

103
21



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

CARACTERIZACION DE LA EXPRESION DE
MOLECULAS DE ADHESION, DE LA ADHESION
in vitro DE CELULAS DEL MELANOMA MURINO
5ab1 Y DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO *in vitro*
CON CUMARINA O DERIVADOS
MONOHIDROXILADOS EN AMBOS PROCESOS.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
MARCO ANTONIO VELASCO VELAZQUEZ



MEXICO, D. E.

1997.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente Prof. Juan José Mandoki Weitzner.
Vocal Prof. Ana María Vázquez Álvarez
Secretario Prof. Juan Arcadio Molina Guarneros
1er. suplente Prof. Francisco García Tamayo
2o. suplente Prof. Francisca Pérez Severiano.

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio de Farmacología
Celular. Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina.
U.N.A.M.

Asesor de tema:

M.C. Juan Arcadio Molina Guarneros



Supervisor técnico:

Q.F.B. María Juana García Mondragón.



Sustentante:

Marco Antonio Velasco Velázquez.



TABLA DE CONTENIDOS.

CONTENIDO	PAGINA
ANTECEDENTES.	4
I - El cancer problema prioritario de salud pública.	4
II - Antecedentes de la cumarina y del uso de cumarinas en el tratamiento de neoplasias	4
Productos de biotransformación de la cumarina	6
III -Mecanismos de acción antineoplásica de la cumarina	8
IV -Adhesión celular y moléculas de adhesión	8
Integrinas	9
Superfamilia de las inmunoglobulinas	11
Familia de las proteínas de unión a cartilago	12
V.- Propuestas en este estudio	13
OBJETIVOS.	14
HIPOTESIS.	14
MATERIAL Y METODOS.	15
Cultivo celular	15
Evaluación de la modificación de la proliferación celular.	15
ELISA en célula	16
Ensayos de adhesión	17
Análisis estadístico	18
RESULTADOS.	19
Expresión de moléculas de adhesión	19
Caracterización de las propiedades adherentes del melanoma	20
Efecto de la cumarina y sus derivados monohidroxilados sobre la proliferación celular	21
Efecto de la cumarina y sus derivados monohidroxilados sobre la expresión de moléculas de adhesión	23
Efecto de la cumarina y sus derivados monohidroxilados sobre la adhesión celular	28
DISCUSION.	32
BIBLIOGRAFIA.	35
FOTOGRAFIAS.	40

ANTECEDENTES.

I.-EL CANCER: PROBLEMA PRIORITARIO DE SALUD PUBLICA.

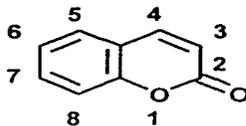
La segunda causa de muerte en México, según las estadísticas de mortalidad de 1995 de la Secretaría de Salud, son los tumores malignos (48,222 casos) En ese año, entre los tumores malignos, los de tráquea, bronquios y pulmones causaron el porcentaje mayor de defunciones 12.38% (5 970 casos), seguidos por los tumores malignos del estómago y cuello del útero (*)

En los Estados Unidos de Norteamérica, en 1995, el número de nuevos casos de carcinoma pulmonar y de melanoma se estimó en 177,000 y en 38,600 respectivamente. El número de defunciones por estas dos causas durante ese periodo fué de aproximadamente 166,000. A pesar de los avances en el tratamiento de la enfermedad, la sobrevida a 5 años para todos los tipos de cáncer de pulmón es de 13% y para el melanoma metastásico es de 16%. En los Estados Unidos el cáncer pulmonar es la causa principal de muerte por cáncer (20%), tanto en hombres, como en mujeres mayores de 35 años de edad (1)

(*) D.G.E.I. Secretaria de Salud

II.-ANTECEDENTES DE LA CUMARINA Y DEL USO DE CUMARINAS EN EL TRATAMIENTO DE NEOPLASIAS.

La cumarina es un producto natural que está presente en diversas plantas como el haba de tonka, el clavo y el trébol dulce. También se encuentra en algunos aceites esenciales como el de lavanda. Vogel, en 1822, aisló la cumarina a partir del haba de tonka (2). Años después, en 1868, fué sintetizada por Perkin (2). Actualmente se han identificado muchos compuestos estructuralmente relacionados con la cumarina que presentan actividad biológica. Químicamente la cumarina es una lactona, la benzo 2A pirona, aunque también se la agrupa dentro del grupo de compuestos llamados flavonoides *Esquema I*



Esquema 1 Estructura química de la cumarina

Por su actividad antipirética y anti-inflamatoria, la cumarina ha sido utilizada en el tratamiento de enfermedades reumáticas. Por estimular la actividad fagocitaria de macrófagos y la actividad de otras células del sistema inmune ha sido utilizada en el tratamiento de infecciones crónicas (brucelosis, mycoplasmosis, toxoplasmosis, fiebre Q) (2). Además la cumarina posee actividad antineoplásica, e inhibe la biotransformación directa de compuestos a sus formas carcinogénicas (3). Actualmente derivados cumarínicos como la warfarina y el dicumarol son utilizados como anticoagulantes. Estos compuestos inhiben la reducción enzimática de la vitamina K. Esta reducción está acoplada a la carboxilación y activación de factores de la coagulación sanguínea.

Los anticoagulantes derivados de la cumarina comenzaron a utilizarse en el tratamiento de neoplasias para prevenir la formación de estroma de fibrina alrededor del tumor. A mediados del presente siglo se describió la asociación de la fibrina con los tumores y se postuló que esta pudiera tener importancia en la producción de metástasis.

Se ha demostrado que compuestos cumarínicos como la warfarina, en combinación con otros tratamientos, alarga al doble la supervivencia de pacientes con carcinoma pulmonar (4). Este compuesto también retarda la evolución de algunos tipos de neoplasias (5). La cumarina ha mostrado actividad antineoplásica *in vivo* en melanomas malignos, (6,7) carcinoma renal metastásico (8) y en carcinoma prostático

(9). En un estudio *in vitro* se observó que la cumarina inhibe el crecimiento de 14 diferentes líneas tumorales humanas (10).

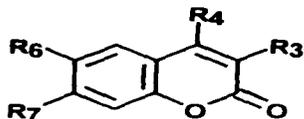
La cumarina, la warfarina y el fenocuprón (otro derivado cumarinico), disminuyen el número de metástasis inducidas en modelos murinos de cáncer experimental (11, 12, 13, 14, 15). A diferencia de la warfarina y el fenocuprón, la cumarina carece de efecto anticoagulante y es poco tóxica. En humanos se han tolerado hasta 7 g diarios con efectos adversos de poca importancia y reversibles al suspender el tratamiento (16).

Productos de biotransformación de la cumarina.

La cumarina es metabolizada por el sistema del citocromo P-450 (isoforma CYP2A6 en humanos) (17), produciendo derivados monohidroxilados. Hay diferencias cuantitativas importantes en las biotransformaciones de la cumarina entre el humano y el ratón. El principal producto de biotransformación de la cumarina en humanos es la 7-hidroxycumarina, en el ratón es la 3-hidroxycumarina (2) *Esquema II, Tabla I*. Se ha propuesto que algunos de los productos de biotransformación de la cumarina pudieran tener una actividad inmunoestimulante, antineoplásica y antimetastásica mayor que la cumarina (18).

La 7-hidroxycumarina, en el rango de concentraciones de 250 a 300 $\mu\text{g/ml}$ (1.7 a 2 mM) inhibe el crecimiento *in vitro* de células del adenocarcinoma pulmonar humano línea A549 (10). Estas células, expresan intensamente el complejo $\alpha 6/\beta 4$ (19), y se adhieren pobremente a fibronectina y laminina, una menor adhesividad a laminina se asocia a una mayor capacidad invasiva de los tumores (20).

En otro estudio *in vitro* se expusieron monocitos humanos a cloricromeno (un derivado cumarinico) durante 1 minuto. Se observó que a concentraciones entre 15 y 30 μM los monocitos muestran menor adhesividad a células de endotelio de vena umbilical. Esta disminución en la adhesividad fue semejante a la producida por un anticuerpo monoclonal dirigido contra la integrina $\beta 2$ (21).



