



11.261

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

EFFECTO DE COMPUESTOS CUMARINICOS EN EL
CRECIMIENTO DE LA LINEA CELULAR DEL
MELANOMA MURINO B16 F10-5AB1

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

BIOMEDICAS (FARMACOLOGIA)

P R E S E N T A E L

FARMACEUTICO FAUSTO ALEJANDRO JIMENEZ OROZCO

DIRECTOR DE TESIS: MED. CIR. JUAN JOSE MANDOKI WEITZNER.

MEXICO, D. F.

ENERO ~~1990~~

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.

Quiero agradecer con todo mi cariño a mi hermana Elisa y a mi tía María Esther el apoyo que me brindaron durante la realización de este trabajo.

Dedico este trabajo a todas las personas del laboratorio de Farmacología Celular con quien he compartido grandes experiencias, en especial a:

Méd. Cir. Juan José Mandoki Weitzner por haber dirigido esta tesis, por compartir tan generosamente sus conocimientos y por todo el apoyo que me ha brindado .

Al M. en C. Juan Arcadio Molina Guarneros por su apoyo, sus enseñanzas y su crítica siempre certera.

Al Méd. Cir. Nicandro Mendoza Patiño por su apoyo, su amistad y por enseñarme a tolerar a los todos mis compañeros.

A la Q.F.B. Maria Juana Gacia Mondragón por su cariño, tolerancia y paciencia.

A Gabriela por su apoyo, cariño y compañía a lo largo de estos años de estudio.

Al estudiante Armando Orozco Arreaga por su ayuda.

TABLA DE CONTENIDOS

1. ANTECEDENTES

- 1.1 Historia de la cumarina
- 1.2 Uso de compuestos cumarínicos como antineoplásicos
- 1.3 Acciones celulares de la cumarina
- 1.4 Biotransformación de la cumarina
- 1.5 La cumarina como prodroga

2. HIPÓTESIS

3. METAS

4. MATERIAL Y MÉTODO

- 4.1 Material Biológico
- 4.2 Ensayos de proliferación y citotoxicidad celular
- 4.3 Determinación de condiciones experimentales
 - 4.3.1 Relación entre el número de células y densidad óptica
 - 4.3.2 Sincronización
 - 4.3.3 Número óptimo de células
 - 4.3.4 Concentración del vehículo
- 4.4 Compuestos
- 4.5 Exposición a los fármacos
 - 4.5.1 Exposición única
 - 4.5.2 Exposiciones repetidas
- 4.6 Análisis estadístico

5 RESULTADOS

- 5.1 Exposición única: curso temporal del efecto citostático
- 5.2 Comparación del efecto citostático de la cumarina a exposiciones únicas y exposiciones repetidas
- 5.3 Exposición repetida. Concentración inhibitoria 50 (CI50)
- 5.4 Ensayos en fibroblastos murinos. Concentración inhibitoria 50 (CI50).

6. DISCUSIÓN

7 PERSPECTIVAS

8. REFERENCIAS

ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS, GRÁFICAS Y FOTOGRAFÍAS

Figura 1 Estructura química del ácido orto-fenilpropenóico y cumarina.

Figura 2 Estructura química de la Warfarina.

Figura 3 Ciclo de la vitamina K.

Tabla 1 Usos de la cumarina y algunos de sus derivados.

Tabla 2 Estructura química de los compuestos cumarínicos.

Tabla 3 Porcentaje del coeficiente de variación de los dos diseños de exposición.

Tabla 4 Concentraciones inhibitorias 50 de los compuestos estudiados.

Gráfica 1 Curva estándar de formazán de MTT ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

Gráfica 2 Número de células del melanoma murino B16 F10-5AB1, contra densidad óptica.

Gráfica 3 Curva de crecimiento de células del melanoma murino B16 F10-5AB1.

Gráfica 4 Curva de crecimiento en presencia de etanol.

Gráfica 5 Curva de crecimiento en presencia de de etanol.

