



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

Estudio *in vitro* del efecto de la cumarina y
7OH-cumarina en la expresión del oncogén K-ras y
los genes Bcl-2 y Bax en dos líneas celulares de
cáncer pulmonar humano

Para obtener el grado Académico de Doctora en Ciencias

P R E S E N T A

Carmen Martha Elinos Báez

DIRECTOR DE TESIS:

MÉDICO CIRUJANO JUAN JOSÉ MANDOKI
WEITZNER

México, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A DIOS CON TODA MI FÉ

A mi hija Méd. Neuróloga Luz María Farías Elinos por su valiosa ayuda y apoyo para realizar esta tesis.

A mi hijo Ing. en Cibernética y Sistemas Computacionales, Dr Mario Farías-Elinos por su valiosa ayuda al dirigir la presentación de este proyecto y sus gráficos, y a su esposa Licenciada en Informática y pasante de Maestría en Tecnologías de Información Cristina PérezTrejo.

A mi hija QFB Martha Farías Elinos, a su esposo, Dr Carlos Mauricio Laguna Izquierdo y a mis nietros Mauricio y Martín por el apoyo que me brindaron en todo momento para realizar este trabajo.

A mi esposo por su apoyo y confianza en mi.

AGRADECIMIENTOS

Al Med. Cirujano Juan José Mandoki Weitzner por su valiosa dirección para llevar a cabo esta tesis.

Al Dr Luis Felipe Jiménez García y al Dr Abraham Landa Piedra, cotutores de esta tesis por su apoyo para realizar este proyecto.

Al Dr Edgar Centeno Galindo por que siempre tuvo tiempo para oírme y alentarme en los momentos difíciles al realizar este trabajo.

A la Dra. María Dolores Ramírez González.

Al Dr. Ricardo Lascurain Ledesma.

Al Dr. Luis Manuel Terán Juárez.

Al Dr. Emilio Rojas del Castillo

Por sus comentarios tan acertadas en esta tesis.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. ANTECEDENTES	3
a. Introducción.....	3
b. Agentes cancerígenos.....	4
c. Desarrollo de un cáncer.....	6
d. Susceptibilidad.....	6
e. Predisposición.....	7
f. Metilación.....	7
g. Mutaciones en el ADN.....	8
h. Telómeros.....	8
i. Angiogénesis.....	9
j. Metástasis.....	9
1.1 GENES	11
a. cK-ras.....	11
b. Bcl-2.....	13
c. Bax.....	16
1.2 APOPTOSIS	18
1.3 CASPASAS	19
1.4 CÁNCER DE PULMÓN	20
1.5 CUMARINAS	23
a. Usos de las cumarinas.....	24
b. Estructura de la cumarina.....	25
c. Propiedades físicas y químicas de la cumarina.....	26
d. Metabolismo de la cumarina en humanos.....	26
e. Farmacología de la cumarina.....	28

2. OBJETIVO GENERAL	30
OBJETIVO PARTICULAR	30
3. MATERIALES Y MÉTODOS	31
3.1 Líneas celulares.....	31
3.2 Síntesis de la 7OH-cumarina.....	31
3.3 Determinación de la concentración de las cumarinas.....	32
3.4 Cultivos celulares con cumarinas 1.0 mM	33
3.5 Ensayo colorimétrico del MTT.....	36
3.6 Obtención de los lisados celulares.....	37
3.7 Extracción del ARN y proteínas totales.....	37
3.8 Identificación del oncogén K-ras y de los genes Bcl-2 y Bax y de sus productos génicos.....	40
4. RESULTADOS	44
4.1 Síntesis e identificación de la 7OH-cumarinas por IR y RMN.....	44
4.2 Biotransformación de la cumarina en el humano.....	44
4.3 Concentraciones de la cumarina y 7OH-cumarina.....	45
4.4 Efecto de las cumarinas en los cultivos celulares.....	47
4.5 Ensayo del MTT.....	48
4.6 Expresión del oncogén K-ras y de los genes Bcl-2 y Bax y de sus productos génicos.....	49
5. DISCUSIÓN Y TRABAJO A FUTURO	51
6. CONCLUSIONES	56
APÉNDICE A: FIGURAS	57
APÉNDICE B: REACTIVOS	74

APÉNDICE C: ABREVIATURAS..... 76

REFERENCIAS..... 77

RESUMEN

En la estrategia para combatir el cáncer tiene prioridad el desarrollo de nuevas drogas, tóxicas para las células tumorales y poco agresivas para las células normales. Se han identificado algunos compuestos químicos con estas características llamados cumarinas, los cuales son sintetizados por numerosos vegetales verdes algunos de ellos comestibles. En este trabajo se pretende determinar si la cumarina y la 7OHcumarina inducen *in vitro*, la inhibición de la proliferación en dos líneas celulares de cáncer pulmonar humano: A427 (adenocarcinoma) y Calu-1 (carcinoma epidermoide) y si estas drogas alteran la expresión del oncogén K-ras (inductor de proliferación celular desmedida) y de los genes Bcl-2 (antiapoptótico) y Bax (proapoptótico). Para determinarlo cada línea celular se cultivó durante 24 hrs. en RPMI con etanol 1.5%, v/v (disolvente), cumarina 1 mM o 7OHcumarina 1 mM y células crecidas sólo con RPMI. Se obtuvieron los lisados celulares de cada cultivo para extraer de ellos los ARNs y las proteínas totales y por RT-PCR y Western blot conocer la expresión de los genes y las proteínas en estudio.

Los resultados mostraron expresión abatida de K-ras y Bcl-2 e incremento de Bax en la línea A427 tratada con cumarina y 7OHcumarina. En la línea Calu-1 solamente tratada con 7OHcumarina disminuyó K-ras. Concluimos que la droga 7OHcumarina presenta mayor actividad anticancerígena que la cumarina y la línea A427 es más sensible a estas drogas que Calu-1.

ABSTRACT

In the strategy to combat cancer, development of new drugs toxic for tumor cells and not aggressive for normal cells maintains priority. Some chemical compounds have been identified with these characteristics; these are coumarins and are synthesized by numerous plants. Our purpose was to determine whether coumarin and 7OH-coumarin *in vitro* induced inhibition of the proliferation in two cell lines of human lung cancer, A427 (adenocarcinoma) and Calu-1 (epidermoid carcinoma), and whether this effect altered K-ras, bcl-2 (antiapoptotic) and Bax (proapoptotic) protein and genes expression. To do this, we carried out cultures of both cell lines during 24 h with ethanol 1.5% (v/v) (solvent and control), coumarin 1.0 mM or 7OH-coumarin 1.0 mM. We subsequently obtained cell lysates to extract and to identify the previously mentioned proteins by Western blotting and oncogene and genes with oligonucleotides. Our results showed abatement in K-ras and bcl-2 and increase of Bax protein expression in coumarin- and 7OH-coumarin-treated A427 cell lines. also, the results showed decrease in K-ras oncoprotein expression in the 7OH-coumarin-treated Calu-1 cell line. Additionally, 7OH-coumarin was more potent in inhibition of the proliferation, as observed with methyl-thiazol-diphenyl-tetrazolium (MTT). We concluded that inhibition of the studied oncogene and genes is one of several mechanisms that intervene in tumor abatement induced by these chemical compounds.

1. ANTECEDENTES

a. INTRODUCCIÓN

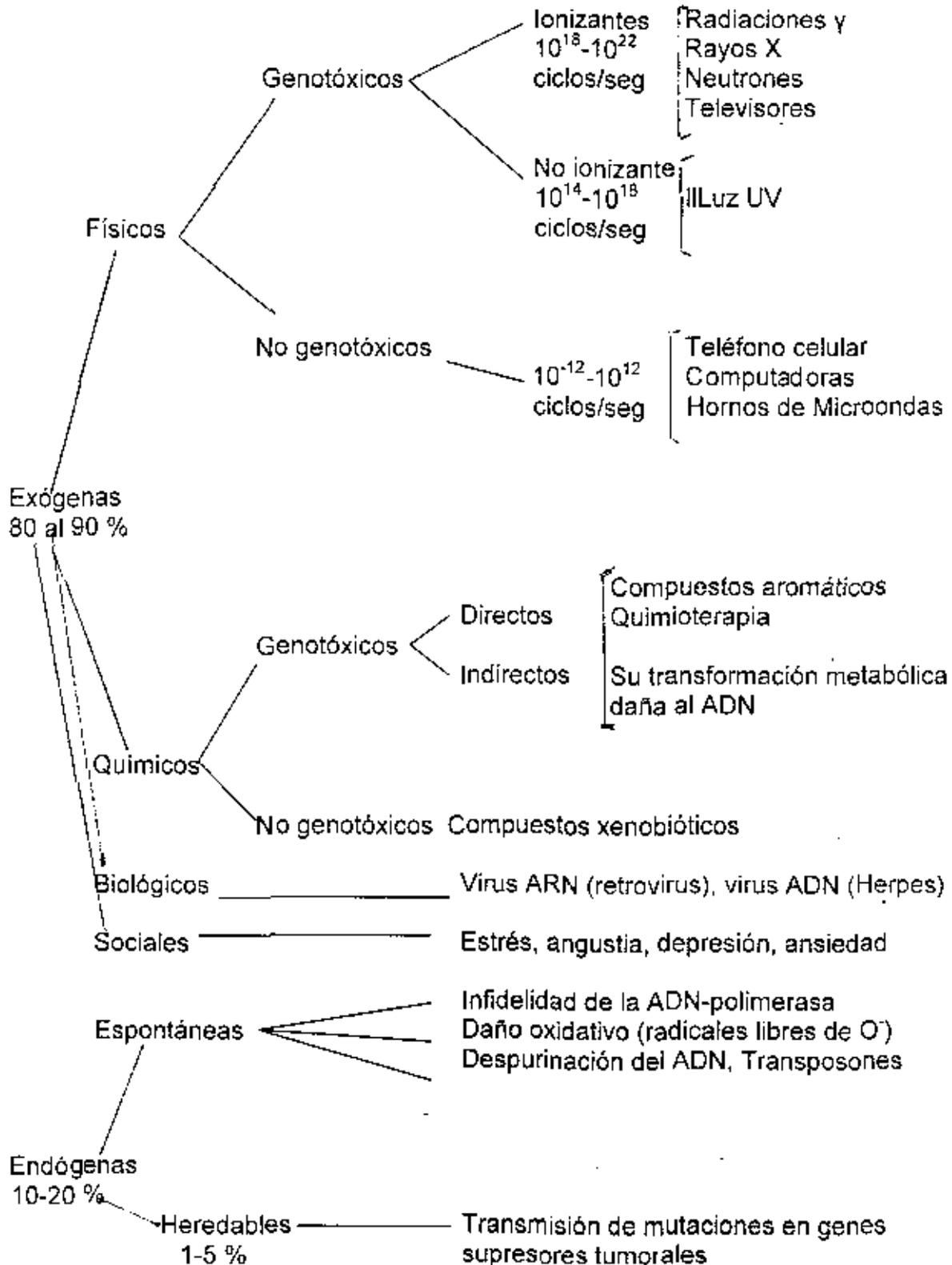
La carcinogénesis es un proceso que se realiza en múltiples etapas, las cuales pueden agruparse en tres: iniciación, promoción y progresión [1]. Se caracteriza por daños genéticos en células que adquieren la capacidad de crecer aceleradamente formando un tumor, como consecuencia de la activación de protooncogenes a oncogenes y/o la inactivación de genes supresores tumorales, además de las alteraciones en el genoma, inducidas por diferentes agentes iniciadores (carcinógenos), **Cuadro 1**. Los agentes iniciadores pueden ser físicos, químicos biológicos y sociales, que inducen errores de replicación o infidelidad de la ADN-polimerasa, logrando alterar a la célula, la cual puede permanecer silenciosa sin dirigirse inmediatamente a la producción de un tumor [2]. Posteriormente se pueden presentar los agentes de promoción, como inflamación, hormonas, promotores específicos, inmunosupresión, que favorecen el daño en el ADN de la célula en etapa inicial, traduciéndose en alteraciones cromosómicas, mutaciones puntuales, modificaciones epigenéticas, dando lugar a la proliferación celular o progresión y todos estos factores a cáncer [3]. El cáncer es una enfermedad conocida desde muchos siglos, ya los egipcios hablaban de este padecimiento [4]. Hace 140 años el microscopista alemán Johannes Müller mostró que el cáncer comprendía la proliferación celular, formación del tumor y la muerte del paciente [4]. Actualmente se sabe que el cáncer es el resultado de un trastorno en los mecanismos regulatorios de la proliferación y diferenciación celular [5, 6]. La célula

maligna tiene la capacidad de proliferar en sitios y tiempos que la célula normal no lo hace porque está sometida a determinados procesos regulatorios que la célula maligna no obedece [7], además se ha observado que la célula tumoral tiene capacidad específica para invadir y destruir tejidos aledaños para su invasión local así como perder moléculas de adhesión célula-célula y de comunicación entre ellas para transformarse en una célula metastásica [8]. La metástasis es la transferencia de células tumorales de un órgano a otro que no está relacionado directamente con él, de esta forma una sola célula maligna o un grupo de ellas puede originar otro tumor a distancia [9]. Por otra parte es capaz de inducir angiogénesis para su nutrición [10].

b. AGENTES CANCERÍGENOS [11, 12]

El cáncer puede comenzar con una población de células con ADN alterado pero silenciosas y activarse por repetidas exposiciones a agentes cancerígenos, [13]. También pueden influir: a) las alteraciones en la respuesta inmune; b) los cambios hormonales asociados con la edad en órganos dependientes del sistema endocrino como en el seno [14] y la próstata; c) los cambios epigenéticos en la región promotora de genes supresores tumorales o de genes que intervienen en la regulación del metabolismo celular; d) las alteraciones en la expresión de un gen, ya sea por deleciones o inserciones cromosómicas; e) también mutaciones puntuales por cambios de un par de nucleótidos y así se tienen mutaciones transicionales, transvercionales, inserciones y deleciones que provocan la sustitución de un solo aminoácido en la cadena polipeptídica codificada, aunque esta proteína defectuosa puede seguir siendo funcional [15].

Cuadro 1. Las causas que originan células cancerosas pueden ser:



c. DESARROLLO DE UN CÁNCER

Es ampliamente aceptado que el desarrollo del tumor es el resultado de la acumulación de alteraciones genéticas que culminan con la conversión metastásica, en una serie compleja con expresión baja de las proteínas de matriz y de moléculas de adhesión célula-célula. La célula tumoral difiere de la célula normal en el sentido de que la tumoral no obedece a los mecanismos que controlan el crecimiento y al mismo tiempo presenta capacidad metastásica, lo que involucra muy diversos factores, siendo unos obedecidos por algunas células tumorales y otros por distintos tumores, posiblemente debido a la variabilidad biológica [16]. Dado lo anterior se pueden clasificar los tumores en tres grupos: 1) tumor benigno: el cual se encapsula como un mecanismo de defensa que puede realizar el organismo para aislar a las células comprometidas. Este tumor es incapaz de producir células metastásicas. 2) tumor *in situ*: usualmente se desarrolla en el epitelio y no invade la membrana basal, algunos autores lo consideran una displasia (irregularidad epitelial) aunque puede preceder a un cáncer *in situ*. 3) tumor maligno: un cáncer totalmente desarrollado de dimensiones pequeñas con capacidad metastásica [17].

d. SUSCEPTIBILIDAD

La susceptibilidad al cáncer esta determinada por eventos genéticos de herencia mendeliana y eventos epigenéticos heredados no mendelianos [18].

e. PREDISPOSICIÓN

La predisposición es favorecida por la presencia del polimorfismo y las impresiones genómicas que se han identificado en protooncogenes y genes supresores tumorales como: APC, BRCA1, BRCA2, DCC, p16/MLM/MTS, p53, RB, VHL [19, 20], debido a cambios epigenéticos en la regulación de la expresión de un gen no parental [21]. Se sabe que ambos padres contribuyen en la genética de su progenie, con excepción del cromosoma sexual y el ADN mitocondrial. La mayoría de los genes se expresan bialélicamente, pero por modificaciones epigenéticas específicas de gameto se originan genes autosomales monoalélicos en células somáticas y de esta forma se elimina uno de los alelos [22, 23, 24]. Por ejemplo, p53 pierde la heterocigosidad (LOH) inactivándose y suprimiendo su capacidad supresora tumoral.

f. METILACIÓN

La metilación anormal es otro evento epigenético [25], ocasionado por hipermetilación en secuencias CpG y es crítica en las impresiones genómicas. La 5-metil-citosina tiene un efecto fuerte en las regiones promotoras de los mamíferos, sugiriendo que la metilación anormal del ADN inhibe la transcripción, porque reduce la afinidad de unión de los factores de transcripción específicos de secuencia [26]. El incremento en la metilación de las secuencias CpG que se presentan en células cancerígenas se puede atribuir a la desregulación de la metiltransferasa [27], con alta actividad de novo, aunque no se sabe si esto último causa inactivación del gen o si refuerza la inactivación inducida por otros mecanismos, por lo que la metilación anormal en CpG de los promotores pueden silenciar a genes; lo mismo se presenta con

hipometilación, como sucede en las áreas pericentroméricas que son metiladas en la heterocromatina constitutiva —la pérdida de la metilación pericentromérica es una anomalía de inestabilidad fasial centromérica inmunodeficiente— y en otros tipos de cáncer humano.

g. MUTACIONES EN EL ADN

Las alteraciones genéticas pueden ser por mutación puntual en los protooncogenes y genes supresores tumorales, ya sea por transición o transversión, por desórdenes endógenos como desaminación de la citosina o la 5-metil-citosina [28], despurinación [29, 30], hipometilación [31, 32], hipermetilación [33], daño oxidativo por la presencia de radicales libres de oxígeno [12] o por deleciones o inserciones cromosomales siendo la pérdida de alelos más frecuente en los cromosomas 3p, 5q, 8p, 9p, 11p, 13q, 17p, convirtiendo a los protooncogenes en oncogenes y desactivando a los genes supresores tumorales.

h. TELÓMEROS

En las células cancerosas se encuentran los telómeros más largos (casi como los que se encuentran en las células germinales). Los telómeros son elementos genéticos localizados al final de los brazos de los cromosomas eucariotes; consisten de secuencias cortas repetidas al azar de ADN, estabilizando al cromosoma vía la telomerasa y evitando así su degradación. En la célula cancerosa, por el contrario, los telómeros se encuentran más grandes y la enzima telomerasa activa, lo que probablemente contribuye a la habilidad de la célula a dividirse indefinidamente en el tumor maligno [34]. La

mayoría de las células normales no expresan la enzima telomerasa activa en cantidades detectables pero sí se encuentra en las células germinales, en las células epiteliales del cordón umbilical, anormalmente en las células tumorales y en las células senescentes [35-37]. Las alteraciones en los telómeros inducen la inestabilidad genómica [38]. La inhibición de esta enzima podría utilizarse en terapias de cáncer.

i. ANGIOGÉNESIS.

Un tumor maligno de 2 mm de diámetro presenta requerimientos nutrimentales que no pueden ser suministrados por procesos de difusión y requiere de capilares sanguíneos que le proporcionen los nutrimentos necesarios. Los capilares sanguíneos se derivan normalmente de los ya existentes, por lo que a este proceso se le llama neovascularización o angiogénesis, el cual se activa a través de péptidos angiogénicos que estimulan la motilidad y la proliferación de las células endoteliales [39]. Los péptidos angiogénicos pueden ser sintetizados y liberados por las mismas células tumorales incluyendo el *factor de crecimiento endotelial vascular* (VEGF) y el *factor- α de crecimiento transformante* (TGF- α) [40]. Tomando en cuenta lo anterior, podría bloquearse la síntesis de los péptidos angiogénicos en las terapias de cáncer.

j. METÁSTASIS

En la diseminación de las células tumorales (células metastásicas) se ha observado reducción de las moléculas de adhesión celular (CAMs) [41]. La célula metastásica presenta modificaciones en la adhesión

celular y se transporta vía linfática [4] y sanguínea [42], sin embargo la presencia de la célula neoplásica en la sangre no constituye metástasis, ya que muchas de ellas mueren debido al control proporcionado por la respuesta inmune del hospedero como citocinas, macrófagos, linfocitos T CD4+, CD8+, células NK, plaquetas, y también por la turbulencia del torrente sanguíneo. Todos estos factores forman parte de la hostilidad que va a encontrar la célula metastásica en su trayecto [43], pero el enfermo se encuentra inmunocomprometido, lo que favorece su diseminación metastásica. La célula tumoral no se adhiere a las paredes de los grandes vasos por el flujo sanguíneo, sin embargo este flujo la lleva hasta los capilares donde tiene que atravesarlos por un proceso activo, salir de ellos y exponerse a membranas basales adecuadas. Ahí puede utilizar la liberación de citocinas que incrementan la expresión de una variedad de moléculas de adhesión, localizadas en la superficie de la célula tumoral, para implantarse en el nuevo tejido u órgano.

Así la o las células "iniciadas" sufren cambios en sus caracteres bioquímicos: funcionales y estructurales, resultando en células tumorales con diferente grado de resistencia a las terapias en el mismo tumor, debido a que puede ser de composición policlonal. El tumor puede ser de origen monoclonal, no obstante y debido a las mutaciones a que es sometida cada célula de ese tumor, puede mostrar diferencias en estructura, morfología, rango de crecimiento, cariotipo, comportamiento, invasión y alteraciones en la expresión de moléculas de adhesión para formar células metastásicas. Éstas pueden tener características que difieren de la mayoría de las células de ese mismo tumor. Su variabilidad puede ser generada por

mecanismos epigenéticos dando lugar a la diversidad fenotípica y al concepto de heterogeneidad [44, 45], favorecidos por las alteraciones y pérdida de alelos en genes supresores tumorales y mutaciones en los protooncogenes para convertirse en oncogenes.

1.1 ONCOGÉN K-ras Y GENES Bcl-2 Y Bax

Los genes que se comportan como protooncogenes, al ser inapropiadamente activados, producen una mutación en su secuencia de nucleótidos o una delección en sus cromosomas, alterando la traducción del mensaje genético y rompiendo el equilibrio del metabolismo celular por inactivación de genes supresores tumorales y activación de oncogenes [46], ya sea por causas exógenas (80-90%) o endógenas (10-20%). Los genes de células de vertebrados superiores, muy conservados en la evolución y sin actividad neoplásica, se les nombró protooncogenes por su similitud con los oncogenes virales. También se observó que sus productos génicos tienen funciones importantes en la regulación del metabolismo celular y son heredables porque forman parte del genoma celular. Los protooncogenes celulares participan en forma ordenada y controlada en la diferenciación, proliferación y metabolismo celular. En esta tesis se determinó la expresión del oncogén K-ras y los genes bcl-2 y Bax.

a. ONCOGÉN cK-ras.

El oncogén cK-ras pertenece a la gran familia Ras en humanos, de los cuales se conocen H-ras (descubierto su homólogo en virus por Harvey), K-ras4A y K-ras4B (descubierto por Kirsten) y N-ras, aislado de neuronas. K-ras se localiza en el cromosoma 12, N-ras en el

cromosoma 1 y el H-ras en cromosoma 11 [47, 48]. Todos ellos tienen el mismo nombre que sus correspondientes homólogos virales y constan de 4 exones con baja semejanza en su secuencia, sin embargo, codifican para una proteína altamente homóloga de 21 kDa llamada p21 ras. En el citosol se traduce ras como precursor sin actividad, de ahí se transloca a la cara citoplásmica de la membrana celular donde actúa como protooncoproteína (p21 ras), interviniendo en el metabolismo de la célula normal y controlando la proliferación y diferenciación a través de su actividad de GTPasa (Guanosina trifosfatasa). Al unirse a GTP actúa en forma activa (GTP-ras), induciendo proliferación celular, pero al hidrolizarse GTP se obtiene la forma inactiva unida a GDP (GDP-ras), que impide la proliferación celular por la intervención de la proteína GAP (complejo de 5 proteínas), que estimula la actividad intrínseca de GTPasa de ras. La proteína ras participa en la transducción de señales de la membrana celular al núcleo. En la superficie celular se encuentran diferentes receptores de superficie, si algunos de ellos son reconocidos por su ligando específico, se induce un cambio conformacional del dominio extracelular del receptor. Este cambio se transmite por el dominio transmembrana hasta su dominio citoplásmico, donde se encuentra una serie de proteínas tirosina cinasa que se autofosforilan, y fosforilan a GDP-ras a través de GAP para obtener GTP-ras (su forma activa). Por otra parte, sólo así GTP-ras puede fosforilar a Raf-1, una cinasa serina/treonina que se une selectivamente al dominio aminoterminal de GTP-ras. Raf-1 activada fosforila a una proteína cinasa activada por mitógeno (MAPKK), iniciando una cascada de fosfo-transferencia. Activada MAPK (MAPKK) se transloca del

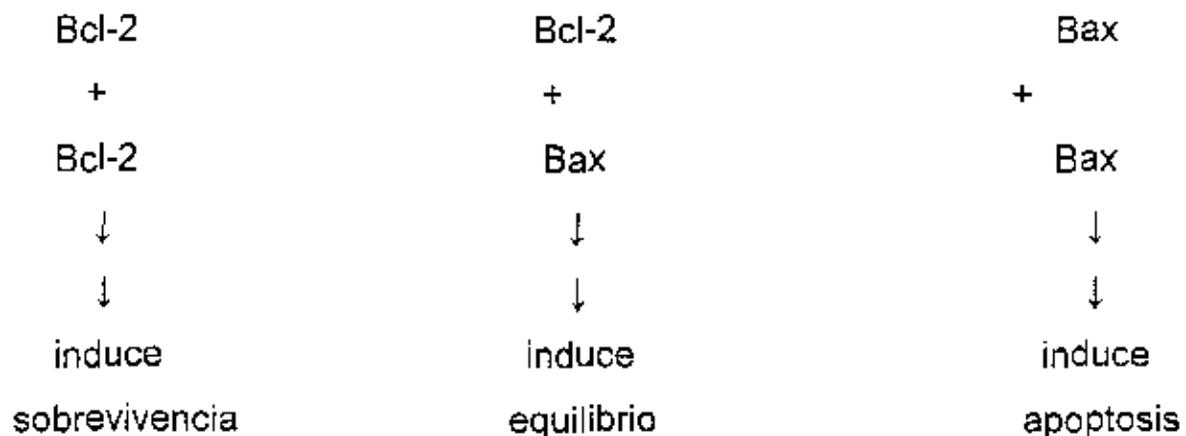
citoplasma al núcleo, para fosforilar y activar a factores de transcripción específicos. Sin embargo, el proto-oncogén K-ras se puede alterar convirtiéndose en oncogén por mutaciones puntuales en los codones 12, 13 y 61 para tener actividad de oncogén, o también puede intervenir la enzima farnesiltransferasa que transfiere un grupo farnecilo a través del C 15 del farnesildifosfato a un residuo de cisteína del C-terminal de ras, confiriéndole hidrofobicidad e impidiendo la hidrólisis de GTP para pasar a GDP por impedimento estérico y por lo tanto, induciendo proliferación celular constante [49, 50]. Se ha observado que inhibiendo a la enzima farnesiltransferasa se bloquea la proliferación celular y esto podría ser útil en la terapia del cáncer cuya proliferación es dependiente de ras [51, 52].

b. GEN Bcl-2.

