blebbing y las flechas  $\rightarrow$  corresponden a los cuerpos apoptóticos. (400X)



**Figura 16.** Células A-427 expuestas a 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cumarina o 7-hidroxycumarina durante 6 hrs. (400X)



**Figura 17.** Células A-427 expuestas a 300 µg/ mL de cumarina o 7-hidroxycumarina durante 12 hrs . Las flechas **→** corresponden a células con blebbing y las flechas **→** corresponden a los cuerpos apoptóticos. (400X)



**Figura 18.** Células A-427 expuestas a 300 µg/ mL de cumarina o 7 hidroxycumarina durante 24 hrs . Las flechas rojas corresponden a células con blebbing y las flechas verdes corresponden a los cuerpos apoptóticos. (200X)

## **6.2 Determinación de la actividad de Caspasas 8 y 3 en lisados celulares de las líneas A-549 y A-427 tratadas con cada cumarina .**

Después de haber observado los cambios morfológicos en células inducidas a apoptosis con cumarina ó 7-hidroxycumarina, procedimos a determinar la actividad enzimática de 2 caspasas.

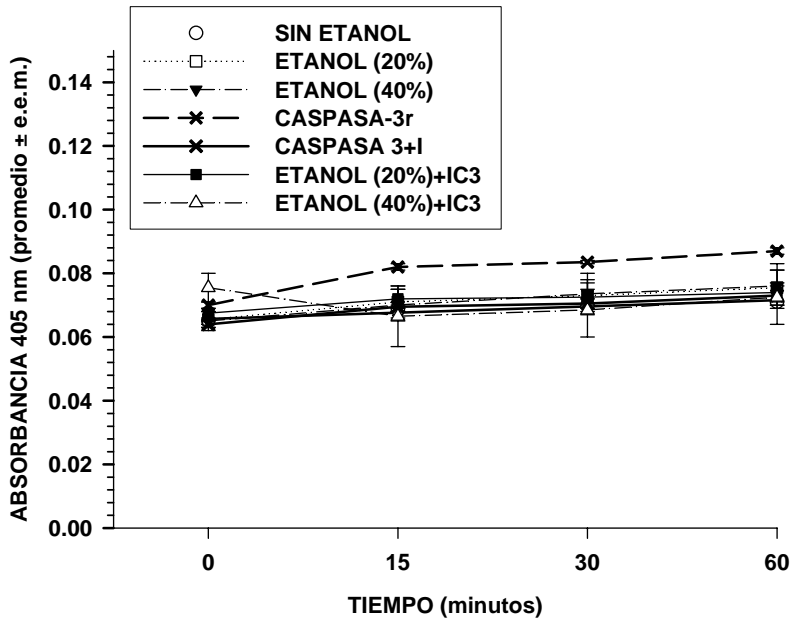
Utilizando caspasas recombinantes (como control positivo de la actividad) y sus respectivos inhibidores (inhibición específica), se realizaron cinéticas de la actividad de la caspasa en lisados de células A-549 y A-427 expuestas al vehículo o tratadas con cumarina o 7-hidroxycumarina a diferentes concentraciones. Las determinaciones se realizaron en 3 ocasiones, se muestran las más representativas. Los resultados presentados corresponden al promedio de un triplicado de la actividad de caspasa 3.

En ninguna de las líneas celulares que no fueron expuestas a los compuestos cumarínicos se detectó actividad basal de caspasa 8 ó caspasa 3.

### **6.2.1 Determinación de la cantidad de proteína necesaria para determinar la actividad de Caspasas en lisados celulares .**

Se utilizaron lisados de células Jurkat, 1 µg de proteína de lisado celular para cada pozo de reacción (microplacas de 96 pozos), para inducir apoptosis, las células se expusieron a etanol al 20% y al 40% (v/v). Se detectó la actividad, cuando se utilizó como control positivo la caspasa 3 recombinante (en ausencia de lisado celular), misma que no se observó al utilizar el inhibidor específico de la caspasa 3 (Fig 19-A). Al no observar actividad, se repitió la determinación utilizando en esta ocasión 5 µg de proteína/pozo de reacción. En estas condiciones, se detectó la actividad de caspasa 3 en las dos muestras inducidas a apoptosis con etanol, además de la actividad de caspasa-3 recombinante que fue abolida al administrarse en conjunto con su inhibidor (Fig 19-B). Basándonos en estos resultados se decidió realizar las determinaciones de ambas caspasas utilizando 2.5 µg proteína/pozo de reacción de los lisados celulares de cada exposición.

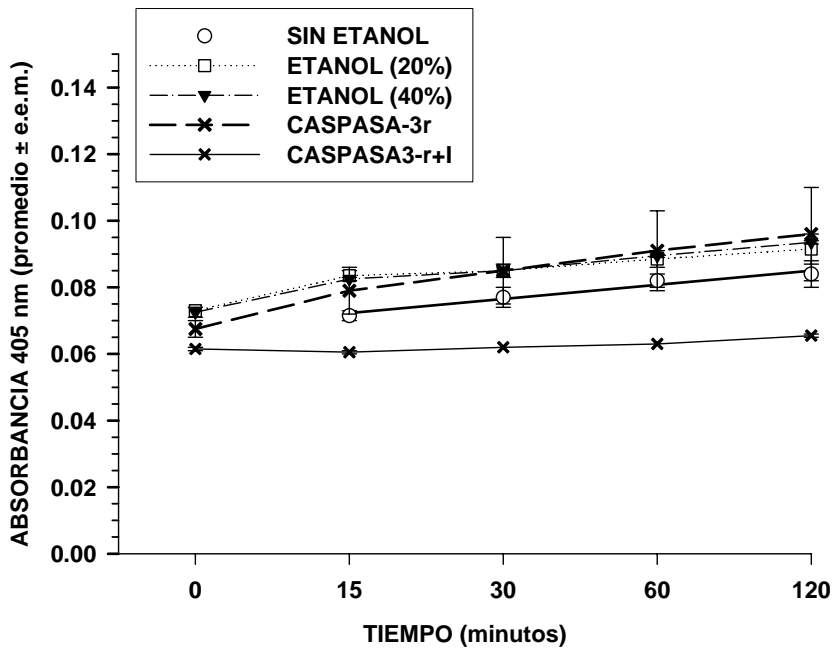
**A) ENSAYO COLORIMÉTRICO DE ACTIVIDAD DE CASPASA 3 EN LISADO DE CELULAS JURKAT (1 µg/pozo) EXPUESTAS 60 MINUTOS A ETANOL**



**Figura 19** Cinética de la actividad de caspasa 3 utilizando: C3 recombinante con o sin su inhibidor, lisado de células Jurkat en RPMI o expuestas a etanol al 20 y 40%.

**A)** 1 µg/pozo de proteína, se observa que la única muestra que presenta actividad de caspasa 3 es la correspondiente a la caspasa 3 recombinante. **B)** 5 µg/pozo, se observa que las células expuestas a Etanol presentan una actividad de caspasa 3 similar a la obtenida con la caspasa 3 recombinante.

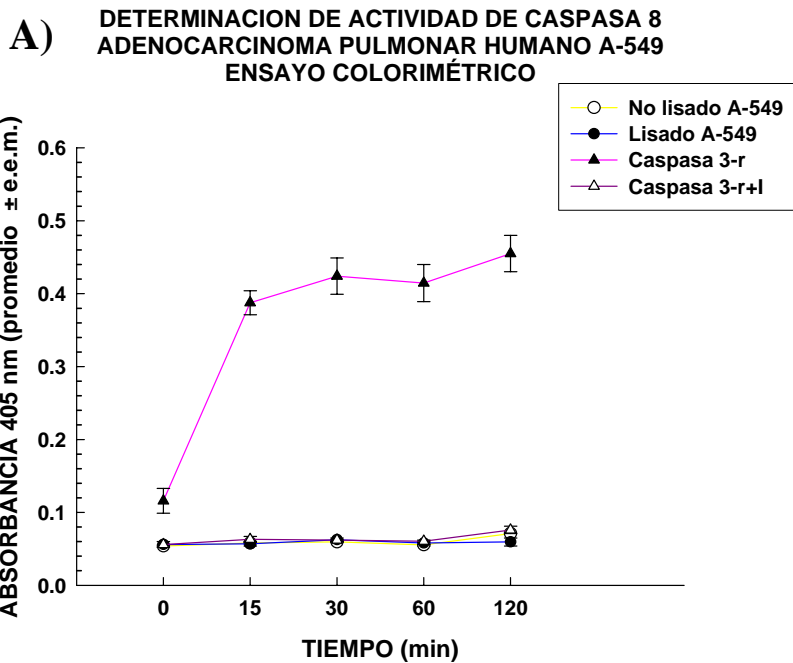
**B) ENSAYO COLORIMÉTRICO DE ACTIVIDAD DE CASPASA 3 EN LISADO DE CELULAS JURKAT (5 µg/pozo) EXPUESTAS 60 MINUTOS A ETANOL**



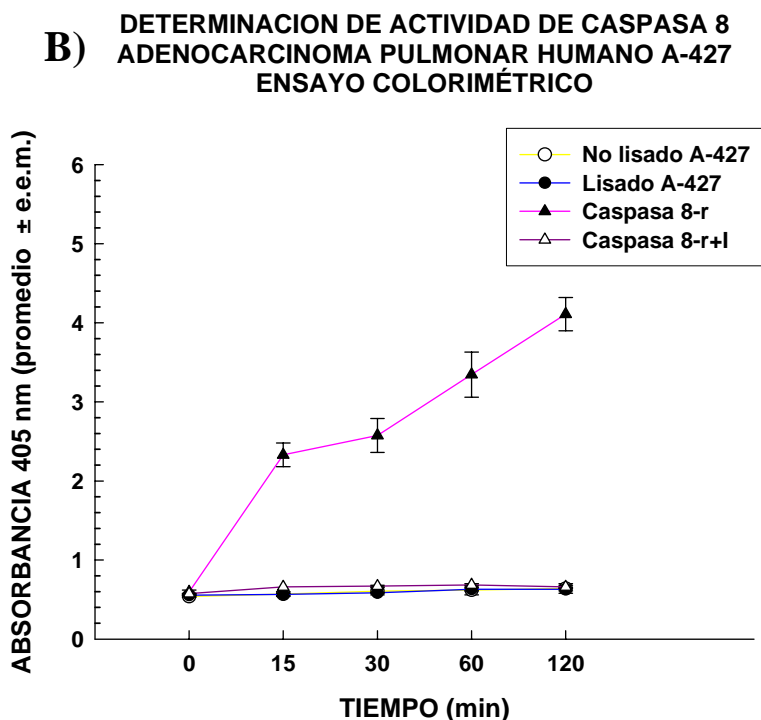


### 6.2.2 Determinación de la actividad de Caspasa 8 en lisados celulares de A-549 y A-427 sin tratamiento.

No se presentó actividad de caspasa 8 en los lisados de células sin exposición a los compuestos para las dos líneas celulares en condiciones normales de cultivo. Las mediciones fueron realizadas al tiempo 0, 15, 30, 60 y 120 min. (Fig 20)