Gráfica 6 Crecimiento de células expuestas a cumarina.

Gráfica 7 Curso temporal del efecto citostático de cumarina, 4-acetoxicumarina y 8-metoxicumarina.

Gráfica 8 Curso temporal del efecto citostático de 3-acetoxicumarina, 4-metoxicumarina, 6-metoxicumarina, 7-acetoxicumarina y 7-metoxicumarina.

Gráfica 9 Curso temporal del efecto citostático de 3-hidroxycumarina, 3-metoxicumarina, 6-acetoxicumarina y 7-hidroxycumarina.

Gráfica 10 Curso temporal del efecto citostático de 4-hidroxycumarina y 6-hidroxycumarina.

Gráfica 11 Porcentaje de citostasis de la cumarina, a exposición única.

Gráfica 12 Porcentaje de citostasis de la cumarina, a exposiciones repetidas.

Gráfica 13 Concentración inhibitoria 50 de la cumarina, exposición única

Gráfica 14 Concentración inhibitoria 50 de la cumarina, exposición repetida.

Gráfica 15 CI50 de 6-hidroxycumarina.

Gráfica 16 CI50 de 7-hidroxycumarina.

Gráfica 17 CI50 de 3-acetoxicumarina.

Gráfica 18 CI50 de 7-acetoxicumarina.

Gráfica 19 CI50 de 4-metoxicumarina.

Gráfica 20 Curva de crecimiento de fibroblastos murinos.

Gráfica 21 Crecimiento de fibroblastos murinos expuestos a cumarina.

Gráfica 22 CI50 de cumarina en fibroblastos murinos.

Gráfica 23 CI50 de 3-acetoxicumarina en fibroblastos murinos.

Gráfica 24 CI50 de 4-metoxicumarina en fibroblastos murinos.

Gráfica 25 CI50 de 6-hidroxycumarina en fibroblastos murinos.

Fotografía 1 Células del melanoma murino B16 F10-5AB1.

Fotografía 2 Células del melanoma murino B16 F10-5AB1 expuestas a MTT.

1. ANTECEDENTES

1.1 HISTORIA DE LA CUMARINA

La cumarina es un compuesto heterocíclico; es la lactona del ácido orto-hidroxi fenil-propenóico (Figura 1). Los cristales de cumarina tienen un agradable aroma característico y se han identificado en muchas plantas y aceites esenciales. En 1820, Vogel la aisló por primera vez del haba del tonka de la Guyana, *Coumarouna odorata* (Murray et al, 1982). Posteriormente se aisló cumarina de otras plantas como del clavo (*Melilotus officinalis*) y de los aceites de lavanda y acacia (Cohen 1978).



Figura 1. Estructura química del ácido orto-fenilpropenóico y de cumarina.

Medio siglo después, en 1868, W. H. Perkin, la obtuvo por síntesis química, tratando sales de sodio de *orto*-hidroxibenzaldeído con anhídrido acético. Era la primera vez que se sintetizó un perfume vegetal. Por su agradable aroma, la cumarina y algunos de sus derivados tienen gran diversidad de usos (Tabla 1).

Tabla 1: Usos de la cumarina y algunos de sus derivados.

COMPUESTO	APLICACIONES NO TERAPÉUTICAS
cumarina	dulcificante y aditivo (industria de los alimentos) aromatizante y fijador (industria del tabaco) fijador (perfumería)
warfarina	raticida
4-metilumbeliferona	tinte láser
3-acetil-4-metil-7-amino cumarina	marcador fluorescente
6-metilcumarina	potenciador de aroma, filtros solares.
7-hidroxycumarina	filtros solares
	APLICACIONES TERAPÉUTICAS
warfarina	anticoagulante oral
cumarina	disminuye la fragilidad y la permeabilidad capilar inmunomodulador y tumoristático

Además de su uso no médico, existen compuestos cumarínicos con uso clínico importante. La warfarina (Figura 2) es un fármaco usado para prevenir la formación de trombos, y cuando se han producido, para evitar su extensión. Se emplea desde 1951 y es el anticoagulante oral que se prescribe con mayor frecuencia (Goodman & Gilman 1996).