Esquema II. Estructura química de los derivados de la cumarina.

TABLA I

PRODUCTOS DE BIOTRANSFORMACION DE LA CUMARINA

POSICION DEL SUSTITUYENTE	GRUPO FUNCIONAL	DERIVADO CUMARINICO
R ₃ ^a	OH	3-HIDROXICUMARINA
R ₄	OH	4-HIDROXICUMARINA
R ₆	OH	6-HIDROXICUMARINA
R ₇ ^b	OH	7-HIDROXICUMARINA

^a principal producto de biotransformación en ratón.

^b principal producto de biotransformación en humanos.

III.-MECANISMOS DE ACCION ANTINEOPLASICA DE LA CUMARINA.

Contrariamente a lo que se pensó inicialmente, el efecto antineoplásico de derivados cumarínicos no se debe a sus propiedades anticoagulantes. La administración de vitamina K, que antagoniza la acción anticoagulante de derivados cumarínicos como la warfarina, no antagoniza el efecto antineoplásico (12, 23). Además la cumarina tiene actividad antineoplásica y carece de actividad anticoagulante.

Se ha propuesto dos mecanismos participan en la acción antineoplásica de la cumarina 1) inhibe el crecimiento de algunas células tumorales, 2) estimula ciertos componentes del sistema inmune que participan en la reacción contra el tumor (2). Respecto a la acción inmunoestimulante, se ha reportado (23) que la cumarina tiene un efecto sinérgico *in vitro* con endotoxina bacteriana estimulando la secreción de factores solubles (IL-1 β), IL-6).

También se ha reportado que la cumarina impide la duplicación celular por medio de la inhibiendo enzimas que participan en la síntesis de ácidos nucleicos. Enzimas que son inhibidas por la cumarina son: poli (ADPribosil) polimerasa en ratas (24) y topoisomerasa II en humanos (25).

Se desconocen los mecanismos exactos que intervienen en las acciones antineoplásicas de la cumarina y que disminuyen los siguientes procesos: 1) la carcinogénesis; 2) el crecimiento tumoral; 3) la producción de metástasis.

IV.- ADHESION CELULAR Y MOLECULAS DE ADHESION.

La adhesión celular es un proceso fundamental que regula la organogénesis y la diferenciación en organismos procariontes y eucariontes. En la última década se han identificado numerosas glicoproteínas receptoras denominadas moléculas de adhesión celular (CAMs) y moléculas de adhesión a sustrato (SAMs). Estas moléculas sirven de mediadoras en los procesos de adhesión entre células y/o entre células y la matriz extracelular (MEC). Su función y expresión han sido aclaradas mediante anticuerpos monoclonales, ensayos de adhesión célula-célula y célula-sustrato, así como mediante técnicas de cromatografía de afinidad. Se sabe que estas moléculas se expresan

tempranamente durante el desarrollo en la mayoría de las células y posteriormente se siguen expresando en muchos tejidos derivados de las 3 capas germinales (26).

En diferentes modelos se ha demostrado durante la morfogénesis de tejidos la presencia de un repertorio limitado de CAMs y SAMs que se expresan en un patrón espacio-temporal bien definido. La ruptura de este patrón puede explicar, al menos en parte, la pérdida de la arquitectura tisular y la proliferación incontrolada observada en los tumores malignos. Se sabe que las células tumorales se diseminan al perder su capacidad de adhesión respecto a sus células vecinas. Al mismo tiempo expresan moléculas mediante las cuales interaccionan con la lamina basal y la atraviesan (27)

Moléculas de Adhesión.

Se han identificado cuatro familias principales de moléculas de adhesión: cadherinas, selectinas, integrinas y la superfamilia de inmunoglobulinas (28, 29, 30)

El presente estudio se refiere a tres moléculas de adhesión: una integrina, una molécula de la superfamilia de las inmunoglobulinas, y a una glicoproteína de la familia de las proteínas de unión a cartilago. Las familias a las que pertenecen estas moléculas de adhesión tienen gran importancia en el proceso metastásico de tumores

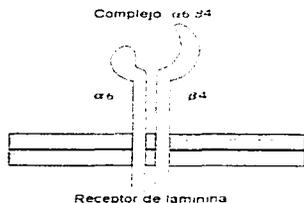
Integrinas.

Estas proteínas, descubiertas hace menos de 10 años, están constituidas por dos subunidades ó cadenas (α y β) asociadas en forma no covalente. A la fecha se conocen por lo menos 15 cadenas α y 8 cadenas β , que se asocian en 21 heterodímeros diferentes (30). Ambas subunidades son glicoproteínas transmembranales y varios dominios de algunas subunidades β interactúan indirectamente con los filamentos de actina del citoesqueleto (31)

Las integrinas se expresan en células epiteliales, en leucocitos y en otros tipos celulares; e intervienen en las interacciones de estas células con el ambiente que las rodea (matriz extracelular u otras células) (32). El patrón de expresión de estas moléculas cambia durante los procesos de cicatrización, inflamación crónica, diferenciación y durante las transformaciones malignas. En cultivos celulares la expresión de integrinas puede ser regulada por factores de crecimiento o por citocinas inflamatorias (33).

Actualmente se sabe que una subunidad α determinada puede expresarse en asociación con cualquiera de las subunidades β . Los complejos heterodiméricos pueden diferir en sus afinidades a diversos ligandos, presentan afinidades diferentes cuando se expresan en diferentes tipos de células (26, 34). Se ha sugerido que el repertorio de integrinas de un tipo celular depende de su origen histológico y su grado de diferenciación (35).

Un miembro de la familia de las integrinas recientemente aislado de células epiteliales humanas, es el receptor de laminina (36). Estructuralmente, este complejo molecular está formado por las subunidades $\alpha 6$ y $\beta 4$. Esta integrina se expresa intensamente en células tumorales murinas de mama y en líneas celulares de carcinomas humanos (37). También se expresa en carcinomas de pulmón humanos y de ratón, en líneas celulares humanas y en tumores sólidos (38). Su expresión aumenta importantemente en células metastásicas (39).



Esquema III Receptor de laminina. La estructura heterodimérica de este complejo es compartida por todas las integrinas

Utilizando anticuerpos monoclonales y técnicas de biología molecular, como sondas de cDNA, se ha demostrado la expresión tanto *in vivo* como *in vitro* de la integrina $\alpha 6/\beta 4$ o receptor de laminina en el carcinoma de pulmón humano y murino, (20). En el carcinoma de Lewis murino de pulmón (LL), la subunidad $\beta 4$ se expresa ampliamente en las células de tumores metastásicos y se encuentra disminuida o ausente en las no metastásicas (20).

El análisis de tejidos provenientes de melanomas malignos ha mostrado un aumento en la expresión de la integrina $\alpha 4/\beta 1$ (VLA-4) en un 40% de los melanomas invasivos y metastásicos (40) Una sobreexpresión de la subunidad $\alpha 2$ en células de rhabdomioma humano se asocia a un incremento de las metástasis *in vivo* (41) En diferentes tipos de carcinoma y aun en diferentes clones de un mismo tipo de carcinoma la expresión de receptores celulares que son afines a las proteínas de la matriz extracelular es diferente (42)

Superfamilia de las inmunoglobulinas.