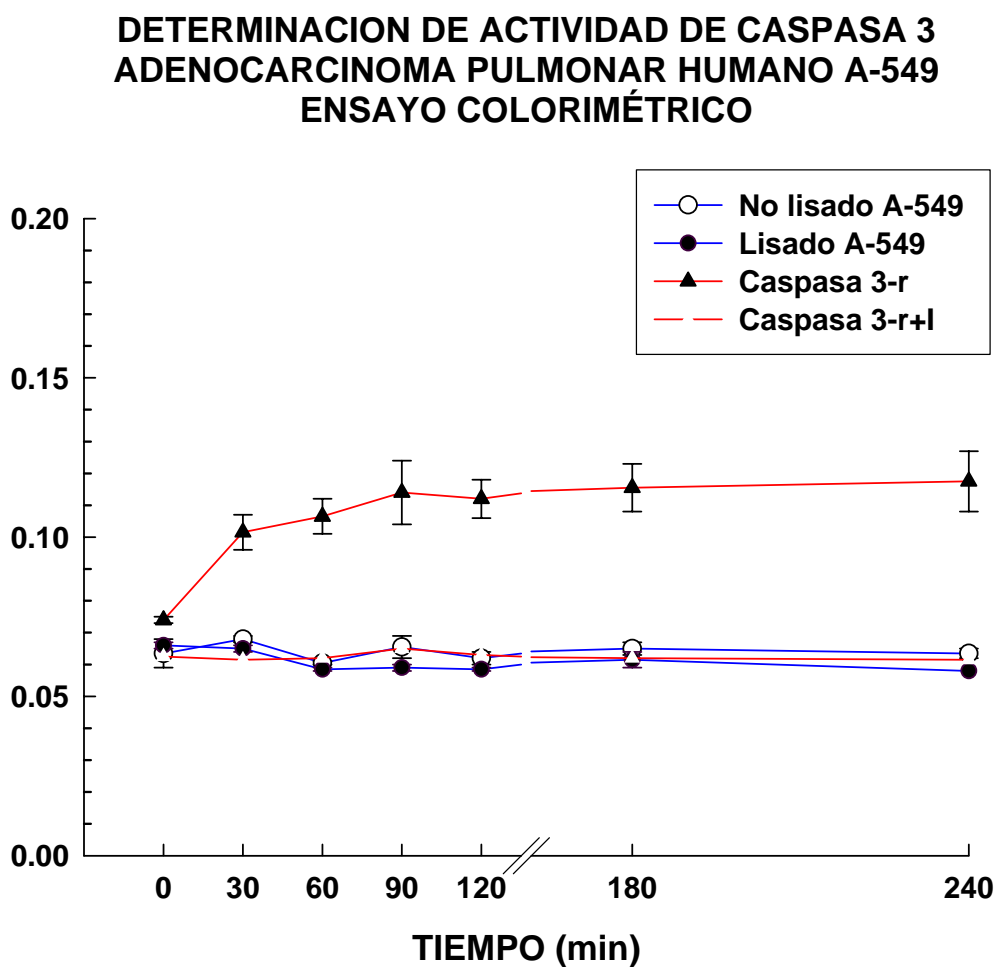


**Figura 20.** Cinética de la actividad de caspasa 8 utilizando: C8 recombinante, lisado de **A)** Células A-549 y **B)** Células A-427, con o sin inhibidor de C8. Se observa que la única muestra que presenta actividad de caspasa 8 en ambas líneas celulares es la correspondiente a la caspasa 8 recombinante.



### 6.2.3 Determinación de la actividad de Caspasa 3 en lisados celulares de A-549 y A-427 sin tratamiento.

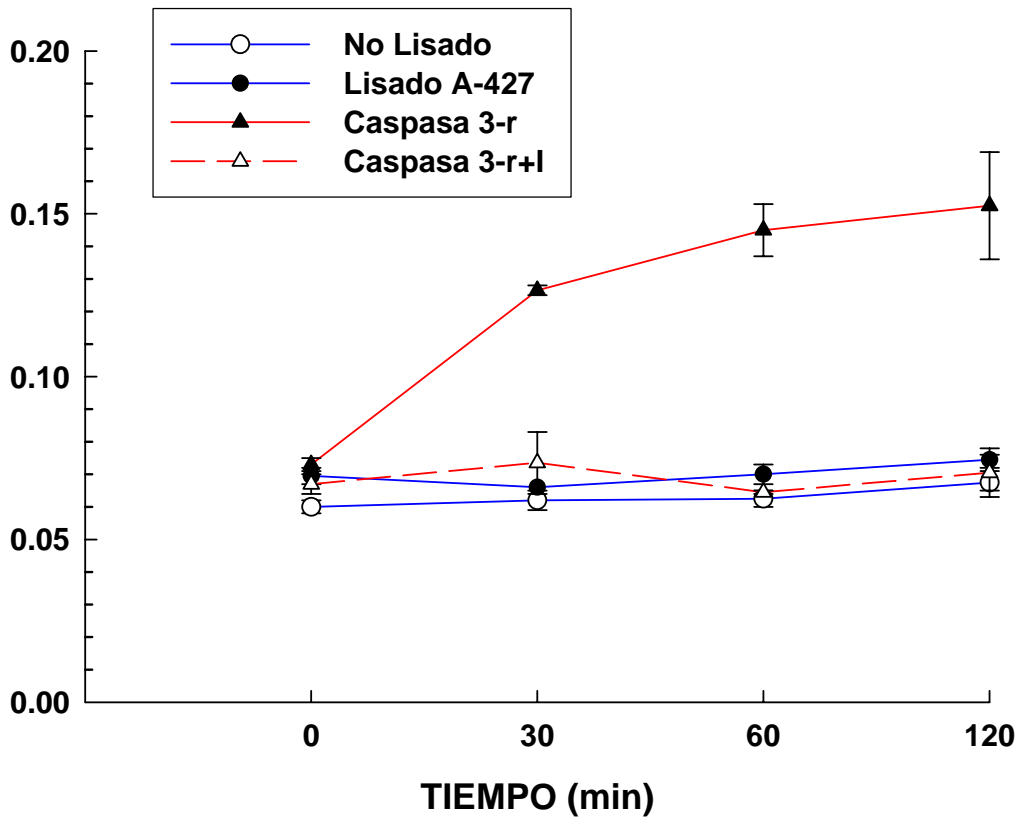
Los resultados muestran que no se presentó actividad de caspasa 3 basal en los lisados de células que no fueron expuestas a compuestos cumarínicos para las dos líneas celulares en condiciones normales de cultivo (Fig 21 y 22). Para la línea A-549 las mediciones fueron realizadas al tiempo 0, 15, 30, 60, 120, 180 y 240 min (Fig 21). Se observó que después de los 60 minutos ya no existen variaciones en las mediciones por lo que las determinaciones posteriores se realizaron hasta los 120 min.



**Figura 21.** Cinética de la actividad de caspasa 3 utilizando: C3 recombinante, lisado de células A-549 con o sin inhibidor de C3.

Se observa que la única muestra que presenta actividad de caspasa 3 es la correspondiente a la caspasa 3 recombinante. Además se observa que la actividad de la caspasa 3 llega a su máximo y se estabiliza a partir de los 60 min.

**DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE CASPASA 3  
ADENOCARCINOMA PULMONAR HUMANO A-427  
ENSAYO COLORIMÉTRICO**

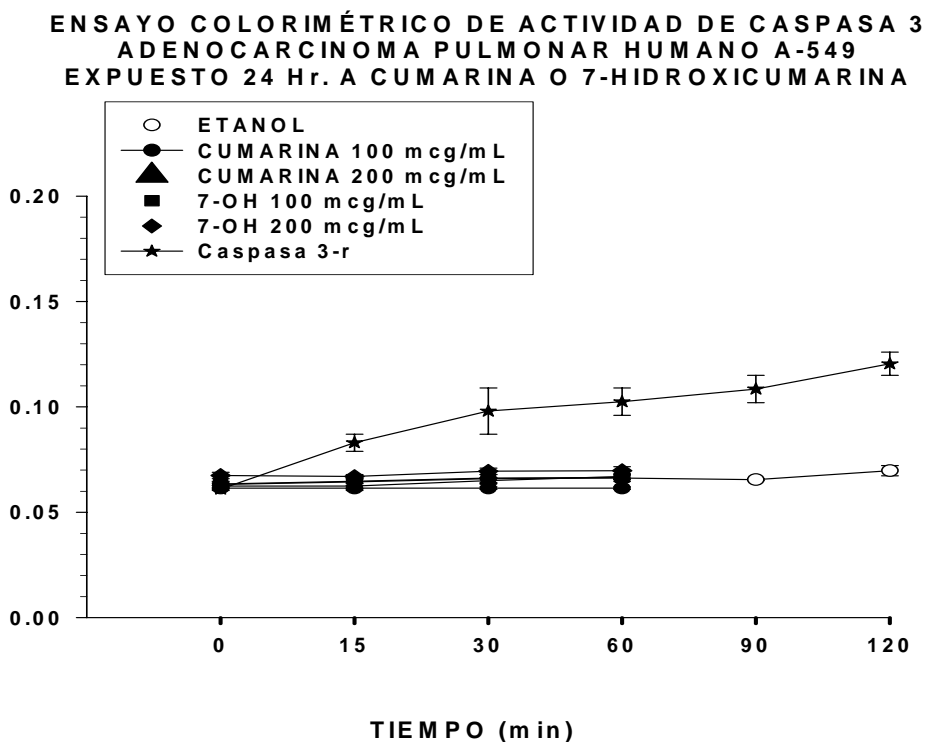


**Figura 22.** Cinética de la actividad de caspasa 3 utilizando: C3 recombinante, lisado de células A-427 con o sin inhibidor de C3. Se observa que la única muestra que presenta actividad de caspasa 3 es la correspondiente a la caspasa 3 recombinante.