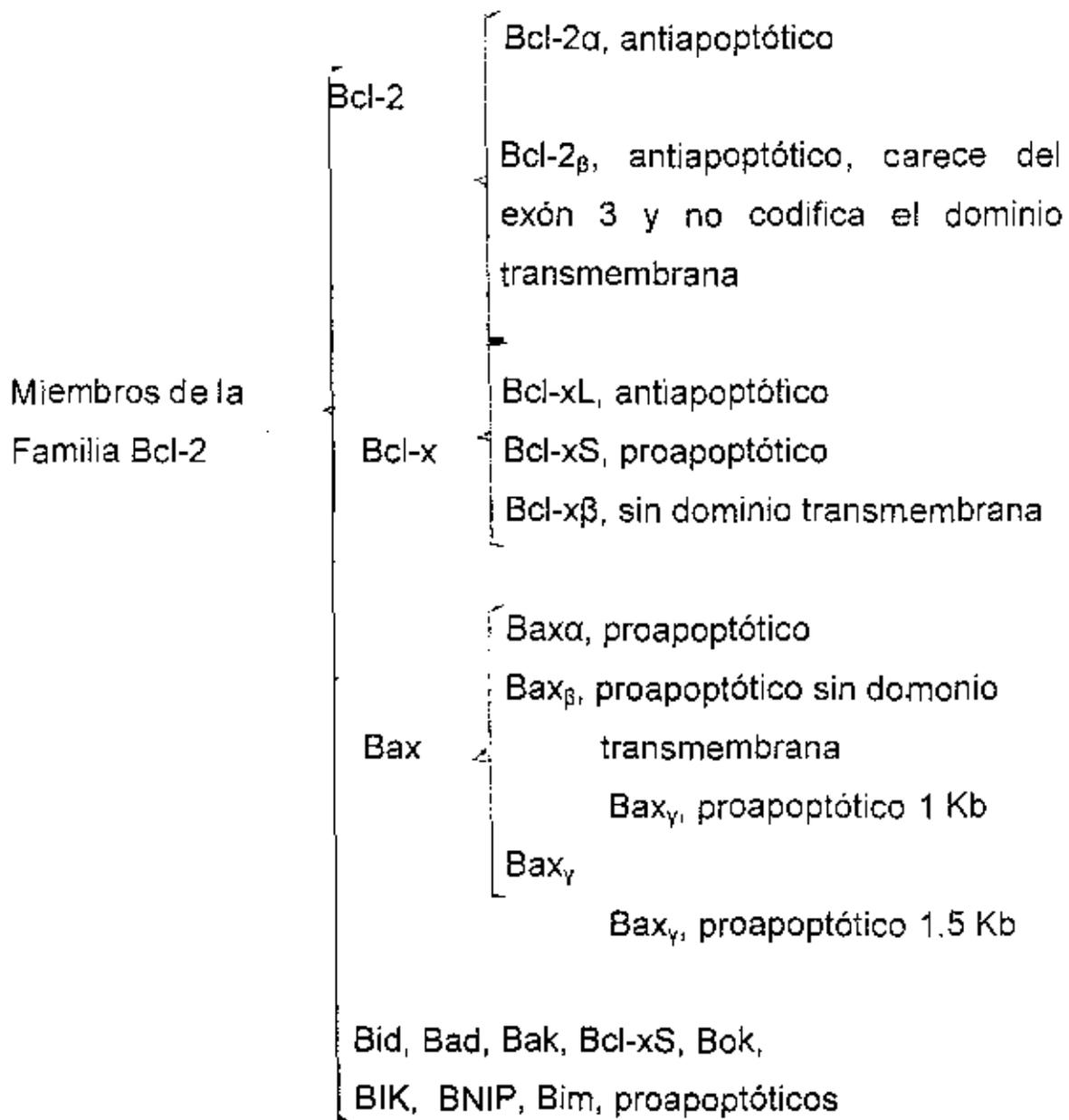
El gen Bcl-2 pertenece a una familia de genes Bcl-2, cuyos productos génicos tienen actividad antiapoptótica y presentan de dos a cuatro secuencias de nucleótidos muy semejantes. Las regiones están separadas en los dominios BH1, BH2 y BH4 [55a], que se encuentran repetidos en los demás miembros de la familia de genes: antiapoptóticos Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, A1, en humanos. En condiciones normales, interviene en el equilibrio de la célula para mantener su homeostasis dependiente de proliferación, diferenciación, emigración, inmigración y muerte celular, siendo esta última necesaria en algunos tejidos, por ejemplo la piel (células epiteliales): para remover células programadas a morir, células indeseables; aunque también se ha observado que Bcl-2 se encuentra incrementada en células de larga vida como los linfocitos en condiciones normales. El pre ARN Bcl-2,

para madurar a ARN mensajero (de Bcl-2), entra en procesos alternativos originándose un corrimiento del marco de lectura con diferentes cortes para dar tres transcritos que se traducen en proteínas con pesos moleculares muy cercanos de 25, 26 y 27 kDa y son reconocidos por el mismo anticuerpo monoclonal. Los miembros de la familia Bcl-2 que tienen una región carboxilo Terminal hidrofóbica pueden anclarse en las membranas: nuclear, citoplásmica y mitocondrial, dejando libre en el citoplasma a la región amino-terminal. La proteína Bcl-2 tiene actividad antioxidante por lo que se encuentra incrementada en los sitios con radicales libres de oxígeno liberados de mitocondria, evitando la oxidación de los lípidos de membrana y la muerte [57-61].

La familia de genes Bcl-2 interviene en la regulación de la sobrevivencia y muerte celular, el destino que se le da a la célula va a depender de diversos factores que induzcan una mayor o menor concentración de cada uno de ellos, facilitando la formación de dímeros: Bcl-2-Bcl-2, que induce a la sobrevivencia; bcl-2-Bax, que se considera en equilibrio y Bax-Bax, que conduce a la muerte celular [55a].



Cuadro 2. Clasificación de la familia Bcl-2



La formación de dímeros se realiza a través de los dominios BH1 o BH2 por lo que las mutaciones en estos dominios pueden impedirlo y por ello, también, inhibir su actividad [55, 56]. Se ha observado que Bcl-2 tiene habilidad para modular el tráfico, en forma selectiva a través de la transmembrana mitocondrial impidiendo la liberación del

citocromo c y por esta vía puede inhibir la activación de las caspasas inductoras de la muerte celular. El gen Bcl-2 puede sufrir translocación cromosomal por yuxtaposición con un *locus* de la cadena pesada de las inmunoglobulinas, pasando del cromosoma 18q21 (del gen Bcl-2) al 14q32 (de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas), obteniéndose t(14:18) con el resultado de la activación del oncogén Bcl-2 [54].

c. GEN Bax.

El gen Bax pertenece a la gran familia Bcl-2 de genes proapoptóticos: Bax, Bad, Bid, Bak, Bok, Bim, Bcl-xS, BIK, BNIP [55]. El gen Bax tiene 6 exones y por procesamientos alternativos en la maduración del pre-ARN mensajero se recorre el marco de lectura, obteniéndose sitios de corte diferentes y como resultado, transcritos de distinto tamaño que se traducen en un complejo de proteínas que comprende: una proteína de 21 kDa de membrana nuclear y mitocondrial llamada Bax- α y dos proteínas citosólicas llamadas Bax- β y Bax- γ . Estas proteínas presentan homología con Bcl-2 en los dominios altamente conservados BH1 y BH2 *in vivo*. La sobreexpresión de Bax favorece la formación de homodímeros y acelera la apoptosis [55]. Otros estudios sugieren que el gen Bax tiene un papel supresor en la carcinogénesis en una vía dependiente de p53, porque tiene una secuencia de reconocimiento para p53, aunque también puede activarse por otra vía independiente de p53 [62]. Bax al translocarse a la membrana externa mitocondrial forma canales iónicos dependientes de pH y voltaje, alterando el potencial mitocondrial transmembrana (ψ) por la bomba protónica $F_0 F_1$ -ATPasa y liberando citocromo c, el cual se une a Apaf-

1 y ATP para activar a caspasa 9 en el citoplasma; al mismo tiempo, la liberación del citocromo c induce una deficiencia en el acoplamiento de la cadena de transporte de electrones al O₂ y estos electrones incrementan la producción de superóxidos y peróxidos de hidrógeno. Todo esto lleva a la iniciación de una vía de señalización apoptótica dependiente de mitocondria [63].

***Gen supresor tumoral**

El gen supresor tumoral p53 codifica para una proteína p53, que nativa y activada, puede evitar el inicio de la replicación de una célula maligna [64]. Interviene en muchas funciones siendo la más importante su actividad transcripcional con su propio gen y otros genes. La proteína p53 consiste de cuatro dominios: un dominio de transactivación en la región amino-terminal; un dominio de unión a ADN donde se realiza el mayor número de mutaciones; un dominio de tetramerización y un dominio regulatorio carboxilo-terminal. Un *tetrámero de la molécula p53 se ensambla a través del dominio de oligomerización* facilitando al dominio amino-terminal interactuar con los factores de transcripción e incrementar la expresión del gen. [64]. P53 puede reprimir la expresión de otros genes por regulación negativa en virtud de la función represora para Bcl-2 y survivina. La proteína survivina inhibe la apoptosis porque bloquea la activación de las caspasas-3 y -7 [65]. Al dañarse el ADN, p53 realiza la transcripción de diversas moléculas entre las que se encuentran una batería de genes llamada p21 (Waf1/cip1/MCL-1) que codifica para un inhibidor de cinasas dependientes de ciclina reprimiendo el ciclo celular en la fase G₁, [66]. La proteína p53 nativa es de corta vida y en

la célula normal se mantiene en bajos niveles por ubiquitinación y su regulador negativo es la proteína Hdm2. La transcripción del gen Hdm2 es fuertemente activada por p53 [67]. La célula tumoral con p53 inactivado presenta resistencia a las drogas citotóxicas, probablemente debido a que no funciona el punto de referencia en G1/S, lo que reduce la sensibilidad a la apoptosis [68].

1.2 APOPTOSIS

La muerte celular programada o mecanismos de apoptosis [69] que se refieren a los cambios morfológicos que se pueden presentar en la célula y que culminan con su muerte [70, 71]. Este proceso tiene un papel importante en la homeostasis de un tejido. Se puede presentar la apoptosis en la embriogénesis, en células sujetas a recambio, metamorfosis, involución del seno lactante y en células cuyo ADN ha sido dañado por agentes físicos, químicos o biológicos [72,73]. También en las células tumorales que responden al tratamiento quimioterapéutico [74] se ha observado que, bajo ciertas condiciones, las moléculas de clase I del complejo principal de histocompatibilidad conducen a apoptosis a células B en linfomas humanos [75]. La apoptosis comprende eventos que fundamentalmente difieren de la muerte celular degenerativa o necrosis [76]. Basados en su morfología, bioquímica e incidencia, la apoptosis se puede presentar en una sola célula y no está asociada a inflamación, posiblemente porque los restos (cuerpos apoptóticos, nombre dado por Kerr) son fagocitados inmediatamente por las células aledañas no dando lugar a la inflamación; en cambio, la necrosis abarca un grupo de células para morir y sí va acompañada de inflamación ocasionada por moléculas

quimiotácticas liberadas al romperse la célula y se infiltran en el tejido activando a macrófagos y linfocitos [77]. Existen mecanismos de inicio que deben ser específicos al tipo de daño en la célula y que van a inducir la activación de genes necesarios para inducir a la célula a apoptosis o a necrosis. La apoptosis puede ser inducida por una gran cantidad de factores y así la célula que entra en apoptosis rápidamente se estrecha, pierden sus moléculas que las contactan con la células vecinas y de manera subsecuente se presenta: condensación de la cromatina, empacándose en masas pequeñas en la membrana nuclear; fragmentación del ADN nuclear, cada vez más pequeños de 150 pb y fragmentos oligonucleosomales; degradación de las moléculas clave del citoplasma, formación de vesículas citoplásmicas que incluyen vesículas nucleares, mitocondrias y otros organelos [78], formándose los cuerpos apoptóticos que son fagocitados inmediatamente por las células aledañas y macrófagos [76], posiblemente por moléculas de fosfatidilserina activadoras de la fagocitosis que se acumulan en la superficie celular [79]. Tal parece que todo lo anterior tiene una función protectora para prevenir la transferencia de material genético activo a las células vecinas.

1.3 CASPASAS

Las caspasas pertenecen a una familia de cisteín-proteasas activas, que realizan la degradación de moléculas clave de la célula para culminar en apoptosis, la cual se lleva a cabo al activarse los llamados receptores de muerte de la superficie celular [80]. Cuando los receptores de muerte son reconocidos por ligandos específicos, incluyendo moléculas quimioterapéuticas, entonces se transmite la

señal al citoplasma a través de moléculas llamadas dominios de muerte y se forma el complejo de señalización inductora de muerte o DISC (del inglés: death inducing signaling complex) [81], que permite la activación de las procaspasas a caspasas para realizar su función [81]. Se conocen 10 caspasas que pueden estar reguladas por los productos de los oncogenes de la familia Bcl-2, como bcl-2 y bcl-X (antiapoptótico) [82] y Bax, Bad y Bid (proapoptótico) [83]. Otras proteínas inhibidoras de la apoptosis son las IAPs, que junto con bcl-2 bloquean la actividad de las caspasas [84]. Bax, Bad, Bid Bak favorecen la apoptosis porque forman poros específicos en la mitocondria facilitando la salida del citocromo c [83, 84] para activar, junto con ATP y Apaf-1 a la procaspasa-9 a caspasa-9 iniciadora, que a su vez activa a la caspasa-3 efectora iniciándose la cascada de caspasas inductoras de apoptosis [85].

En el campo de los tumores malignos es necesario conocer las anomalías moleculares, las alteraciones cromosomales y la bioquímica del metabolismo de la célula normal y tumoral para el tratamiento de los tumores cancerígenos.

1.4 CÁNCER DE PULMÓN

El cáncer pulmonar es una neoplasia que se desarrolla en las células basales totipotenciales del epitelio bronquial, es la respuesta de la célula pulmonar a la exposición prolongada a un agente cancerígeno. Los principales factores de riesgo son: el humo del tabaco o de leña en personas activas y pasivas que presenten susceptibilidad y/o predisposición, aunque no necesariamente para desarrollar un tumor maligno [86]; la contaminación atmosférica, muy relacionada con la

actividad del hombre y su progreso, producida por las emanaciones de las industrias y de los motores de combustión; las minas de asbesto y su industrialización; el factor genético; la edad; las infecciones virales (VIH).

El cáncer pulmonar es un problema de salud pública a nivel mundial, como lo demuestran las estadísticas de otros países [87]. Se sabe que en México la 2ª causa de muerte la ocupan los tumores malignos. Esto fue dado a conocer por las estadísticas del Registro Histopatológico de Neoplasias en México (1999-2001) de la Secretaría de Salud [88]. Del total de los casos, los tumores de traquea, bronquios y pulmón ocuparon el 2º lugar en muertes (12.38 %), siendo responsable de 27,310 defunciones registradas en México en ese trienio. Con respecto a la incidencia del cáncer pulmonar por entidad federativa se observó que el centro y norte de la República registraron los más altos porcentajes en comparación con los estados del sur. No es fácil el diagnóstico temprano de la enfermedad porque no se han identificado marcadores bioquímicos con la suficiente sensibilidad, especificidad y facilidad en la obtención de la muestra y cuando se llega a identificar, puede considerarse un hallazgo porque en sus etapas tempranas es prácticamente asintomático. En etapas más avanzadas el 70 % de los casos presenta metástasis a ganglios linfáticos y a distancia; los síntomas que se presentan están de acuerdo con la localización del tumor en el pulmón, ya sea central o periférico [89]. La respuesta a la terapia es pobre, por esta razón se cuestiona si dicha terapia ofrece beneficios reales para el enfermo en el tiempo de sobrevivencia, que puede variar de meses a ocho años con una calidad de vida pobre [90]. Es necesario conocer la biología de la enfermedad y las

anormalidades en la patogenia del cáncer pulmonar [91], que permitan su diagnóstico temprano para aplicar el tratamiento más adecuado, considerando que se carece de un modelo de orden cronológico en la detección de los primeros síntomas, que ayuden a identificar las alteraciones moleculares iniciales. Se sabe que en el cáncer pulmonar se alteran diversos protooncogenes para convertirse en oncogenes y también se presentan mutaciones en genes supresores tumorales, translocaciones cromosomales, polimorfismo [9, 10], cambios epigenéticos [8, 17], activación anormal de la telomerasa, pérdida de alelos, siendo más frecuente en el cromosoma 3p [92], 5q, 8p, 9p [93, 94], 17p [64], favoreciendo el progreso del tumor maligno. De acuerdo con la clasificación de cáncer de pulmón publicada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), se consideran cuatro tipos de cáncer pulmonar más frecuentes: carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide), adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y carcinoma de células pequeñas (células de avena). El porcentaje de respuesta de estos tipos de neoplasias pulmonares a la quimioterapia combinada es muy bajo [90, 95], agravándose el padecimiento por la liberación de células metastásicas [41, 96]. En la patogenia del cáncer pulmonar humano tiene prioridad determinar las anormalidades moleculares para ser consideradas en el desarrollo de nuevos fármacos que sean tóxicos para las células tumorales y poco agresivos para las células normales.

En este proyecto se pretende estudiar el efecto en la expresión de los oncogenes K-ras, Bcl-2 y Bax por la actividad anticancerígena y antimetastásica de unas moléculas de origen vegetal llamadas cumarina y 7OH-cumarina, que se estudian en las dos líneas celulares

de cáncer pulmonar humano más frecuentes en México: A427 (adenocarcinoma) y Calu-1 (carcinoma epidermoide) con una frecuencia de 40.4 % y 38.4% respectivamente y así contribuir a la identificación del mecanismo de acción antineoplásica de estos compuestos químicos en el tratamiento del cáncer pulmonar humano.

1.5 CUMARINAS

En la naturaleza las cumarinas son sintetizadas por más de 800 especies de vegetales verdes de las familias Orquidaceae y Moraceae, a esta última pertenecen: Gramineae, Leguminosae, Rosaceae, Umbelliferae. La cumarina se encuentra en monocotiledóneas y dicotiledóneas en cantidades apreciables, también en aceites esenciales como el aceite de acacia, aceite de lavanda, trébol dulce, en el heno y a ella debe su olor. Puede encontrarse libre o como heterósido tanto en el tronco, tallo, hojas, flores, fruto, semillas, en las plantas de forraje [97]. Se dice que en los vegetales actúa como repelente de insectos e inhibe el crecimiento y la esporulación de hongos. Fue aislada por primera vez por Vogel en 1822 del haba de tonka, *Dipterix odorata*; Guibour la bautizó con el nombre de Cumarina y fue sintetizada por Perkin en 1868. Se encuentra como un complejo brillante, conjugado a azúcares y ácidos. Se han aislado y caracterizado más de 1300 cumarinas, principalmente de plantas verdes [98]. La sintetizan algunos microorganismos del género *Streptomyces* y *Aspergillus*; la novobiocina es un derivado de la cumarina [99].

a. Cuadro 3. USOS DE LAS CUMARINAS**•En la industria**

Cumarina	Industria de alimentos, dulcificante y aditivo. Industria del tabaco como aromatizante y fijador. Perfumería como fijador [100]
Warfarina	Raticida [101]
4-metilumbeliferona	Propiedad fluorescente [102]
3-acetil-4-metil-7-amino cumarina, 7-amino-4-metil cumarina	Marcador fluorescente, dosificador en espectrofotometría de nitrilos [103]
6-metilcumarina	Filtros solares [104]
7-hidroxycumarina	Filtros solares [104]

•En medicina

Cumarina	Disminuye la fragilidad y la permabilidad capilar [105], anticancerígeno y antimetastásico [106], antiinflamatorio [107]
Warfarina	Anticoagulante oral [108]
7-hidroxycumarina	Anticancerígeno y antimetastásico [106]

•En la industria de los alimentos como sazonador en combinación con la vainillina.

•En perfumería tanto por su olor fragante y dulce como fijador, porque aumenta el olor de los aceites esenciales, siendo más utilizada la 3, 4-dihidroxycumarina y 6-metil-cumarina por el El Dispensatory of the United Status Part 1, 25th edn (1955). La 7OH-cumarina se usa en

cremas como protector del sol. Por su aspecto brillante se utiliza en maquillajes y rubores.

- En el electroplatinado, porque reduce la porosidad e incrementa la brillantez de varios depósitos de metales como el níquel.
- En laboratorios químicos la 7OH-cumarina, 7-amino-4-metil-cumarina y la 4-metil-lumbeliferona se utilizan como sustrato de enzimas fluorogénicas. El amino-metil-cumarina-ácido acético se utiliza como etiquetado fluorescente para marcar anticuerpos y lectinas. En el heno se encuentra principalmente 4OH-cumarina, que es un precursor del dicumarol y la warfarina, que es un antagonista de la vitamina K (84). La warfarina es un fármaco usado para prevenir la formación de trombos y es el anticoagulante oral que se prescribe con mayor frecuencia [108].

b. ESTRUCTURA DE LA CUMARINA.

La estructura química de la cumarina muestra estar formada por un anillo bencénico unido a una α -pirona, la cual es un anillo heterocíclico de 6 miembros: un átomo de oxígeno en la posición alfa y 5 átomos de carbono con orbitales sp^2 , es la 1,2-benzopirona y se le puede considerar como la lactona del ácido fenil propenóico o cumarina [99] y el ortohidroxi-fenil-propenóico o 7OH-cumarina. La cumarina tiene hidrógenos sustituibles por otros radicales y así en la naturaleza se encuentran numerosos derivados de la cumarina con diversas propiedades que son utilizadas por diferentes industrias.

c. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LA CUMARINA.

La cumarina tiene un peso molecular de 146,13, su aspecto es de placas pequeñas, brillantes, incoloras, olor agradable característico, con un máximo de absorción en luz UV a 272 nm en cloroformo; soluble en etanol, cloroformo y aceites, parcialmente soluble en agua hirviente [109].

d. METABOLISMO DE LA CUMARINA EN EL HUMANO.

El metabolismo de la cumarina va a depender de la especie que la recibe [110]. La vida media de la cumarina tiene una duración alrededor de hora y media, sea cual fuere la vía de entrada (oral, intravenosa, intramuscular o tópica) [111]. La cumarina al entrar en el organismo humano sufre biotransformación, que se realiza en el hígado interviniendo la isoforma CYP 2A6 del citocromo p450. Esta enzima cataliza la hidroxilación del carbono 7 de la cumarina obteniéndose el metabolito 7OH-cumarina [112], en seguida interviene otra enzima, la glucuroniltransferasa para obtenerse otro metabolito el 7OH-cumaringlucurónido. Estos metabolitos, a través del torrente sanguíneo son transportados a diferentes tejidos y órganos del cuerpo humano donde presenta predilección por células epiteliales, actuando principalmente en piel, riñón, próstata y pulmón; por lo tanto al encontrarse en la sangre se filtra y se elimina por orina y heces fecales [113, 114], donde se monitorea para determinar las concentraciones de los metabolitos eliminados a diferentes tiempos después de su administración [115]. Se han realizado experimentos con humanos sanos [116], para valorar la manifestación de efectos colaterales a concentraciones de 2 a 3 gramos diarios, siendo negativos los

resultados [117, 118]. Se sabe que las cumarinas activan la respuesta inmune celular del enfermo y además, actúan directamente sobre la célula maligna reduciendo el tamaño del tumor; esto refleja las concentraciones relativamente altas de las cumarinas en los experimentos para obtener una respuesta biológica *in vivo* e *in vitro*. Las concentraciones altas de la cumarina en los cultivos va a originar un gradiente de difusión entre el exterior y el interior de la célula estableciendo un manejo de fuerzas que favorecen la entrada de las cumarinas a la célula tumoral, ésta parece estar mediada por estructuras de superficie de composición fosfolipídica, uniéndose en forma inespecífica a receptores de membrana activándolos. Una vez que llega la cumarina a la cara interna de la membrana celular se considera que actúa como un primer mensajero, activando a segundos mensajeros en una forma similar a la transducción de señales inducida por los lipopolisacáridos (LPS). En la célula tumoral hay proliferación celular constante debido a que K-ras pierde su actividad de GTPasa quedando en su forma activa (GTP-ras) constantemente y el complejo GAP no puede hidrolizar a GTP y reducirlo a GDP. En esta vía de transducción de señales se realiza el rompimiento del fosfatidilinositol-4,5-difosfato por la fosfolipasa C- β acoplada a la proteína G (llevándose a cabo este mecanismo tanto en la célula normal como en la tumoral), pero en los cultivos de células tumorales con las drogas aquí estudiadas etiquetadas radiactivamente se ha observado que, al llegar la cumarina a la cara interna de la membrana celular cierra ese circuito operacional porque la cumarina se acopla a la proteína G impidiendo la transducción de señales al núcleo y por lo tanto inhibiendo la proliferación celular [119, 120].