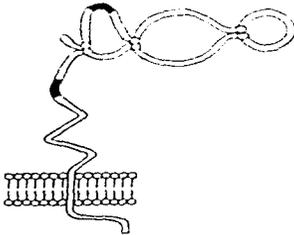
Muchas de las proteínas que intervienen en el reconocimiento célula-célula o célula-sustrato contienen elementos estructurales relacionados entre sí Esto sugiere que los genes que codifican a estas moléculas tienen una historia evolutiva común (27) La superfamilia de las inmunoglobulinas agrupa un gran número de moléculas con múltiples dominios semejantes a los de los anticuerpos, que consisten en una secuencia primaria de 60 a 70 aminoácidos codificados por discretos exones (30)

Por la especificidad de sus enlaces en la adhesión célula-célula y célula-sustrato se atribuye gran importancia a este grupo de moléculas de adhesión en el proceso de metástasis y en la invasión de tumores El antígeno carcinoembrionario, una proteína oncofetal que pertenece a esta superfamilia, es mediadora de la agregación homotípica en líneas celulares de carcinoma de colon (43) Este antígeno también actúa como una molécula de adhesión accesoria en el enlace célula-matriz (44)

La molécula intercelular de adhesión (ICAM-1), se enlaza a la integrina $\alpha L/\beta 2$ (LFA-1) haciendo posible la migración de los leucocitos (45) ICAM-1 se expresa débilmente en el endotelio no activado, pero su expresión se incrementa fuertemente después de la exposición durante varias horas a IL-1 β , TNF α , o interferon γ (45) Un aumento en la expresión de la molécula intercelular de adhesión se ha correlacionado con el desarrollo de melanomas y su tendencia a producir metástasis (46) En otros tumores se ha observado una diferencia en la expresión de ICAM-1 entre los tumores primarios y sus metástasis (47)

Familia de las proteínas de unión a cartilago.

La molécula CD44 es una glicoproteína de membrana que pertenece a la familia de las proteínas de unión a cartilago *Esquema IV* Se conocen varias isoformas generadas por "splicing" de un gene que contiene 19 ó 20 exones (30) Este antígeno está presente en fibroblastos, macrófagos, células de la médula osea de la serie granulocítica y algunas líneas tumorales Se expresa en altas densidades en la superficie celular de linfocitos humanos (48)



Esquema IV. Estructura secundaria de la molécula CD44, de la familia de proteínas de unión a cartilago Propuesta por Zhong (52)

CD44 participa en el reclutamiento de linfocitos, en la activación de células T y es mediador de la adhesión por interacción con su ligando ácido hialurónico (HA) (49, 50) También puede interactuar con las moléculas de matriz extracelular como colágena tipo I, laminina y fibronectina (30)

Variantes de melanoma maligno humano que expresan gran número de moléculas CD44 muestran una mayor capacidad para adherirse a hialuronato Debido a esto producen numerosas metástasis a pulmón, donde hay una gran cantidad de este sustrato (39) En cambio aquellas clonas que expresan menor número de moléculas CD44, presentan una menor movilidad y producen menor número de metástasis (39) Esta correlación también ha sido observada en carcinomas de colon y de mama (51)

Se desconoce el mecanismo por el cual algunas isoformas de CD44 promueven la producción de metástasis. Se ha especulado que la expresión de esta molécula en

las células tumorales promueve su entrada y permanencia en los ganglios linfáticos, y su posterior migración (26)

V.-PROPUESTAS EN ESTE ESTUDIO

Las células tumorales presentan como signos característicos, una expresión de diversas glicoproteínas aberrantes (antígenos asociados a tumores), ó un patrón de expresión molecular alterado en su superficie. Esto puede conducir a alteraciones en los mecanismos de reconocimiento que median la adhesión célula-célula ó célula-sustrato. Como resultado, la diseminación de las células tumorales puede incrementarse, dando lugar a metástasis. En la presente investigación se estudian tres moléculas de adhesión: 1) la integrina LFA-1, 2) la molécula ICAM-1, de la superfamilia de las inmunoglobulinas, 3) la glicoproteína CD44 de la familia de las proteínas de unión a cartilago. Estas moléculas tienen importancia en el proceso metastásico de tumores. Basados en estos antecedentes se propone en este estudio:

- 1) Caracterizar en células del melanoma murino B16-F10/5ab1 el patrón de expresión de las tres moléculas de adhesión mencionadas
- 2) Caracterizar la conducta adherente heterotípica célula-sustrato de esta línea celular.
- 3) Determinar si es posible modificar farmacológicamente estos patrones con cumarina ó productos de biotransformación monohidroxilados de la cumarina.

OBJETIVOS.

El presente estudio pretende determinar si existe modificación farmacológica *in vitro* por cumarina y cuatro de sus derivados monohidroxilados (productos de biotransformación), en células de la clona 5ab1 de la sublínea de melanoma murino B16-F10, productoras de metástasis pulmonares. Las modificaciones estudiadas fueron:

- 1 -En la expresión de LFA-1 (integrina $\alpha L/\beta 2$), ICAM-1 (CD54 de la superfamilia de las inmunoglobulinas) y CD44 (proteína de la familia de las moléculas de unión a cartilago)
- 2 -En la capacidad de adhesión a moléculas de la matriz extracelular (hialuronato y colágena porcina tipo I)

HIPOTESIS.

La cumarina y cuatro de sus productos de biotransformación (derivados monohidroxilados) producen la disminución de la expresión de 3 moléculas de adhesión en la superficie celular del melanoma en estudio.

Como consecuencia de esta acción farmacológica las células disminuyen su capacidad adherente a moléculas de la matriz extracelular (hialuronato y colágena tipo I). Estas moléculas de MEC están presentes en los tejidos en donde predominantemente aparecen metástasis de estos tumores. La disminución de la capacidad adherente puede ser uno de los mecanismos mediante los cuales el tratamiento *in vivo* con cumarinas disminuyen el número de metástasis espontáneas.

MATERIAL Y METODOS.

Cultivo celular:

Se utilizaron células de la clona 5ab1 de la sublinea de melanoma murino B16-F10 *Fotografía 1*, provenientes de ratones singénicos C57BL/6 que generosamente nos proporcionó el Dr Guillermo Alfaro, investigador del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U N A M. Estas células se cultivaron en botellas para cultivo celular de 80 cm² de área (Nunc) en un volumen total de medio de 15 ml hasta obtener una monocapa confluyente. El medio de cultivo utilizado fue medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor (SIGMA), 1% de aminoácidos no esenciales, 1 mM de piruvato de sodio, estreptomicina (100 µg/ml) y penicilina sódica cristalina (100 U I /ml). Las incubaciones se llevaron a cabo a una temperatura de 37^o C en atmósfera con 5% de CO₂. Las células fueron sincronizadas en medio sin suero durante las 24 horas previas al bioensayo. Posteriormente las células se despegaron de las botellas de cultivo decantando el medio, lavando con PBS 15 mM NaCl pH 7.2 y exponiéndolas a tripsina al 0.25% (Gibco). Las células se contaron en hematocitómetro y se evaluó la viabilidad por la exclusión de azul tripan, siendo esta mayor o igual al 95%.

Evaluación de la modificación de la proliferación celular por los compuestos cumarínicos.

Se sembraron las células en placas estériles de 96 pozos (Delta Nunc) a una densidad de 2.5×10^4 células/pozo, por sextuplicado. El rango de concentraciones varió en progresión geométrica base 2 entre 5 y 300 µg/ml (29 µM a 1.85 mM) de 3-, 4-, 6-, y 7-monohidroxycumarinas. La 6-hidroxycumarina se estudió a concentraciones entre 0.8 y 50 µg/ml (5 a 308 µM) debido a su menor solubilidad en etanol. Para todas las cumarinas el tiempo de exposición fue de 24 horas. Las células control fueron expuestas sólo al disolvente del fármaco (etanol).

Después de la exposición a los fármacos se evaluó el efecto de estos sobre la proliferación celular mediante el ensayo colorimétrico de reducción de Metiltetrazolio (MTT) (53) *Fotografía 2*

ELISA en célula.

Se sembraron las células en placas estériles de 96 pozos (Delta Nunc) a una densidad de 2.5×10^4 células/pozo, por sextuplicado. Para los ensayos de expresión de CAMs se hicieron diluciones a la mitad a partir de esa concentración y se utilizaron como control negativo pozos sin células.

En los tratamientos con cumarinas se utilizaron las mismas concentraciones que para los ensayos de proliferación con un tiempo de exposición de 24 horas. Se utilizó como grupo control células tratadas con el disolvente del fármaco (etanol) y como control negativo pozos sin células.