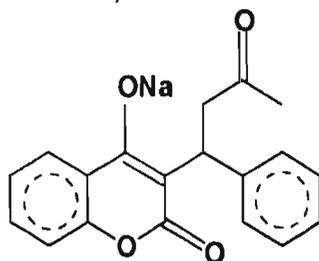


Figura 2. Estructura química de la Warfarina

Su mecanismo de acción se conoce: inhibición del ciclo de la vitamina K (Figura 3), que se requiere para la síntesis de los factores de coagulación II, VII, IX y X.

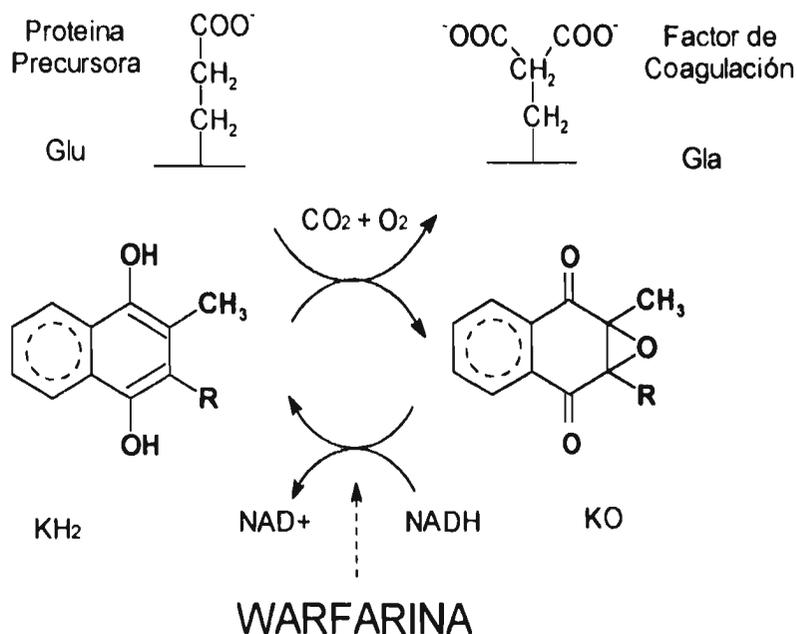


Figura 3. Ciclo de la vitamina K: la carboxilación del glutamato (Glu) de proteínas precursoras de factores de coagulación, a γ -carboxilglutamato (Gla), está acoplado a la oxidación de la forma reducida de la vitamina K (KH_2) a su forma de epóxido (KO); la reacción se lleva a cabo en el retículo endoplásmico y requiere CO_2 y O_2 . La warfarina inhibe el sistema de reductasas que reducen el epóxido de la vitamina K (KO) a su forma reducida (KH_2) que es la forma activa de la vitamina.

Los factores de la coagulación dependientes de la vitamina K (II, VII, IX y X), en la región amino terminal, tienen doce residuos de ácido glutámico (Glu) que deben ser carboxilados para ser biológicamente activos. Los residuos γ -carboxilglutamato (Gla) aumentan la afinidad de esas proteínas a los iones de Ca^{2+} , lo que permite la formación de un complejo catalítico eficiente que conduce a la formación del coágulo. La carboxilación de las proteínas se lleva a cabo en el retículo endoplásmico (Morris DP, et al. 1993) y requiere de bióxido de carbono, oxígeno molecular y vitamina K en su forma reducida (KH_2). La carboxilación se acopla de manera directa con la oxidación de vitamina K (KH_2) a epóxido (KO). El epóxido de vitamina K (KO) se reduce a través de un sistema de enzimas a la vitamina K (KH_2) que nuevamente es utilizada en la carboxilación de proteínas precursoras de factores de coagulación. La warfarina inhibe las reductasas específicas que permiten el reciclaje de la vitamina K. Los efectos de la warfarina pueden ser antagonizados por administración exógena de vitamina K o de factores de coagulación.