#### 6.2.4 Determinación de la actividad de Caspasa 3 en lisados de A-549 y A-427 expuestas a cumarina ó 7-hidroxicumarina

Para determinar si la caspasa 3 se activa a consecuencia de la exposición de las células a los compuestos cumarinicos, células A-549 fueron expuestas a 100 y 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cumarina o 7-hidroxicumarina. En este ensayo se utilizaron 2.5  $\mu\text{g}$  de proteína /pozo y no se detectó actividad de caspasa 3 a ninguna de las 2 concentraciones (Fig 23), lo cual correlaciona con la ausencia de cambios morfológicos observados en estas células expuestas a concentraciones menores de 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . (Fig. 1-6) (Tabla 1)

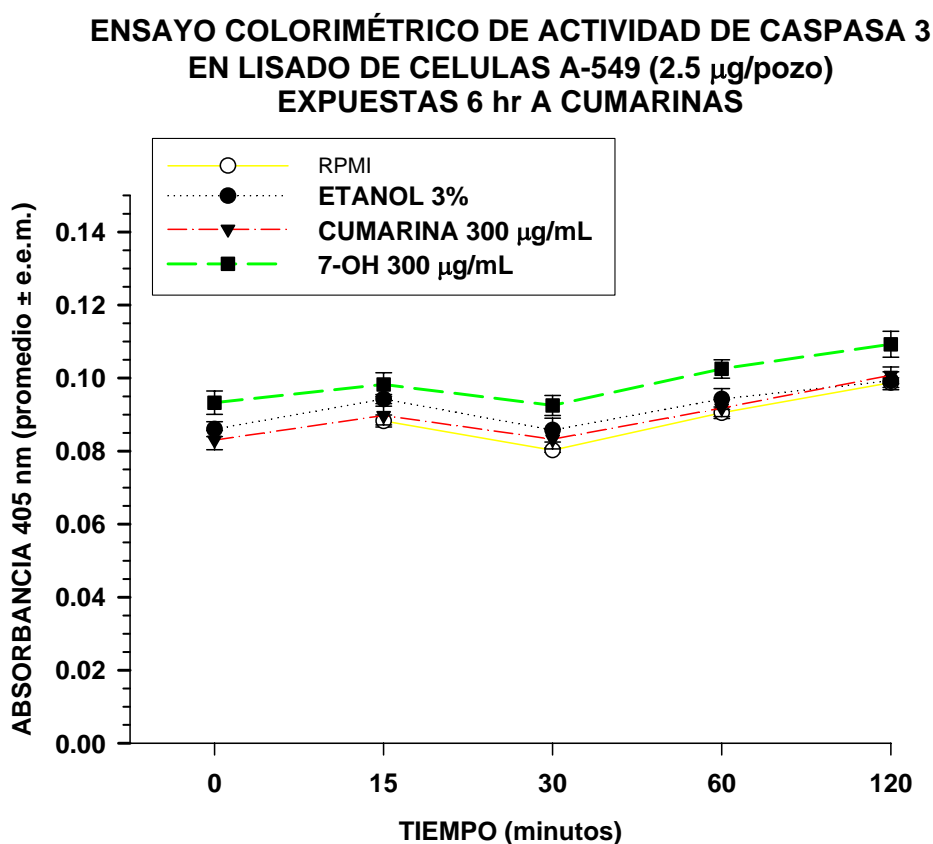
Por lo tanto se realizaron ensayos con células expuestas a 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cumarina ó de 7-hidroxicumarina durante 6, 12 ó 24 horas.



**Figura 23.** Cinética de la actividad de caspasa 3 en lisados de células A-549 expuestas a 100 y 200  $\mu\text{g}$  de cumarina o 7-hidroxicumarina durante 24 h.

**a) Exposición de células A-549 a compuestos cumarínicos durante 6 horas.**

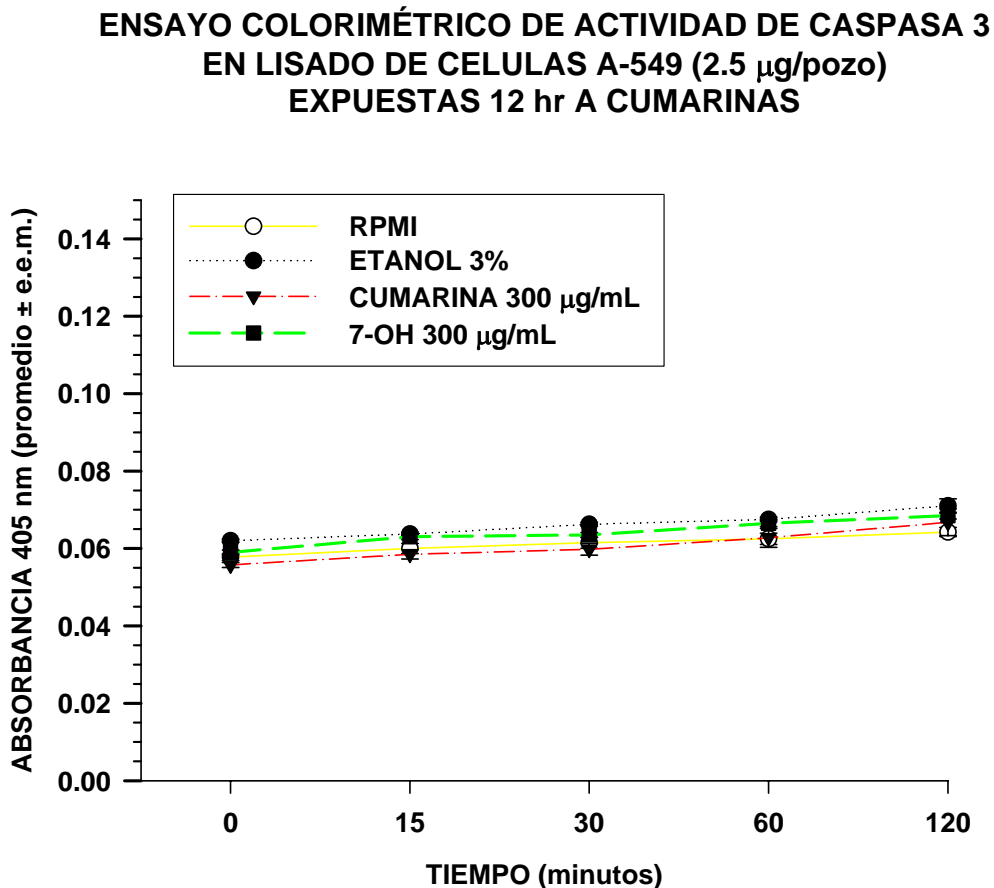
En células A-549 expuestas a 300  $\mu\text{g/mL}$  de compuestos cumarínicos durante 6 horas se observó un incremento en la actividad de caspasa 3 en las células expuestas a 7-hidroxicumarina, sin embargo este incremento no fue significativo respecto a las células expuestas a etanol. (Fig 24) Estos resultados concuerdan con la ausencia de cambios morfológicos característicos de apoptosis a las 6 hrs de exposición con 300 $\mu\text{g/mL}$  compuestos cumarínicos (Fig 13).



**Figura 24.** Cinética de la actividad de caspasa 3 en lisados de células A-549 expuestas a 300  $\mu\text{g/mL}$  de cumarina o 7-hidroxicumarina durante 6 hrs. No se observaron diferencias estadísticamente significativas.

### b) Exposición de células A-549 a compuestos cumarínicos durante 12 horas

En células A-549 expuestas a 300  $\mu\text{g/mL}$  de cada cumarina durante 12 horas no se detectó actividad de caspasa 3 diferente a la del control de vehículo (Fig. 25), aún cuando la morfología de las células expuestas se vió afectada y se observaron células apoptóticas al microscopio (Fig 14).

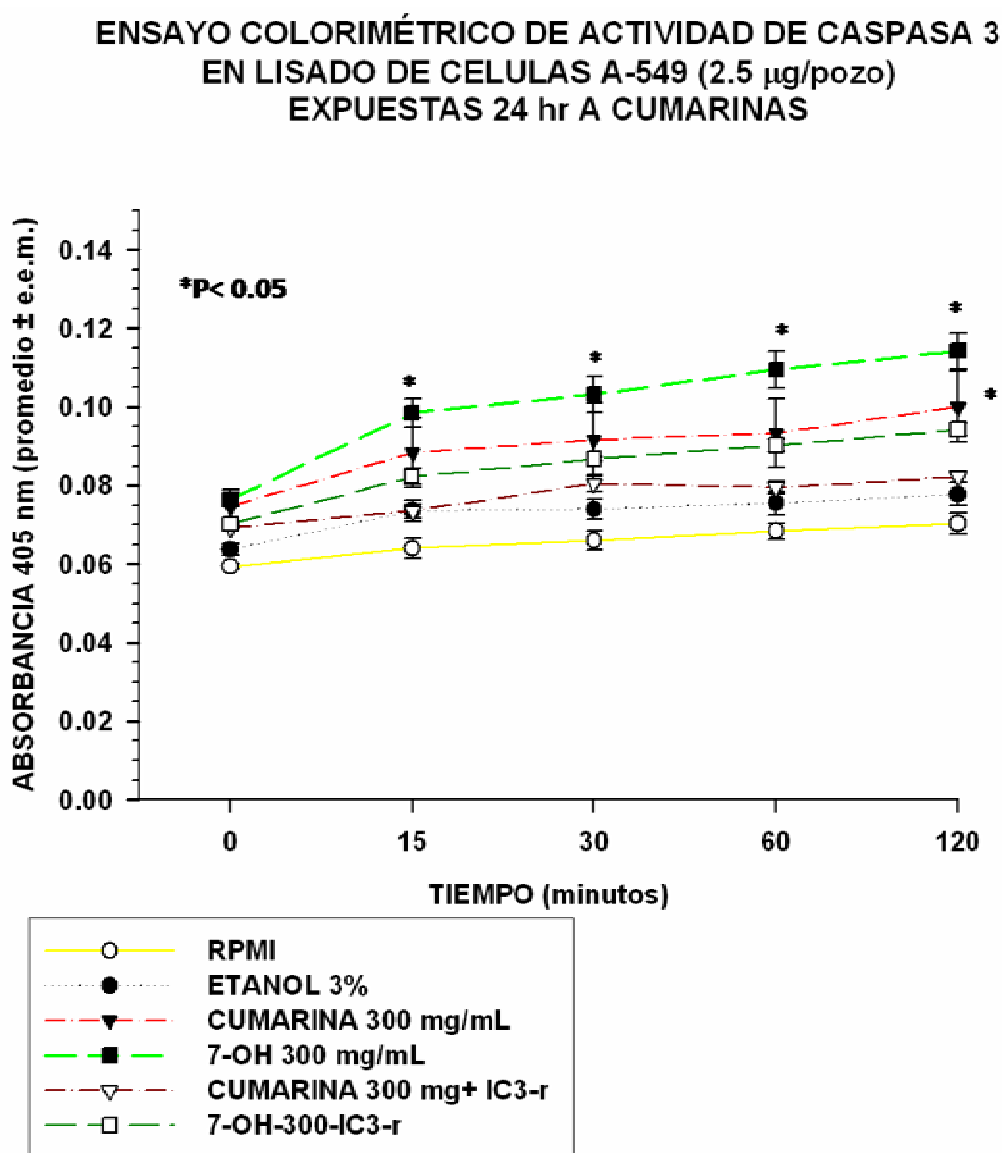


**Figura 25.** Cinética de la actividad de caspasa 3 en lisados de células A-549 expuestas a 300  $\mu\text{g/mL}$  de cumarina o 7-hidroxycumarina durante 12h. No se observaron diferencias estadísticamente significativas con las distintas exposiciones .