Algunos autores han reportado que la cumarina carece de efectos citotóxicos [121], otros describen efectos citostáticos moderados [122]. También se reportó que la cumarina y la 7OH-cumarina tienen efectos citostáticos reversibles en 14 líneas celulares humanas [123], para lo cual realizaron mediciones cada 48 hrs. durante una semana, empleando concentraciones de 500 µg/ml y se llegó a la conclusión de que el efecto de la cumarina es dependiente de la concentración y del tiempo de exposición. Marshall y colaboradores concluyeron que la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) era de 250 a 300 µg/ml.

e. FARMACOLOGÍA DE LA CUMARINA.

La cumarina y sus derivados tienen propiedades antiinflamatorias no esteroide, antialérgicas, anticoagulantes. Se utilizan en el tratamiento del linfedema, infecciones crónicas, desórdenes del sistema inmune y cáncer. Sus propiedades anticancerígenas se consideran un hallazgo al usar derivados de la cumarina con propiedades anticoagulantes en pacientes que además sufrían de algún tumor maligno, donde se observó una reducción en el tamaño del tumor y en la formación de metástasis [124]. También se vio que la warfarina incrementa la actividad fagocítica de los macrófagos alrededor del tumor y el reclutamiento de polimorfonucleares en esos sitios. Estudios realizados con la 7OH-cumarina mostraron que inhibe la división celular en la fase G₀/G₁ y por lo tanto la proliferación [125]. La terapia con cumarina actúa en dos formas: inhibiendo el crecimiento de algunas células tumorales y estimulando componentes de la respuesta inmune contra el tumor por incrementar la liberación de la interleucina-1 (IL-1) de células mononucleares humanas [126]. Y también por su

interacción con células killer (NK) y en la función de los monocitos [127]. Así la cumarina y la 7OH-cumarina son capaces de inhibir el crecimiento de un número de células tumorales de distinto origen de una manera dependiente de tiempo y concentración por modulación del ciclo celular [128-130], también por inhibición de la poli(ADP-ribosa)-polimerasa [131]. Se ha observado que la cumarina y la 7OH-cumarina inhiben el crecimiento de células tumorales de pulmón. La 7OH-cumarina tiene actividad quimiopreventiva en la hepatocarcinogénesis inducida por la aflatoxina B₁ en ratas, debido a que esta droga incrementa la expresión de enzimas de detoxificación como la aflatoxina B₁-aldehído reductasa, de la glutatión S-transferasa subunidades A5 y P1, de la óxidoreductasa NAD(P)H:quinona [132]. Es necesario conocer los mecanismos y factores que intervienen en tratamientos con agentes farmacológicos, por ejemplo de las cumarinas, que de manera selectiva ataquen a las células malignas y sean poco agresivos para las células normales, así como la identificación de biomarcadores o moléculas específicas en fase temprana para realizar el diagnóstico precoz de esta enfermedad [133].

2. OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia del oncogén K-ras y los genes Bcl-2 y Bax en las líneas celulares A427 y Calu-1, antes y después del tratamiento con las drogas aquí estudiadas, para conocer la respuesta de las células tumorales en lo referente a la expresión de estos genes expuestos a las cumarinas.

OBJETIVO PARTICULAR

Observar por microscopía óptica si se producen cambios morfológicos celulares de las líneas A427 y Calu-1 al ser cultivadas con los compuestos cumarínicos y si estos compuestos inducen inhibición de la proliferación celular y si coinciden con las alteraciones en la expresión de los genes y sus productos génicos aquí estudiados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LINEAS CELULARES

Se utilizaron dos líneas celulares de cáncer pulmonar humano:

Línea celular A427, es un adenocarcinoma, obtenido de la American Type Culture Collection (ATCC Rockville, MD, USA), aislado de un tumor de localización periférica de bronquio segmentado humano.

Línea celular Calu-1, es un carcinoma epidermoide obtenido de ATCC y aislado de un tumor central en bronquio principal.

Como controles positivos se utilizaron: la línea SW480 aislada de colon humano, expresa al oncogén K-ras; la línea celular HeLa aislada de cáncer de cervix humano, expresa al oncogén Bax; bcl-2 es expresado por linfocitos T humanos, aislados de sangre periférica, la cual fue obtenida de persona sana, realizándose una punción venosa del pliegue anterior del brazo. El gen bcl-2 es constitutivo de los linfocitos

3.2 SÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA 7OH-CUMARINA

La 7OH-cumarina fue sintetizada utilizando la reacción de Knoevenagel [134], 2,4-dihidroxibenzaldehído y dietil malonato, seguida por hidrólisis con ácido sulfúrico concentrado y su descarboxilación para obtener un sólido el cual fue cristalizado con una solución acuosa de etanol al 20%, obteniéndose cristales blancos. Esto fue realizado por el grupo de la doctora Elvira Santos y el maestro Fernando León en la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se purificó mediante Cromatografía Líquida de alta Eficiencia (HRLC),

y se caracterizó por espectroscopia, Infrarrojo (IR) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Peso molecular de la cumarina, 146 y de su derivado 7OH-cumarina, 162. **Fig. 1 A**, muestra la estructura química de la cumarina y la 7OH-cumarina. **B**, El espectro de la 7OH-cumarina, las flechas indican los valores de los sitios característicos de la 7OH-cumarina. **C**, determinación del ^{13}C -DMSO y en **D** del protón de 7OH-cumarina ^1H -DMSO, que se realizaron para comprobar pureza de la 7OH-cumarina.

La estructura de la cumarina muestra que pertenece al grupo de las benzo- α -pironas, también se le considera la lactona del ácido orto-hidroxifenil propenoico. Consiste de un anillo bencénico unido a una α -pirona, la cual está formada por un anillo heterocíclico de 6 miembros con un átomo de oxígeno y cinco átomos de carbono con orbitales sp^2 . La molécula tiene hidrógenos que pueden ser sustituidos por diferentes radicales, tanto en forma natural por el vegetal como en forma sintética, los que le confieren distintas propiedades.

3.3 DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE LAS CUMARINAS UTILIZADAS EN ESTA TESIS

Fig. 2. Células viables de las líneas A427 cultivadas en RPMI 1640, suplementado al 10% con suero fetal bovino, incubadas durante 24 hrs. a 37°C, 5% de CO_2 y atmósfera humidificante, con las siguientes condiciones: 2A) células sin tratamiento; 2B) células tratadas con etanol al 1.5% (v/v) (disolvente); células tratadas con cumarina a las siguientes diluciones: 2C) 1.0; 2D) 0.5; 2E) 0.25; 2F) 0.125 mM.

Fig. 3. Células viables de la línea A427 cultivadas en RPMI 1640, suplementado al 10% con suero fetal bovino, incubadas durante 24

hrs. a 37°C, 5% de CO₂ y atmósfera humidificante, con las siguientes condiciones: 3A) células sin tratamiento; 3B) células tratadas con etanol al 1.5% (v/v) (disolvente); células tratadas con 7OH-cumarina a las siguientes diluciones: 3C) 1.0; 3D) 0.5; 3E) 0.25; 3F) 0.125 mM

Fig. 4. Células viables de la línea Calu-1 cultivadas en RPMI 1640, suplementado al 10% con suero fetal bovino, incubadas durante 24 hrs. a 37°C, 5% de CO₂ y atmósfera humidificante, con las siguientes condiciones: 4A) células sin tratamiento; 4B) células tratadas con etanol al 1.5% (v/v) (disolvente); células tratadas con cumarina a las siguientes diluciones: 4C) 1.0; 4D) 0.5; 4E) 0.25; 4F) 0.125 mM.

Fig. 5. Células viables de la línea Calu-1 cultivadas en RPMI 1640, suplementado al 10% con suero fetal bovino, incubadas durante 24 hrs. a 37°C, 5% de CO₂ y atmósfera humidificante, con las siguientes condiciones: 5A) células sin tratamiento; 5B) células tratadas con etanol al 1.5% (v/v) (disolvente); células tratadas con 7OH-cumarina a las siguientes diluciones: 5C) 1.0; 5D) 0.5; 5E) 0.25; 5F) 0.125 mM.

A cada uno de los cultivos realizados se tomó fotografía a 200X de amplificación con una cámara Nikon y un microscopio invertido Nikon (Nikon H-III Power, FDX-35).

3.4 CULTIVOS CELULARES CON CUMARINAS 1.0 mM

Como se demostró en el inciso 3.3 que la dosis tóxica de la cumarina y de la 7OH-cumarina fue de 1.0 mM y con la finalidad de corroborar y comparar estos resultados se realizaron los cultivos de la línea A427, **Fig. 6**, con las siguientes condiciones: 6A) células sin tratamiento; 6B) células tratadas con etanol al 1.5% (v/v) (disolvente); 6C) células tratadas con cumarina 1.0 mM; 6D) células tratadas con 7OH-

cumarina 1.0 mM. Para los cultivos de la línea Calu-1, **Fig. 7**, se utilizaron las siguientes condiciones: 7A) células sin tratamiento; 7B) células tratadas con etanol al 1,5% (v/v) (disolvente); 7C) células tratadas con cumarina 1.0 mM; 7D) células tratadas con 7OH-cumarina 1.0 mM y cultivadas durante 24 hrs., para obtener, de estos cultivos los lisados celulares, de donde se extraerán los ARN y proteínas totales e identificar en ellos los oncogenes por RT-PCR y las oncoproteínas por Western blot que se estudian en este trabajo. Todos estos cultivos se realizaron en la siguiente forma: las líneas celulares se cultivaron en 10 ml de RPMI 1640 (SIGMA-ALDRICH CHEMICAL CO, St Louis MO.9 suplementado al 10 % con suero fetal bovino (Gibco BRL, Life Technologies, Inc. P.O.; Box 6482; 9800 Medical Center Drive, Mariland. USA), se incubaron a 37°C, 5 % de CO₂ y atmósfera humidificante, en botellas para cultivo NUNC de 75 ml (International Corporation. NALGE NUNC. 2000 North Aurora Road Naperville IL 60563 1796. USA), hasta 80-90% de confluencia, se separaron las células del plástico de la botella utilizando 4 ml de tripsina al 0.25 %, se centrifugaron a 3000 rpm y el paquete celular se lavó dos veces con RPMI 1640, se resuspendieron en 5 ml de RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino. Se determinó su viabilidad con azul Tripán y se contaron las células viables en la siguiente forma: 80 µl de RPMI 1640 más 10 µl de azul Tripán y 10 µl de la suspensión homogénea de las células cultivadas, se mezcló muy bien y de esto se midieron 10 µl para colocarlos en la cámara de Neubauer, donde se contaron las cuatro cuadrículas para glóbulos blancos y se promediaron para obtener una cifra la que se multiplicó por 10 y por 10 000 para obtener el número de células tumorales por ml de la

suspensión y determinar qué volumen de la suspensión celular contiene 1×10^7 células viables, que se deben agregar por botella de cultivo NUNC con 10 ml de RPMI 1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino, se incubaron a 37°C y 5 % de CO₂ y atmósfera humidificante durante 3 hrs., en seguida se adicionaron a uno de los cultivos de la línea celular A427 y a uno de los cultivos de Calu-1 el etanol al 1.5% (v/v) (disolvente y control); a otro cultivo, la cumarina (PM 146) a la concentración 1.0 mM o 7OH-cumarina (PM 162) a la concentración de 1.0 mM, disueltas en etanol absoluto y esterilizadas por filtros Millipore de 0.22 µm (Millipore Corporation Bedford, MA 01730) y además una botella de cultivo de A427 y otra con Calu-1 sin tratamiento. Todos estos cultivos fueron incubados durante 24 hrs. con las mismas condiciones ya indicadas. De estos cultivos se tomó fotografía a 200X de amplificación utilizando una cámara Nikon y un microscopio invertido Nikon. Los controles positivos (SW480 y HeLa) se cultivaron de la misma manera pero sin agregar las cumarinas. Los linfocitos se obtuvieron por punción venosa, la cual se trató con heparina (SIGMA CHEMICAL CO. St Louis MO), 10 U/ml de sangre, se diluyó con un volumen igual de RPMI y se estratificaron 8 ml de sangre diluida en 4 ml de Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), centrifugando a 1500 rpm, 10 min., para separar los linfocitos y lavarlos con RPMI. Se ajustaron las cuentas a 2×10^6 células/ml, se obtuvieron los lisados celulares que se utilizaron como control positivo para bcl-2.

3.5 ENSAYO COLORIMÉTRICO DEL MTT

MTT [135]. Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium) (Sigma). Es un ensayo colorimétrico de reducción para medir sobrevivencia y/o proliferación celular. Se utilizó una placa de microtitulación (NUNC), colocando 2×10^4 células/pozo de la línea A427 y otra placa para Calu-1; a cada pozo se le agregaron 100 μ l de RPMI suplementado y se realizó por triplicado, se incubaron a 37 °C, 5% de CO₂, atmósfera humidificante, durante 3 hrs., enseguida se obtuvieron: células sin tratar, células tratadas con etanol al 1,5% (v/v) (disolvente), cumarina 1.0 mM o 7OH-cumarina 1.0 mM, incubándose durante 24 hrs. en atmósfera humidificante, 37 °C y 5% CO₂, enseguida se añadieron 20 μ l/pozo de una solución estéril de MTT (5 mg/ml de PBS). Se incubaron las placas por 4 hrs. en las mismas condiciones anteriores, se eliminó el sobrenadante totalmente y se agregaron 100 μ l/pozo de dimetil sulfóxido (DMSO, SIGMA), agitando la placa por 10 minutos, para disolver los cristales de formazán obtenidos por reducción del MTT debido al metabolismo celular y su absorbencia se midió en un lector de ELISA a 570 nm. Los efectos de las cumarinas dentro de la célula tumoral se explican en las Figuras 8 y 9 [156]. Las pruebas de los MTTs se realizaron por triplicado en tres experimentos separados. Las lecturas obtenidas se sometieron al programa STAT GRAFIC computarizado para determinar los valores de la probabilidad (p) y las diferencias significativas estadísticamente del control (*). El porcentaje de inhibición del crecimiento celular (IC%), se estimó para cada droga después de su incubación por 24 h, **Tabla 1** y **Gráfica 1** y se calculó con la siguiente fórmula:

IC% = [(1-valor de las células tratadas con cumarinas/valor de las células tratadas con disolvente)X100]

3.6 OBTENCIÓN DE LOS LISADOS CELULARES.

Al terminar el tiempo indicado para los cultivos del inciso 3,4 se cosecharon las células y se obtuvieron los lisados celulares para extraer de ellos las proteínas y los ARN totales. Aunque en esta extracción de proteínas no corresponde en tiempo real a los ARNs, si están muy cercanos a estos tiempos porque se extrajeron del mismo cultivo (el ARN obtenido no se ha traducido en proteínas y las proteínas actuales corresponden al ARN del ciclo anterior), pero se realizaron los experimentos con el ARN obtenido para demostrar con los oligonucleótidos específicos, sentido y antisentido, que los oncogenes de K-ras, bcl-2 y Bax sí se expresan en las líneas celulares A427 y Calu-1, antes y después del tratamiento con las drogas y que sus productos génicos son identificados con los anticuerpos monoclonales específicos para cada una de las oncoproteínas. Determinando si los oncogenes y las proteínas alteran su expresión al ser cultivadas las células con las drogas en estudio.

3.7 EXTRACCIÓN DEL ARN Y LAS PROTEÍNAS TOTALES

Extracción: una vez que llegó a término el tiempo de cultivo de las células en la botella NUNC se eliminó el sobrenadante, lavando con PBS estéril para eliminar el resto del medio de cultivo y enseguida se obtuvieron los lisados celulares utilizando el reactivo TRIzol (Life Technologies GIBCO BRL) para extraer el ARN total [136] y las proteínas totales [137], siguiendo el protocolo del fabricante.

Extracción del ARN y determinación de su concentración: se adicionan 3 ml del reactivo TRI_{ZOL} a la botella de cultivo y se mantiene así por 5 min. o hasta que todas las células hallan completado su lisis. Acto seguido se coloca 1 ml/tubo ependorf, se agitan fuertemente en vortex hasta homogenizar todas las partículas en suspensión y se agregan 0.2 ml de cloroformo por ml del reactivo TRI_{ZOL}, se mezcla, se esperan 5 min. y se centrifuga a 12 000 rpm, 10 minutos. Con este procedimiento se obtienen dos capas, se separa la capa superior acuosa e incolora, que lleva el ARN total, colocándola en un tubo ependorf [136, 137], se agrega igual volumen de isopropanol, se mezcla y se mantiene a -20°C, 30 min. Se centrifuga a 12000 rpm y el botón formado se lava con etanol al 70%, se centrifuga a 8000 rpm, se decanta y se deja evaporar el etanol, el ARN se disuelve en 20 µl de agua-DEPC y se guarda a -20°C hasta su uso. La concentración del ARN se midió obteniendo la densidad óptica a 260 nm, se multiplicó por el factor para ARN, que es 40 y se multiplicó por la dilución realizada, obteniéndose µg/µl de ARN. La pureza de los ribosomales de 28 y 18 s de cada ARN total se comprobó en geles de agarosa al 1% en condiciones reductoras, **Fig 11 A**.

Extracción de las proteínas y determinación de su concentración: se utiliza la capa intermedia y la inferior colorida de fenol-cloroformo que se obtuvo después de la extracción del ARN y que ahora lleva ADN y proteínas. El ADN se elimina agregando 300 µl de etanol absoluto por ml de TRI_{ZOL}, se agita y se centrifuga a 8000 rpm, 10 min. El sobrenadante (libre de ADN), se trata con 1.5 ml de isopropanol por cada ml de TRI_{ZOL} que se utilizó inicialmente, esperar 30 min. y centrifugar a 12 000 rpm, 10 min., separar el sobrenadante y el botón,

que lleva las proteínas totales, se lava 3 veces con 3 ml de una solución de clorhidrato de guanidina 0.3 M en etanol al 95 %, y por último un lavado con etanol absoluto, centrifugando cada lavado a 4000 rpm, 5 min. Se secan las proteínas al vacío por 10 min. y se disuelven en SDS al 1 %, guardándolas a -20°C hasta su análisis. La concentración de las proteínas totales se determinó con la técnica de Lowry modificada por Peterson [138]. Ver apéndice B.

Se realiza la curva estándar con albúmina sérica bovina (BCA) 1 mg por ml de agua destilada estéril.

Procedimiento: 10 μl de la muestra de proteína, más 0.1 ml de DOC al 0,15 %, agitar e incubar 10 min., agregar 0.1 ml de TCA al 72 %, mezclar por vortex y centrifugar a 6000 rpm, 15 min., decantar y el botón resuspenderlo en 0.5 ml de agua destilada, añadir 0.2 ml del reactivo A, mezclar e incubar 10 minutos, adicionar 0.1 ml del reactivo B, agitar en vortex, esperar 30 min. y leer en el espectrofotómetro a 750 nm. Se leen la curva estándar y enseguida las muestras de proteínas.

Para saber si las concentraciones de las proteínas se determinaron correctamente, se realizó una electroforesis en geles de acrilamida al 10 % en condiciones reductoras, colocando 30 μl de proteína por pozo y utilizando marcadores de pesos moleculares, 15 μl /pozo (The Bench Mark Prestained Protein Ladder, 10-190 kDa, Accesolab). Al terminar la electroforesis el gel se tiñó con azul Coomassi por una hora y se destiñó con ácido acético al 10 % hasta que se observaron las bandas teñidas en el gel incoloro.

Una vez que se observó que las concentraciones de las proteínas eran correctas se procedió a realizar los Western blots correspondientes para identificar las proteínas de interés.

3.8 IDENTIFICACIÓN DEL ONCOGÉN K-ras Y LOS GENES Bcl-2 y Bax OBTENIDOS POR RTPCR Y DE LAS CORRESPONDIENTES PROTEÍNAS POR Western blot.

Western blotting. Se realizaron electroforesis en geles al 10 % de acrilamida-SDS [139], colocando 30 µg/pozo de proteína de las líneas A427 o Calu-1 cultivadas con las siguientes condiciones: proteínas de línea celular sin tratamiento, tratadas con: etanol al 1.5 %, cumarina 1.0 mM o 7OH-cumarina 1.0 mM. Terminadas las electroforesis los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa optimizadas para proteína (Hybond-C, Amersham Life Technology). Cada membrana se bloqueó con PBS-BSA 3%-Tween-20 al 0.3% durante toda la noche, enseguida se incubó una membrana con el anticuerpo cuya oncoproteína se quiere identificar: utilizando para la proteína K-ras el anticuerpo anti-K-ras, Clona Y 13-259 hecho en rata. Para la oncoproteína bcl-2 el anticuerpo anti-bcl-2, Clona bcl-2-100 hecho en ratón y para la oncoproteína Bax el anticuerpo Clona 2D2 hecho en ratón, (ZIMED Laboratories, Inc. 458 Carlton Court South San Francisco, CA 94080-2012. USA); También se utilizó el anticuerpo anti-β-tubulina 4026, hecho en ratón (SIGMA), que se utilizará como control de carga y para normalizar los valores obtenidos de las proteínas en estudio. Cada anticuerpo fue diluido 1:1000 en PBS-BSA-Tw₂₀, incubado durante 3 hrs. El 2º anticuerpo que se utilizó fue, para K-ras un anticuerpo anti-rata marcado con fosfatasa alcalina y diluido

1:1000 en 20 ml de TBS (buffer-Tris-NaCl) más 100 μ l de Tw₂₀ diluido al 10 %, incubando por una hora. Para bcl-2, Bax y β -tubulina se utilizó un anticuerpo anti-ratón marcado con fosfatasa alcalina y se siguió el mismo procedimiento que para K-ras. El desarrollador de color para cada membrana se realizó disolviendo 0.125 g de nitro-azul de tetrazolio/5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato toluidina (NBT/BCIP) (Roche Diagnostics corporation Roche Molecular Biochemicals. 9115 Hague Road, P.O. Box 50414 Indianapolis IN 46250-0414. USA) en 10 ml de agua desulfada estéril que se vierten sobre la membrana y se mantiene en la oscuridad, observándose cada 5 min. Cuando aparecen las bandas definidas se termina la reacción lavando la membrana con agua destilada. Una vez seca la membrana se tomó fotografía **Fig. 10**. La intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría de banda, con el programa RFLP (Scanalitic version 2.1, 1994. Scanalities, a division of CSPIMA, USA). Las densitometrías de las bandas de K-ras, bcl-2 y Bax se normalizaron con respecto a las densitometrías de las bandas de β -tubulina (valor de 1), **Tabla II**. Se realizaron 3 experimentos por separado y las lecturas normalizadas se sometieron al programa STAT GRAFIC computarizado para determinar los valores de la probabilidad (p) y las diferencias significativas estadísticamente del control (*), **Tabla III**.

Obtención por RT de los cADNs del oncogen K-ras y los genes bcl-2 y Bax y su amplificación por PCR.

RT. [140], se realizó con un μ g de ARN total y 100 pmoles del oligo (dT)₁₅ (Roche Molecular Biochemical), incubándose a 65°C por 10 min., inmediatamente se llevó a 4°C y se agregaron: ditiotreitól (DTT) 10 mM; mezcla de nucleótidos (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) 1.0 Mm,

enzima Transcriptasa Reversa (RT) 50 U, buffer 5X para RT 4 μ l (Roche Molecular Biochemical) y agua bidestilada estéril para un volumen total de 20 μ l; se incubó a 42°C, 50 minutos, enseguida a 30°C, 10 minutos y se guardó a -20°C hasta su análisis.

PCR, se realizó con: 2 μ l del cADN obtenido por RT; mezcla de nucleótidos 0.2 mM; los oligos iniciadores sentido y antisentido 0.4 μ M; ADN polimerasa (Taq) 2.5 U en 20 μ l; buffer 10X para PCR, 2 μ l; Mg Cl₂, 1.5 mM; agua bidestilada estéril para un volumen total de 20 μ l

Los oligonucleótidos iniciadores sentido y anti-sentido de los cADNs en estudio fueron: para K-ras, iniciador sentido 5'ACT GAA TAT AAA CTT GTG GTA GTT GGA CCT3', antisentido 5'CTA TTG TTG GAT CAT ATT CG3', que reconocen un fragmento de 106 pares de bases [141]. Para bcl-2, iniciador sentido 5'ACG ACT TCT CCC GCC GCT ACC 3', antisentido 5'TCT CCC GGT TGACGC TCT CCA3', reconocen un fragmento de 192 pares de bases, [55]. Para Bax, el oligo iniciador sentido 5'ATG GAC GGG TCC GGG GAG3', antisentido 5'TCC AGT TCG TCC CCG AT3', reconoce un fragmento de 210 pares de bases. Para β -tubulina, iniciador sentido 5'AGC CAT ATG TTC TTG GCA3', antisentido 5'AGT TGG CAG TCA ACA TGG TC3', reconoce un fragmento de 420 pares de bases [142], (Custom primer Gibco BRL Life Technologies).

La amplificación se realizó en el termociclador (Gene Amp PCR System 2400. Perkin Elmer), conociendo la TM de los iniciadores sentido y antisentido para cada oncogen: K-ras, TM=64°C; bcl-2, TM=68°C; Bax, TM=60°C; β -tubulina, TM=55°C. Condiciones de temperatura: 95°C, 5 min.; y 30 ciclos de: desnaturalización 95°C/30

seg.; para la alineación 58°C-62°C/30 seg., dependiendo de la TM de cada oncogén; para la elongación, 72°C/30 seg.; al final 72°C/5 min. y enseguida 4°C, para luego guardarlo a -20° C hasta su análisis.

Identificación de los cADNs de K-ras, Bcl-2 y Bax obtenidos por PCR.

Se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 3% en TBE 1X, colocando 8 µl/pozo de cada cADN amplificado; 2 µl/pozo de pesos moleculares (DNA Molecular Weight Marker XIV, 100-1500 bp). El gel se tiñó con bromuro de etidio (1 mg/100 ml de agua bidest.) durante 30 seg. se destiñó con agua destilada por 30 min. y se observó en el transiluminador (DyNA Light Dual Intensity UV Transilluminates, Labnet). Se tomó fotografía con una cámara Polaroid (DS'34 GelCam CAMERA SYSTEM. SIGMA), con película polaroid tipo 667 (Kodak).