1.2 USO DE COMPUESTOS CUMARÍNICOS COMO ANTINEOPLÁSICOS.

En pacientes con diferentes tipos de cáncer tratados con warfarina, se observó un efecto antineoplásico. El número de metástasis fue menor que el del grupo testigo y el tiempo de supervivencia se incrementó al doble (Thornes 1975; Zacharski 1981). La actividad antineoplásica de la warfarina es independiente de sus efectos anticoagulantes. En modelos animales los efectos anticoagulantes se antagonizaron administrando vitamina K o factores de la coagulación II, VII, IX y X, sin disminuir la actividad antineoplásica (Thornes et al, 1982; Maat et al, 1981). Además la cumarina, que carece de actividad anticoagulante, presenta actividad antineoplásica (Hilgard et al, 1977).

La cumarina, por carecer de acción anticoagulante, es considerablemente menos tóxica que la warfarina, puede ser administrada a dosis mayores (Cox et al, 1975) y no tiene efectos teratogénicos (Preuss et al, 1987). En estudios clínicos de primera fase (en humanos sanos) se probaron dosis de 300 mg a 7 g diarios. Se observó que la cumarina puede ser administrada aún a dosis de varios gramos por día durante períodos largos, sin producir efectos tóxicos importantes (Marshall et al, 1991, 1994a).

En estudios multicéntricos se ha demostrado que la cumarina retarda el desarrollo de adenocarcinoma renal (Marshall et al, 1987; Marshall et al, 1990), de cáncer prostático (Mohler et al, 1992; Marshall et al, 1994a), y previene la recurrencia de melanoma (Marshall et al 1989, Thornes 1989; Thornes et al, 1994).

1.3 ACCIONES CELULARES DE LA CUMARINA

La cumarina y la 7-hidroxycumarina inhiben el crecimiento de 14 líneas tumorales humanas. En estos ensayos se ha observado que en las células expuestas al fármaco disminuye la incorporación de análogos de timidina (Marshall et al, 1994). Se desconocen los mecanismos moleculares que modulan estos efectos.

La cumarina inhibe *in vitro* el crecimiento de fibroblastos murinos transfectados por el oncogen EJ-*ras* y previene la tumorigénesis *in vivo* de dichas células (Tseng et al, 1987). Se ha reportado que, además de disminuir el número de células transformadas que entran en fase S, reduce la expresión de la proteína *ras* p21 predominantemente en la fase G₁, inhibiendo así el crecimiento celular (Conley 1987; Kahn et al, 1994).

Se ha propuesto que la cumarina y la 7-hidroxycumarina puede controlar el crecimiento de ciertos tumores a través de la regulación de la expresión de oncogenes, ya que estudios moleculares en células transfectadas con los oncogenes *ras* y *myc* han mostrado que la 7-hidroxycumarina disminuye los niveles de ARN mensajero de dichos oncogenes (Seliger et al, 1994).

1.4 BIOTRANSFORMACIÓN DE LA CUMARINA

La cumarina es oxidada, tanto *in vitro* como *in vivo*, a monohidroxycumarinas en todas las posiciones de la molécula (Iersel et al. 1994; Shilling et al. 1969). Además, el anillo lactónico puede hidrolizarse y se han descrito como productos de excreción ácido o-hidroxifenilacético y ácido o-hidroxifenilláctico (Shilling et al, 1969). Estos productos de biotransformación pueden ser acetilados, metoxilados, sufrir conjugaciones con ácido glucurónico u otro tipo de transformaciones.