Después de los tratamientos, las células fueron fijadas a 4°C durante 30 minutos con glutaraldehído al 0.05% en amortiguador de fosfato salina 15 mM, pH 7.2 (PBS), se "bloquearon" los pozos con 150 μl /pozo albúmina bovina fracción V al 1% en amortiguador de carbonatos 0.1M, pH 9.6 durante toda la noche a 4°C .

Mediante la técnica inmunoenzimática ELISA en célula (54), se identificó y cuantificó la expresión de CD54 (ICAM-1) empleando un anticuerpo monoclonal anti ratón hecho en hamster (clona 3E2 Pharmingen), diluido 1:400 en PBS. Este anticuerpo se incubó durante tres horas a temperatura ambiente. El segundo anticuerpo utilizado fue monoclonal anti IgG de hamster producido en ratón 1:5000 (Sigma) durante dos horas. El tercer anticuerpo agregado fue policlonal de cabra conjugado a peroxidasa anti Fab de ratón 1:2000 (Sigma) incubado durante una hora. Para identificar CD11a (cadena α_L de LFA-1), y CD44 se emplearon anticuerpos monoclonales de rata anti-CD11a (clona M17/4 Pharmingen) y anti-CD44 (sobrenadante del hibridoma NIM/R8 que fue un generoso obsequio del Dr. Leopoldo Santos Argumedo, Investigador del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV IPN), diluidos 1:400 en PBS. El correspondiente anticuerpo se incubó durante tres horas a temperatura ambiente. El segundo anticuerpo utilizado fue un anticuerpo anti rata-biotinilado producido en cabra (Sigma) 1:20,000 durante dos horas. Se hizo una última incubación con Extravidina-Peroxidasa 1:2000 (Sigma) durante una hora a temperatura ambiente.

En todos los casos se lavó extensamente la placa y se agregó ortofenilendiamina 2mM en amortiguador de citrato/fosfato pH 5.5 y, como sustrato, peróxido de hidrógeno 15 mM, se detuvo la reacción con 50 μl de H_2SO_4 2M y se leyó en un lector de

microplacas Biotek EL311 a una longitud de 490 nm con un filtro de referencia de 630 nm.

Ensayos de adhesión.

Para determinar la adhesión celular se utilizó una versión modificada del ensayo propuesto por Miyake (49) En estos ensayos se utilizaron como sustratos colágena porcina tipo I, por ser una molécula presente en grandes cantidades en la matriz extracelular (MEC) y que sirve como ligando a varias moléculas de adhesión de familias diferentes. El ácido hialurónico (otra molécula de MEC) de cordón de vena umbilical humana, se utilizó por ser el ligando específico de la molécula CD44.

Para estos ensayos las células se sembraron a una densidad de 4×10^4 células/pozo y se expusieron a los fármacos en las condiciones descritas anteriormente, se retiró el medio, se expusieron por 6 minutos a una solución de tripsina al 0.25% (Gibco), y se lavaron para después transferir la células a placas Maxisorp (Nunc) de 96 pozos que se habían cubierto, durante toda la noche, con $2 \mu\text{g/pozo}$ de colágena porcina tipo I ó $200 \mu\text{g/pozo}$ de hialuronato sódico, ambos disueltos en PBS.

Para determinar el tiempo de incubación en los ensayos de adhesión, se realizaron para ambos sustratos cinéticas de adhesión evaluando el número de células adheridas a diferentes tiempos de incubación (se utilizaron células sin tratamiento) Para las placas cubiertas con colágena esta evaluación se hizo fijando las células adheridas con formaldehído al 3 % por 15 minutos. Estas células se expusieron durante toda la noche a una solución al 0.5 % de azul de toluidina para después cuantificar la absorbancia que presentaban a una longitud de onda de 630 nm (55) En el caso de las placas recubiertas con hialuronato se realizó un ensayo equivalente en el que el número de células adheridas se determinó mediante la reducción de MTT a formazán de MTT (53).

Con base en los resultados obtenidos las células que habían sido previamente tratadas con cumarinas se incubaron, en medio sin suero con albúmina bovina al 1 %, durante 3 horas para la evaluación de la adhesión a colágena tipo I y 75 minutos en el mismo medio, para los ensayos con ácido hialurónico. Posteriormente las células no adheridas se removieron con un lavado y se cuantificó el resto colorimétricamente mediante la reducción de MTT (53).

Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó con el programa SigmaStat F. W. V. 2.0. Para comparar los grupos tratados con el grupo control se utilizó la prueba t de Student con p corregida por el método de Bonferroni (56) para los grupos presentaban una distribución normal. Se utilizó la prueba de Dunn de comparación de rangos para los grupos que no presentaban una distribución normal. En todos los casos el nivel de significancia se estableció en $\alpha < 0.05$. Los datos obtenidos se graficaron en el programa SigmaPlot F:W V 3.0 de Jandel Scientific.

RESULTADOS.

Expresión de moléculas de adhesión celular (CAMs).

En la línea celular de melanoma murino B16/5ab1 se identificó la expresión constitutiva de las siguientes moléculas

- 1) De la integrina LFA-1, evaluando la expresión de la subunidad α L (CD11a) de esta proteína
- 2) De la molécula intercelular de adhesión 1 (ICAM-1 ó CD54), proteína de la superfamilia de inmunoglobulinas.
- 3) De la glicoproteína CD44 de la familia de proteínas de unión a cartilago.

Se observó una relación directamente proporcional entre el número de células y la absorbancia registrada con la técnica que se describe en Material y Métodos *Figura 1.*

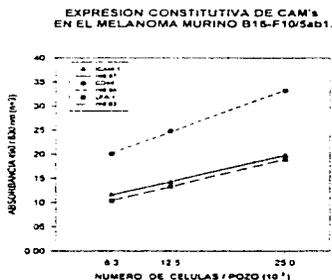


Figura 1. Detección, mediante Elisa en célula, de tres moléculas de adhesión en diferente número de células

Caracterización de las propiedades adherentes de células del melanoma murino B16-F10/5ab1.

La cinética de adhesión de células del melanoma a colágena tipo I muestran que se requieren tres horas para que se adhiera el mayor número de células *Figura 2*

Cuando se utiliza hialuronato como sustrato para la adhesión celular, sólo se requieren 75 minutos para que el número de células adheridas sea máximo *Figura 3*

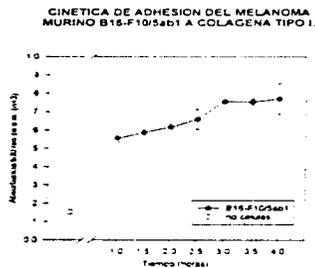


Figura 2. Evaluación de la adhesión celular a colágena porcina tipo I, mediante tinción con azul de toluidina, a diferentes tiempos de incubación.

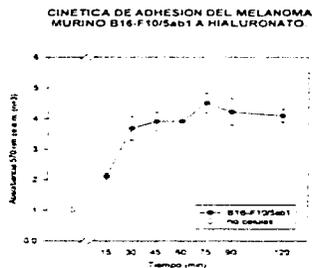


Figura 3. Evaluación de la adhesión celular a hialuronato, mediante la reducción de MTT, a diferentes tiempos de incubación.

Efecto de la cumarina y sus derivados monohidroxilados sobre la proliferación celular.