Estos resultados solamente identifican al oncogen K-ras (fragmento de 106 pares de bases); los genes bcl-2 (fragmento de 196 pb); y de Bax (fragmento de 210 pb); β-tubulina (fragmento de 420 pb) (control de carga), como se demuestra en la Fig, 11 B. En esta forma se comprueba la existencia del oncogén K-ras y de los genes Bcl-2 y Bax en las dos líneas celulares A427 y Calu-1 antes del tratamiento con la cumarina y la 7OH-cumarina y las alteraciones que se observan en su expresión después del tratamiento con las drogas mencionadas.

4. RESULTADOS

4.1 SÍNTESIS E IDENTIFICACIÓN DE LA 7OH-CUMARINA

La estructura molecular de la cumarina (peso molecular 147) y de la 7OH-cumarina (peso molecular 162) se muestran en la Fig. 1A.

Se caracterizó para demostrar su pureza y su confiabilidad al ser utilizada en este experimento; obteniéndose por IR (infrarrojo) los valores del grupo cetónico 3170, de la doble ligadura 1680, del grupo OH 1603 cm^{-1} , Fig. 1B. Por RMN (resonancia magnética nuclear) se determinó la posición de los H alifáticos por el protón (^1H), ppm, Fig. 1C. Con el ^{13}C se caracterizaron los carbonos alifáticos y los valores de δ (desplazamiento químico), ppm Fig. 1F. Las unidades que caracterizan a este compuesto se dan en ppm.

4.2 BIOTRANSFORMACIÓN DE LA CUMARINA EN EL HUMANO

La cumarina es un constituyente natural y frecuente en plantas. Al ser ingerida por el ser humano sufre una transformación metabólica (en el hígado) a través de una isoforma del citocromo p450, la CYP2A6 que favorece la hidroxilación en la posición 7 de la cumarina, para obtener su principal metabolito la 7OH-cumarina, que es la forma activa que actúa en todo el organismo [112]. Se sabe que las cumarinas intervienen activando la respuesta inmune humoral y también directamente con la célula tumoral inhibiendo su proliferación. Tomando en cuenta su tamaño pequeño y sus grupos funcionales, la cumarina puede adherirse a las estructuras fosfolipídicas de la membrana celular y en forma inespecífica se une a receptores de superficie a los que activa en forma semejante a los lipopolisacaridos (LPS) y entra a la cara interna de la membrana celular [119,120].

donde actúa como primer mensajero activando a segundos mensajeros. En esta vía de transducción de señales al núcleo, se obtiene el fosfatidilinositol-3,4-difosfato el cual es hidrolizado por la fosfolipasa C- β , que es activada por la proteína G, pero en los cultivos con cumarina, la cumarina se une a la proteína G y bloquea la transducción de señales al núcleo inhibiendo la proliferación celular. Esto fue visto por Zänfer y col. en 1997 [130].

4.3 DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LA CUMARINA Y 7OH-CUMARINA UTILIZADAS EN LOS CULTIVOS CELULARES

Cultivos de 24 hrs. de la línea celular A427 con cumarina Fig 2. En 2A se observa que las células sin tratamiento crecen con formas irregulares, turgentes y con prolongaciones a manera de puentes citoplásmicos. En 2B, cultivadas con etanol, las células no presentan cambios morfológicos notorios. En 2C, las células tratadas con cumarina 1.0 mM presentan cambios morfológicos, observándose células esféricas de menor tamaño que las anteriores agrupadas en racimos pequeños. En 2D, los efectos de la cumarina 0.5 mM provocan cambios morfológicos celulares menos intensos que en el inciso anterior. En 2E, la cumarina 0.250 mM disminuye mucho sus efectos sobre los cambios morfológicos de las células. En 2F, la cumarina a 0.125 mM casi no afecta la morfología celular. Es importante hacer notar que los cultivos 2D, 2E y 2F, al eliminar las drogas, para luego incubarlas únicamente con el medio de cultivo, las células se recuperan, principalmente en los cultivos 2E y 2F que requieren menos tiempo para su recuperación.

La Fig. 3 corresponde a la línea A427 cultivada con 7OH-cumarina durante 24 hrs. En 3A se observan células sin tratamiento, con las mismas características de 2A. En 3B, las células son tratadas con etanol 1.5% (v/v) (solvente) y presentan las mismas características de 2B. En 3C, la línea se incubó con 7OH-cumarina 1.0 mM, los cultivos mostraron profundos cambios morfológicos, las células se ven como pequeñas esferas agrupadas en grandes racimos. En 3D, con 7OH-cumarina 0.5 mM las células se ven menos deformadas que en el inciso anterior. En 3E las células se cultivaron con 7OH-cumarina 0.25 mM, las células se observan con ligeros cambios morfológicos con respecto a 3A. En 3F se utilizó 7OH-cumarina 0.125 mM, la droga casi no afecta la morfología de las células. Por otro lado, en los cultivos 3D, 3E y 3F, al eliminar la droga, las células se recuperan y vuelven a proliferar, principalmente 3E y 3F. El cultivo 3D requirió más hrs. para su recuperación

La Fig 4 y la Fig. 5 muestran a la línea celular Calu-1 cultivada con cumarina o 7OH-cumarina respectivamente: en 4A y 5A, células cultivadas sin drogas. En 4B y 5B, células tratadas con etanol 1.5% (v/v) (solvente). En 4C, tratadas con cumarina 1.0 mM; en 5C, tratadas con 7OH-cumarina 1.0 mM. En 4D, tratadas con cumarina 0.5 mM; en 5D tratadas con 7OH-cumarina 0.5 mM. En 4E tratadas con cumarina 0.25 mM; en 5E tratadas con 7OH-cumarina 0.25 mM. En 4F células tratadas con cumarina 0.125 mM; en 5F tratadas con 7OH-cumarina 0.125 mM. En todos estos cultivos se observó que el etanol y las drogas no afectan la morfología de las células de la línea Calu-1: las células crecen muy unidas unas con otras formando un mosaico de células poligonales y adheridas al plástico de la botella de cultivo, pero

si se separan estas células de la botella de cultivo, se lavan y se vuelven a sembrar sin las drogas proliferan nuevamente, excepto en los cultivos 4C y 5C. Con estos experimentos se concluyó que la dosis citotóxica corresponde a 1.0 mM tanto para la cumarina como para la 7OH-cumarina. Estos resultados están de acuerdo con los experimentos realizados por otros investigadores (87, 98, 119, 120).

4.4 EFECTO DE LAS CUMARINAS EN LOS CULTIVOS CELULARES

Tomando en cuenta la dosis citotóxica de las cumarinas (1.0 mM), se realizaron los cultivos de 24 hrs. y se tomó fotografías a 200X de amplificación de la línea celular A427 Fig. 6. Con las siguientes características: en 6A se muestran células sin tratamiento, observándose formas irregulares, turgentes con prolongaciones a manera de puentes citoplásmicos, adheridas al plástico. 6B corresponde a células tratadas con etanol al 1.5% (v/v) (disolvente) en RPMI 1640, presenta células semejantes a las anteriores, sin cambios morfológicos notorios y con viabilidad positiva. 6C muestra, a esta línea celular tratada con cumarina 1.0 mM en la que si se observan cambios morfológicos notorios: las células se ven redondas, cercanas unas a otras y la viabilidad, en varias de ellas es negativa. 6D, de la línea celular tratada con 7OH-cumarina 1.0 mM, muestra células muy deterioradas, redondas de tamaño reducido, formando racimos y con viabilidad negativa en muchas de ellas. La viabilidad fue medida por exclusión con azul Tripano y por MTT.

Las fotografías 200X de amplificación de los cultivos de 24 hrs. de la línea celular Calu-1 Fig, 7; células sin tratamiento se observan en 7A,

las células crecen unidas unas a otras formando un mosaico de células poligonales, adheridas al plástico de la botella de cultivo; este crecimiento también lo presentan las células cultivadas con etanol, **7B**; los cultivos tratados con cumarina 1.0 mM, **7C** y con 7OH-cumarina 1.0 mM **7D**, en ninguno de ellos se observan cambios morfológicos apreciables, debido posiblemente a la morfología de crecimiento propia de la línea celular en los diferentes cultivos, los cuales no pierden su aspecto de mosaico, sin embargo, por exclusión con azul Tripán mostraron varias células viabilidad negativa, siendo mayor el número de células no viables con 7OH-cumarina que con cumarina.

4.5 ENSAYO DEL MTT PARA MEDIR LA INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR INDUCIDA POR LAS CUMARINAS

El abatimiento de la proliferación celular inducida con las cumarinas y medido por el ensayo colorimétrico de reducción del MTT, el cual se realizó por triplicado, mostró resultados similares a los obtenidos por exclusión con azul Trypan. Se sabe que el colorante azul Trypan entra al citoplasma cuando la membrana plasmática ha sido dañada, este teñido detectó 18% de células muertas en los cultivos de A427 con cumarina y 50% con 7OH-cumarina. La línea Calu-1 disminuyó un 25% con cumarina y 37% con 7OH-cumarina. El ensayo de MTT mide la viabilidad celular porque el MTT es reducido por la enzima mitocondrial succinatodeshidrogenasa, es una medida de células vivas e indirectamente de disminución del crecimiento, mostrando una inhibición del 14% en los cultivos de A427 tratada con cumarina y del 54% tratadas con 7OH-cumarina. La línea Calu-1 con cumarina inhibió 22% y con 7OH-cumarina 30%. La evaluación estadística de las

células sin tratamiento, cultivadas con etanol (control) y cultivadas con las drogas se calculó utilizando el análisis de variancia STAT GRAFIC. Se estimó un valor de $***p < 0.001$ y con diferencias significativas estadísticamente del control, para la línea celular A427 tratada con cumarina y 7OH-cumarina. Para la línea Calu-1 se estimó una probabilidad de $*p < 0.1$, con diferencia significativa estadísticamente del control, al ser tratada con 7OH-cumarina. En los dos resultados de la evaluación se obtuvo un intervalo de confianza de 95%. El porcentaje de inhibición de la proliferación celular inducido por estas drogas se estima en el **Tabla I** y **Gráfica I**. La inhibición de la proliferación celular inducida por las cumarinas se explica en la **Fig 8**.

4.6 EXPRESIÓN DEL ONCOGÉN K-ras Y LOS GENES Bcl-2 y Bax Y LAS CORRESPONDIENTES PROTEÍNAS

En estos experimentos, la identificación del oncogen cK-ras, y los genes bcl-2 y Bax indican que sí se expresan en las células sin tratamiento de A427 y Calu-1 y además, en los cultivos tratados con las cumarinas se observan las alteraciones que sufren los cADNs inducidas por las drogas, aunque no estén en tiempo real **Fig.11 B**. Esto nos indica el efecto inhibitorio de las cumarinas desde su entrada a la célula, a través de la membrana celular, **Fig. 8** y **Fig 9**. Por otra parte, las alteraciones en la expresión de las correspondientes proteínas están indicando disminución en la expresión de las proteínas que intervienen en la proliferación celular (K-ras) y sobrevivencia (Bcl-2) y un incremento en la proteína considerada apoptótica (Bax), siendo este efecto más notorio por la 7OH-cumarina, **Fig. 10**. (para saber las funciones de K-ras, leer página 14; para Bcl-2, 16; para Bax, 19).

Los Western blots realizados con las proteínas extraídas de los lisados celulares muestran a las dos líneas celulares cultivadas con etanol al 1.5% (v/v), los cuales se utilizaron como puntos de referencia para comparar los resultados obtenidos al ser cultivadas con las drogas. En la línea celular A427 cultivada con cumarina y 7OH-cumarina se observa abatimiento notorio en la expresión de K-ras (bandas de 21 kDa) y mostramos con este experimento el abatimiento de bcl-2 (bandas de 26 kDa) e incremento de Bax (bandas de 23 kDa). La línea celular Calu-1 cultivada con cumarina disminuye ligeramente la expresión de K-ras pero no disminuye la expresión de bcl-2 ni se incrementa la expresión de Bax, sin embargo al ser cultivada con 7OH-cumarina se observó abatimiento notorio de K-ras y ninguna alteración de las proteínas bcl-2 ni de Bax, **Fig. 10**.

La intensidad de las bandas de los Western blot se cuantificó por densitometría y las densidades ópticas obtenidas de las proteínas K-ras, Bcl-2 y Bax se normalizaron con las densidades ópticas (valor de 1) de β -tubulina (bandas de 55 kDa) que se utilizó como control de carga, **Fig. 10**, y **Tabla II** y **Tabla III**.

En los PCRs, las electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio para identificar a los oncogenes muestran: para K-ras disminución notoria en su expresión en la línea A427 tratada con 7OHcumarina y también con cumarina en comparación con el etanol; en Calu-1 disminuye la expresión de K-ras con las dos drogas; Bcl-2 disminuye en A427 con 7OHcumarin; en Calu-1, Bcl-2 se incrementa, posiblemente esto favorezca su sobrevivencia a esta línea; en A427 no se altera Bax; en Calu-1 se incrementa Bax con cumarina y 7OHcumarina, **Fig. 11**.

5. DISCUSIÓN Y TRABAJO A FUTURO

La estructura de la cumarina y la 7OH-cumarina **Fig. 1**, muestran tener un anillo benzénico que le confiere actividad a la molécula que pertenece (por ejemplo actividad antiproliferativa), sin embargo, la 7OH-cumarina muestra tener una mayor actividad anticancerígena, posiblemente debida a la presencia del grupo HO- en la posición 7 (posición orto) de la molécula. Estos efectos se muestran tanto *in vivo* como *in vitro*, debido a la transformación que sufre la cumarina al entrar en el organismo humano y convertirse en 7OH-cumarina [112].

Los cultivos de las dos líneas celulares, A427 y Calu-1 con diferentes concentraciones de la cumarina o 7OH-cumarina mostraron que la concentración de las cumarinas que afectó más a estas líneas fue de 1.0 mM, sin embargo esta dosis en la línea celular Calu-1, se observó con menor agresividad, tal parece que la línea Calu-1 es más resistente a la actividad de las cumarinas, o quizás utilice otros mecanismos de adaptación que le confieren cierta resistencia a las drogas aquí utilizadas. En cambio la línea A427 es más sensible a estas drogas, principalmente a la 7OH-cumarina. Dosis menores como 0.5, 0.25 o 0.125 mM mostraron tener actividad citostática tanto de la cumarina como de la 7OH-cumarina en las dos líneas celulares, ya que su actividad antiproliferativa fue transitoria, también *disminuye* a medida que disminuye la concentración de las drogas, esto permite considerar que su actividad es dependiente de dosis y tiempo, lo cual está de acuerdo con los experimentos realizados por Marshall y col., en 1991 [129], porque si se prolongan los tiempos con la concentración de 1 mM de las cumarinas durante 48 y 72 hrs. todas las células son afectadas siendo irreversible su recuperación en las

dos líneas (datos no mostrados). Como se mencionó en Resultados la cumarina y la 7OH-cumarina actúan como un primer mensajero alterando la actividad de GTPasa de K-ras, estos resultados coinciden con los obtenidos por Zänker y colaboradores [119]. Además la cumarina puede inducir a segundos mensajeros para la transducción de señales al núcleo, en esta vía el fosfatidilinositol-3,4-difosfato es hidrolizado por la fosfolipasa C- β unida a la proteína G, generando diacilglicerol que va a reclutar a la proteína cinasa C a la membrana celular y el inositol-1,4,5-trifosfato libera al ion calcio del retículo endoplásmico al citosol. Pero la cumarina presenta afinidad por la proteína G, se une a ella y bloquea su actividad en esta vía, impidiendo que la transducción de señales llegue al núcleo e inhibiendo la proliferación celular. También se ha visto que la cumarina frena el ciclo celular en la fase G_0/G_1 [128], observándose en esta fase mayor número de células que en la fase S, posiblemente sea otra forma de inducir la inhibición de la proliferación celular por estas drogas. Esta actividad es dependiente de la concentración de las drogas y del tiempo que se cultiven las células con esas dosis. Sin embargo el efecto de las cumarinas esta conectado con el metabolismo dependiente de la especie que lo recibe [143, 144]. Lo cual se traduce en un efecto inhibitorio de la proliferación.

En este trabajo se utilizaron la cumarina y la 7OH-cumarina a una concentración 1,0 mM, así la cumarina indujo en la línea celular A427 un 14% de inhibición de la proliferación y la 7OH-cumarina el 54% (visto por el ensayo colorimétrico del MTT), en este porcentaje de células se manifiestan los efectos antiproliferativos de las cumarinas

que inhiben la replicación del ADN, la transcripción del ARN y la síntesis de proteínas.

Se realizó un cultivo de cada línea celular con etanol (disolvente) al 1.5% (v/v) durante 24 hrs., en ellos no se observaron cambios morfológicos ni alteraciones de la viabilidad celular en las dos líneas, lo cual permitió ver los efectos de los compuestos cumarinicos en los cultivos correspondientes, como se observó en las fotografías de los cultivos y en los Western blot. Bcl-2 y Bax en los Western blot muestran dos bandas de pesos moleculares muy cercanos, durante la maduración de estos pre ARN se presentan procesos alternativos donde varían los sitios de corte por el corrimiento del marco de lectura en varias bases obteniéndose transcritos (ARN mensajero maduro) de diferente tamaño, que al ser traducidos en proteínas se obtienen dos bandas una de 22 y 23 kDa para Bax [55] y de 25, 26 y 27 kDa para Bcl-2 [54] reconociendo, respectivamente al mismo anticuerpo utilizado aquí, **FIG. 10**. Estos transcritos de Bax contienen los dominios con estructura α -helicoidal BH1, BH2, BH3 (siendo BH3 un dominio crítico de muerte) [145] y los transcritos de Bcl-2 con los dominios BH1, BH2 y BH4 [146]. Los dominios BH1 y BH2 son necesarios en la formación de hetero- y homodímeros que son regiones muy conservadas en la familia de genes Bcl-2 y necesarios para reconocerse y formar los dímeros que dirigen el destino de la célula. Además Bcl-2 actúa como un antioxidante incrementando su presencia en los sitios donde se libera los radicales libre de oxígeno alrededor de mitocondria [147]. La identificación del oncogén K-ras y los genes bcl-2 y Bax **Fig. 11**, comprueba la existencia de estos genes

las líneas celulares A427 y Calu-1 antes del tratamiento y se observan alterados después de ser tratados con las cumarinas.

Por primera vez en las dos líneas de cáncer pulmonar humano, estos experimentos muestran que la gran familia Bcl-2 de genes cuyos productos génicos tienen actividad proapoptótica y antiapoptótica que han sido afectados por la cumarina y la 7OH-cumarina: observando incremento de la proteína Bax, con actividad proapoptótica e inhibición en la expresión de la proteína bcl-2 que dirige a la sobrevivencia, favoreciendo así, el abatimiento de la célula tumoral en estos cultivos, junto con la disminución en la expresión de la oncoproteína K-ras (el abatimiento de la proteína K-ras, en cáncer pulmonar ya ha sido visto por otros autores como un inductor de la proliferación celular constante) [141], y por lo tanto se observa que Bax, bcl-2 y K-ras contribuyen a disminuir la masa tumoral. En muchos casos se ha observado que la célula cancerosa frecuentemente es resistente a la apoptosis, esto refleja cambios en la red regulatoria que controla la transcripción de los genes involucrados. El gen supresor tumoral p53 (activador de la transcripción) y el factor de transcripción NF- κ B (factor nuclear cappa B) son importantes reguladores de la apoptosis: p53 es inducido cuando el ADN es dañado y reprime la transcripción de Bcl-2 e induce la transcripción de Bax. El factor de transcripción NF- κ B inhibe la apoptosis y a Bax; el inhibidor de este factor de transcripción es el I κ B el cual impide que NF κ B reconozca un sitio en el promotor de Bax y por lo tanto Bax si pueda ser expresado [148].

En los procesos cancerígenos imperan proteínas que dirigen a la sobrevivencia, de la familia Bcl-2, también silenciadores proapoptóticos de la familia Bcl-2 o inhibidores de las proteínas

proapoptóticas como las IAP: cIAP1, cIAP2, XIAP y survivina [149]; inductores de sobrevivencia que se han encontrado en muchos cánceres con la activación constitutiva de Akt/proteína cinasa B (Akt/PKB), en la vía de transducción de señales el fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP₃) recluta Akt/PKB a la membrana, donde se fosforila para intervenir en la vía de transducción de señales que median la transcripción de genes [150]; eventos del ciclo celular [151]; proliferación celular [152]; angiogénesis [39]; *confiere resistencia a drogas inductoras de apoptosis de la familia Bcl-2* [153].

Con lo anterior se ha visto que las cumarinas intervienen directamente con la célula tumoral. También se ha visto que interactúan con la respuesta inmune celular [154], activando a las células NK que liberan IL-2. Tanto IL-2 como las cumarinas reclutan a macrófagos alrededor del tumor y activan sus propiedades fagocíticas para destruir a la célula maligna [124, 126].

Las alteraciones de K-ras pueden ser utilizadas como biomarcadores en fase temprana de la enfermedad [155], buscando al gen y/o la proteína en lavados bronquioalveolares, expectoraciones o esputo obtenidos de personas sanas, fumadores, personas de alto riesgo: fumadores pasivos, trabajadores del asbesto y ,también, pacientes con cáncer pulmonar, para hacer un estudio comparativo que permita identificar marcadores bioquímicos.

Los hallazgos sobre el mecanismo y modo de acción de la cumarina y 7OH-cumarina pueden convertirlas en fármacos importantes para su aplicación clínica en el cáncer pulmonar.

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este proyecto con las líneas celulares de cáncer pulmonar humano A427: adenocarcinoma de tumor periférico de bronquios segmentados y Calu-1: carcinoma epidermoide de tumor central de bronquio principal, al ser cultivadas con cumarina 1.0 mM y 7OH-cumarina 1.0 mM durante 24 hrs. mostraron respuestas diferentes, observándose que 7OH-cumarina presentó mayor actividad anticancerígena aunque ya se explicó que la cumarina al entrar al organismo humano se metaboliza a 7OH-cumarina y es como actúa en el organismo, además la línea celular A427 mostró ser más vulnerable a la 7OH-cumarina.

La línea celular A427 al ser cultivada con cumarina 1.0 mM o 7OH-cumarina 1.0 mM durante 24 hrs. mostró muy disminuida la expresión de K-ras y bcl-2 e incrementada la expresión de Bax. Estos resultados de bcl-2 y Bax son vistos por primera vez en cáncer pulmonar tratado con estas drogas y demuestra que contribuyen a una disminución de la proliferación de la línea celular A427.

La línea celular Calu-1 cultivada con 7OH-cumarina 1.0 mM durante 24 hrs. mostró disminuida la expresión de K-ras pero no de bcl-2 ni incrementada Bax, lo que la dirige a una menor disminución de la proliferación celular. Esto demuestra que los tumores presentan diferentes umbrales de respuesta a los fármacos dependiendo de sus características y de su origen.

La cumarina y su metabolito la 7OH-cumarina son toleradas por las células normales por lo que podrían utilizarse como agentes quimiopreventivos y en tratamientos como anticancerígenos.

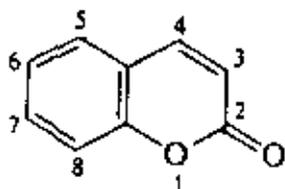
APÉNDICE A:

Estructura de las cumarinas y su pureza por IR RMN.