### c) Células A-549 expuestas durante 24 horas

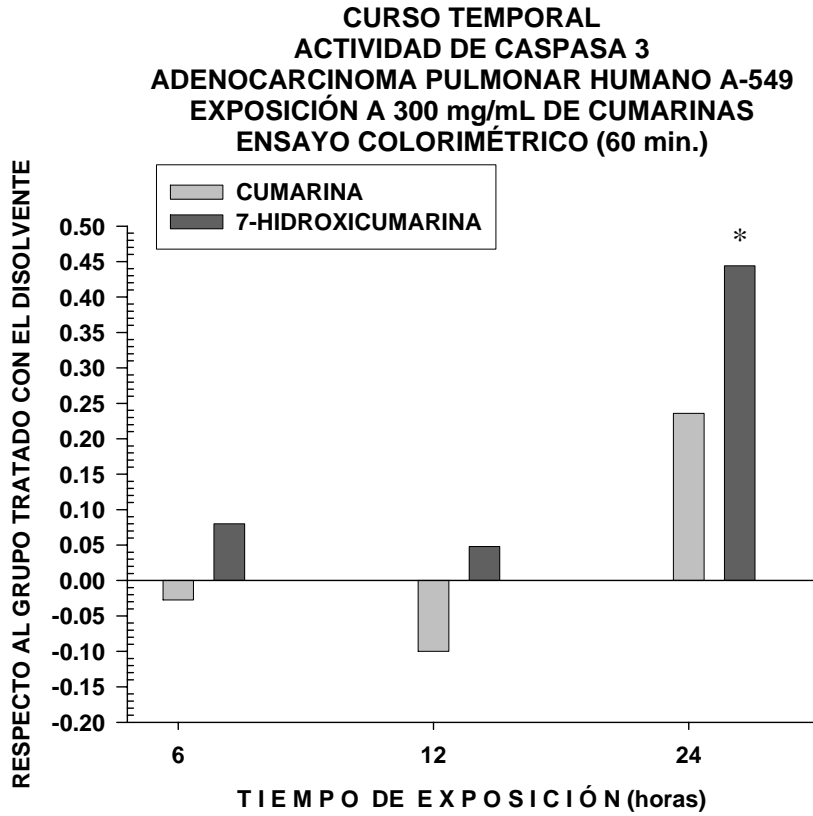
Células A-549 fueron expuestas a 300  $\mu\text{g/mL}$  de cumarina ó 7-hidroxycumarina disueltas en etanol al 3% durante 24 horas y se realizó el ensayo de actividad de caspasa 3, en el cual se encontró que la actividad de caspasa 3 en el lisado de células expuestas a 7-hidroxycumarina durante 24 horas presenta un incremento estadísticamente significativo respecto a el control de células expuestas únicamente al

solvente. El cambio de las células expuestas a 300 µg/mL de cumarina durante 24 h sólo fue significativo a los 120 min. Aunque se encontraron cambios morfológicos característicos de apoptosis en las células expuestas a cumarina en estas condiciones (Fig 15), las células expuestas a 7-hidroxicumarina fueron las que presentaron un incremento en la actividad de caspasa 3, respecto al control de células expuestas únicamente al disolvente, a todos los tiempos de exposición, estadísticamente significativo (Fig 26) y que corresponde con los cambios morfológicos observados a las 24hrs de exposición. (Fig 15)



**Figura 26.** Cinética de la actividad de caspasa 3 en lisados de células A-549 expuestas a 300 µg/mL de cumarina o 7-hidroxicumarina durante 24h ; observa un incremento significativo en la actividad de caspasa 3 en las células expuestas a 7-hidroxicumarina, a diferencia de las células expuestas a cumarina, el incremento sólo fue estadísticamente significativo a los 120 min.

Encontramos que la actividad de caspasa 3 es un 40% mayor con 7-hidroxycumarina en células expuestas durante 24 h, con respecto a la actividad de caspasa 3 presente en las células que solo fueron expuestas a etanol. (Fig 27)



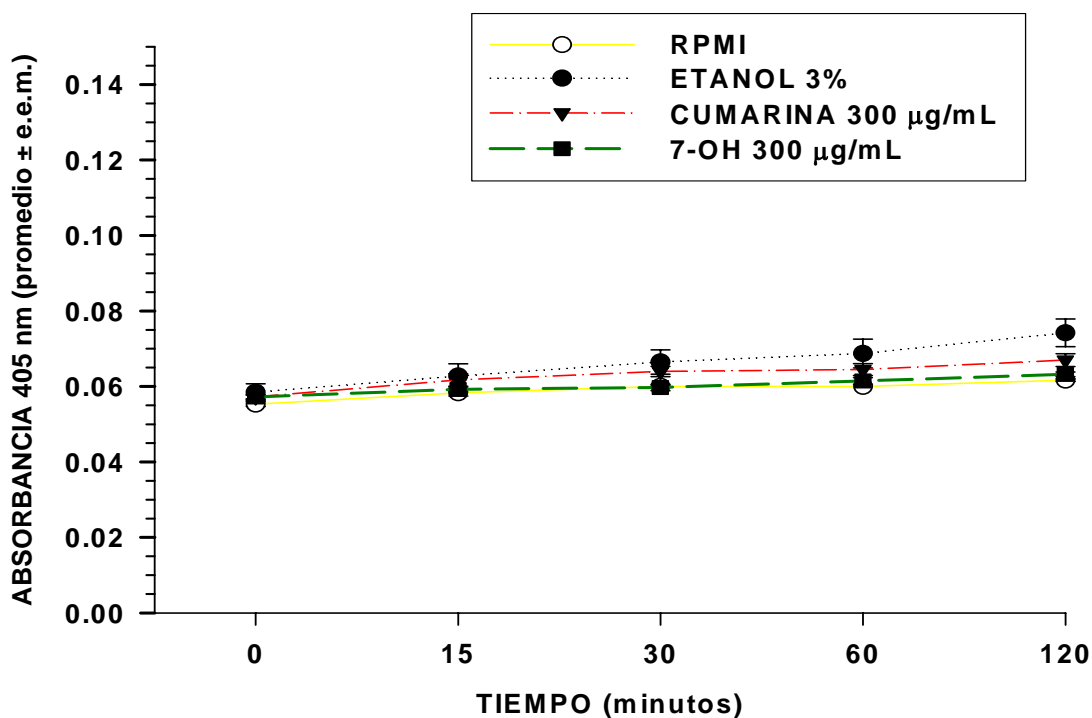
**Figura 27.** Índice de la actividad de caspasa 3 con respecto a las células expuestas a etanol (línea continua), durante el curso temporal de exposición a 300 µg/mL de cumarina ó 7-OH cumarina.



#### d) Células A-427 expuestas durante 12 horas

Cuando se estudiaron al microscopio los cambios morfológicos en células A-427 expuestas a 300µg/mL de compuestos cumarínicos durante 123 hrs, las células presentaron cambios morfológicos característicos de apoptosis; (Fig 17) sin embargo no se detectó actividad de caspasa 3 diferente a la del control de etanol en nuestras determinaciones. (Fig 28)

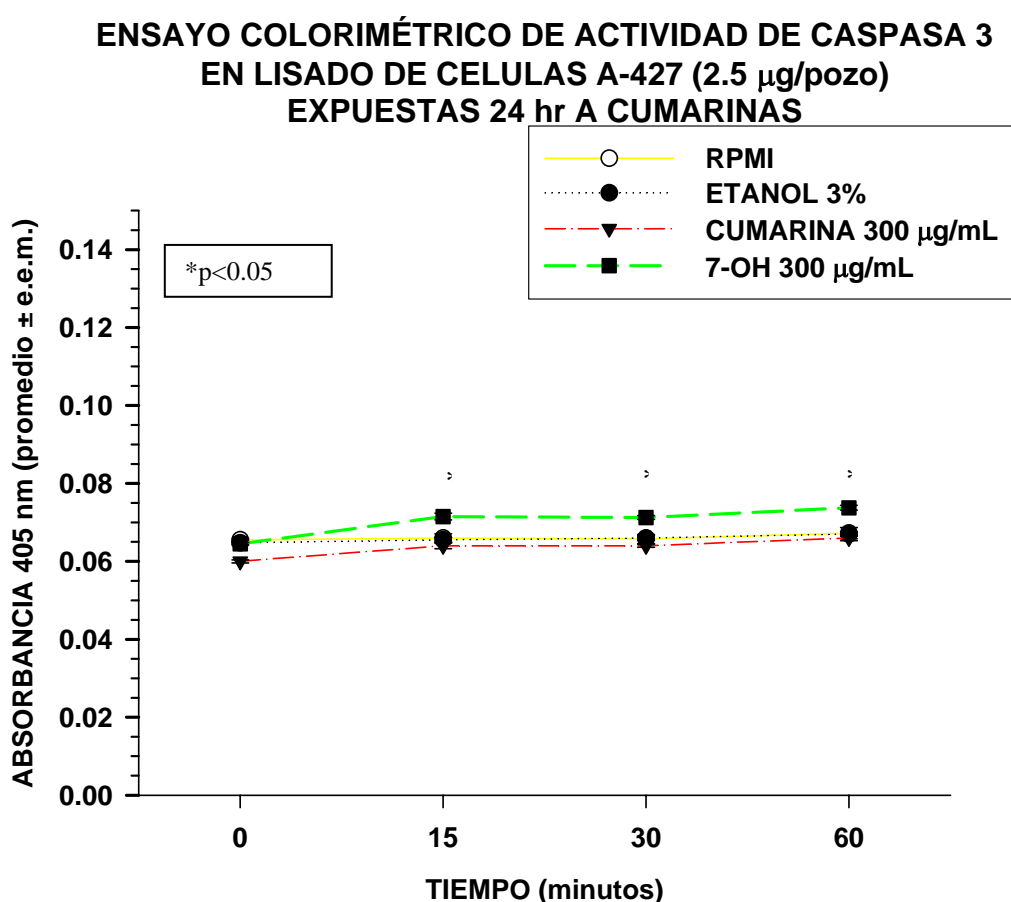
#### ENSAYO COLORIMÉTRICO DE ACTIVIDAD DE CASPASA-3 EN LISADO DE CELULAS A-427 (2.5 µg/pozo) EXPUESTAS 12 hr A CUMARINAS



**Figura 28.** Cinética de la actividad de caspasa 3 en lisados de células A-427 expuestas a 300 µg/mL de cumarina ó 7-hidroxycumarina durante 12 h. No se observaron diferencias significativas respecto al control de etanol con las diferentes exposiciones

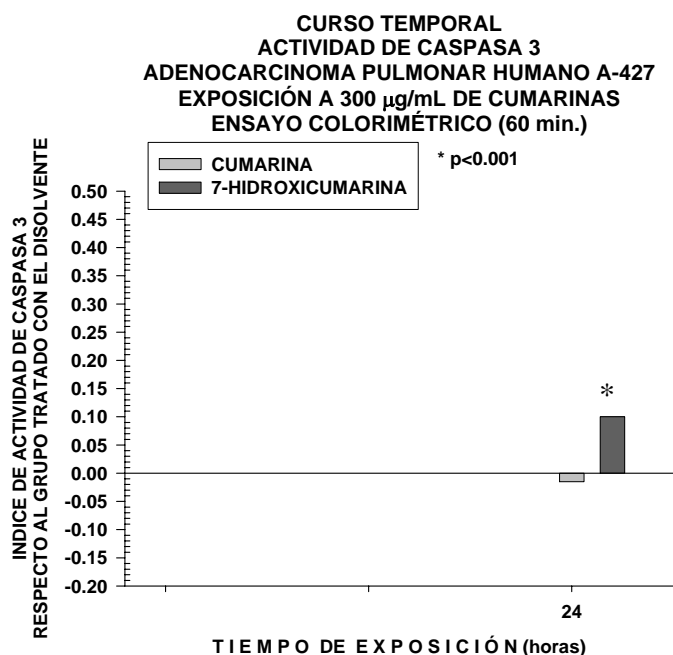
### e) Células A-427 expuestas durante 24 horas

Células A-427 fueron expuestas a 300 µg/mL de cumarina ó 7-OH cumarina durante 24 h. Morfológicamente, se observó que estas células son mucho más sensibles que las A-549 inclusive al etanol, el disolvente de las cumarinas (Fig 18). No obstante, al ser expuestas a la cumarina no se observó una diferencia en la actividad de caspasa 3 respecto al control. Los resultados obtenidos son similares a la otra línea celular ya que nuevamente es la 7-hidroxycumarina la que presenta un incremento significativo en la actividad de caspasa 3 y no la cumarina a pesar de que morfológicamente se observen cambios similares con ambos compuestos (Fig 29).