La cumarina no afectó la proliferación de las células del melanoma murino B16-F10/5ab1, en el rango de concentraciones de 5 a 300 µg/ml, con una exposición de 24 horas. (No se presentan resultados)

La 3-hidroxicumarina mostró un efecto citostático en las células del melanoma. En concentraciones de 150 y 300 µg/ml disminuyó la proliferación celular en un 40 y 60 % respectivamente. *Figura 4a*

La 4 hidroxicumarina, a la concentración de 300 µg/ml, disminuyó ligeramente la proliferación de esta línea celular, mostrando una diferencia entre las medias de tratamiento y control del 9 %. *Figura 4b*

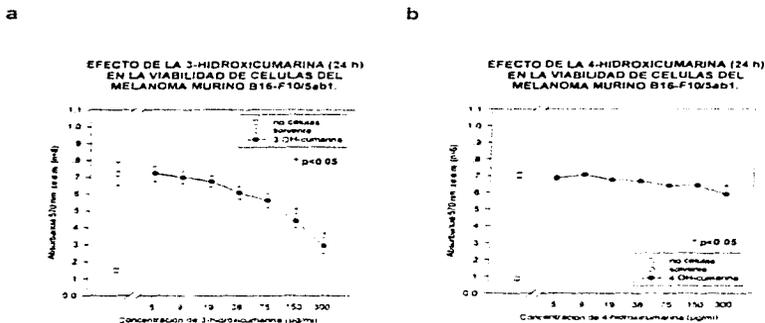
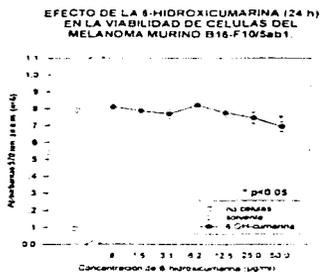


Figura 4. Evaluación de la proliferación celular mediante la reducción de MTT, posterior al tratamiento por 24 horas con (a) 3 OH-cumarina (b) 4 OH-cumarina. En ambos casos se utilizaron células tratadas con el disolvente de los fármacos como control y pozos sin células como control negativo.

La 6 hidroxycumarina, a la concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$, disminuyó en un 12 %, la proliferación de las células del melanoma. *Figura 5a*.

La 7 hidroxycumarina presentó efecto citostático en las células del melanoma a la concentración de 300 $\mu\text{g/ml}$. A dicha concentración, la proliferación disminuyó 20 %. *Figura 5b*.

a



b

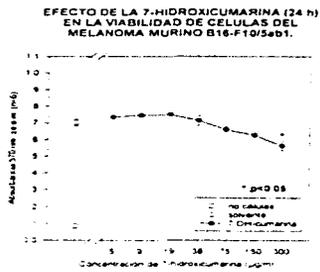


Figura 5. Evaluación de la proliferación celular mediante la reducción de MTT, posterior al tratamiento por 24 horas con (a) 6 OH-cumarina (b) 7 OH-cumarina. En ambos casos se utilizaron células tratadas con el disolvente de los fármacos como control y pozos sin células como control negativo.

Efecto de la cumarina y sus derivados monohidroxiados sobre la expresión de moléculas de adhesión.

LFA-1.

La cumarina no afectó significativamente la expresión de la integrina LFA-1 a ninguna de las concentraciones estudiadas (No se presentan resultados).

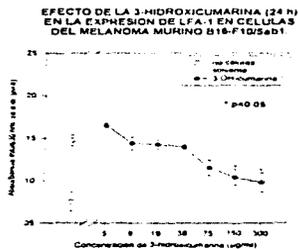
La 3-hidroxicumarina inhibió la expresión de LFA-1 a las concentraciones de 150 y 300 $\mu\text{g/ml}$. Este efecto es, posiblemente, consecuencia de la disminución en la proliferación celular que este compuesto provoca *Figura 6a*

La 4-hidroxicumarina estimuló e inhibió la expresión de la integrina LFA-1. Estimuló la expresión de LFA-1 en un 25 % a la concentración de 38 $\mu\text{g/ml}$, disminuyó la expresión de dicha proteína en la misma proporción a 300 $\mu\text{g/ml}$. *Figura 6b*.

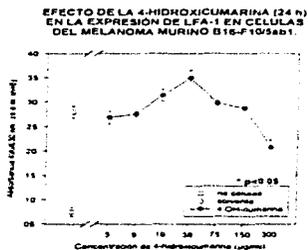
La 6-hidroxicumarina disminuyó la expresión de LFA-1 en un 25 % en el rango de concentraciones entre 1.6 y 6.2 $\mu\text{g/ml}$. A concentraciones mayores no se observó efecto significativo. *Figura 6c*.

La 7-hidroxicumarina a la concentración de 300 $\mu\text{g/ml}$ muestra una inhibición en la expresión de la integrina LFA-1, lo cual puede deberse a la disminución en la proliferación celular provocada por este compuesto. *Figura 6d*.

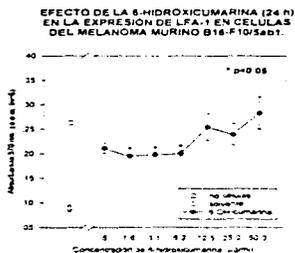
a



b



c



d

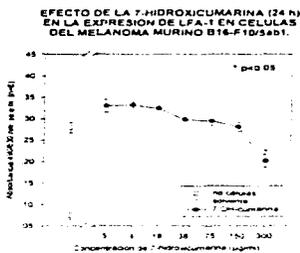


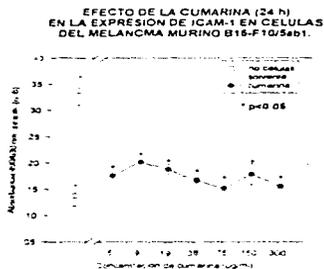
Figura 6. Evaluación de la expresión de LFA-1 mediante ELISA en célula, posterior al tratamiento por 24 horas con (a) 3 OH-cumarina (b) 4 OH-cumarina (c) 6 OH-cumarina (d) 7 OH-cumarina. En todos los casos se utilizaron células tratadas con el disolvente de los fármacos como control y pozos sin células como control negativo.

ICAM-1.

La cumarina inhibió la expresión de la proteína ICAM-1. Disminuye significativamente la expresión de ICAM-1 en forma independiente a la concentración en el rango de 5 a 300 $\mu\text{g/ml}$. La diferencia entre las medianas fluctúa entre un 40 y un 50 % para todas las concentraciones. *Figura 7a*.

La 3-hidroxycumarina inhibió la expresión de ICAM-1 en 25 % en el rango de concentraciones entre 9 y 300 $\mu\text{g/ml}$. Este efecto no depende de la concentración pues es similar para todas las concentraciones dentro del rango mencionado. *Figura 7b*.

a



b

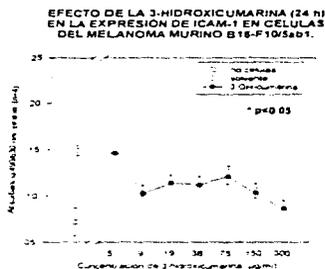


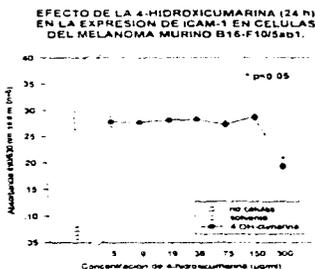
Figura 7. Evaluación de la expresión de ICAM-1 mediante ELISA en célula, posterior al tratamiento por 24 horas con (a) cumarina (b) 3 OH-cumarina. En ambos casos se utilizaron células tratadas con el disolvente de los fármacos como control y pozos sin células como control negativo.

La 4-hidroxycumarina sólo afecta la expresión de ICAM-1 a la concentración de 300 $\mu\text{g/ml}$. *Figura 8a*

La 6-hidroxicumarina disminuyó significativamente la expresión de ICAM-1. Este efecto depende de la concentración, pues las concentraciones más bajas (0.8 y 1.6 µg/ml) no presentan diferencias significativas con el control, sin embargo el rango de concentraciones de 3.0 a 50 µg/ml disminuyen un desde un 45 % hasta un 55 % la expresión dicha proteína. *Figura 8b*.