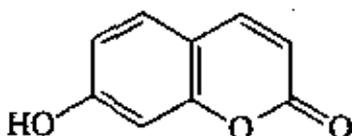
Figuras: 1

A. Estructura

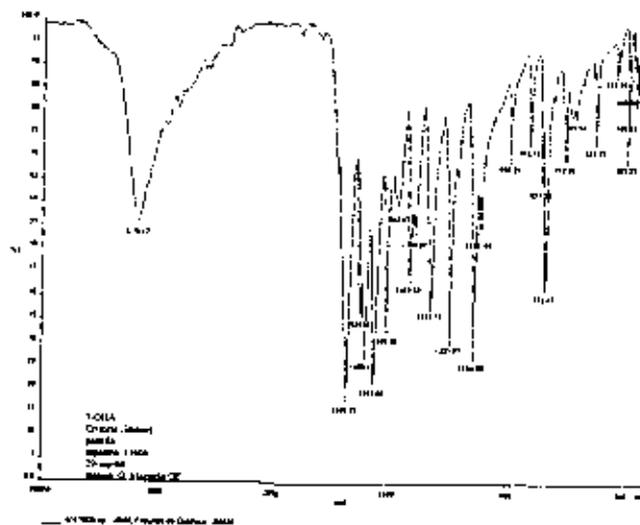
Cumarina PM 146



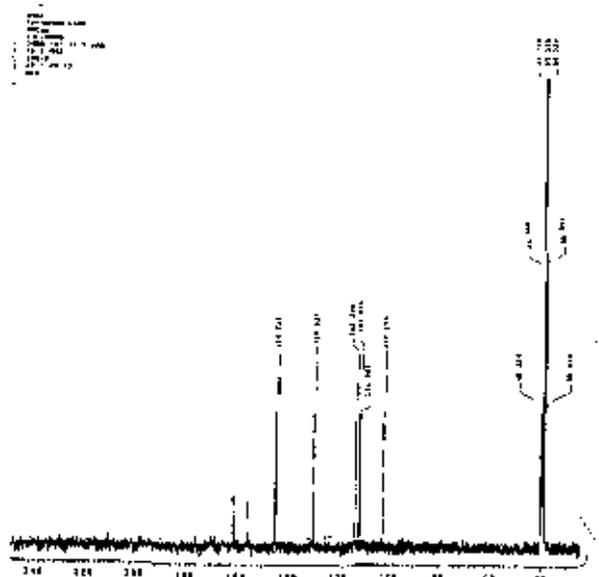
7OH-cumarina PM 162



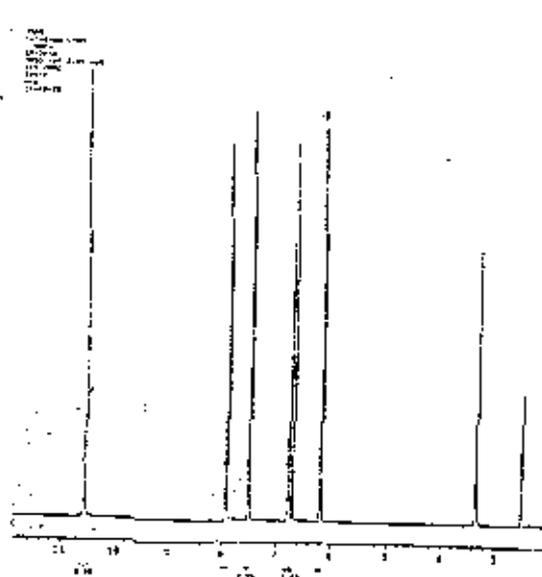
B. Espectro



C. ¹³Carbono-DMSO



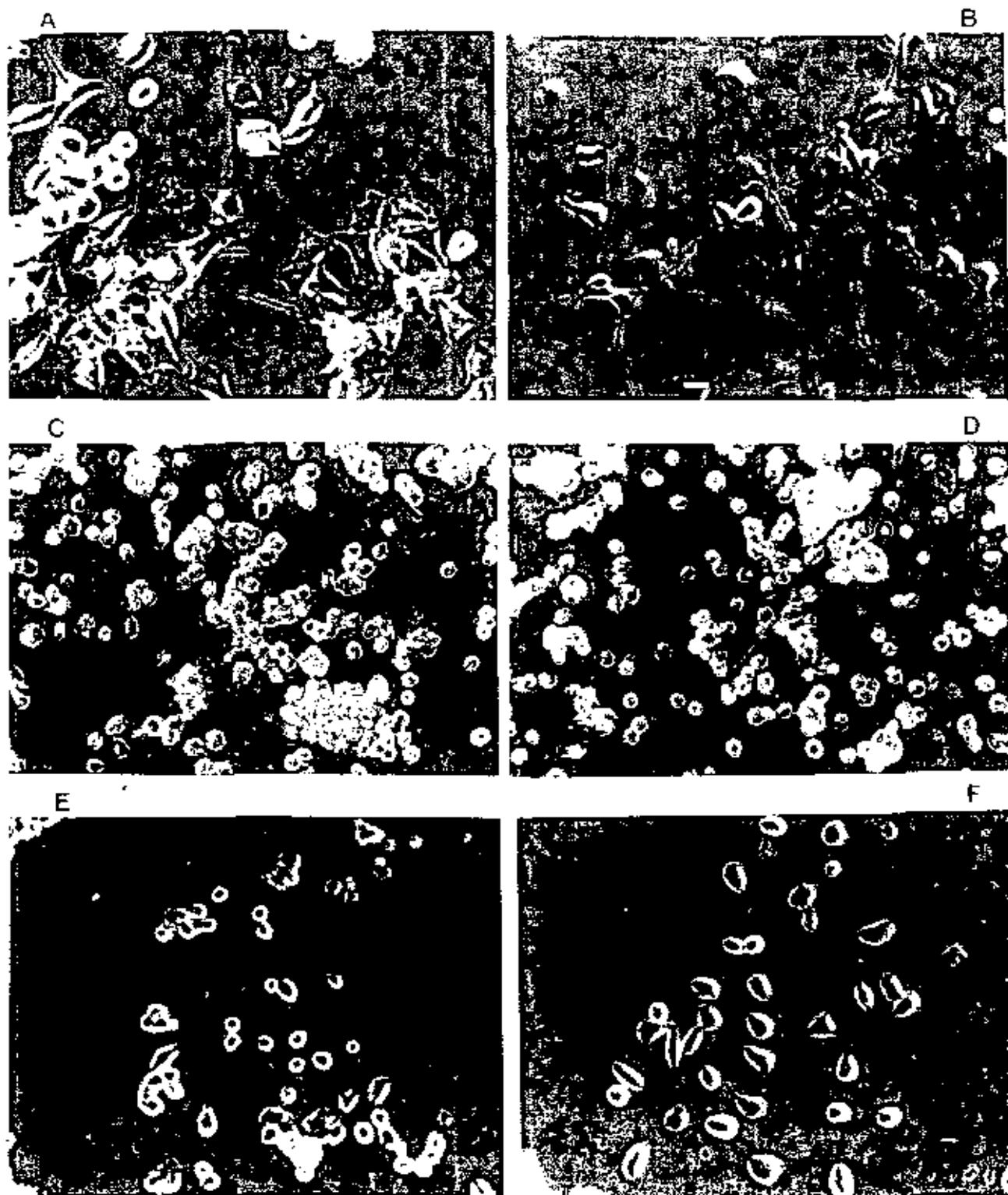
D. ¹H-DMSO



DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE LA CUMARINA EN LA LÍNEA CELULAR A427

Figura 2. Página 62. Cultivo de 24 hrs. de la línea celular A427: **A**, células sin tratamiento, estas células crecieron turgentes con formas irregulares y prolongaciones citoplásmicas. **B**, células tratadas con etanol (disolvente), este cultivo no mostró cambios notorios en la morfología celular. **C**, células tratadas con cumarina 1.0 mM mostrando los cambios morfológicos siguientes: las células presentaron formas esféricas, de tamaño reducido, y se encuentran agrupadas en pequeños racimos. **D**, células tratadas con cumarina 0.5 mM, el aspecto de estas células es semejante al inciso anterior aunque menos deterioradas. **E**, tratadas con cumarina 0.25 mM, las células muestran ligeros cambios en su forma y no se encuentran agrupadas en racimos. **F**, células cultivadas con cumarina 0.125 mM, las células tienen el aspecto semejante a las células cultivadas con etanol. Estos resultados nos indican que la dosis citotóxica de la cumarina es de 1.0 mM y las dosis de 0.5, 0.25 y 0.125 mM corresponden a dosis citostáticas ya que eliminando la droga de los cultivos las células se recuperan y vuelven a proliferar. Fotografías 200X de amplificación.

Figura 2. LÍNEA CELULAR A427 TRATADA 24 H CON CUMARINA

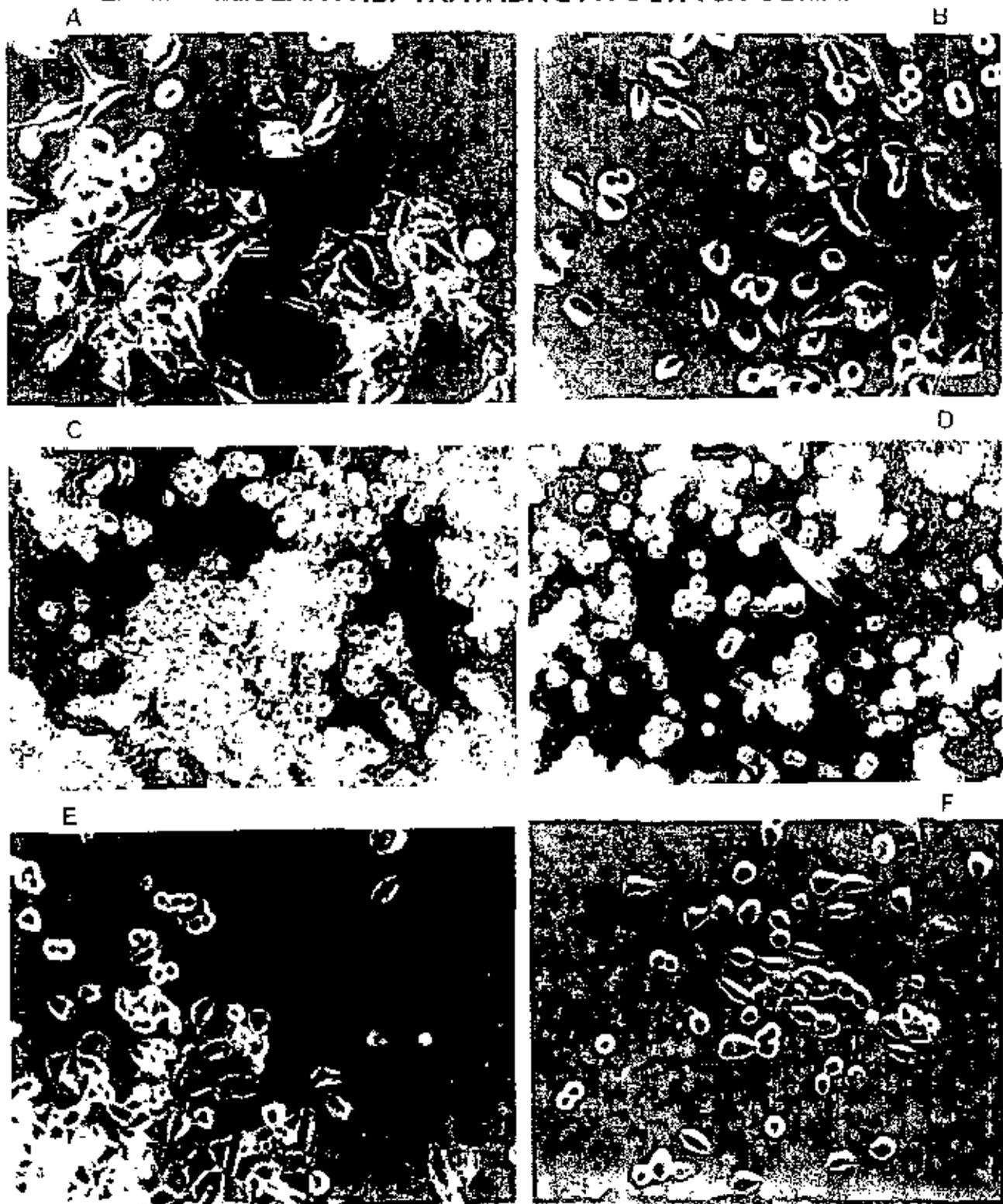


A, células sin tratamiento. B, células + etanol (disolvente)
Concentraciones de la cumarina:
C, 1.0 mM D, 0.5 mM E, 0.25 mM F, 0.125 mM

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE LA 7OH-CUMARINA EN LA LÍNEA CELULAR A427

Figura 3. Página 64. Cultivos de 24 hrs. de la línea celular A427: **A**, células sin tratamiento las cuales crecieron turgentes, irregulares y con prolongaciones citoplásmicas. **B**, células tratadas con etanol (disolvente), las cuales no muestran cambios morfológicos notorios. **C**, células tratadas con 7OH-cumarina 1.0 mM, donde se observan células pequeñas, esféricas y agrupadas en grandes racimos. **D**, células cultivadas con 7OH-cumarina 0.5 mM, cuyo aspecto es semejante al anterior, pero se agrupan en racimos pequeños. **E**, células tratadas con 7OH-cumarina, 0.25 mM, las células se observan poco deterioradas, con respecto a las células sin tratamiento, aunque su tamaño sigue siendo pequeño. **F**, células tratadas con 7OH-cumarina 0.125 mM, estas células presentan un aspecto semejante a las células tratadas con etanol. Estos resultados muestran que la dosis 1.0 mM de la 7OH-cumarina equivale a una dosis citotóxica y las dosis 0.5, 0.25 y 0.125 mM son dosis citostáticas y además la 7OH-cumarina muestra ser una droga más agresiva que la cumarina en esta línea celular. Fotografías 200X de amplificación.

Figura 3. LÍNEA CELULAR A427 TRATADA 24 H CON 7OH-CUMARINA

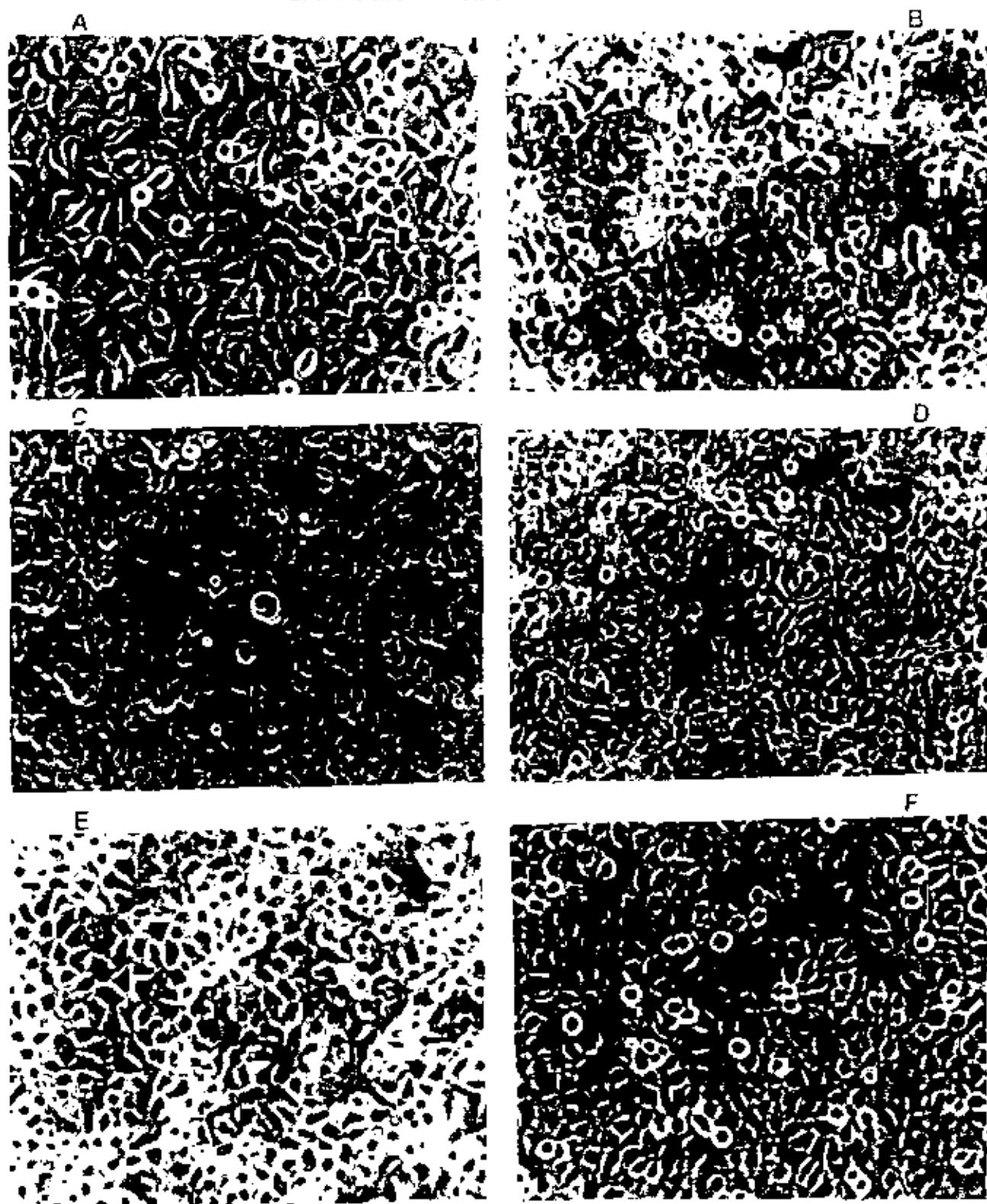


A, células sin tratamiento. B, células + etanol (disolvente)
Concentraciones de la 7OH-cumarina:
C, 1.0 mM D, 0.5 mM E, 0.25 mM F, 0.125 mM

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE LA CUMARINA EN LA LÍNEA CELULAR Calu-1

Figura 4. Página 66. Cultivo de 24 hrs. de la línea células Calu-1: **A**, células sin tratamiento. **B**, células tratadas con etanol (disolvente). **C**, células tratadas con cumarina 1.0 mM. **D**, células tratadas con cumarina 0.5 mM. **E**, tratadas con cumarina 0.25 mM. **F**, células tratadas con cumarina 0.125 mM. En todos estos cultivos no se observaron cambios morfológicos celulares, pero la citotoxicidad fue determinada eliminando la droga del medio de cultivo y se observó que las células si se recuperaban, aunque las células que habían sido tratadas con cumarina 1.0 mM necesitaron más tiempo para su recuperación, por lo que se consideró que la cumarina tiene actividad citostática para esta línea celular. Fotografías 200X de amplificación.

Figura 4. LÍNEA CELULAR Calu-1 TRATADA 24 H CON CUMARINA

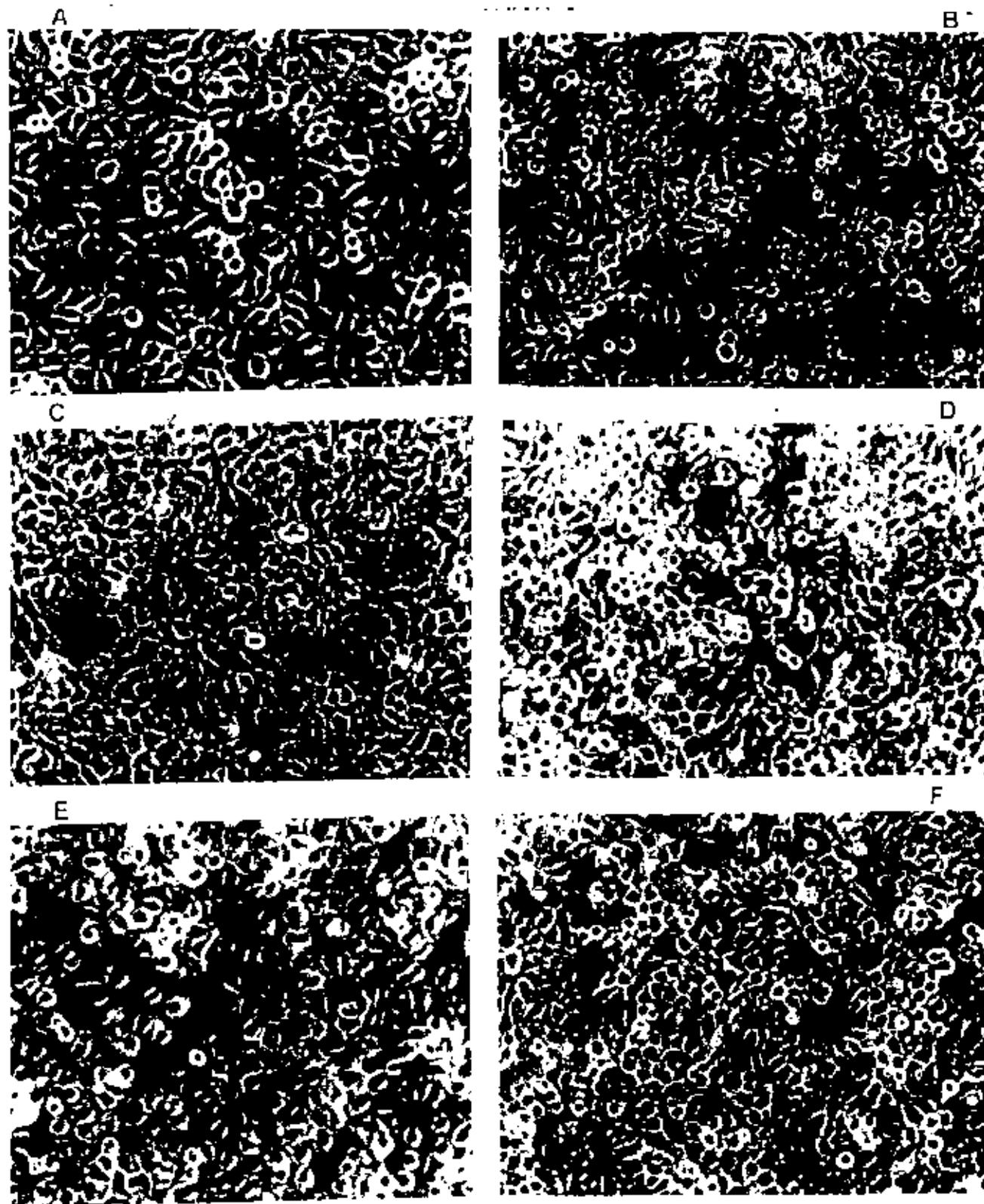


A, células sin tratamiento. B, células + etanol (disolvente)
Concentraciones de la cumarina:
C, 1.0 mM D, 0.5 mM E, 0.25 mM F, 0.125 mM

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE LA 7OH-CUMARINA EN LA LÍNEA celular Calu-1

Figura 5. Página 68. Cultivo de 24 hrs. de la línea celular Calu-1: **A**, células sin tratamiento. **B**, células tratadas con etanol (disolvente). **C**, células tratadas con 7OH-cumarina 1.0 mM. **D**, células tratadas con 7OH-cumarina 0.5 mM. **E**, células tratadas con 7OH-cumarina 0.25 mM. **F**, células tratadas con 7OH-cumarina 0.125 mM. Estos cultivos no mostraron ningún cambio morfológico en sus células. Su toxicidad se manifestó al eliminar la droga de los cultivos, observándose que las células cultivadas con 7OH-cumarina 1.0 mM no se recuperaban al eliminar la droga, considerándose que esta dosis es citotóxica. En cambio las células cultivadas con 0.5, 0.25 o 0.125 mM de la 7OH-cumarina las células volvían a proliferar indicando que son dosis citostáticas en esta línea celular. Fotografía 200X de amplificación.

Figura 5. LÍNEA CELULAR Calu-1 TRATADA 24 H CON 7OH-CUMARINA



A, células sin tratamiento. B, células + etanol (disolvente)
Concentraciones de la 7OH-cumarina:
C, 1.0 mM D, 0.5 mM E, 0.25 mM F, 0.125 mM

COMPARACION DE LOS CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR A427

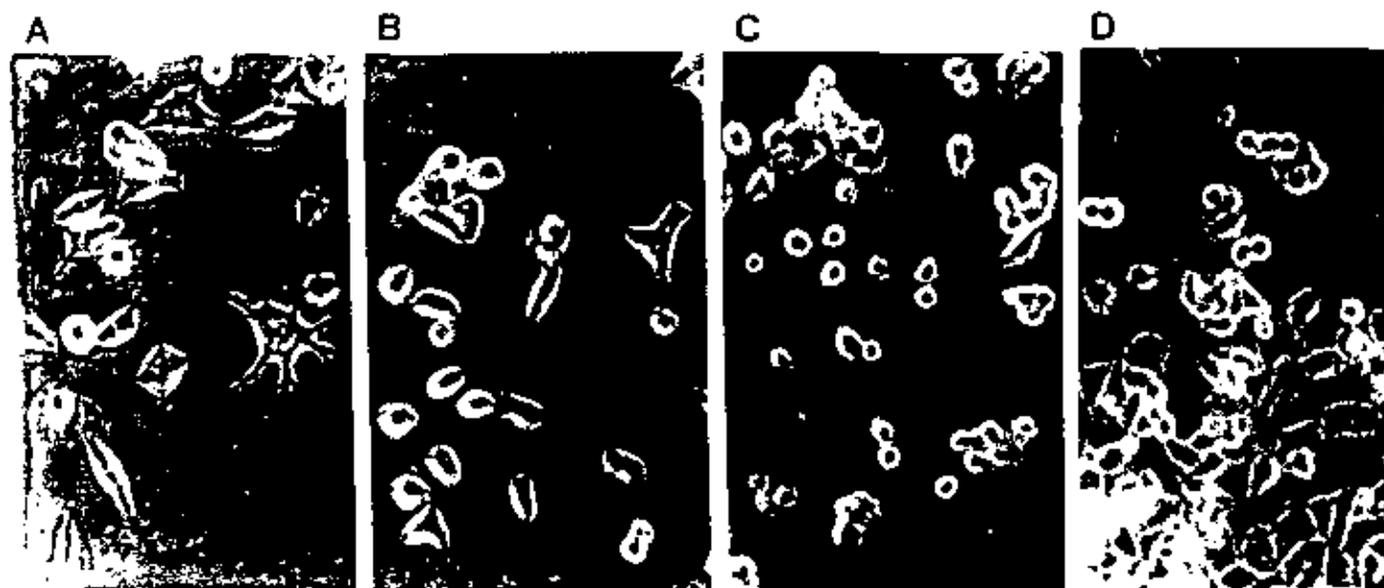


Figura 6. Evaluación microscópica de los cambios morfológicos que se presentan durante el cultivo de la línea celular A427 cultivada durante 24 hrs. en RPMI suplementado: **A**, células viables sin tratamiento, las cuales crecieron turgentes, con formas irregulares y prolongaciones citoplásmicas. **B**, cultivadas con 1.5% (v/v) de etanol (solvente), sin presentar cambios morfológicos notorios, **C**, con cumarina 1.0 mM y **D**, con 7OH-cumarina 1.0 mM, en la que se observan células de tamaño reducido y agrupadas en racimos, siendo más notorio en (D). Fotografías 200X de amplificación.

COMPARACIÓN DE LOS CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR Calu-1

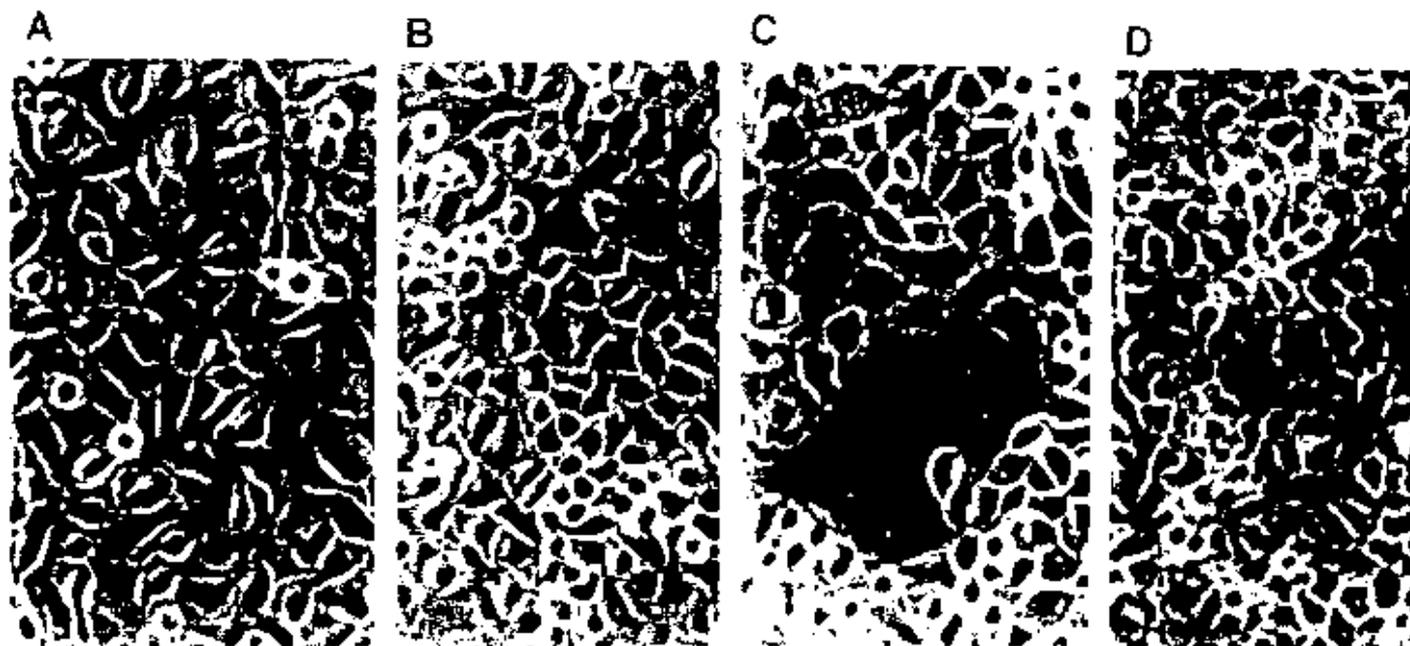


Figura 7. Evaluación microscópica de los cambios morfológicos presentados por la línea celular Calu-1 cultivada con RPMI suplementado, durante 24 hrs.: **A**, células sin tratamiento. **B**, cultivadas con etanol al 1.5% (v/v), (solvente). **C**, con cumarina 1.0 mM y **D**, con 7OH-cumarina 1.0 mM. No se observaron cambios morfológicos notorios en ninguno de los cultivos. ellas crecieron formando un mosaico de células poligonales, muy juntas una de otra y muy adheridas al plástico de la botella de cultivo. Fotografías 200X de amplificación.