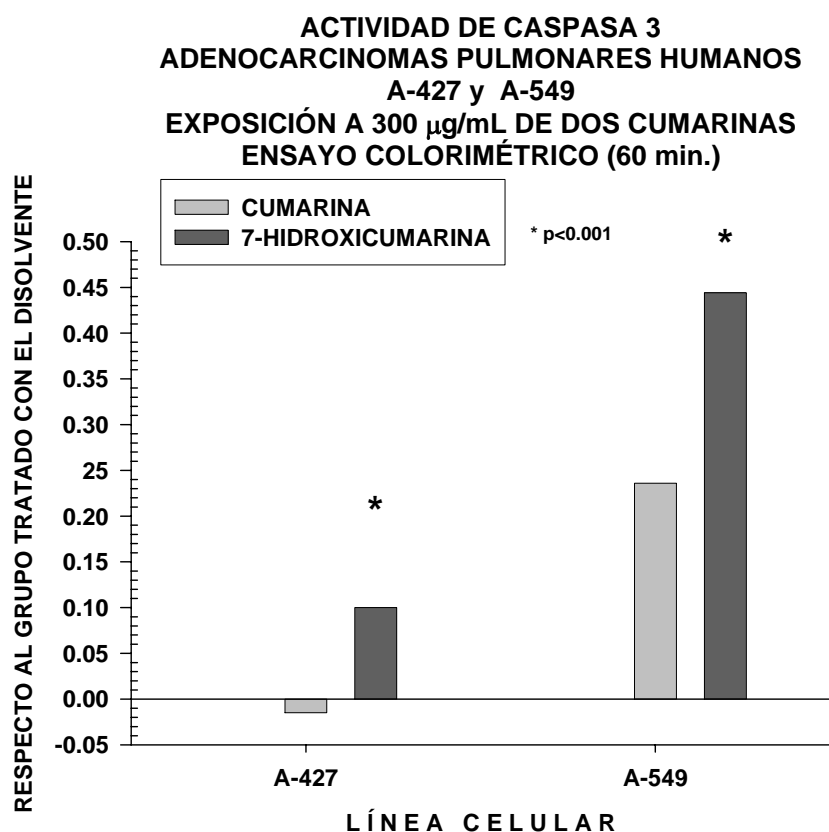
**Figura 29.** Cinética de la actividad de caspasa 3 en lisados de células A-427 expuestas a 300 µg/mL de cumarina o 7-hidroxycumarina durante 24h. Se observó un incremento significativo respecto al control de etanol únicamente con las células expuestas a 7-hidroxycumarina a partir de los 15 min.

Encontramos que la actividad de caspasa 3 en células A-427 es un 10% posterior a la exposición a con 7-OH cumarina durante 24h, con respecto a la actividad de caspasa 3 presente en las células que solo fueron expuestas al disolvente de las cumarinas (etanol), durante 24h. (Fig 30)



**Figura 30.** Indices de la actividad de caspasa 3 respecto al control de disolvente (línea continua) posterior a la exposición durante 24 h a 300 µg/mL de cumarina o 7-OH cumarina en células A-427.

Aún cuando morfológicamente las células A-427 fueron más sensibles que las A-549 a las exposiciones, la caspasa 3 presenta una actividad mayor cuando proviene de células expuestas a 7-hidroxycumarina en ambas líneas celulares; pero esta diferencia se presenta con diferente intensidad (Fig 31). Al ser expuestas a los compuestos cumarínicos a una concentración de 300 µg/mL durante 24 horas, las células A-427 presentan un incremento en la actividad de caspasa 3 del 10% respecto al control de etanol, mientras que el incremento en las células A-549 fue del 40%.



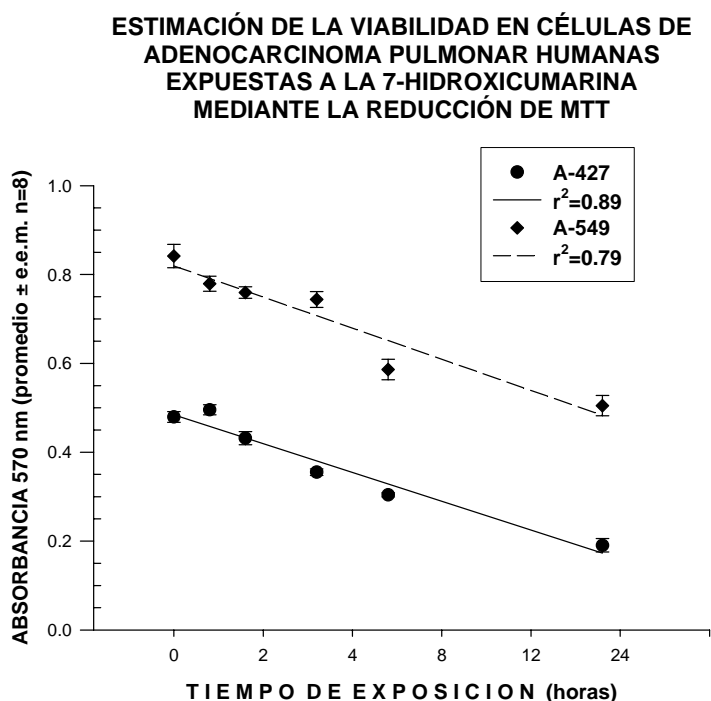
**Figura 31.** Índices de la actividad de caspasa 3, respecto al control de disolvente (línea continua), posteriores a la exposición durante 24 h a 300 µg/mL de cumarina ó de 7-hidroxicumarina. Se observó que la actividad de caspasa 3 incrementó un 10% en las células A-427 y un 40% en las células A-549.

Observando los resultados obtenidos hasta el momento podemos concluir que, no se encontraron cambios morfológicos característicos de apoptosis ambas líneas celulares cuando fueron expuestas a concentraciones menores de 300 µg/mL de los compuestos cumarínicos. Y los cambios observados al exponer a las células a esta concentración de cumarina o de 7-hidroxicumarina se resumen en la Tabla 1. Con estos datos determinamos buscar los cambios en la expresión de proteínas involucradas en el proceso apoptótico de células expuestas a 300 µg/mL durante 24 hrs.

	Tiempo de exposición	Cambios morfológicos			Incremento en la actividad de C3 respecto a EtOH	
		EtOH 3%	Cumarina 300µg/mL	7OHC 300µg/mL	Cumarina 300µg/mL	7OHC 300µg/mL
A-549	6h				∅	∅
	12h		*	**	∅	∅
	24h		**	***	∅	SI
A-427	6h				∅	∅
	12h	*	*	**	∅	∅
	24h	**	***	***	∅	SI

### 6.3 Estimación de la viabilidad celular por exposición de las células a la 7-hidroxicumarina

Se realizó el curso temporal de la exposición de ambas líneas celulares a la concentración de la 7-hidroxicumarina que mostró evidencia de los cambios morfológicos característicos de apoptosis. En las células de la línea A-549 se observó una reducción concentración-dependiente de manera lineal, de la viabilidad a partir del tiempo cero, a las 12 horas fue de 30.3% y llegó a su máximo a las 24 horas de la exposición (reducción de 39%) (Fig 32). Entre las 12 y las 24 horas solamente disminuyó en 9.9%. Esta reducción en la viabilidad fué coincidente con el porcentaje de actividad de caspasa 3 observado a las 24 horas (40%; Fig 31) En el caso de las células A-427, se observó el mismo efecto de reducción de la viabilidad, concentración-dependiente, una disminución de 38% a las 12 horas, que llegó al 65% a las 24 horas (Fig 32), aunque aquí no se observó una relación proporcional con la actividad de la caspasa 3, ya que a las 24 horas, solamente fue de 10.5% (Fig 31)



**Figura 32.**-Curso temporal durante 24 horas de la exposición a 300 µg/mL de 7-hidroxicumarina. Determinación de la viabilidad mediante ensayo colorimétrico de la reducción de metiltetrazolio en células de adenocarcinoma pulmonar humano