La 7-hidroxicumarina, a la concentración de 300 µg/ml, provoca una disminución en la expresión de ICAM-1. A esta concentración de 7-hidroxicumarina se observó efecto citostático. El resto de las concentraciones no tienen efecto sobre la expresión de ICAM-1. (No se presentan resultados).

a



b

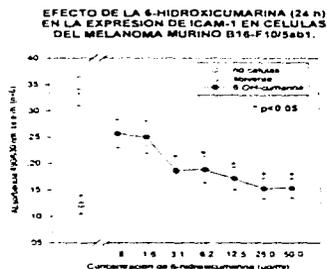


Figura 8. Evaluación de la expresión de ICAM-1 mediante ELISA en célula, posterior al tratamiento por 24 horas con (a) 4 OH-cumarina (b) 6 OH-cumarina. En ambos casos se utilizaron células tratadas con el disolvente de los fármacos como control y pozos sin células como control negativo.

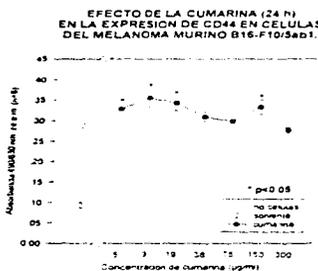
CD44.

La cumarina estimuló la expresión de CD44. Aumenta significativamente la expresión de esta glicoproteína a las concentraciones de 5, 9, 19 y 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$. El incremento en la expresión fluctúa entre el 10 y el 20 %. *Figura 9a*.

La 4-hidroxicumarina, a la concentración de 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$, estimuló en un 15 % la expresión de CD44. *Figura 9b*

Las 3-, 6-, y 7- hidroxicumarinas no afectaron significativamente la expresión de la molécula CD44 en la superficie de las células del melanoma (No se presentan resultados).

a



b

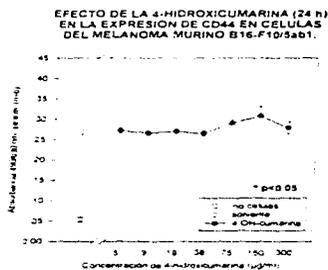


Figura 9. Evaluación de la expresión de CD44 mediante ELISA en célula, posterior al tratamiento por 24 horas con (a) cumarina (b) 4 OH-cumarina. En ambos casos se utilizaron células tratadas con el disolvente de los fármacos como control y pozos sin células como control negativo

Efecto de la cumarina y sus derivados monohidroxilados sobre la adhesión a moléculas de matriz extracelular.

Adhesión a colágena tipo I.

La cumanna no afectó significativamente la adhesión a colágena porcina tipo I a ninguna de las concentraciones estudiadas (No se presentan resultados).

La 4-hidroxycumarina estimuló la adhesión celular a colágena tipo I. La concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ incrementa la adhesión 65 %; mientras que las de 9 y 19 $\mu\text{g/ml}$ lo hacen en aproximadamente 50 % *Figura 10a*

La 7-hidroxycumarina inhibió la adhesión a colágena en el rango de concentraciones entre 9 y 300 $\mu\text{g/ml}$. La disminución en la media de los grupos tratados es de 35 a 40 % para las concentraciones de 9 a 150 $\mu\text{g/ml}$. A la concentración de 300 $\mu\text{g/ml}$ se observó un mayor efecto inhibitorio, sin embargo ya se ha discutido que esta concentración tiene efecto citostático *Figura 10b*.

No se observaron diferencias significativas en la adhesión a colágena tipo I ni con la 3-hidroxycumarina ni con la 6-hidroxycumarina. (No se presentan resultados).

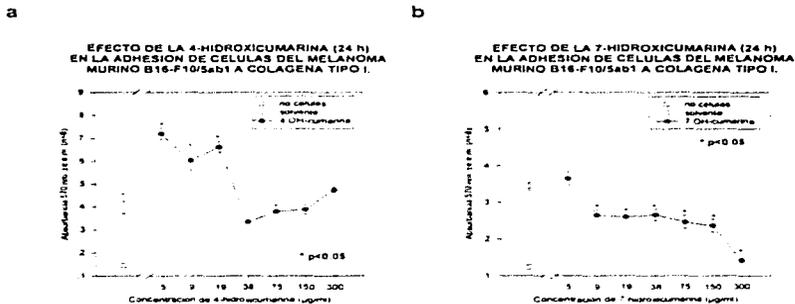


Figura 10 Evaluación de la adhesión celular a colágeno porcino tipo I mediante la reducción de MTT, posterior al tratamiento por 24 horas con (a) 4 OH-cumarina (b) 7 OH-cumarina. En ambos casos se utilizaron células tratadas con el disolvente de los fármacos como control y pozos sin células como control negativo.

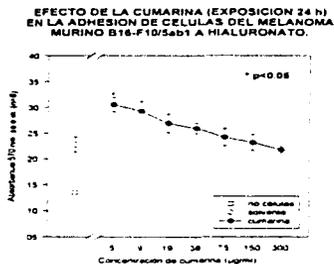
Adhesión a hialuronato.

La cumarina incrementó la adhesión a hialuronato en un 30 % aproximadamente a las concentraciones de 5 y 9 µg/ml. El resto de las concentraciones no afectó la adhesión. *Figura 11a*.

La 3-hidroxicumarina no produjo modificaciones significativas en la adhesión celular a hialuronato. (No se presentan resultados)

La 4-hidroxicumarina, a las concentraciones de 5 y 38 µg/ml, estimuló en un 17% la adhesión a hialuronato. La concentración de 300 µg/ml inhibe la adhesión. *Figura 11b*.

a



b

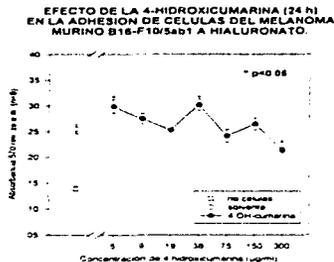


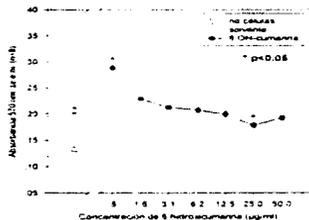
Figura 11. Evaluación de la adhesión celular a hialuronato mediante la reducción de MTT, posterior al tratamiento por 24 horas con (a) cumarina (b) 4 OH-cumarina. En ambos casos se utilizaron células tratadas con el disolvente de los fármacos como control y pozos sin células como control negativo.

La 6-hidroxicumarina, a la concentración de 0.8 µg/ml, incrementó notablemente (40 %) la adhesión a hialuronato. Por otro lado la concentración de 25 µg/ml provocó que la adhesión a dicho sustrato disminuya en un 14 %. *Figura 12a.*

La 7-hidroxicumarina estimuló la adhesión de las células del melanoma a hialuronato. La concentración de 5 µg/ml incrementó en un 40 % la adhesión respecto al control; las concentraciones de 9 y 300 la incrementaron en 20 %. *Figura 12b.*

a

**EFFECTO DE LA 6-HIDROXICUMARINA (24 h)
EN LA ADHESIÓN DE CELULAS DEL MELANOMA
MURINO B16-F105ab1 A HIALURONATO.**



b

**EFFECTO DE LA 7-HIDROXICUMARINA (24 h)
EN LA ADHESIÓN DE CELULAS DEL MELANOMA
MURINO B16-F105ab1 A HIALURONATO.**

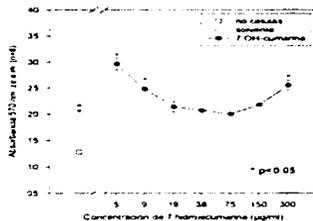


Figura 12. Evaluación de la adhesión celular a hialuronato mediante la reducción de MTT, posterior al tratamiento por 24 horas con (a) 6 OH-cumarina (b) 7 OH-cumarina. En ambos casos se utilizaron células tratadas con el disolvente de los fármacos como control y pozos sin células como control negativo.

DISCUSION

Los resultados obtenidos muestran que la línea celular de melanoma murino B16-F10/5ab1 expresa constitutivamente (sin inductores presentes) las moléculas de adhesión LFA-1 (integrina α L β 2), ICAM-1 (proteína de la superfamilia de las inmunoglobulinas CD54) y CD44 (de la familia de proteínas de unión a cartilago). La expresión de LFA-1 en esta línea celular no ha sido reportada, mientras que los resultados de la expresión de ICAM-1 y CD44 coinciden con lo reportado en la literatura (46, 42). Para este estudio se logró implementar una metodología para estudiar el proceso de adhesión célula-sustrato que no requiere de radioisotopos ni de equipo de alto costo.