TABLA 1. Porcentaje de inhibición del crecimiento celular (CI%), inducido por la actividad de las cumarinas en las líneas celulares A427 y Calu-1 cultivadas durante 24 hrs. con cumarina 1.0 mM o 7OH-cumarina 1.0 mM, usando un ensayo colorimétrico del MTT.

Línea celular	A427	Calu-1
Droga	%IC DE	%IC DE
Cumarina	14 = 0.20 *	22 = 0.14
7OH-cumarina	54 = 0.13 **	30 = 0.17 *

DE = Desviación Estandar
A427, ***p<0.001 Calu-1, *p<0.1

Estadística significativa considerada es el valor de p.

Los asteriscos indican las diferencias significativas estadísticamente teniendo como control los valores del etanol.

Con un intervalo de confiabilidad de 95%.

Para determinar el valor de %IC, se utilizó la siguiente fórmula:

%IC = [(1- valor de las células cultivadas con cumarinas/valor de células con etanol) 100]

GRÁFICA 1. Representación gráfica de los valores mostrados en la tabla 1, observándose que la droga 7OH-cumarina presenta mayor actividad antiproliferativa que la cumarina y la línea celular A427 muestra ser más sensible a la cumarina y a la 7OH-cumarina que la línea Calu-1

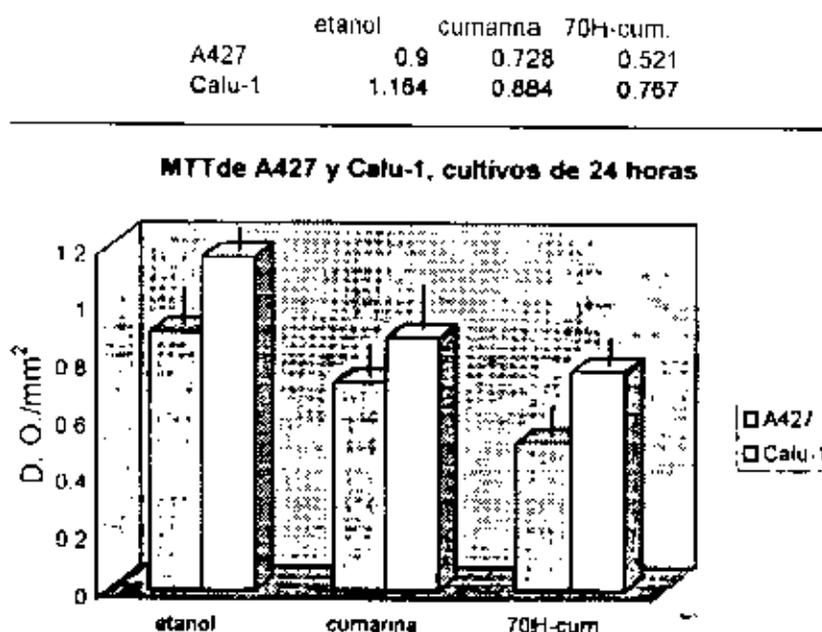
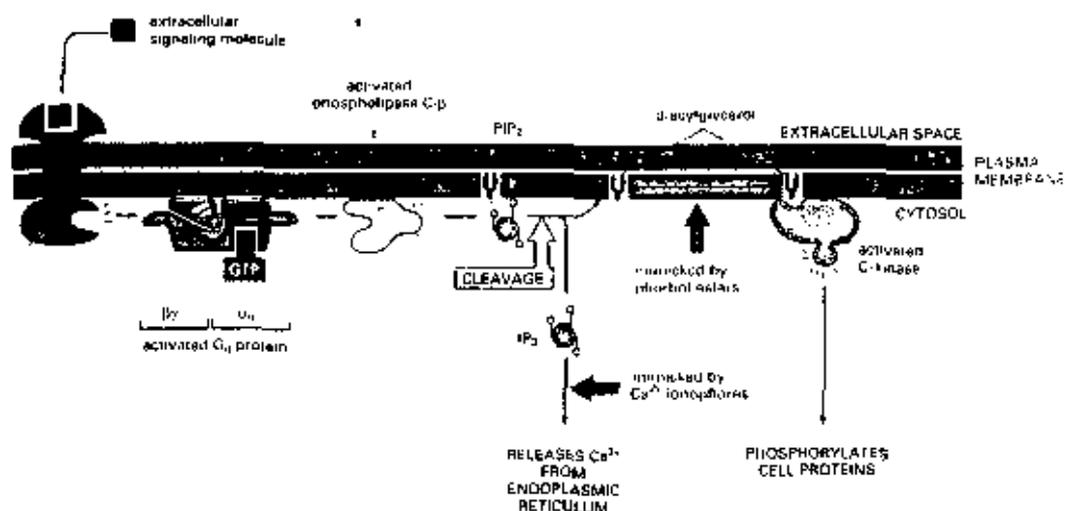


FIGURA 8. Efecto de la cumarina y 7OHcumarina en la célula tumoral
A.- Superficie celular. Los LPS (lipopolisacáridos) inducen una vía de transducción de señales de la membrana al núcleo en la célula normal



B.- La cumarina activa la vía de transducción de señales semejante a los LPS. La cumarina se une a la proteína G impidiendo la activación de la fosfolipasa C β , bloqueando la transducción de señales al núcleo e inhibiendo la proliferación celular de la célula tumoral.

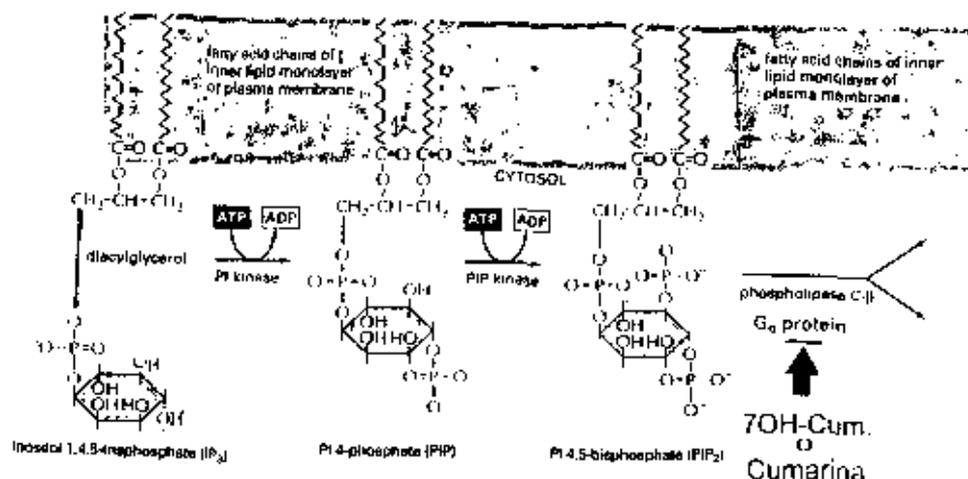
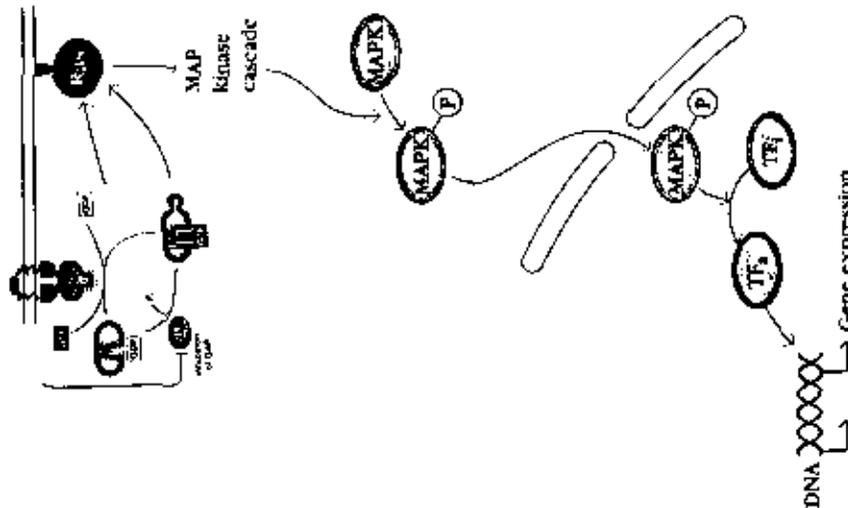
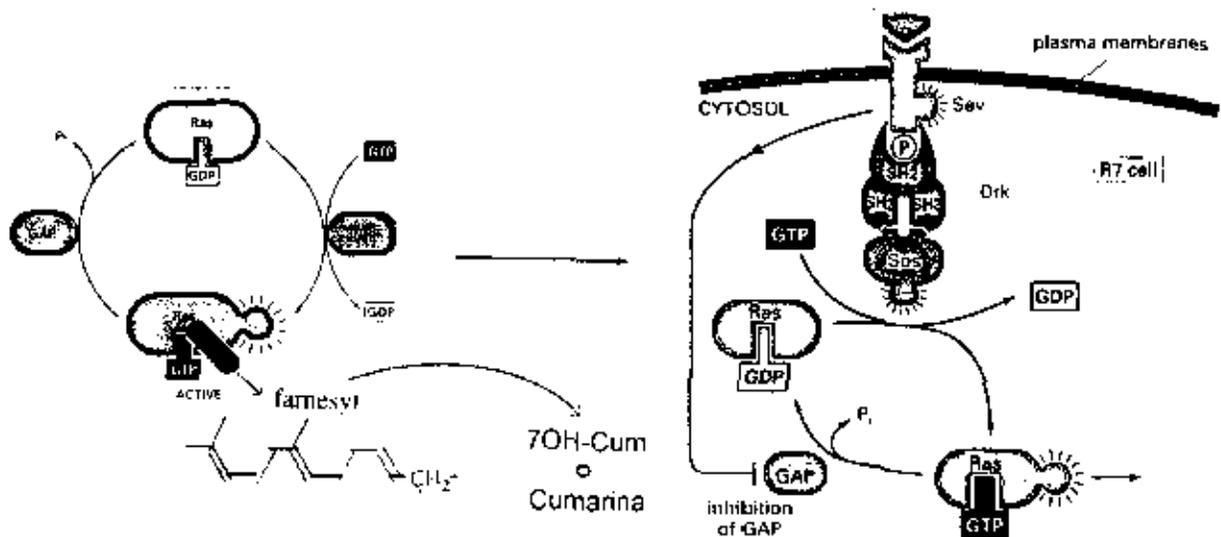


Figura 9.- Efecto de la cumarina y 7OHcumarina en la célula tumoral
A.- La proteína K-ras está en la cara interna de la membrana celular y tiene actividad de GTPasa controlando la proliferación y diferenciación de la célula normal



B.- Un agente cancerígeno puede activar a la proteína farnesil-transferasa y unir un grupo farnesilo a una cisteína del carboxilo Terminal de ras impartándole hidrofobicidad, lo cual evita la hidrólisis de GTP-ras favoreciendo la proliferación constante de la célula tumoral. La cumarina dentro de la célula se une al grupo farnesilo impidiendo su unión con ras, así el complejo GAP activa la función de GTPasa de ras e hidrolisa a GTPras para obtener GDPras inactiva impidiendo la proliferación de la célula tumoral, [156].



**WESTERN BLOT REALIZADO CON LAS PROTEÍNAS TOTALES
OBTENIDAS DE LOS LISADOS CELULARES DE LAS LÍNEAS
A427 Y Calu-1**

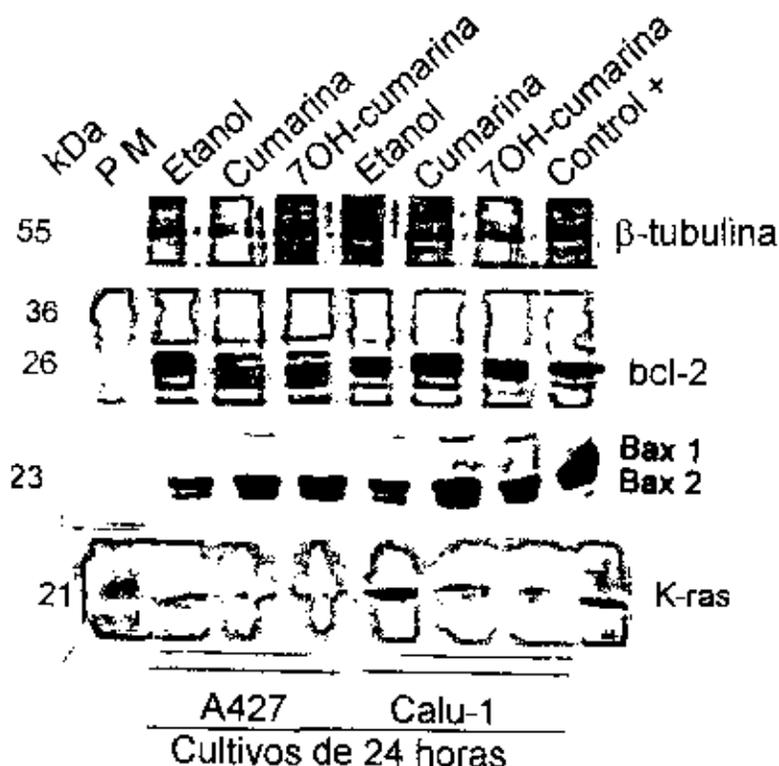


Figura 10. Los lisados celulares de estas líneas cultivadas por 24 hrs. en RPMI 1640 con etanol 1.5% (v/v) (disolvente), cumarina 1.0 mM ó 7OH-cumarina 1.0 mM, mostraron por Western blot en A), la línea A427 cultivada con cumarina y 7OH-cumarina reducen la expresión de K-ras (bandas de 21 kDa) y de bcl-2 (bandas de 26 kDa) e incrementan la expresión de Bax (bandas de 23 kDa). En cambio la línea Calu-1, solamente cultivada con 7OH-cumarina redujo la expresión de K-ras. Los valores obtenidos con etanol son puntos de referencia para valorar los resultados obtenidos con la cumarina y la 7OH-cumarina. Las bandas de β -tubulina (55 kDa), representan un control de carga.

TABLA II. Promedio de las densidades ópticas obtenidas por densitometría de bandas de tres experimentos realizados por Western blots de bcl-2, Bax, K-ras y β -tubulina de las líneas celulares A42.

DO./mm²

Línea celular	Bcl-2	Bax	K-ras	β -tubulina
A427 + etanol	845	719	175	847
A427 + cumarina	305	724	55	792
A427 + 7OH-cumarina	390	741	67	805
Calu-1 + etanol	713	703	248	770
Calu-1 + cumarina	800	745	170	805
Calu-1 + 7OH-cumarina	602	707	75	795

TABLA III. Normalización de los valores de las densitometrías de bcl-2, Bax y K-ras, con respecto a los valores de las densitometrías de β -tubulina (valor de 1).

Línea celular	Bcl-2/ β - Tubulina DE	Bax/ β - Tubulina DE	K-ras/ β - Tubulina DE
A427 + etanol	0.997 \pm 0.011	0.85 \pm 0.027	0.206 \pm 0.017
A427 + cumarina	0.385 \pm 0.025 ***	0.915 \pm 0.039 *	0.069 \pm 0.023 **
A427 + 7OH-cum.	0.484 \pm 0.042 ***	0.921 \pm 0.015 *	0.083 \pm 0.032 **
Calu-1 + etanol	0.926 \pm 0.030	0.914 \pm 0.053	0.322 \pm 0.040
Calu-1 + cumarina	0.993 \pm 0.043	0.926 \pm 0.076	0.211 \pm 0.038 *
Calu-1 + 7OH-cum.	0.757 \pm 0.020 *	0.89 \pm 0.019	0.094 \pm 0.015 **

Estadística:

A427, Bcl-2
p<0.0001

A427, Bax
p<0.04

A427, K-ras
p<0.0006

Calu-1, Bcl-2
p<0.003

Calu-1, Bax
p<0.5

Calu-1, K-ras
p<0.001

Expresión del oncogén K-ras y de los genes bcl-2, Bax y β -tubulina obtenidos por RT-PCR

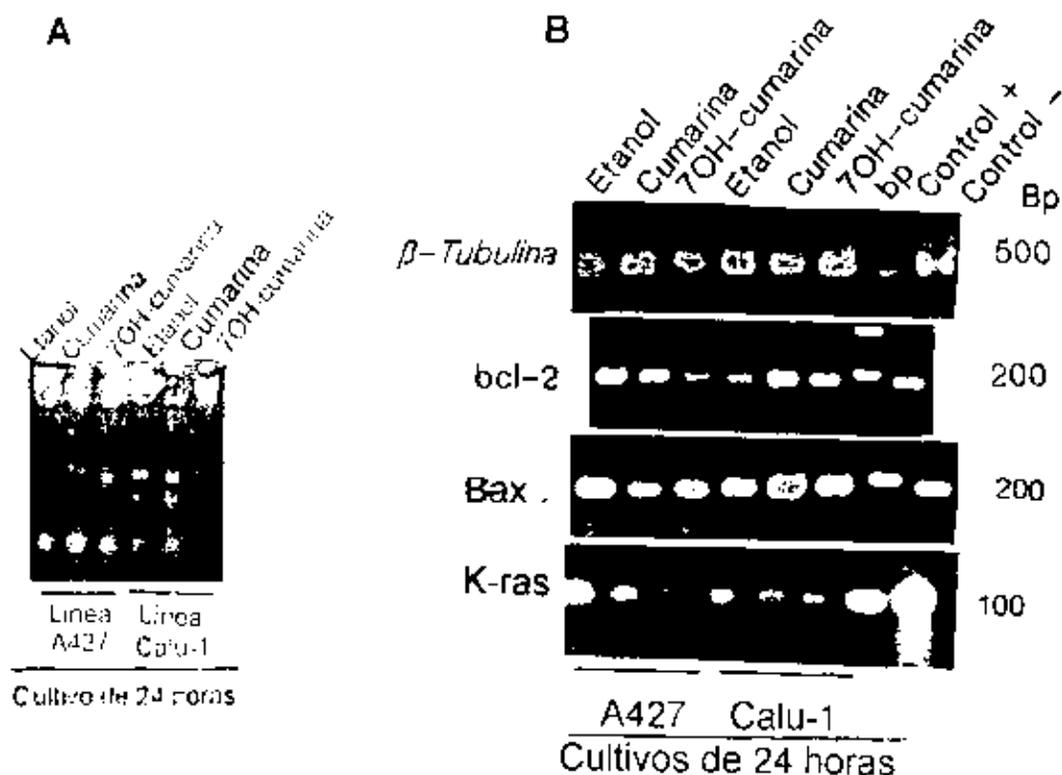


Figura 11. A, electroforesis en geles de agarosa al 1% en condiciones reductoras con los ARNs totales mostrando que los ribosomales de 28 y 18 s no se encuentran degradados. B, PCRs en electroforesis de geles de agarosa de los cADNs obtenidos por RT del oncogén K-ras (fragmento de 106 pares de bases) y de los genes bcl-2 (fragmento de 196 pares de bases), Bax (210 pares de bases) y β -tubulina (420 pares de bases), (control de carga), utilizando los oligonucleótidos correspondientes. Los cADNs no corresponden en tiempo real con las proteínas obtenidas en este experimento, sin embargo ellos y las proteínas fueron aisladas de los mismos cultivos. Además comprueban la existencia de estos genes en las líneas celulares A427 y Calu-1, cuya expresión se muestra alterada al ser incubadas con cumarina y 7OH-cumarina.

APÉNDICE B. REACTIVOS**Medio de cultivo RPMI**

RPMI 1640	10 g
Agua bidestilada	1 litro
NaHCO ₃	2 g
HCl 0.5 N	5 ml

Esterilizar por filtro 0,22 nm

Tripsina 0.25 %

Sol. Stock 2.5%	10 ml
RPMI 1640	90 ml

Sol. MTT

MTT	5 mg
PBS 1X	1 ml

Esterilizar por filtro 0.22 nm

Clorhidrato de guanidina 0.3 M

Clorhidrato de guanidina	0.28659 g
Alcohol al 95%	10 ml

Buffer de transferencia (proteínas), pH 8.35

Tris base	0.025 M
Glicina	0.193 M

Metanol al 20%

El metanol se añade al momento de realizar la transferencia

Sol. TBS 1X (sol. de lavado)

Tris-HCl	3.94 g
NaCl	4.38 g

Disolver en 300 ml de agua bidest., ajustar el pH 7.5, aforar a 500 ml y esterilizar por autoclave.

Buffer de ácido maléico

Ácido maléico	1.161 g
NaCl	0.8766 g

Aforar con agua estéril a 100 ml

Preparación:

En un vaso de precipitados colocar 50 ml de agua bidestilada, agregar el ácido maléico y el NaCl, disolver por agitación. Ajustar el pH a 7.5 agregando NaOH en lentejas. Aforar a 100 ml. Esterilizar por filtro de 0.45 μ m.

Sol. Stock bloqueadora

Polvo bloqueador	10 g
Buffer de ácido maléico	100 ml

Preparación:

Colocar todo en un vaso de precipitados y calentar de 50°–65°C hasta que se disuelva y se obtenga una solución opalescente. Guardar en refrigeración.

Sol bloqueadora 1X

Sol stock bloqueadora	1 ml
Sol. de TBS	9 ml

Buffer de detección

Tris·HCl	2.42 g
NaCl	1.169 g
MgCl ₂	2.03 g

Disolver en 100 ml de agua bidestilada, ajustar el pH a 9.5 y aforar a 200 ml

Reactivos de Lowry-Peterson

Reactivo A

Partes iguales de: solución de tartrato de cobre-carbonato de sodio

SDS al 10%

NaOH 0.8 N

Agua destilada

Reactivo B

1 vol. de Folin-Ciocalteu-Fenol

5 vols. de agua destilada

Reactivos para proteínas

Desoxicolato de sodio (DOC) al 0.15%

Ácido tricloracético (TCA) al 72%

APÉNDICE C:	ABREVIATURAS
7OH-cumarina	7-hidroxi-cumarina
ATCC	American Type Culture Collection
Pmol	picomoles
U	unidades
TM	temperatura media
GTPasa	guanosina trifosfatasa
GTP	guanosina trifosfato
GDP	guanosina difosfato
TNF	factor de necrosis tumoral
IR	Infrarrojo
RMN	Resonancia Magnética Nuclear

REFERENCIAS

- [1]. Franks LM. and Teich. Editors, Imperial Cancer Research Fund, London.. Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer, Third Edition, 1998; page 8.
- [2]. De Vita T., Hellman S. and Rosenberg, SA. (ed). Cancer, (5th edn). JB. Lippincott, Philadelphia. 1997
- [3]. Rom WN., Hay JG., Lee TC., Jiang Y., Tchou-Wong KM. Molecular and genetic aspects of lung cancer. Am J Respir Crit Care Med. 2000; 161: 1355-67.
- [4]. Franks LM and Teich. Editors, Imperial Cancer Research Fund, London. Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer. Third Edition, 1998; page 1.
- [5]. Varmus H., Weinberg RA. Genes and the Biology of Cancer. Scientific American Library New York. 1993.
- [6]. Lodish H., Baltimore D., Berk A., Zipursky SL., Matsudaira P. and Darnell J. (ed.) (1995). Molecular Cell Biology. (3rd edn). W H, Freeman New York.
- [7]. Franks LM. and Teich. Editors, Imperial Cancer Research Fund, London. Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer. Third Edition. 1998; page 6.
- [8]. Ceresoli GL., Reni M., Chiesa G. et al. Brain metastases in locally advanced nonsmall cell lung carcinoma after multi-modality treatment: risk factors analysis. Cancer. 2002; 955: 605-612.
- [9]. Law A., Karp DD., Dipetrillo T., Daly BT. Emergence of increased cerebral metastasis after high-dose preoperative radiotherapy with chemotherapy in patients with locally advanced nonsmall cell lung carcinoma. Cancer. 2001; 92: 160-164.
- [10]. Kim HS., Skurk C., Thomas SR., et al. Regulation of angiogenesis by glycogen synthase kinase-3 β . J Biol Chem. 2002; 277: 41888-96.