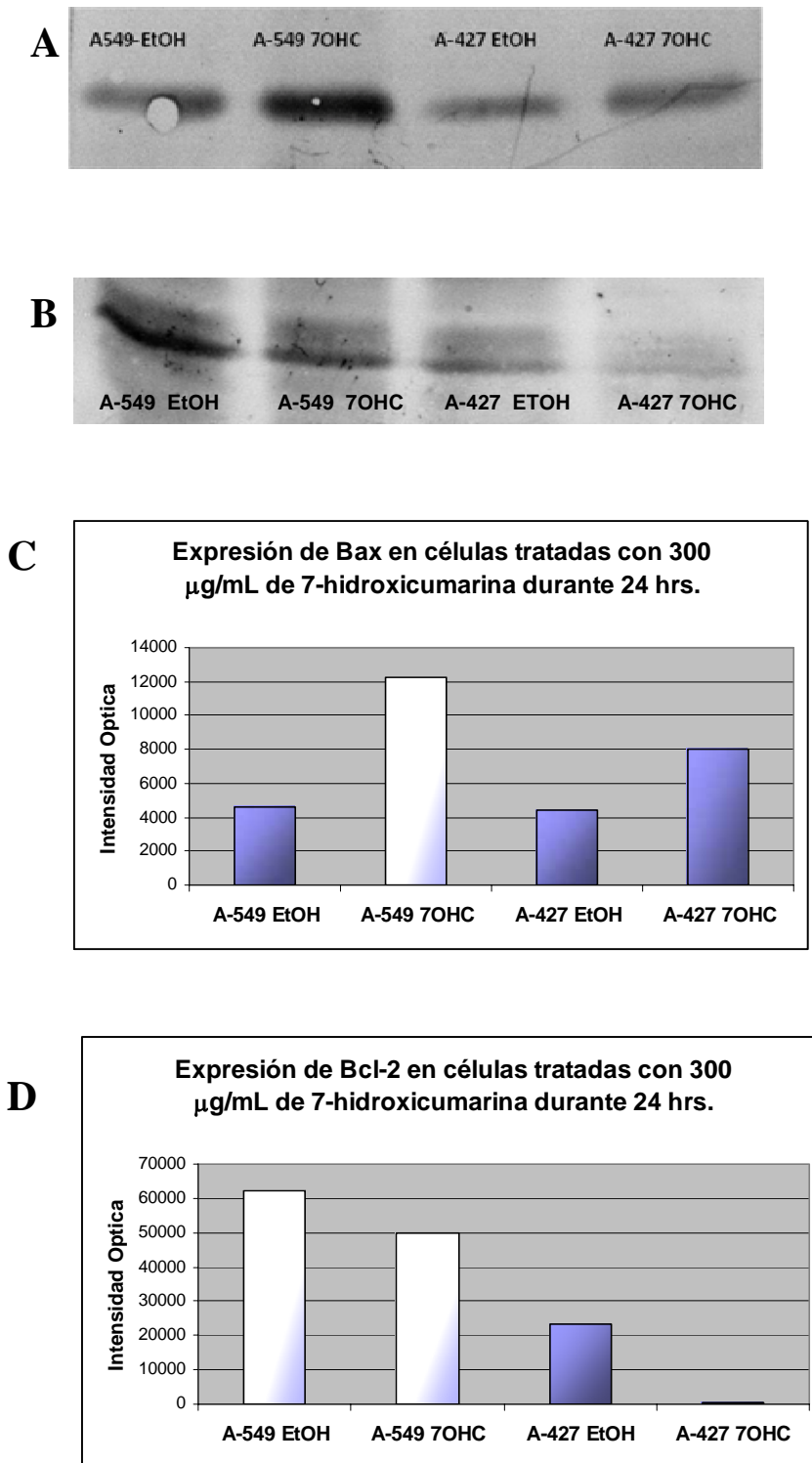
## **6.4 Detección de proteínas involucradas en el proceso apoptótico, mediante electroforesis y western blot.**

Se utilizaron lisados de células A-549 y A-427 expuestas durante 24 hrs a 300 µg/mL de 7-hidroxicumarina para analizar los cambios en la expresión de proteínas que participan en el proceso apoptótico, como Bax y Bcl-2, así como la activación de la caspasa 3, identificando la proteína activa con un peso menor que la proenzima.

### **6.4.1 Detección de Bcl-2 y Bax.**

Se analizaron los cambios en la expresión de Bax (proteína pro-apoptótica) y Bcl-2 (proteína anti-apoptótica) cuando se indujo apoptosis en células A-549 y A-427.

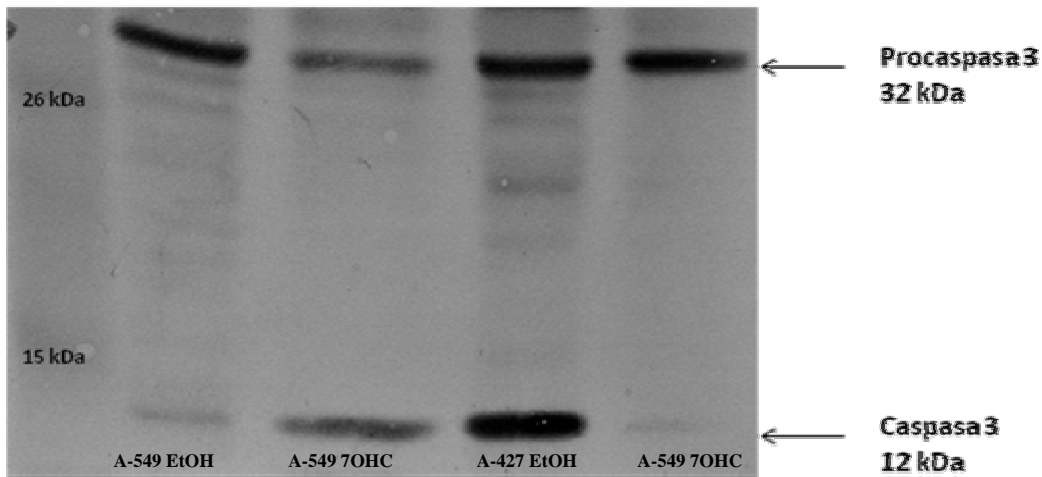
Los efectos de la exposición a 300 µg/mL de 7-hidroxicumarina o al control de etanol durante 24h sobre la expresión de Bax y Bcl-2 en ambas líneas celulares se muestran en las figuras 33 y 34. Concentraciones iguales de proteína de lisados de células A-427 y A-549 que fueron expuestas a 300 µg/mL de 7-hidroxicumarina durante 24 horas y analizadas por SDS-PAGE (17%) y subsecuentemente realizados los inmunoblots con anticuerpos anti-Bcl-2 y anti-Bax. La expresión de Bcl-2 (acción de supervivencia celular) se vio disminuida a consecuencia de la exposición a 7-hidroxicumarina en ambas líneas celulares, siendo más evidente en las células A-427 expuestas a 7-hidroxicumarina donde casi desaparece.(Fig 33-B y D) La expresión de Bax (acción inhibitoria de la supervivencia celular) se observó incrementada en relación al control de etanol a consecuencia de la exposición a la 7-hidroxicumarina. (Fig 33-A y C)



**Figura 33** Inmunoblot (A) anti-Bax y (B) anti-Bcl-2 en lisados de células A-549 y A-427 expuestas a el vehículo o a 300  $\mu$ g/mL de 7-hidroxicumarina durante 24 hrs .  
 Cuantificación densitométrica de la expresión de (C) Bax (D) Bcl-2 de los inmunoblots realizados, donde se observa un incremento en la expresión de Bax y una disminución en la expresión de Bcl-2 de las células expuestas a 7OHC respecto a las expuestas únicamente a etanol.

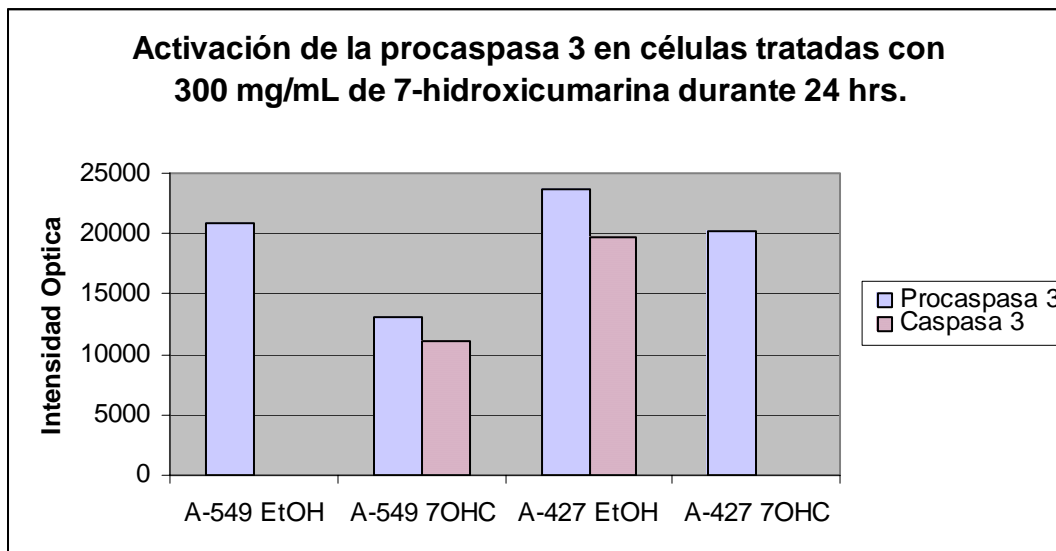
### 6.4.2 Detección de Caspasa 3

La caspasa 3 es una proteína citosólica que normalmente se encuentra como proenzima de 32 kDa . Es activada mediante proteólisis en un heterodímero de 12 y 17 kDa. Posterior a la inducción de apoptosis con 300  $\mu\text{g/mL}$  de 7-hidroxicumarina durante 24 hrs, se observó en los lisados de las células A-549 tratadas con etanol, una banda correspondiente a la proenzima de 32 kDa y de manera casi imperceptible la banda correspondiente al producto de activación , a diferencia de los lisados de las células tratadas con 7-hidroxicumarina una disminución de la banda de la proenzima y la consecuente aparición de la banda de 12 kDa correspondiente a uno de los productos de activación de la caspasa 3.(Fig 37). En las células A-427 se observa de manera intensa la banda correspondiente a la caspasa 3 activa cuando las células fueron expuestas unicamente al disolvente y cuando las células fueron expuestas a la 7-hidroxicumarina se observa una ligera disminución en la banda correspondiente a la procaspasa 3 (Fig 37) y no logra observarse la banda de activación de la caspasa 3. (Fig 36)



**Figura 36.** Efecto de la exposición durante 24 horas de las líneas celulares a la 7-hidroxicumarina sobre la activación de la caspasa 3. Se observa claramente en las células A-549 expuestas a el fármaco, el desdoblamiento de la proteína de 32 kDa (atenuación de la banda) y la aparición de una banda de 12 kDa (activación de la caspasa 3). En el caso de las células A-427 expuestas a etanol, se observa este desdoblamiento, este hecho coincide con los cambios morfológicos de apoptosis, que presenta esta línea celular por la exposición a etanol.



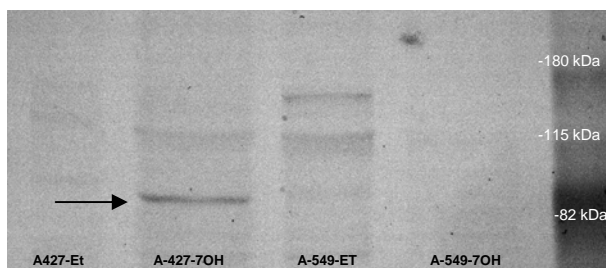


**Figura 37.** Cuantificación densitométrica de la expresión de la procaspasa 3 y de la caspasa 3 activa obtenida del inmunoblot anti-caspasa 3 (Fig 36) donde se observa en las células A-549 la relación entre la disminución de la procaspasa 3 y el incremento de la caspasa-3 activa y en las células A-427 la expresión de la proteína activa e inactiva es muy similar cuando es tratada con el disolvente e inexistente el producto activo cuando se trata con la 7-hidroxicumarina.