Los resultados del presente trabajo demuestran que los derivados cumarínicos actúan de manera directa sobre la expresión de moléculas de adhesión, independientemente de que puedan tener actividad inmunomoduladora (2). La acción farmacológica de estos compuestos puede incrementar la expresión de CAMs (cumarina sobre la expresión de CD44, 4-hidroxycumarina sobre la expresión de LFA-1), o puede disminuir la expresión de las mismas (cumarina y 6-hidroxycumarina sobre la expresión de ICAM-1). Esto sugiere que la cumarina y sus derivados monohidroxilados pueden tener propiedades reguladoras de la expresión de estas moléculas de adhesión. Cabe resaltar que un mismo fármaco puede producir ambos efectos, ya sea sobre la misma molécula de adhesión (4-hidroxycumarina sobre la expresión de LFA-1) o sobre moléculas diferentes (cumarina). Esto significa que la acción de diferentes hidroxycumarinas tiene diferentes efectos sobre la expresión de moléculas de adhesión. En algunos casos, diferentes concentraciones de una misma cumarina producen efectos diferentes. Se ha reportado que la cumarina incrementa *in vitro* la expresión de los antígenos DR y DQ en células mononucleadas humanas de sangre periférica (57), lo cual muestra que también otras moléculas de superficie pueden verse modificadas por la acción de compuestos cumarínicos.

Es importante señalar que, en la mayoría de los casos en los que se produce acción farmacológica, esta no varía con la concentración, dentro del rango estudiado.

Efectos máximos de las cumarinas sobre la expresión de moléculas de adhesión pueden producirse a concentraciones que distan mucho de ser citostáticas.

En la adhesión célula-sustrato, se observa que la cumarina y las 4-, 6-, y 7-hidroxicumarinas estimulan la adhesión a hialuronato. Conviene señalar el hecho de que compuestos que no modifican la expresión de CD44, si modifican la adhesión a hialuronato. Esto sugiere que la expresión de otras moléculas de adhesión con afinidad por hialuronato puede ser alterada por cumarinas sin afectar CD44. En la adhesión a colágena tipo I, las moléculas que produjeron acciones más relevantes fueron la 4-hidroxicumarina y la 7-hidroxicumarina. La 4-hidroxicumarina aumenta la adhesión a concentraciones bajas (5-19 µg/ml). En el caso de este compuesto hay correlación entre el aumento en la expresión de LFA-1 y el aumento a la adhesión a colágena, sin embargo, es poco probable que LFA-1 sea la única responsable del efecto. Hay que considerar que la adhesión a colágena no es específica, es decir no existe un ligando específico para colágena. Varias moléculas de adhesión pueden interactuar con este sustrato.

La 7-hidroxicumarina disminuye significativamente la adhesión en forma independiente a la concentración. Esta hidroxicumarina no modifica la expresión de ninguna de las moléculas de adhesión estudiadas. El efecto que observamos puede tener varias causas: 1) puede deberse a la regulación de la expresión de otras moléculas de adhesión; 2) puede deberse a modificaciones que impidan que el citoesqueleto interactúe adecuadamente con estas moléculas, aún cuando estas se expresen en cantidad suficiente; ó 3) puede ser que otro (s) sistema (s) celular (es) este siendo modificado (40).

Respecto al mecanismo de acción de los compuestos cumarínicos se ha reportado que existen un gran número de sitios de unión para la cumarina (7.5×10^6 sitios/célula) en células mononucleadas del sistema inmune. La afinidad de estos sitios es diferente para diferentes hidroxicumarinas (58). Esto nos lleva a la posibilidad de que existan diferentes receptores para los diferentes derivados, o que la afinidad de estos sea lo que determine su actividad. Hay evidencia de que, una vez que el fármaco se ha unido al receptor, la naturaleza hidrofóbica de la molécula le permite atravesar la membrana y modificar eventos intracelulares como la producción y secreción de interleucinas (23).

Otros de los mecanismos de acción de derivados cumarínicos que se ha reportado están relacionados con la inhibición de enzimas. Hace ya una década que se sabe que algunos flavonoides inhiben cinasas (59). Esto puede afectar la transmisión de señales dentro de la célula. También se ha reportado que la cumarina inhibe de manera no competitiva a la poli(ADP ribosa) polimerasa (24), y a la topoisomerasa II (25). No se ha podido discernir si la acción sobre la topoisomerasa es debida a que la cumarina afecta la función de la enzima como ATPasa o si afecta la unión del complejo DNA-topoisomerasa II (25).

El mecanismo de acción por el que derivados cumarínicos modulan la expresión de moléculas de adhesión y la adhesión celular no se conoce aún. Estudios posteriores son necesarios para buscar dicho mecanismo y lograr el desarrollo de fármacos más potentes para disminuir en forma más completa la producción de metástasis de tumores malignos.

BIBLIOGRAFIA.

1. Twelve major cancers. Scientific American. Special issue: What you need to know about cancer? Sep 1996. 92-98.
2. Egan D., O'Kennedy R., Moran E. The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarin-related compounds. Drug Metabolism Reviews. 1990. 22. 503-529.
3. Feuer G., Kellen J., Kovacs K. Suppression of 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene-induced breast carcinoma by coumarin in the rat. Oncology. 1976, 33. 35-39.
4. Zacharski LR, Henderson WG, Rickles FR, Forman WB, Cornell CJ, Jackson R, et al. Effect of Warfarin on Survival in Small Cell Carcinoma of the Lung. JAMA 1981, 245. 831-835.
5. Thornes R. Adjuvant therapy of cancer via the cellular immune mechanisms or fibrin by induced fibrinolysis and oral anticoagulants. Cancer. 1975, 35. 91-92.
6. Zanker K. et al. Coumarin in melanoma patients: an experimental and clinical study. Drugs Exptl Clin Res. 1984, 11. 767-774.
7. Thornes R. et al. Cimetidine and coumarin therapy of melanoma. Lancet. 1982; 2. 238-241.
8. Dexeus F. et al. Phase II study of coumarin and cimetidine in patients with metastatic renal carcinoma. Journal of Clinical Oncology. 1990, 8. 325-329.
9. Mohler J. et al. Coumarin (1,2-benzopyrone) for the treatment of prostatic carcinoma. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 1994, 120 (Suppl) S35--S38.
10. Marshall ME, Kervin K, Benefield C, Umerani A, Albainy-Jenei S, Zhao Q et al. Growth-inhibitory effects of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin on human malignant cell lines in vitro. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 1994, 120 (Suppl): S3-S10.
11. Berkada H. Proc Amer. Ass. Cancer Research. 1974, 15. 99-102.
12. Matt B. Selective macrophage inhibition abolishes warfarin-induced reduction of metastasis. Br. J. Cancer. 1981, 41: 313-316.
13. Maat B., Hilgard P. Anticoagulants and experimental metastases-evaluation of antimetastasis effects in different model systems. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 1981; 101:275-283.