- [11]. Adams GE., Cox R. Radiation carcinogenesis. Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer. Third edition, Ed. by Franks LM and Teich NM. Oxford University Press Inc., New York. 1998; page 130.
- [12]. Lutz WK. Endogenous genotoxic agents and processes as a basis of spontaneous carcinogenesis. *Mutat. Res.*, 1990; 238: 287–295
- [13]. Lynch TJ., Bell DW., Sordella R. et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2004; 350: 2129-2139.
- [14]. Jacobsen BM., Richet JK., Sartorius CA., Horwitz KB. Expression profiling of human breast cancer and gene regulation by progesterone receptors. *J mammary Gland Biol Neoplasia.* 2003; 8: 257-68.
- [15]. Shen MR., Jones IM. and Mohrenweiser H. Non conservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res.* 1998; 58: 604-608.
- [16]. Alcantar F., Sánchez R., Quintero A. Estudio del mecanismo de la resistencia a fármacos en células tumorales. *LAB-acta* 4/2 1992: 71-75.
- [17]. Stsjazhko VA., Tsyb AF., Tronko ND., Souchkevitch G., Baverstock KF. Childhood thyroid cancer since accident at Chernobyl *British Medical Journal.* 1995; 310: 801.
- [18]. Kinzler ER. and Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes: gatekeepers and caretakers. *Nature*, 1997; 386: 761-763.
- [19]. Hinds PW. and Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Current Opinions in Genetics and Development.* 1994; 4: 135-41.

- [20]. Lunn RM., Hetzlsouer KJ., Parshad R., Umbach DM. XPD polymorphisms: effects on DNA repair proficiency. *Carcinogenesis*. 2000; vol 21, No. 4: 551-555
- [21]. Jones PA. & Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nature Genetics*, 1999; 213: 163-167.
- [22]. Fong KM., Biesterveld E., Virmani A., Wistuba I., Sekido Y., Bader S., Minna J. FHIT and FRA3B 3p14.2 allele loss are common in lung cancer and preneoplastic bronchial lesions and are associated with cancer-related FHIT cDNA splicing aberrations. *Cancer Res.*, 1997; 57: 2256-2267.
- [23]. Fong KM., Zimmerman PV., Smith PJ. Tumor progression and loss and heterozygosity at 5q and 18q in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.*, 1995; 55: 220-223.
- [24]. Knudson AG. Two genetic hits (more and less) to cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001; 1 (2): 157-162.
- [25]. Vousden KH. and Lu X. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2: 594-604.
- [26]. Bestor TH. *Hum Mol Genet*. 2000; 9: 2395-2402.
- [27]. Vertino PM., Yen WC., Gao J. De novo methylation of CpG island sequences in human fibroblasts overexpression DNA(cytocine5)-methyltransferasa. *Mol Cell Biol*, 1996; 16: 4555-4565
- [28]. Gonzalgo ML., Jones PA. Mutagenic and epigenetic effects of DNA methilations. *Mutation Res*. 1996; 386: 107-118.
- [29]. Erlich M., Zhang XY., Inamdar NM. Spontaneous deaminacion cytosine and 5-methylcytosine residues in DNA and replacement of 5-methylcytosine residues with cytosine residues. *Mutat Res*, 1990; 238: 277-286.
- [30]. Loef LA ., Preston BD, Mutagenesis by apurinic/apirimidinic sites. *Annu Rev Genet*, 1986; 20: 201-230.

- [31]. Robertson KD., Jones PA. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis*. 2000; 21 (3): 461-467.
- [32]. Rountree MR., Bachman KE., Herman JG. and Baylin SB. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene*. 2001; 20: 3156-3165.
- [33]. Richard LM., Veronica B. DNA methylation and cancer. *J. Cell Physiol*. 2000; 183: 145-154.
- [34]. Esteller M., Sparks A., Toyota M. Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 4366-4371.
- [35]. Henson JD., Neumann AA., Yeager TR. and Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene*, 2002; 21: 598-610.
- [36]. Lundblad V. Telomere maintenance without telomerase. *Oncogene*, 2002; 21: 522-531.
- [37]. Karlseder J., Smogorzewska A. and de Lange T. Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science*, 2002; 295: 2446-2449.
- [38]. Hackett JA., Feldser DM. and Greider CW. Telomere dysfunction increases mutation rate and genomic instability. *Cell*, 2001; 106: 275-286.
- [39]. Kim HS., Skurk C., Thomas SR. Regulation of angiogenesis by glycogen synthase kinase-3 β . *J Biol Chem*, 2002; 277: 41888-96.
- [40]. Agarwal A., Das K., Lerner N. The AKT/I κ B kinase pathway promotes angiogenic metastatic gene expression in colorectal cancer by activating nuclear factor-K β and β -catenin. *Oncogene*, 2005; 24: 1021-1031
- [41]. Reeves ME. A metastatic tumour cell line has greatly reduced levels of a specific homotypic cell adhesion molecule activity. *Cancer Research*, 1992; 52: 1546-1552.

- [42]. Ceresoli GL., Capuzzo R., Gregorc V., Bartolini S., Crino L., Villa E. Gefitinib in patients with brain metastases from non-small-cell lung cancer a prospective trial. *Ann Oncol*, 2004; 15: 1042-1047.
- [43]. Lai R., Dang CT., Malkin MG., Abrey LE. The risk of central nervous system metastases after trastuzumab therapy in patients with breast carcinoma. *Cancer*, 2004; 101: 810-816.
- [44]. Cordon-Carlo C. Mutation of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *American Journal of Pathology*, 1995; 147: 545-60.
- [46]. Bishop JM. Cancer: the rise of the genetic paradigm. *Genes and Development*, 1995; 9: 1309-1315.
- [47]. Barbacid M. Ras Genes. *Ann Rev Biochem*, 1987; 56: 779-827.
- [48]. Zhang FL. Kirschmeier D., Karr I., James RW., Bond I., Bishop WR. Characterization of Ha-ras, N-ras, Ki-ras4A and Ki-ras4B as *in vitro* substrate for farnesyltransferase and geranylgeranyl protein transferase type I. *J Biol Chem*, 1997; 272: 10232-10239.
- [49]. Schlessinger J. How receptor tyrosine kinases activate ras. *Trends in Biochemical Sciences*, 1993; 18: 273-275.
- [50]. Bos JL. Ras oncogenes in human cancer. A review. *Cancer Res*, 1989; 49: 4682-4689.
- [51]. Barrington RE., Subler MA., Rands E., Omer CA., Muller PJ., Kohl NE. A farnesyltransferase inhibitor induces tumor regression in transgenic mice harboring multiple oncogenic mutation by mediating alterations in both cell cycle control and apoptosis. *Mol Cell Biol*, 1998; 18: 85-92.
- [52]. Adjei AA., Dy GK., Erlichman C. A phase 1 trial of ISIS 2503 an antisense inhibitor of H-ras, in combination with gencitabine in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res*, 2003; 9: 115-123.

- [53]. Tsujimoto Y., Shimizu S. Bcl-2 family: life or death switch. *FEBS Lett*, 2000; 466: 6-10.
- [54]. Tsujimoto Y., Gorham J., Cossman J., Jaffe E., Croce CM. The t(14:18) chromosome translocation involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science*, 1985; 229: 1390-1393.
- [55]. Oltvai z., Milliman CL. Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerize *in vivo* with a conserved homolog Bax that accelerate programmed cell death. *Cell*, 1993; 74: 609-619.
- [56]. Murphy KM., Ranganathan V., Farnsworth ML., Kavallaris M., Lock RB. Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug induced apoptosis human tumor cells. *Cell Death Differ*, 2000; 7: 102.
- [57]. Guénat I., Sidote-de Fraisse C., Gaumer S., Mignotte B. Bcl-2 and Hsp27 act different leveles to suppress programmed cell death. *Oncogene*, 1997; 15: 347-360.
- [58]. Antomsson B., Montessuit S., Sanchez B., Martinou JC. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem*, 2001; 276: 11613-11623.
- [59]. Cory S., Huang DC., Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*, 2003; 22: 8590-8607.
- [60]. Belka C., Budach W. Anti-apoptotic Bcl-2 proteins: structure, function and relevance for radiation biology. *Int J Radiat Biol*, 2002; 78: 643-658.
- [61]. Jan JH., Surh YI. Potentiayion of cellular antioxidant capacity by Bcl-2: implications for its antiapoptotic function. *Biochem pharmacol*, 2003; 66: 1371-1379.
- [62]. Kwana T., Mackey MR., Perkins G. Bid, Bax and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*, 2002; 111: 331-342.

[63]. Li H., Shu H., Xu C.J., Yuan J. Cleavage of BID by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 1998; 94: 491-501.

[64]. Vousden KH. *Cell*, 2000; 103: 691-694.

[65]. Hoffman WH., Biade S., Silfou JT., Chen J. and Murphy M. *J Biol Chem*, 2002; 277: 3247-3257.

[66]. Latham KM., Eastman SW., Wong A., Hinds PW. Inhibition of p53-mediated growth arrest by overexpression of cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol*, 1996; 16: 4445.

[67]. Vargas DA., Takahashi S., Ronai Z. Mdm2 a regulator of cell growth and death. *Adv Cancer Res*, 2003; 89: 1-34.

[68]. El-Deiry WS. The role of p53 in chemosensitivity and radiosensitivity. *Oncogene*, 2003; 22: 7486-7495.

[69]. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol*. 2000; 157: 1415-1430.

[70]. Oda E., Ohki R., Murasawa H, Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, 2000; 288: 1053-1058.

[71]. Thompson EB. Apoptosis. *Ann Rev Physiol*, 1998; 60: 533-573.

[72]. Kaufmann SH., Vaux DL. Alterations in the apoptotic machinery and their potential role in anticancer drug resistance. *Oncogene*, 2003; 22: 7414-7430.

[73]. Strasser A., O'Connor L., Dixit V. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*, 2000; 69: 217-245.

[74]. Cotter TG., Lennon SV., Glynn JM., Green DR. Microfilament-disrupting agent the formation of apoptosis bodies in tumor cell undergoing apoptosis. *Cancer Res*, 1992; 52: 997-1005. De Vita T., Helliman S., Rosenberg SA. (ed). *Cancer* (5th edn) Saunders, Philadelphia. 1994.

- [75]. Pedersen AE., Bregenholt S., Johansen B., Claesson MH. MHC-1-induced apoptosis in human B-lymphomas cell is dependent on protein tyrosine and serine/threonine kinases. *Experimental cell Research*, 1999; 251: 128–134.
- [76]. Majno G., Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am J. Pathol*, 1995; 146: 3–15.
- [77]. Kerr JF., Winterford CM., Brian B. Apoptosis its significance in cancer therapy. *Cancer*, 1994; 73: 2013–2026,
- [78]. Yang J., Liu X., Bhalla K. Prevention of apoptosis by bcl-2 release of cytochrome c from mitochondrialblocked. *Science*, 1997; 275: 1129–1132.
- [79]. Krahlting S., Callagen MK., Williamson P., Schlegel RA. Exposure phosphatidylserine is a general feature in the phagocytosis of apoptotic lymphocytes by macrophages. *Cell Death Differ*, 1999; 6: 183–189.
- [80]. Debatin KM., Kramer PH., Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J*, 1998; 17: 1674–1687.
- [81]. Medema JP., Scaffidi C., Kischkel FC., Shevchenko A., Mann M., Kramer PH., Peter M. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J*, 1997; 16: 2794–2804.
- [82]. Adams JM., Cory S. The bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Csience*, 1998; 281: 1322–1326.
- [83]. Yoshida H., Kong YY., Yoshida R., Elia AJ., Hakem A., Hakem R., Penninger JM., Mak TW. Apaf-1 is required for mitochondrial pathway of apoptosis and brain development. *Cell*, 1998; 94: 739–750.
- [84]. Scorrano L., Korsmeyer SJ. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic Bcl-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003; 304: 437–444.

- [85]. Bandala E., Espinosa M., Maldonado V., Melendez-Zajgla J. Inhibitor of apoptosis-1 (IAP-1) expression and apoptosis in non-small-cell lung cancer cell exposed to gemcitabine. *Biochem Pharmacol*, 2001; 62: 13-19.
- [86]. Doll R., Peto R., Wheatley K., Gray R., Sutherland I. Mortality in relation to smoking: 40 years observation on male British doctors, *British Medical J*, 1994; 309: 901-911.
- [87]. Jemal A., Tiwari RC., Murray T. American Cancer Society. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin*, 2004; 54: 8-29.
- [88]. Registro Histopatológico de Neoplasias en México. Secretaría de Salud. 2001.
- [89]. Rivero Serrano O. Neumología. Ed. Trillas, 2a edición, pg 209-217. 1988.
- [90]. Finley R. Lung cancer in *Pharmacotherapy, a pathophysiologic approach*. Di Piro J. Appleton and Lange, 1993; pg: 1958-1967.
- [91]. Rom WN., Hay JG., Lee TC., Jian. Y., Tchou-Wong KM. Molecular and genetic aspects of lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000; 161: 1355-1367.
- [92]. Testa J. Chromosome alterations in human lung cancer, in Mitchell J., Johnson D., Turrisi A. (eds: *Lung Cancer Principles and Practice*. Philadelphia PA, Lippincou-Raven, pg: 55-71. 1996.
- [93]. Merlo A., Gabrielson E., Askin F. Frequent loss of chromosome 9 in human primary non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, 1994; 54: 640-642
- [94]. Wiest J., Franflin W., Otstot J. Identification of a novel region of homozygous deletion on chromosome 9p in squamous cell carcinoma of the lung. The location of a putative tumor suppressor gene. *Cancer Res*, 1997; 57: 1-6.

- [95]. Stahel RA., Zangemeister-Wittke U. Antisense oligonucleotides for cancer therapy—an overview. *Lung Cancer*, 2003; 41: S81-S88.
- [96]. Friedl P., Noble PB., Walton PA., Laird DW., Chauvin PJ., Tabaj RJ., Black M., Zänker KS. Migration of coordinated cell clusters in mesenchymal and epithelial cancer explain *in vitro*. *Cancer Res*, 1995; 55: 4557–4560.
- [97]. Murray RDH., Mendez J., Brown SA. *The National Coumarine*. Chichester: John wiley, 1982.
- [98]. Bell EA., Charlwood BV. *Secondary Plants Products*. Berlin: Julius Springer, 1980: 334–340.
- [99]. Keating G., O’Kennedy R. The chemistry and occurrence of coumarins. *Coumarins: Biology, Applications and Mode of Actions*. 1997; Chapter 2: 23–54.
- [100]. O’Kennedy R., Thornes D. *Coumarins. Biology, Applications, and mode of actions*. Edited by JONH WILEY & SONS. 1997.
- [101]. Lake BG., Evans JG., Walter DG., Price RJ. Studies on the hepatotoxicity and metabolism of coumarin in the rat and Syrian hamster. *Human Exp Toxicol*, 1990; Oral communication: 356.
- [102]. Bourson J., Bourrel M-N., Valeur B. Ion-responsive fluorescent compounds. Part 3. Cation complexation with coumarin 153 linked to monoaza-15-crown-5. *Anal Chim Acta*, 1992; 257: 189-93.
- [103]. Zhou JY., Dauphin C., Hamon M. Utilisation de 7-amino-4-methylcoumarine pour le dosage spectrophotometrique des nitrites. *Ann Pharm Fr*, 1993; 51 (2): 94-100.
- [104]. Chadzaj Jał. Die biologischen Eigenschaften und die pharmakologische Wirkung der cumarine und Furocumarine. *Terpeniidy kumariny Moscou & Leningrad GV Pigulevskij*, 1965: 25-30

- [105]. Thornes RD. Prevention of recurrence of malignant melanoma by coumarin (1,2-benzopirone). *J Irish Coll Phys Surg*, 1993; 22 (suppl): 17-19.
- [106]. Marshall ME., Albainey-Jenei S., Umerani A., Zhao Q. Direct cytotoxic effects of coumarin and 7-hydroxycoumarin human malignant cell lines *in vitro*. *J Irish Coll Phys Surg*, 1993; (Suppl 1): 71-2.
- [107]. Casley-Smith JR. Die Wirkund der Benzopirone beim Lymphödem und bei anderen eiweißreichen Odemen. *Vasomed*, 1994; 6: 232-4.
- [108]. Sutcliffe FA., MacNicholl DA., Gibson G. Aspects of anticoagulant action: a review of the pharmacology, metabolism and toxicology of warfarin and congeners. *Drug Metab Drug Interact*, 1987; 5(4): 225-272.
- [109]. Declan P., Gary J., O'Kennedy R., Thornes RD. Analysis of coumarins. *Coumarins: Biology, Applications and Mode of Actions*. Chapter 12: 277-302. 1997.
- [110]. Cohen AJ. Critical review of the toxicology of coumarins with special reference to interspecies differences in metabolism and hepatotoxic response and their significance to man. *Fd Cosmet Toxicol*, 1979; 17: 277-289.
- [111]. Egan D., O'Kennedy R., Moran E., Cox D., Prosser E., Thornes RD. The pharmacology, metabolism, analysis and applications of coumarins and coumarin-related compounds. *Drug Metab Res*, 1990; 22: 503-529.
- [112]. Miles JS., McLaren AW., Forrester LM., Glancey MJ., Lang MA., Wolf CR. Identification of the human liver cytochrome P450 responsible for coumarin 7-hydroxylase activity. *Biochem J*, 1990; 267: 365-371.
- [113]. Egan DA., O'Kennedy R. Rapid and sensitive determination of coumarin and 7OH-coumarin and its glucuronide conjugate in urine

and plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 1992; 582: 137–143.

[114]. Moran E., O’Kennedy R., Thornes RD. Analysis of coumarin and its urinary metabolites by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 1987; 416: 165–169.

[115]. Cholerton S., Idle ME., Vas A., González FJ., Idle JR. Comparison of a novel thin-layer chromatographic-fluorescence detection method for the determination of 7OH-coumarin in human urine. *J Chromatogr*, 1992; 575: 325–330.

[116]. Merkel U., Sigusch H., Hoffmann A. Grapefruit juice inhibits 7-hydroxylation of coumarin in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*, 1994; 46: 175–177.

[117]. Rautio A., Kraul H., Kojo A., Salmela E. Interindividual variability of coumarin 7-hydroxylation in healthy individuals. *Pharmacogenetics*, 1992; 2: 227–233.

[118]. Sharif S., Lotterer E., Michaelis HC., Bircher J. Pharmacokinetics of coumarin and its metabolites after intravenous and peroral administration of high-dose coumarin in normal human volunteers. *Arch Pharmacol*, 1991; 344: (Suppl) 95.

[119]. Zänker KS., The mode of entry of coumarin into cell and its effects on cell-cell communication and migration. O’Kennedy R., Thornes RD (EDS). *Coumarins Biology. Applications and mode of actions*. Chichester. John Wiley & Sons. Ltd. 1997; cap 6: pg 125–141.

[120]. Hsu L., Zänker KS. Decreased cell growth and expression of p²¹H-ras in RBA cell treated by 7OH-coumarin. *Abstr Coumarin Intracellular Signalling from RAS to Genes*. Iowa State University, 9th MDCB/Symposium: 35. 1994.

[121]. Maucher A., Kager E., von Angeres E. Evaluation of the antitumour activity of coumarin in prostate cancer models. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1993; 119: 150–154.

- [122]. Roskopf F., Kraus J., Franz G. Immunological and anti-tumor effects of coumarin and some derivatives, *Pharmazie*, 1992; 47: 139–142.
- [123]. Marshall ME., Mohler JL., Edmonds K., Williams B., Butler K., Ryles M., Weis L., Urban D., Markiewicz M. An update review of the clinical development of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7OH-coumarin. *J Cancer Res Clinical Oncol*, 1994; 120: 39–42.
- [124]. Myers RB., Parker M., Grizzle WE. The effects of coumarin and suramin on the growth of malignant renal and prostatic cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1994; 120: 11–13.
- [125]. Siegers CP., Bolstelmann HC. Effect of coumarin on cell cycle proliferation in human tumor cell lines. *J Irish Coll Phys Surg*, 1993; 22: 47–50.
- [126]. Zlabinger G., Böhmig G., Rosenkrans A., Stuhlmeier K. Intracellular signalling in coumarin-enhanced IL-1 production induced by lipopolysaccharide. *J Irish Coll Physic Surg*, 1993; 22: 38–43.
- [127]. Marshall ME., Conleey D., Hollingsworth P., Brown S., Thompson JS. Effects of coumarin (1,2-benzopyrone) on lymphocyte natural killer cell and monocyte functions *in vitro*. *J Biol Response Mod*, 1989; 8: 70–85.
- [128]. Kahn J., Preis P., Waldman F., Tseng A. Jr. Coumarin modulated the cell cycle progression of an MTV-Ejras cell line. *J Cancer Res Oncol*, 1994; 120: 19–22.
- [129]. Marshall ME., Kevin K., Benefield C., Umerani A., Albaini-Jensel S., Zhao Q., Khazaeli MB. Growth-inhibitory effects of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7OH-coumarin on human malignant cell lines *in vitro*. *J Cancer Res Clin Oncol. Suppl*, 1991; 120: 3–10.
- [130]. Zänker K. Coumarin(s) interfase between cell growth inhibition expression of oncogenes, tumor cell locomotion and cell to cell communication. *J Irish Phys Surg*, 1993; 22: 51–55.

- [131]. Tsen A., Lee WMF., Kirsten E., Hkam A., McLick J. Buki K., Kun E. Prevention of tumorigenesis of oncogene-transformed rat fibroblasts with DNA site inhibitors of poly(ADP)ribose polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84: 1107–1111.
- [132]. Kelly VP., Ellis EM., Manson M M., Chanas SA., Moffat GJ., McLeod R., Judah DJ., Neal GE., Hayes JD. Chemoprevention of aflatoxin B1 hepatocarcinogenesis by coumarin, a natural benzopyrone that is a potent inducer of aflatoxin B1-aldehyde reductase, the glutathione S-transferase A5 and P1 subunits, and NAD(P)H:quinone oxidoreductase in rat liver. *Cancer Res*, 2000; 60: 957–969.
- [133]. National Toxicology Program Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis of coumarin in F344/N Rats and B6C3F₁ Mice (Gavage Studies). US Department of Health and Human Services. NIH Publication No. 92: 3153. 1992.
- [134]. Sethna S. and Phadke P. *Organic Reactions*, 1953; 7: 20
- [135]. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods*, 1983; 65: 55–63.
- [136]. Chomczynski P., Sacchi N. *Anal Biochem*, 162: 156. 1987.
- [137]. Chomczynski P. *Biothechniques*, 15: 532. 1993.
- [138]. Peterson GL. Determination of total protein. *Methods in Enzymology*, vol. 91: 95–119. 1983.
- [139]. Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 1970; 227: 280–285.
- [140]. Innis MA., Miambo KB., Gelfand DH., Brow MAD. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85: 9436–9440.

- [141]. Kahn S., Yamamoto F., Almoguera C., Winter E., Forrester K., Jordano J., Perucho M. The cK-ras gene and human cancer. *Anticancer Res*, 1987; 7 (4a): 639–652.
- [142]. Kelley MJ., Li S., Harpole DH. Genetic Analysis of the β -Tubulin in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal Cancer Institute*, 2001; Vol 93, No. 24: December 19.
- [143]. Greim H., Filser JG. Risikoabschätzung in der Toxikologie. Voraussetzungen für die Übertragbarkeit von Daten aus dem Tierversuch auf den Menschen. In: Dengler HJ., Mutschler E. Eds. *Fremdstoffmetabolismus und Klinische Pharmakologie*. Stuttgart & Jena:Gustab Fischer, 1994: 141–151.
- [144]. Fentem JH., Fry JR. Species differences in the metabolism and hepatotoxicity of coumarin. *Comp Biochem Physiol*, 1993; 104: 1–8.
- [145]. Chittenden T. BH3 domains: intracellular death-ligands critical for initiating apoptosis. *Cancer Cell*, 2002; 2: 165-166.
- [146]. Rutledge SE., Chin JW., Schepartz A. A view to a kill ligands for Bcl-2 family proteins *Curr Opin Chem Biol*, 2002; 6: 479-485.
- [147]. Coultas L., Strasser A. The rol of the Bcl-2 protein family in cancer. *Semin Cancer Biol*, 2003;13: 115-123.
- [148]. Bentires-Alj M., Dejardin E., Viatour P., Lint CV., Froesch B., Reed JC., Merville M-P, and Bours V. Inhibition of the NF-Kb transcription factor increases Bax expression in cancer cell lines. *Oncogene*, 2001; 20: 2805-2813.
- [149]. Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene*, 2003; 22: 8581-4.
- [150]. Wansel M., Kleine-Kohlbrecher D., Herold S. Akt and 14-3-3eta regulate Miz1 to control cell-cycle-arrest after DNA damage. *Nat Cell Biol*, 2005; 7: 30-41.
- [151]. Alvarez B., Garrido E., Garcia Sanz JA., Carrera AC. Phosphoinositides 3-kinase activation regulates cell division times by

coordinated control of cell mass and cell cycle progression rate. *J Biol Chem*, 2003; 278: 26466-73.

[152]. Shelton JG., Steelman IS., Lee JT. Effects of the RAF/MEK/ERK and P13K/AKT signal transduction pathways on the abrogation of the cytokine-dependence and prevention of apoptosis in hematopoietic cell. *Oncogene*, 2003; 22: 2478-92.

[153]. Nam SY., Jung GA., Hur GC. Upregulation of FLIP(S) BY Akt , a possible inhibition mechanism of TRAIL-induced apoptosis in human gastric cancers. *Cancer Sci*, 2003; 94: 1066-73.

[154]. Zlabinger GJ., Nöhammer C., Böhming GA., Menzel JE. Mode of action of coumarin in immune cell. *J. Cancer Res Clin*, 1994; 128: 17-18.

[155]. Oshita F., Nomura I., Yamada K., Kato Y., Tanaka G., Noda K. Detection of K-ras mutations of bronchoalveolar lavage fluid cell aids the diagnosis of lung cancer in small pulmonary lesion. *Clinical Cancer Res*, 1999; 5: 617-620.

[156]. Newcombe RA., Stockley RW., Hunter JL. and Webb MR. The interaction between Rac 1 and its guanine nucleotide dissociation inhibitor (GDI), monitored by a single fluorescent coumarin attached to GDI. *Biochemistry*, 1999; 38: 6879-6886.