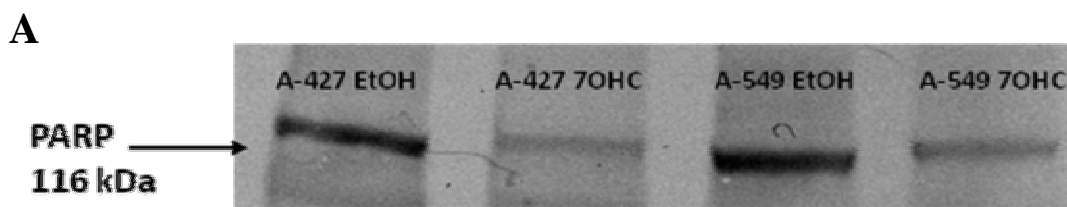
#### 6.4.3 DETECCION DE PARP

Uno de los sustratos de la caspasa 3 durante la apoptosis es PARP (poli adenosin ribosa difosfato polimerasa), una enzima involucrada en la reparación del ADN y por lo tanto la integridad del genoma. La ruptura proteolítica de PARP por caspasa 3, deriva en un cambio en su patrón electroforético de una banda de 116 kDa a una de 85 kDa, la cual identificamos con un anticuerpo anti-PARP. Asimismo, la degradación de PARP fue utilizada como un indicador de la activación de caspasa 3 en respuesta a la exposición de células A-549 y A-427 con 7-hidroxicumarina.

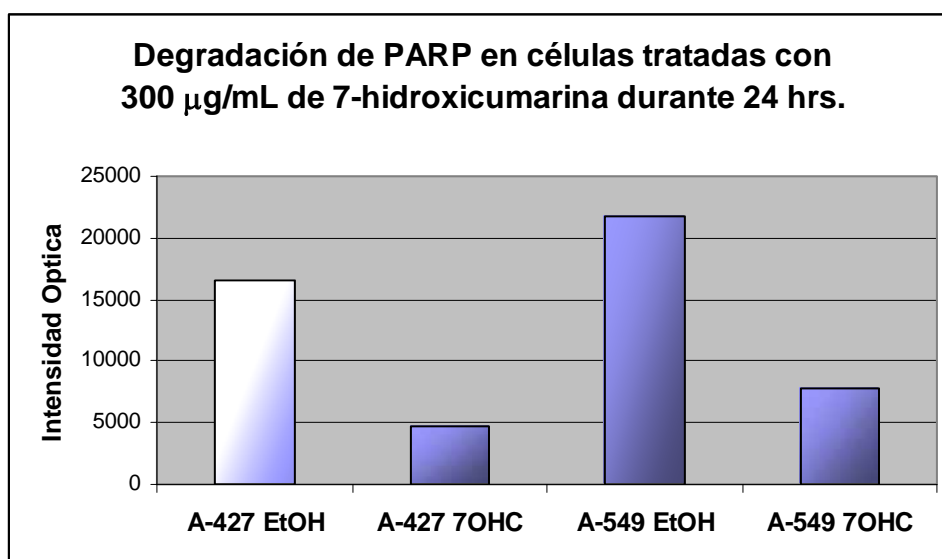
Posterior a la inducción de apoptosis con 300 µg/mL de 7-hidroxicumarina se observó en los inmunoblots de las células A-427 la banda correspondiente a PARP y más intensa la correspondiente al producto de degradación de PARP. En los lisados de las células A-549, se observó la banda correspondiente a PARP y no se observó la banda correspondiente al producto de degradación de PARP.



**Figura 38.** Efecto de la caspasa 3 activa sobre su sustrato PARP, evidenciada por la ruptura proteolítica de la proteína de 118 kDa y la aparición de una banda en 85 kDa marcada con una flecha. Concentraciones iguales de proteína de lisados de células A-427 y A-549 expuestas a 300  $\mu\text{g/mL}$  de 7-hidroxycumarina durante 24 horas y analizadas por SDS-PAGE (17%) y subsecuentemente realizados los inmunoblots con anticuerpos anti-caspasa 3.



**B**



**Figura 38.-**Efecto de la caspasa 3 sobre el sustrato PARP, evidenciada por la degradación de PARP. (A) Se observa la disminución de la intensidad de las bandas (118 kDa) en ambas líneas celulares expuestas a 300  $\mu\text{g/mL}$  de la 7-hidroxycumarina durante 24 horas. (B) Cuantificación densitométrica de la inmunodetección de PARP, donde se observa una disminución en la detección de PARP en los lisados de células expuestas a la 7-hidroxycumarina respecto a las células expuestas sólo al disolvente.

## 7. DISCUSIÓN

Zlabinger *et al.*,(1994), utilizando cumarina marcada radioactivamente ( $^{14}\text{C}$ ) y monocitos humanos, en ensayos de binding, mediante análisis de Scatchard, demostró, la presencia de sitios de unión para cumarina, en número relativamente alto ( $7.5 \times 10^8$  /célula), pero cuya afinidad era baja ( $K \approx 2 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ ). Ensayos de inhibición con 7-hidroxicumarina revelaron que una concentración molar cuatro veces mayor de este compuesto fueron necesarios para desplazar el 50% de la cumarina de su sitio de unión, mientras que la cumarina no marcada radioactivamente, no cambió las propiedades de unión a estos sitios. Estos resultados indicaron que la unión de la cumarina a las células esta caracterizada por sitios de alta capacidad, y de baja afinidad y que al parecer, existen sitios de unión para la 7-hidroxicumarina, distintos a los de la cumarina, porque la 7-OHC, no desplazó importantemente a la cumarina. Además determinó la existencia de sitios de unión para la cumarina en células mononucleares humanas.

Se ha descrito que algunas proteínas cinasas juegan un papel clave en el control de la proliferación celular y que se encuentran activadas en mayor grado en las células tumorales (p. ej. la vía PI3K/Akt que contribuye a la resistencia a la apoptosis) (Shulze, 2004). También se ha descrito que algunas cumarinas simples inhiben algunas de estas cinasas *in vitro* (cumarina, 7-hidroxicumarina: a la concentración de 200  $\mu\text{M}$ , la cumarina no inhibe EGFR-PTK, PKC, PKA y la 7-hidroxicumarina inhibe en 40.7% la PKA y en 10.5% la PKC; Yang;1999). La dafnetina (7-,8-dihidroxicumarina) inhibe en 99.6%, 99.1 y 98.6 a las cinasas EGFR-PTK, PKC, PKA, respectivamente (Yang;1999). La esculetina (6,7-dihidroxicumarina) a la concentración de 800  $\mu\text{M}$ , altera selectivamente el estado de fosforilación de miembros de la superfamilia de las MAP cinasas ya que produce desfosforilación de la cinasa reguladora de señales extracelulares 1/2 (ERK1/2) e hiperfosforila a la cinasa N-terminal c-Jun (JNK)(Yang *et al.*, 2006). Cuando se pretratan las células con un inhibidor específico de JNK, se reduce la translocación del citocromo *c* de la mitocondria al citosol, que produce la esculetina, pero no es abolida, por lo que aparentemente, esta cumarina emplea otra vía distinta para activar a la caspasa 3 (Yang;2006). Velasco *et al.* (2003) observaron la reducción en la fosforilación de proteínas de 125, 70, 65 y 35 kDa al tratar células del melanoma B-16 con 4-hidroxicumarina (160-500  $\mu\text{M}$ ) y lo cual se relacionó con la desorganización del citoesqueleto de actina. Más recientemente Salinas (2005), describió los blancos de la 4-hidroxicumarina, *in vitro*, en células B16-F10 de

melanoma murino ya que induce alteraciones en la expresión y activación de proteínas que participan en los procesos de adhesión, como paxilina, Rac y Rho.

Finn *et al* (2004), encontró que la dafnetina ó 7-,8-dihidroxicumarina (500  $\mu$ M) activa a la MAP cinasa (p38) en células A-498 (adenocarcinoma renal humano) de manera concentración y tiempo-dependientes, sin embargo no encontró actividad de caspasa-3.

Por lo que, aparentemente los efectos inductores de la apoptosis que observamos en el presente estudio, no guardan relación con los procesos de inhibición de algunas cinasas, descritos para algunas de las cumarinas simples.

En el presente estudio se determinó : **1)** La concentración y el tiempo de ambos fármacos, para inducir cambios morfológicos característicos de apoptosis, en dos líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar humano A-549 y A-427. Las concentraciones que determinamos de estos compuestos, para inducir estos efectos son mayores a las reportadas previamente por López-González *et al* (160  $\mu$ g/mL), así como el tiempo (4-6 horas vs. 12-24 horas). Es posible que esta diferencia se deba a que la metodología empleada por este autor, permite observar estadios tempranos de apoptosis (marcaje mediante anexina V y citometría de flujo), ó también a que los resultados reportados (incremento de la apoptosis por la cumarina de 50% y la 7-OHC lo produjo en 83.3% en la línea A-427), fueron encontrados en las células A-427 únicamente y no en las A-549, en las que en nuestros experimentos, a las 12 horas de exposición, presentaban claramente los cambios característicos de apoptosis, incluido el tratamiento con el disolvente (etanol al 3%).

Sin embargo, Chia-Yih *et al* (2001), describió que la esculetina (6,7-dihidroxicumarina) inhibe la sobrevivencia de las células HL-60 de leucemia promielocítica, de manera concentración-dependiente y tiempo-dependiente, mostrando evidencia de los cambios morfológicos característicos de apoptosis que ocurrieron a las 24 horas de exposición, mediante la observación microscópica, que es la misma metodología que nosotros utilizamos.

**2)** Identificamos los cambios bioquímicos de presencia e incremento de la actividad enzimática de caspasa 3, se observaron principalmente en las células A-549 tratadas con

la 7-hidroxicumarina, a las 24 horas de exposición (40% respecto al control de disolvente), en cantidad menor con la cumarina (25%), el compuesto parental. Esto va en concordancia con lo reportado por Kim *et al* (2005), quien observó el máximo efecto sobre la actividad de la caspasa 3, en las células HL-60 tratadas por 25 horas con escopoletina (6-metoxi, 7-hidroxicumarina). Esta actividad enzimática máxima, se correlacionó muy bien con los cambios morfológicos característicos de apoptosis que realizó de manera simultánea, en las células tratadas, al igual que nosotros.

**3)** También encontramos en cuanto a la expresión incrementada de la proteína apoptótica mitocondrial Bax, observamos un incremento en la expresión de Bax (al exponerlas a la 7-hidroxicumarina durante 24 horas a una concentración de 300 µg/mL), del 25% en las células A-427 y de 48.5% en las células A-549 tratadas con la 7-OHC respecto a su control de disolvente. Elinos *et al* (2005), reportó un incremento en la expresión de Bax, de solamente 8%, en relación al control de disolvente, luego de tratar a las células A-427 con 160 µg/mL de 7-hidroxicumarina durante 24 horas. Es posible que el efecto observado de manera más intensa, se deba a que empleamos una mayor concentración del fármaco, nuestros resultados muestran congruencia con los reportados por esta autora. Jeong-Yeh *et al* (2006), reportó que el tratamiento de adipocitos 3T3-L1 con esculetina 800 µM, durante 24 horas, incrementó en 2.09, la expresión de Bax, al analizar el índice con la expresión de Bcl-2 al tiempo 0, lo cual también muestra congruencia con nuestros resultados.