14. Maucher A., Kager M., Von Angerer. Evaluation of the antitumor activity of coumarin in prostate cancer models. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1993; 119: 150-154
15. Von Angerer E. *et al* Antitumour activity of coumarin in prostate and mammary cancer models. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1994; 120 (Suppl): S14-S16
16. Marshall ME, Mohler JL, Edmonds K, Williams B, Butler K, Ryles M, *et al* , An updated review of the clinical development of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1994; 120 (Suppl) S39-S42
17. Pelkoneen O., Rautio A., Raunio H., *et al*. Regulation of coumarin 7-hydroxylation in man *J. Cancer Res. Oncol.* 1994. 120 suppl. S31-S32 -
18. Moran E., O'Kennedy R., Thornes R. Analysis of coumarin and its urinary metabolites by high-performance liquid chromatography *Journal of Chromatography* 1987, 416 165-169
19. Giard D., Aaronson S., Todaro G., Arnstein P., Kersey J., Dosik H., *et al* . In vitro cultivation of human tumors. establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 1989, 51 1417-1423
20. Falcioni R, Cimino L, Perrotti D, Rizzo MG, Sacchi A. $\alpha 6/\beta 4$ integrin in lung carcinoma in *Cancer and Inflammation*. Epenetos A. and Pignatelli M (ed) Harwood Academic Publishers Switzerland 1995: 45-58
21. Tranchina S, Bernasconi S, Dejana E, Dei Maschio A. Inhibition of human monocyte adhesion to endothelial cells by the coumarin derivative, cloricromene. *Br J Pharmacol.* 1994, 111: 575-581
22. Hilgard P., Schulte H., Wetzig G., Schmitt G. Oral anticoagulation in the treatment of a spontaneously metastasizing murine tumor. *Br. J. Cancer.* 1978; 35 78-85
23. Stuhlemer K., *et al* . Synergistic effect of coumarin (1, 2 benzopyrone) and endotoxin in the induction of human interleukin-1. *Clin. exp. Immunol.* 1991; 84: 317-323
24. Tseng A., Lee W., Kirsten E., *et al* . 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
25. Lonco A., Long B. Biochemical characterisation of elsamicin and other coumarin-related antitumor agents as potent inhibitors of human topoisomerase II *Eur J. Cancer.* 1993, 29A. 1985-1991.

26. Pignatelli M., Liu D., Nigam AK., Gagliardi G., Lalani EN., Stamp G. Adhesion molecules in neoplasia: an overview in Cell adhesion molecules in Cancer and Inflammation. Epenetos AA and Pignatelli M (ed) Harwood Academic Publishers Switzerland, 1995 1-14
27. Alberts B., Dennis B., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. Molecular Biology of the cell Garland Publishing Inc U.S.A. 1994 Chap. 23, 24
28. Hynes R. and Lander A. Contact and adhesive specificities in the associations, migrations and targeting of cells and axons. Cell 1992, 68 303-322
29. Chávez R., Reyes J., Maldonado G., Vázquez L., Estrada S., Gorocica P., Zenteno E. Moléculas de cooperación y regulación durante la migración celular en la respuesta inflamatoria. Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex. 1994, 7: 67-76
30. Imhof B., Duon D. Leukocyte migration and adhesion. Advances in immunology 1995, 58 345-399
31. Sastry S., Horwitz A. Integrin cytoplasmic domains: mediators of cytoskeletal linkages and extra- and intracellular initiated transmembrane signaling. Curr. Opin. Cell Biol. 1993, 5 345-399
32. Hynes R. Integrins: Versatility, modulation, and signalign in cell adhesion. Cell 1992, 69:11-25.
33. Papadopoulos Heino J. Regulation of integrin expression. Epenetos AA and Pignatelli M (ed) Harwood Academic Publishers Switzerland 1995 147-155.
34. Felding-Habermann B. and Cheresh D. Vitronectin and its receptors. Curr. Opin. Cell Biol. 1993; 5: 864-868
35. Cheresh DA, Smith JW, Cooper HM, and Quaranta. A novel integrin vitronectin receptor ($\alpha\alpha/\beta\alpha$) is responsible for distinct adhesive properties of carcinoma cells. Cell 1989, 57: 59-69
36. Kajji S., Tamura, R. N., Quaranta, V. A novel integrin ($\alpha\text{E}/\beta\text{4}$) from human epithelial cells suggests a fourth family of integrin adhesion receptors. EMBO J., 1989; 8: 673-680.
37. Kennel S., Foote I.J., Falcioni R., Sonnenberg A., Crouse C., Hemler ME. Analysis of the tumor associated antigen TSP-180: identity with $\alpha\text{6}\beta\text{4}$ in the integrin superfamily. J. Biol. Chem. 1989; 264 15515-15521

38. Falcioni R, Sacchi A, Reseau J, and Kennel SJ. Monoclonal antibody to human carcinoma-associated protein complex: quantitation in normal and tumor tissue. *Cancer Res* 1988; 48: 816-821.
39. Ball ED, Graziano RF, Pettengill OS, Sorenson GD, Franger MW. Monoclonal antibodies reactive with cell carcinoma of the lung J. *Natl. Cancer Inst.* 1984; 72: 593-598.
40. Albelda S., Mette S., Elder D., Stewart R., Damjanovich L., Erlin M., Buck C. Integrin distribution in malignant melanoma: association of the $\beta 3$ subunit with tumor progression. *Cancer Res.* 1990; 50: 6757-6764.
41. Chan B., Matsura N., Takada Y., Zetter B., Helmer M. *In vitro* and *in vivo* consequences of VLA-2 expression on rhabdomyosarcoma cells. *Science* 1991; 251: 1600-1602.
42. Birch, M., Mitchell S., Hart IR. Isolation and Characterization of Human Melanoma Cell Variants Expressing High and Low levels of CD44. *Cancer Res.* 1991; 51: 6660-6667.
43. Benchimol S., Fuks A., Jothy S., Beauchemin N., Shirota K., Stanners C. Carcinoembryogenic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell.* 1989; 57: 327-334.
44. Pignatelli M., Durbin H., Bodmer W. Carcinoembryogenic antigen functions as an accessory molecule mediating colon epithelial cell-collagen interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990; 87: 1541-1545.
45. Dustin M., Rothlein R., Bhan A., Dinarello C., Springer T. Induction by IL-1 and interferon γ , tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J. Immunol.* 1986; 137: 245-254.
46. Johnson J., Stade B., Holtzman B., Schawable W., Riethmuller G. *De novo* expression of intercellular adhesion molecule in melanoma correlates with increased risk of metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991; 88: 641-644.
47. Natali P., Nicotra M., Cavaliere R., Giannarelli D., Biggoti A. Tumor progression in human malignant melanoma is associated with changes in $\alpha 6/\beta 1$ laminin receptor. *Int. J. Cancer* 1990; 49: 168-172.
48. Lesley J., Hyman R., Kinkade P. CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv. Immunol.* 1993; 54: 271-335.

49. Miyake K., Underhill C., Lesley J., Kincade P. Hyaluronate can function as a cell adhesion molecule and CD44 participates in hyaluronate recognition. *J. Exp. Med.* 1990; 172: 69-75
50. Aruffo A., Stamenkovic I., Melnick M., Underhill C., Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 1990; 61: 1303-1313.
51. Matsumura Y., Tarrin D. Significance of CD44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation. *Lancet* 1992; 340: 1053-1058
52. Zhong Z. *et al*. Monoclonal antibodies to CD44 and their influence on hyaluronan recognition. *J. Cell Biology* 1995; 130: 485-495
53. Green L., Reade J., Ware C. Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J. Immunol. Meth.* 1984; 70: 257-268
54. Nibbering PH, Van de Gevel JS, Van Furth R. A cell-ELISA for the quantification of adherent murine macrophages and the surface expression of antigens. *J. Immunol. Meth.* 1990; 131: 25-32
55. Pierschiba M., Ruoslahti E. Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 1984; 81: 5985-5988.
56. Zar J. *Biostatistical analysis*. 2nd Edition. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J.; 194-195.
57. Marshall M., Rhoades J., Mattingly C., Jennings C. Coumarin (1,2-benzopyrone) enhances DR and DQ antigen expressions by peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Mol. Biother.* 1991; 3: 204-206
58. Zlabinger G., Nohamemer G. *et al*. Mode of action of coumarin in immune cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1994; 120 (suppl): S17-S18
59. Graziani Y., Erikson E., Erikson R. The effect of quercetin on the phosphorylation activity of Rous sarcoma virus transforming gene product in vitro and in vivo. *Eur. J. Biochem.* 1983; 135: 583-589.



Fotografía 1 Celulas del melanoma murino B16-F10/5ab1 en cultivo



Fotografía 2 Celulas del melanoma murino B16-F10/5ab1 despues de la exposición a metiltetrazolo