Effects of coumarin and 7OH-coumarin on bcl-2 and Bax expression in two human lung cancer cell lines in vitro

C.M. Elinos-Báez^{a,*}, F. León^b, E. Santos^b

^a Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70228, Ciudad Universitaria, México D.F. 04510, México

^b Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México D.F. 04510, México

Received 19 October 2004; revised 27 March 2005; accepted 19 April 2005

Abstract

Coumarin and its derivative 7-hydroxycoumarin (7-OHC) have antitumor and antimetastatic properties. The purpose of this study was to investigate the possible effects of these compounds on expression of the bcl-2 and Bax oncoproteins in two human lung cancer cell lines, A427 and Calu-1. The cells were cultured in vitro for 24 h in RPMI 1640 with 1.5% (v/v) ethanol, 1.0 mM ethanolic coumarin or 1.0 mM ethanolic 7-OHC. Viability was determined in each cell line by an MTT assay. Total protein was extracted from cell lysates and the bcl-2 and Bax oncoproteins were identified. Western blotting showed a decrease in bcl-2 and an increase in Bax in A427 cells cultured with coumarin or 7-OHC. Neither drug changed bcl-2 expression in Calu-1 cells compared to solvent controls, and Bax expression was only slightly increased by coumarin. We conclude that 7-OHC is a more potent inhibitor of cell proliferation than coumarin and has more marked effects on oncoprotein expression. Also, the A427 cell line was more sensitive to the drugs than Calu-1.

© 2005 International Federation for Cell Biology. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Bcl-2; Bax; Coumarin; 7OH-coumarin

1. Introduction

Coumarins are synthesized by numerous green plant species (Murray et al., 1982) and by some bacteria and fungi, and they have low toxicity in human. Both coumarin and 7-hydroxycoumarin (7-OHC) have antiproliferative effects against malignant cell lines (Cox et al., 1999), so it might be expected that the antiproliferative properties of these drugs would be myelosuppressive in murine and human bone marrow progenitor cells in vivo, but this is not so (Gallicchio et al., 1989). These studies have contributed to our understanding of the biological effects of these molecules. They affect the cell

immune response (Zlabinger, 1997) and act directly on malignant cells reducing tumor size (Kawai et al., 2001), but the biochemical mechanisms involved have not been described in detail. The purpose of the present study was to determine whether 1.0 mM coumarin and 7OH-coumarin (146 µg/ml coumarin or 162 µg/ml 7OH-coumarin) alter the expression of members of the Bcl-2 oncoprotein family, which play a crucial role in regulating survival. The expression of bcl-2 (survival action) and Bax (survival inhibition action) was examined in two human lung cancer cell lines: A427 (adenocarcinoma) and Calu-1 (epidermoid carcinoma).

In Mexico, two forms of pulmonary cancer are most commonly detected; adenocarcinoma (40%) and epidermoid carcinoma (38.4%) (Registro Histopatológico de Neoplasias en México, Secretaría de Salud,

* Corresponding author. Tel./fax: +52 56 22 38 55.

E-mail address: elinos@servidor.unam.mx (C.M. Elinos-Báez).

1997). The 26 kDa membrane protein bcl-2 may extend the life of the cell by blocking free oxygen radicals, inhibiting cytochrome *c* released from mitochondria, and suppressing caspase-9 activation (Yang et al., 1997). This would cause oncogenic mutations to accumulate in the normal cell, which may facilitate carcinogenesis. Overexpression of bcl-2 may also delay the response of tumor cells to applied therapies (Reed et al., 1996; Meyn et al., 1996). Overexpression of Bax, a 23-kDa membrane protein, results in the formation of homodimers and facilitates the production of channels in the outer mitochondrial membrane, and loss of mitochondrial membrane potential that allows cytochrome *c* release. In the cytoplasm, cytochrome *c* binds Apaf-1 in the presence of ATP and activates inductor caspase-9, which in turn activates executor caspases that cleave death substrates, key cytoplasmic and nuclear proteins (Yoshida et al., 1998; Yamaguchi and Wang, 2001). We have studied other coumarins: 3OH-coumarin, 4OH-coumarin, 6OH-coumarin, none of which showed antiproliferative properties in A427 and Calu-1 cell lines.

Coumarins bind non-specifically to cell surface structures like receptors. They function as first messengers, inducing changes in signal transduction pathways involving GTP-binding proteins. Therefore, coumarins are able to mediate modifications of downstream signals leading to growth (e.g., cell-growth inhibition), and possibly decreasing bcl-2 expression. It has been shown that 7-OHC exerts its antiproliferative effect by modulation of the cell cycle (Khan et al., 1994), although the mechanism responsible for this activity has not yet been clarified. Accordingly, our findings indicate that 7-OHC may display antitumor activity by inhibiting progression through the G₀, G₁ and S phases of the cell cycle.

The Bcl-2 family regulates the fate of normal cells and comprises approximately eight members divided into two groups. Group 1 includes bcl-2 and bcl-X_L, which has a survival action; group 2 includes Bax, Bad, Bid and Bak, which has a survival inhibition action (Reed et al., 1996). The susceptibility of a cell to adverse stimuli is determined in most cases by the dimerization of Bcl-2 family proteins through the highly conserved BH1, BH2 and BH3 domains (Sedlak et al., 1995; Zha et al., 1996). The loss of survival inhibition Bax proteins, or overexpression of the proteins that block them, results in resistance to treatment; this was observed by Pezzella et al. (1993) during a study of apoptosis inhibition in non-small cell lung carcinoma.

It has also been reported that an increase in Bax expression sensitizes cells to chemotherapeutic agents (Guo et al., 2000). Our research indicates that reduced bcl-2 expression in A427 cells may free Bax, allowing it to homodimerize and form mitochondrial pores; this was also reported by Ishibashi et al. (1998). There is no clear rationale to explain the resistance of Calu-1 to

coumarin and 7OH-coumarin. Different cell lines may have different cell growth inhibition thresholds with respect to drug-induced activation (Kobayashi et al., 1993).

2. Materials and methods

2.1. Cell lines

Two human lung carcinoma cell lines used were: A427 (adenocarcinoma) ATCC (American Type Culture Collection, MA, USA), isolated from a peripheral tumor (segmented bronchus); and Calu-1 (epidermoid carcinoma), ATCC, obtained from a central tumor (main bronchus). Both were provided by Dr. José Sullivan López, Department of Molecular Biology, National Institute of Respiratory Diseases, Mexico City. For controls we used HeLa cells, which express the Bax oncoprotein, and isolated human peripheral blood lymphocytes from healthy donors, which express the bcl-2 protein.

2.2. Coumarin and 7OH-coumarin

The drugs were synthesized by Dr. Elvira Santos and colleagues, School of Chemistry, National Autonomous University of Mexico, and provided by Juan José Mandoki. The Sethna reaction (Sethna and Phudke, 1953) was used in their synthesis and they were purified by HPLC. They were characterized by spectroscopy, IR and NMR.

2.3. Antibodies

Mouse monoclonal antibodies used were: anti-bcl-2, clone Bcl-2-100; anti-Bax, clone 2D2 (both from Zymed Laboratories, Inc. San Francisco, CA USA); and anti- β -tubulin, clone Tub 2.1 (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA).

2.4. Culture conditions

Cells of each line were cultured in RPMI 1640 supplemented with heat-inactivated fetal bovine serum and maintained at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere until 80–85% confluence was reached. They were harvested using 0.25% trypsin and their viability was determined by Trypan blue exclusion. A427 cells were seeded at a viable density of 1×10^7 in 10 ml RPMI 1640-supplemented medium. The same procedure was followed for Calu-1 cells. Untreated cells of both lines, or cells in 1.5% (v/v) ethanol (solvent), 1.0 mM ethanolic coumarin or 1.0 mM ethanolic 7OH-coumarin, were cultured for 24 h. Each culture was photographed at 200X with a Nikon H-III Power,

FDX-35 inverted microscope to reveal ethanol and drug-induced morphological changes.

2.5. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay

Changes in the number of viable cells were determined by the MTT assay (Mosmann, 1983). Cells were seeded a viable density of 5×10^3 /100 μ l RPMI/well in a 96-well microplate. Untreated cells of both lines, or cells in 1.5% (v/v) ethanol (solvent and control), 1.0 mM ethanolic coumarin or 1.0 mM ethanolic 7OH-coumarin, were cultured for 24 h and the number of viable cells was estimated by adding 20 μ l/well of MTT (5 mg/ml PBS) for 4 h, enabling viable cell mitochondrial succinate dehydrogenase to reduce MTT to purple formazan crystals. The medium was aspirated and 100 μ l DMSO/well was added. Crystals were dissolved in DMSO and the absorbance at 570 nm was measured with an ELISA reader (Bio-Tec Instrum, EL 311). Three separate experiments were conducted, and each was performed in triplicate. Statgraphic software was used to determine probability values (*p*) and statistically significant differences (*). The percentage inhibition of cell viability was measured using the formula:

$$\%IC = \{(1 - \text{cells with drug/cells in solvent})100\}.$$

2.6. Protein isolation

Cells from each culture were lysed to extract total proteins by the TRIzol method (Chomczynski and Sacchi, 1986). Briefly, RNA and DNA were removed from the cell lysates and total proteins were precipitated from the final supernatant by adding 0.2 ml isopropanol per milliliter of TRIzol used initially. The precipitate was washed with 0.2% guanidine in 95% ethanol, then dissolved in 1% SDS and stored at -20°C until it was analyzed.

2.7. Western blot analysis

The total protein concentration was determined by the Petersen method (Peterson, 1983). Samples of total

protein (30 μ g/well) were separated on 10% SDS-PAGE, transferred to nylon membranes (Hybond-C Amersham Life Technologies) and incubated with the first antibody: anti-bcl-2, labeling 26 kDa bands; anti-Bax, labeling 23 kDa bands; or anti- β -tubulin, labeling 55 kDa bands (charge control). The second (antimouse) antibody (tagged with alkaline phosphatase) was added with a 5-bromo-4-chloro-5-indolyl phosphate toluidine nitroblue tetrazolium substrate as a color development reagent (Roche Diagnostics Co., Molecular Biochemical, Indianapolis, IN, USA). The band intensities were quantified by densitometry using RFLP scan software (Scanalytics, v. 2.1, 1994; Scanalytics, a division of CSPIMA, USA). The bcl-2 and Bax band values were normalized to the β -tubulin value (value = 1). Western blotting assays were repeated at least three times and a representative gel is included as Fig. 4. Data in Table 2 indicate the mean and standard deviation of three normalized densitometry values.

3. Results and discussion

3.1. Chemical structures of coumarin

Fig. 1 shows chemical structures of coumarin and 7OH-coumarin. Coumarin and its 7-OHC derivative have been studied for their binding properties to tumor cell membranes *in vitro*, for their ability to induce gap junction communication and for their ability to inhibit cell proliferation in cells dependent on the overexpression of oncogenes. In order to measure the interaction, intact target cells were radioactively labeled with coumarin. Metastatic breast carcinoma cells showed high-affinity binding properties, whereas an adenocarcinoma raised from a human colorectal primary tumor exhibited low affinity to coumarin. The binding properties of coumarin to target cells are enigmatic, possibly due to biological variability (Zänker, 1993). Diffusion of coumarin molecules through the cell is determined by the phospholipid composition of the plasma membrane. Thus, the level of affinity of coumarins for membrane phospholipids constitutes the driving force that allows the entry of coumarins into the cell (Zänker, 1997).

3.2. Morphological effects of coumarin

Fig. 2A shows the untreated A427 cell line culture, while Fig. 2B shows this culture treated with ethanol. In both cases, the cells grew separately, adopting irregular forms with cytoplasmic elongations. Fig. 2C shows the coumarin-treated culture and 2D is the culture treated with 7OH-coumarin. Small, round cells tending to group together were observed in both these cultures and are particularly prevalent in Fig. 2D. No morphological changes were induced by ethanol. Fig. 3A shows

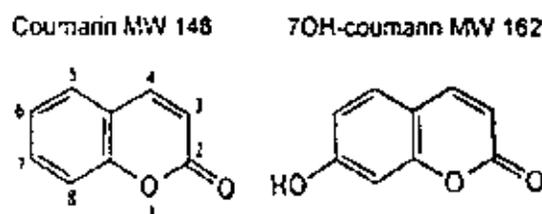


Fig. 1. Chemical structure of coumarin and 7OH-coumarin (7-OHC).

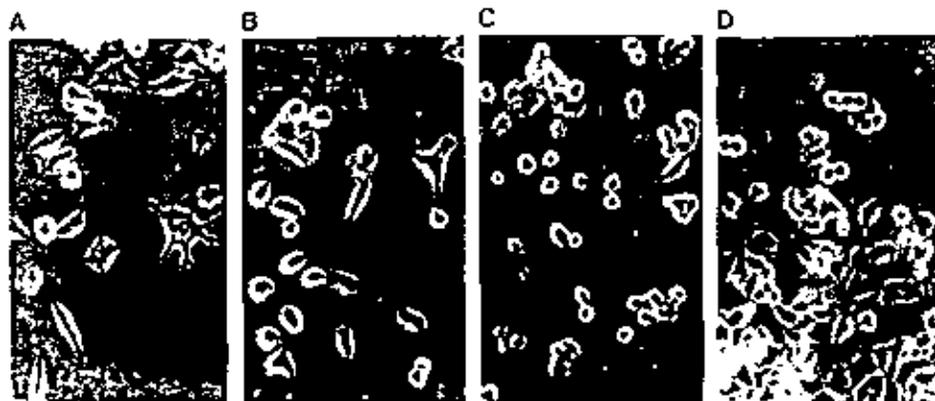


Fig. 2. The effects of coumarin and 7OH-coumarin on the morphology of A427 cells cultured in RPMI 1640 for 24 h: (A) untreated cells; (B) cells treated with 1.5% ethanol (v/v) (solvent); (C) cells treated with 1.0 mM coumarin; and (D) cells treated with 1.0 mM 7OH-coumarin. In (B) a minimal effect of ethanol on the cells is observed, while drug-induced morphological changes can be seen in (C) and (D), more noticeably in (D).

the Calu-1 cell line with no treatment, Fig. 3B with ethanol, Fig. 3C with coumarin and Fig. 3D with 7OH-coumarin. None of these shows evident morphological changes, the cells grew together to form a mosaic that adhered strongly to the culture bottle. The greater effect of the coumarins studied on A427 could be related to specific traits of this cell line and may be indicative of its greater sensibility to the antineoplastic effects of 7-OHC. This effect is particularly of clinical relevance in lung adenocarcinoma with greater incidence of metastasis.

3.3. MTT assay

An MTT assay was performed to determine the inhibition of cell proliferation in the two cell lines cultured for 24 h with 1.0 mM coumarin or 7OH-coumarin, or with 1.5% (v/v) ethanol (solvent control). Table 4 shows the results processed by the Statgraphic

software. Coumarin inhibited A427 cell growth by 14%, while 7OH-coumarin inhibited it by 54% ($***p < 0.001$). The corresponding values for Calu-1 cells were 22% (coumarin) and 30% (7OH-coumarin) ($*p < 0.1$). These results suggest that the A427 cells were more sensitive to both drugs than the Calu-1 cells, and 7-OHC is more active than coumarin, probably due to the HO- group at the 7 carbon position on the benzene.

3.4. Western blot assay

The effects of coumarin, 7OH-coumarin and ethanol (solvent) on bcl-2 and Bax oncoprotein expression after 24 h in the A427 and Calu-1 cultures are shown in Fig. 4. Bcl-2 expression (survival action) was decreased in the A427 cells treated with coumarin and 7-OHC, and Bax expression (survival inhibition action) was slightly increased with coumarin. In the Calu-1 cells treated with

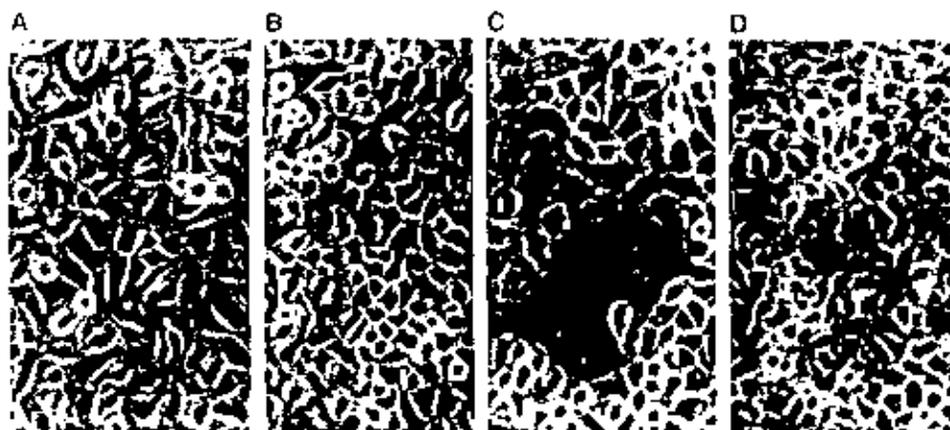


Fig. 3. Effect of coumarin and 7OH-coumarin on morphology of Calu-1 cells cultured in RPMI 1640 for 24 h: (A) untreated cells; (B) cells treated with 1.5% ethanol (v/v) (solvent); (C) cells treated with 1.0 mM coumarin; and (D) cells treated with 1.0 mM 7OH-coumarin. None of these cultures showed evident changes in cell morphology. The cells were strongly attached to the culture bottle, forming a mosaic.

Table 1
Inhibition of proliferation of A427 and Calu-1 cells cultured for 24 h in RPMI 1640 with 1.5% (v/v) ethanol (control), 1.0 mM coumarin or 1.0 mM 7OH-coumarin

Drug	Cell line A427 GI% ± SD	Cell line Calu-1 GI% ± SD
Coumarin	14 ± 0.20*	22 ± 0.14
7OH-coumarin	54 ± 0.13*	30 ± 0.17*

An MTT assay was performed to obtain the growth inhibition percentages (GI%). Values given are means ± SD; $n = 3$. A427 ** $p < 0.001$; Calu-1 * $p < 0.1$. The asterisks indicate statistically significant differences from control (ethanol). Statistical significance was considered at $p < 0.001$ and $p < 0.1$ with a confidence interval of 95% (CI_{95%}).

coumarin, Bcl-2 expression was unchanged and Bax expression was slightly increased in comparison with the control. Three bands of similar molecular weight stained with the bcl-2 antibody and two with the Bax antibody, and their staining intensities were similarly affected by the drug treatments. The multiplicity of bands was due to reading frame displacement during pre-messenger RNA maturation, generating two or three differently sized transcripts that yield oncoproteins with similar molecular weights and properties (Hatanamura et al., 1998). Western blotting assays were repeated at least three times and a representative gel is included as Fig. 4.

The densitometric values for the bcl-2, Bax and β -tubulin bands are given in Table 2; the mean and SD of three normalized bcl-2 and Bax values with respect to



Fig. 4. The effects of coumarin and 7OH-coumarin on the expression of bcl-2 and Bax oncoproteins in A427 and Calu-1 cells cultured for 24 h were analyzed by Western Blotting; ethanol was added to parallel cultures as a control. A427 cells show decreased bcl-2 (26 kDa) (survival action) and increased Bax (23 kDa) (survival inhibition action) in response to both drugs. In contrast, Calu-1 cells show no changes in bcl-2 expression with either drug; Bax increases slightly after treatment with coumarin in comparison with ethanol (control).

β -tubulin (value = 1) are shown. Research in our laboratory indicates that the proliferation capacity of a human adenocarcinoma cell line (A427), overexpressing the bcl-2 oncogene, can be reduced when incubated with 7-OHC and coumarin. Using Western blotting, we have demonstrated with these cells that, when coumarins are present for 24 h in the cell culture medium, the bcl-2 protein is decreased, which raises the intriguing possibility that further intracellular growth signal processing is almost abandoned, leading to inhibition of cell proliferation.

4. Conclusions

The relationship between reduced bcl-2 and high Bax, shown here by Western blotting for the 7OH-coumarin-treated A427 cells, is consistent with the cell-growth inhibition results from the MTT assay (54% for A427 and 30% for Calu-1 treated with 7OH-coumarin) and with the drug-induced morphological changes in the A427 cells. The changes induced by 7OH-coumarin were more marked (Fig. 2). When coumarin enters the body, regardless of the route of administration, it is metabolized in the liver by the CYP2A6 isoform of cytochrome P450. The hydroxylation product, 7OH-coumarin, travels through the bloodstream to act on various organs and tissues. Our results indicate that A427 cells (from a peripheral lung tumor) are more sensitive to these drugs than Calu-1 cells (from a central tumor).

These observations are in agreement with the well-known antiproliferative effect of coumarins on malignant cell lines, decreasing bcl-2 expression and its survival action. There is an urgent need for drugs with minimal side effects but with significant antitumor activity for particular cancers. 7-OHC might be effective in preventing or delaying the formation of metastases; they are candidates for adjuvant treatment strategies to delay metastases. Both coumarin and 7OH-coumarin exhibit low toxicity in normal cells, and their effect on malignant cells recommends them both as chemopreventatives and for use in combined antitumor treatment.

Table 2
Normalization of densitometric values of bcl-2 and Bax oncoproteins with respect to β -tubulin ($n = 3$)

Cell line	bcl-2/ β -tubulin ± SD	Bax/ β -tubulin ± SD
A427 + ethanol	0.997 ± 0.012	0.850 ± 0.027
A427 + coumarin	0.385 ± 0.025	0.915 ± 0.039
A427 + 7 OHC	0.484 ± 0.040	0.921 ± 0.015
Calu-1 + ethanol	0.926 ± 0.029	0.914 ± 0.053
Calu-1 + coumarin	0.993 ± 0.043	0.926 ± 0.016
Calu-1 + 7-OHC	0.757 ± 0.020	0.890 ± 0.019

The band intensities were quantified by densitometry. The bcl-2 and Bax band values were normalized to the β -tubulin value (value = 1).

Acknowledgments

We thank Dr. Dolores Ramirez for comments on the manuscript, José Sullivan López and members of the Pharmacology Laboratory for the generous gift of the A427 and Calu-1 cell lines, Tzipe Govtzensky Zack for help with the RFLP scan software, Julio César Carrero Sánchez for comments on the Spanish manuscript and Victoria Cisneros S. for the English version of this paper.

References

- Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction. *Anal Biochem* 1986;162:156–9.
- Cox D, O'Kennedy R, Thornes RD. The rarity of liver toxicity in patients treated with coumarin (1,2-benzopyrone). *Hum Toxicol* 1989;8:501–6.
- Gallicchio VS, Hulene BC, Marshall ME. Toxicity of coumarin (1,2-benzopyrone) on human peripheral blood mononuclear cells and human and murine bone marrow (GM) progenitor stem cells. *J Biol Res Mod* 1989;8:116–21.
- Guo B, Cao S, Toth K, Azrae RG, Rustum YM. Overexpression of Bax enhances antitumor activity of chemotherapeutic agents in human head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000;6:718–24.
- Hanamura A, Cáceres J, Mayeda A, Franza Jr BR, Krainer AR. Regulated tissue-specific expression of antagonistic pre-mRNA splicing factors. *RNA* 1998;4:430–44.
- Ishibashi Y, Nishimaki K, Asoh S, Nambu-Wakao R, Yamada T, Ohca S. Pore formation domain of human pro-apoptotic Bax induced mammalian apoptosis as well as bacterial death without antagonizing anti-apoptotic factors. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;243:609–16.
- Khan J, Preis P, Waldman F, Tseng Jr A. Coumarin modulates the cell cycle progression of an MTV-EJras cell line. *J Cancer Res Oncol* 1995;120:19–22.
- Kawan S, Tomono Y, Ogawa K, Sugiura M, Yano M, Yoshizawa Y. The antiproliferative effect of coumarins on several cancer cell lines. *Anticancer Res* 2001;21:917–23.
- Kobayashi T, Ruan S, Klodi K, Cliché KO, Shiku H, Andreeff M, et al. Overexpression of Bax gene sensitizes K562 erythroleukemia cell to apoptosis induced by selective chemo-therapeutic agents. *Oncogene* 1998;16:1587–91.
- Meyn RE, Stephens LC, Milas L. Programmed cell death and radioresistance. *Cancer Metastasis Rev* 1996;15:119–31.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: applications to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol* 1983;63:55–63.
- Murray RDH, Méndez J, Brown SA. *The natural coumarins*. Chichester: John Wiley; 1982.
- Peterson GL. Determination of total protein. *Methods Enzymol* 1983;81:95–119.
- Pezzella F, Turley H, Kuzu I, Tungekar MH, Pierce CB, Harris A, et al. Bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma. *N Engl J Med* 1993;329:690–4.
- Reed JC, Miyashita T, Takayama S, Wang HG, Sato T, Krajewski S, et al. Bcl-2 family proteins regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy. *J Cell Biochem* 1996;23–32.
- Sedlak TW, Oltvai ZN, Yank E, Wang K, Boise LH, Thompson CB, et al. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc Natl Acad Sci (Washington)* 1995; 92:7834–8.
- Sethna S, Phadke P. *Org React* 1953;7–20.
- Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J. Prevention of apoptosis by bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997;275:1129–32.
- Yamaguchi H, Wang HG. The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change. *Oncogene* 2001;20:7780–6.
- Yoshida H, Kong YY, Yoshida R, Elia AJ, Hakem R, Penninger JM, et al. Apaf-1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell* 1998;94:739–50.
- Zänker KS. Coumarin(s) interface between cell growth inhibition, expression of oncogenes, tumour cell locomotion and cell-to-cell communication. *Irish Coll Phys Surg* 1993;22:51–5.
- Zänker KS. The mode of entry of coumarin into cell and its effects on cell-cell communication and migration. In: O'Kennedy Richard, editor. *Coumarin biology applications and mode of action*. 1997. p. 126–41 [chapter 6].
- Zha H, Aimé-Sempé C, Sato T, Reed JC. Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2. *J Biol Chem* 1996; 271:7440–4.
- Zlabinger G. Coumarin as an immunomodulator. In: O'Kennedy Richard, Douglas Thornes R, editors. *Coumarins: biology, applications and mode of actions* 1997. p. 111–8 [chapter 5].



IMPRENTA DIGITAL

IMPRENTA "OFFSET" "PLOTEO" TESIS

· Medicina 56, Esq. Medicina
· Copilco Universidad ·
C.P. 04360, Coyoacan, México, D.F.
· TEL: 5659 0009 ·
· imprentedigital@prodigy.net.mx ·