**4)** Nosotros encontramos que la expresión disminuida de la proteína antiapoptótica Bcl-2, en las células tratadas con la 7-hidroxicumarina, correlacionan en concentración y tiempo con los cambios descritos en el incremento en la actividad de caspasa 3 y los de la expresión de Bax. Elinos observó una disminución del 51% en la expresión de Bcl-2, cuando trató a las células A-427 durante 24 horas con 160 µg/mL de 7-OHC. Jeong-Yeh observó una disminución en la expresión de esta proteína del 55% al tratar a los adipocitos 3T3-L1, con la esculetina durante 24 horas.

**5)** En relación a la expresión de la procaspasa 3 y su desdoblamiento en la caspasa 3, en las células tratadas con la 7-hidroxicumarina, durante 24 horas, observamos que correlaciona con los demás hallazgos mencionados anteriormente. Eun-Kyung (2005), reportó que en células HL-60, la escopoletina (6-metoxi,-7 hidroxicumarina) activó a la

caspasa 3 al mostrar evidencia que el tratamiento de estas células, producía la escisión de la poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP de 116 kDa) a un producto de 85 kDa.

Se han descrito cambios semejantes a los provocados por la 7-hidroxicumarina con otras cumarinas (esculetina y escopoletina), en otras líneas celulares (HL-60 y adipocitos 3T3-L1), empleando metodologías semejantes a las que empleamos en este estudio, sin embargo, nadie ha descrito el efecto inductor de la apoptosis y dilucidado la vía que utiliza este compuesto (intrínseca ó extrínseca), en células de adenocarcinoma pulmonar humano, como lo hemos hecho nosotros. Con los resultados obtenidos en éste estudio nosotros proponemos que la 7-hidroxicumarina induce apoptosis mediante la vía intrínseca, lo anterior siendo comprobado por la desregulación en proteínas de la familia Bcl-2 que participan en el mantenimiento (Bcl-2) o disrupción (Bax) de la permeabilidad de la membrana externa de la mitocondria y por la activación de la caspasa 3 y la subsecuente degradación de PARP uno de los sustratos de esta caspasa.

Aún cuando ambas líneas celulares son de adenocarcinoma pulmonar, todos los hallazgos son mas notables en la línea celular A-549 que en la A-427. Estas líneas celulares, tienen propiedades de cultivo un poco diferentes p. ej. en cuanto a la adhesión al sustrato (las A-549 son más adherentes que las A-427).

Es muy probable que las células de cáncer pulmonar, no puedan biotransformar a la cumarina, ya que Koskela *et.al* 1999., no pudieron identificar la expresión del gen CYP2A6, mediante primers específicos para el mRNA del citocromo CYP2A6 (familia protéica que biotransforma a la cumarina) y la técnica de RT-PCR en muestras de lesiones tumorales de 9 pacientes, y dado que el citocromo CYP2A6 es el responsable de la biotransformación de la cumarina, lo que observamos es un efecto directo de la 7-hidroxicumarina sobre su(s) blanco(s) molecular(es) y no del compuesto precursor que es la cumarina, ya que este no puede ser biotransformado por las células de adenocarcinoma pulmonar humano, al carecer del gen que codifica para el CYP2A6.

Requerimos estudios adicionales para identificar el ó los blancos moleculares de este efecto inductor de la apoptosis en estas células.

Finalmente, como encontramos participación específica de la caspasa 3, podemos señalar que ambas cumarinas inducen un efecto de apoptosis, no de paraptosis (muerte celular programada independiente de caspasas) (Bröker, 2005) y que la posición del hidroxilo en el carbono 7 de la molécula, le confiere mayor potencia para producir este efecto inductor de la apoptosis, sugiriendo una posible relación estructura-actividad .

## 8.-BIBLIOGRAFIA

Bröker L, Kruyt F, Giaccone G. Cell Death Independent of Caspases: A Review. *Clin Cancer Res* 2005, 11;9:3155-3162

Chia-Yih Chu, Yu-Ying T, Chau-Jong W, Wei-Long I, Tsui-Hwa T. Induction of apoptosis by esculetin in human leukemia cells. *Eur J Pharm* 2001; 416:25-35

Chen M, Wang J. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis* 2002; 7:313-319

Elinos-Baéz CM, León F, Santos E. Efectos of Coumarin and 7-OH Coumarin on bcl-2 and Bax expression in two human cancer cell lung cell lines in vitro. *Cell Biol Int* 2005; 29(8): 703-708.

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

Gallicchio VS, Hulette BC, Harmon C, Marshall ME. Toxicity of coumarin (1,2-benzopyrone) on human peripheral blood mononuclear cells and human and murine bone marrow progenitor stem cells. *J Biol Response Mod* 1989; 8: 116-121

Jeong-Yeh Yang, Della-Fera MA, Baile C. Esculetin induces mitochondria-mediated apoptosis in 3T3-L1 adipocytes. *Apoptosis* 2006; 11: 1371-1378

Castro-Obregon S, Conarrubias-Robles LF. Muerte Celular Programada En: Jiménez LF, Merchant H. *Biología Celular y Molecular*. 1ª ed. Prentice Hall. 2003; 617-657.

Jiménez-Orozco FA, López -González JS, Nieto-Rodriguez A, Velasco-Velázquez MA, Molina-Guarneros JA, Mendoza-Patiño N, García-Mondragon MJ, Elizalde-Galván P, León-Cedeño F, Mandoki JJ. Decrease of cyclin D1 in the human lung adenocarcinoma cell line A-427 by 7-hydroxycoumarin. *Lung Cancer* 2001; 34:185-194

Johnson DH, Blanke CD: Small cell lung cancer: diagnosis, treatment, and natural history, IN: Fishman AP (ed): *Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders*, vol 2. New York, International Edition Mc Graw Hill, 1998: 1819-1831.

Kawaii S, Tomono Y, Ogawa K, Sugiura M, Yano M, Yoshizawa Y. The antiproliferative effect of coumarins on several cancer cell lines. *Anticancer Res* 2001;21;917-924.

Keating G, O'Kennedy R. The chemistry and occurrence of coumarins. In: O'Kennedy R, Thornes RD, editors. *Coumarins Biology, applications and mode of action*. Chichester, John Wiley and Sons Ltd; 1997.pp 23-66

Kim EK, Kwon KB, Shin BC, Seo EA, Lee YR, Kim JS, Park WJ, Park BH, Ryu DG. Scopoletin induces apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by activations of nuclear factor  $\kappa$ B and caspase 3. *Life Sci* 2005; 77 (7):824-836.

Koskela S, Hakkola J, Hukkanen J, Pelkonen O, Sorri M, Saranen A, Anttila Sisko, Fernandez-Salguero P, Gonzalez F, Raunio H. Expression of CYP2A Genes in human liver and extrahepatic tissues. *Biochem Pharmacol* 1999. 57: 1407-1413.

Lacy A, O'Kennedy R. Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. *Curr Pharm Design* 2004; 10:3797-3811.



Lake BG. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity; relevance for human risk assessment. *Food Chem Toxicol.* 1999; 37: 423-453

Litzky LA: The pathology of non-small cell lung carcinoma, in Fishman AP (ed): *Fishmans' Pulmonary diseases and disorders*, vol 2. New York, International Edition Mc Graw Hill, 1998: 1739-1758.

López-González JS, Prado-Garcia H, Aguilar-Cazares D, Molina-Gaurneros JA, Morales-Fuentes J, Mandoki JJ. Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxycoumarin on human lung carcinoma cell lines. *Lung Cancer* 2004; 43: 275-283.

Marshall ME, Kervin K, Benefield C, Umerani A, Albainy-Jenei S, Zhao Q, Khazaeli MB. Growth inhibitory effects of Coumarin (1,2-benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin on human malignant cell lines in vitro. *J. Cancer Res. Clin Oncol* 1994; 120: S3-S10.

Marshall ME, Mohler JL, Edmonds K, Williams B, Butler K, Ryles M, Weiss L, Urban D, Bueschen A, Markiewicz M. An updated review of the clinical development of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7-hidroxicoumarin. *J. Cancer Res. Clin Oncol* 1994; 120: S39-S42

Mayoral-Chavez MA, Zenteno-Galindo E, Mancilla-Espinoza B, Cairo-Martínez S, Fonseca-Guevara J. Perspectiva monográfica del cáncer pulmonar: Un enfoque molecular y la metástasis al cerebro. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 17 (4):283-292

Medina-Morales F, Salazar-Flores M. Frecuencia y patrón cambiante del cáncer pulmonar en México. *Salud Pública Mex* 2000; 42:333-336

Möhler JL, Williams BT, Thompson IM, Marshall ME. Coumarin (1,2-benzopyrone) for the treatment of prostatic carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 1994; 120: S35-S38

Mosmman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferative and cytotoxic assays. *Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.

Murria RD, Mendez J, Brown SA. *The natural coumarins: occurrence, chemistry and biochemistry.* New York: John Wiley and Sons. 1982.

Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA. Identification and inhibition of the ICE/ CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature.* 1995; 376: 37-43

Pelkonen O, Raunio H, Rautio A, Pasanen M, Langvad E. The metabolism of coumarin. In : O'Kennedy R, Thornes RD, editors. *Coumarins Biology, applications and mode of action.* Chichester, John Wiley and Sons Ltd; 1997.pp 67-92

Peter ME, Krammer PH. Mechanism of CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol* 1998; 10:545-551

Roskopf F, Graus J, Franz G. Immunological and antitumor effects of coumarins and some derivatives. *Pharmazie* 1992; 47: 139-142.

Secretaría de Salud. Registro Histopatológico de Neoplasias en México, 1997

Schulze-Bergkamen H, Krammer P.H. Apoptosis in Cancer-Implications for Therapy. *Sem in Oncol* 2004; 31(1): 90-119

Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science.*1995; 267: 1445-1449

Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM. CPP32, a mammalian homologue of CED-3, is a CmrA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly (ADP-ribose) polymerase. *Cell*. 1995; 81:801-809

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

Velasco-Velázquez MA, Agramonte-Hevia J, Barrera D, Jiménez-Orozco A, García Mondragón MJ, Mendoza-Patiño N, Landa A, Mandoki J. 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 letters* 2003;198;179-186.

Walczak H, Sprick MR. Biochemistry and function of the DISC. *Trends Biochem Sci* 2001; 26(7):452-453.

Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechustan A, Xi XG, Youle RJ. Movement of Bax from cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* AÑO 139: 1281-1292.

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

Zacharski LR, Henderson WG, Rickles FR, Forman WB, Cornell CJ, Jackson R, Edwards R, Headley E, Sang-Hee K, O'Donnell JR, O'Dell R, Tornoyos K, Kwaan HC. Effect of warfarin on survival in small cell carcinoma of the lung. *JAMA* 1981;245(8);831-835.

Zlabinger GJ, Nöhammer C, Böhmig GA, Menzel JE. Mode of action of coumarin in immune cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 1994. 120(suppl):S17-S18.