Los productos en que se biotransforma la cumarina, varían cuantitativamente dependiendo de la especie (Cohen 1978; Shilling et al, 1969; Fink et al, 1966). En primates como el mandril y el humano, la 7-hidroxycumarina es el principal producto de biotransformación (68-92 %). En el humano esta hidroxilación la realiza la isoforma CYP2A6 del citocromo P450 (Pelkonen et al, 1994). En rata y ratón la cumarina se biotransforma principalmente en ácido ortofenil acético (19 %). En el conejo el ácido orto-hidroxifenil acético es el principal producto de biotransformación (18-22 %), seguido por 3-hidroxycumarina (18-23 %) y 7-hidroxycumarina (10-16 %).

1.5 LA CUMARINA COMO PRODRUGA

En el humano el promedio de vida media de la cumarina es de 1.5 horas (Ritschel et al, 1977). La velocidad de eliminación de los productos de biotransformación de la cumarina indican que su vida media es considerablemente más prolongada que la cumarina. Se ha propuestos que la cumarina podría actuar como una prodruga (Egan et al, 1990). La 7-hidroxycumarina es cuantitativamente el producto de biotransformación de la cumarina más importante en el humano. Se piensa que ésta es la forma activa de la molécula (Marshall et al, 1994b). De ser así, los productos de biotransformación podrían tener actividad citostática mayor que la cumarina.

Sólo se ha reportado la actividad citostática de dos hidroxycumarinas a 42 horas de exposición (7-hidroxycumarina y 4-hidroxycumarina) (Roskopf et al, 1992). Los resultados no muestran actividad significativamente mayor al de la cumarina.

En este trabajo se estudió el efecto citostático de la cumarina, cinco monohidroxycumarinas, sus acetatos, así como de sus éteres metílicos. Nuestros resultados muestran que algunos de estos productos tienen actividad citostática *in vitro* mayor que la cumarina. Algunos de estos compuestos tienen actividad 8 veces mayor que la cumarina.

3. HIPÓTESIS

Dada la vida media breve de la cumarina y su biotransformación en varias monohidroxycumarinas con vidas medias más prolongadas, la actividad antineoplásica *in vivo* de la cumarina podría deberse en gran parte a la acción de algún o algunos productos de biotransformación.

In vitro los productos de biotransformación podrían tener actividad citostática mayor que la cumarina.

4. METAS

Evaluar la actividad citostática *in vitro* de la cumarina, cinco monohidroxycumarinas, sus acetatos y éteres metílicos respectivos.

Obtener la concentración inhibitoria 50 (CI50) a 24, 48 y 72 horas de exposición.

5. MATERIAL Y MÉTODO

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se empleó la línea celular del melanoma murino B16 F10-5ab1 (fotografía 1) que fue generosamente proporcionada por el Dr. Guillermo Alfaro, investigador del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 al cual se añadió 1 % de aminoácidos no esenciales, 1 % de piruvato de sodio, penicilina 100 U/ml, estreptomycinina 100 µg/ml y 10 % de suero fetal bovino (SIGMA) cuyo complemento fue inactivado por calor. Estas células fueron generadas en ratones singénicos C57BL6 y se han empleado como modelo para estudiar metástasis (Sargent et al, 1988) y crecimiento de tumores sólidos (Orozco et al, 1997).

4.2. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN Y CITOTOXICIDAD CELULAR.

Para valorar *in vivo* la actividad de compuestos antineoplásicos, existen diferentes ensayos de sobrevivencia y/o la proliferación de células animales. Se pueden agrupar en dos tipos principales:

- A) ENSAYOS CON MARCAJE RADIOACTIVO:** Estos ensayos miden: 1) la liberación de $^{51}\text{Cr}^{2+}$ después de lisis celular; 2) incorporación de metionina ^{35}S ; 3) incorporación de nucleótidos radioactivos durante la proliferación celular. Aunque la sensibilidad de los ensayos es muy alta, requieren reactivos y equipo costosos, que son poco accesibles a laboratorios de investigación. El manejo de estas técnicas conlleva además riesgos para la salud del experimentador (Freshney 1994).
- B) ENSAYOS COLORIMÉTRICOS:** Este método se fundamenta en la capacidad de células vivas, mas no de células muertas, de reducir un sustrato a un producto, cuya concentración se puede cuantificar por un método espectrofotométrico (Mosmann 1983). En estos ensayos se emplea la sal de tetrazolio MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolio), que es de color amarillo y soluble en agua. En las mitocondrias de células vivas, el sistema de dehidrogenasas reduce el MTT a formazán de MTT (1-[4,5-Dimetil tiazol-2il]-3,5-difenilformazan) de color púrpura e insoluble en agua (fotografía 2). Mientras que el MTT no reducido se elimina al retirar el sobrenadante, los cristales de formazán de MTT permanecen en las mitocondrias de la célula. Posteriormente las membranas se disuelven en DMSO (dimetil sulfóxido) y los cristales de formazán entran en solución, que se puede cuantificar por

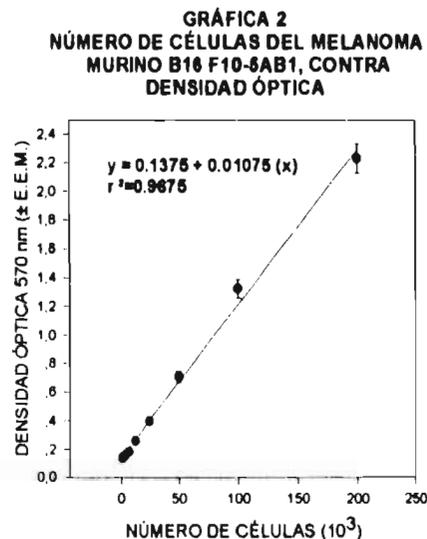
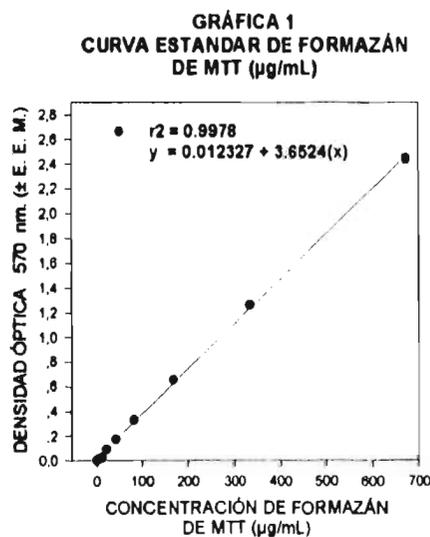
espectrofotometría. La concentración de formazán de MTT es proporcional al número de células. Este método es muy sensible, menos costoso que los métodos con marca radioactiva, y presentan menor riesgo para la salud del experimentador.

Para encontrar las condiciones experimentales óptimas para estos estudios, se realizaron ensayos preliminares siguiendo este método. A microplacas estériles de 96 pozos (NUNC), se agregó a cada pozo 100 μ L de medio y 20 μ L de solución de MTT (5 mg/mL). Las células se incubaron durante 2 horas, a 37°C en una atmósfera conteniendo 5 % de CO₂. (NUAIRE). El número de células que se usaron varió en los primeros experimentos hasta encontrar el número óptimo, que fue de 10⁴ células por pozo.

4.3 DETERMINACIÓN DE CONDICIONES EXPERIMENTALES

4.3.1 RELACIÓN ENTRE EL NÚMERO DE CÉLULAS Y DENSIDAD ÓPTICA.

En la gráfica 1 se muestra la relación lineal entre la concentración de formazán de MTT (1-[4,5-Dimetilazol-2il]-3,5-difenilformazan) y la densidad óptica a la longitud de onda de 570 nm. En la gráfica 2 se puede observar la relación lineal entre el número de células y la densidad óptica a la misma longitud de onda.



4.3.2. SINCRONIZACIÓN

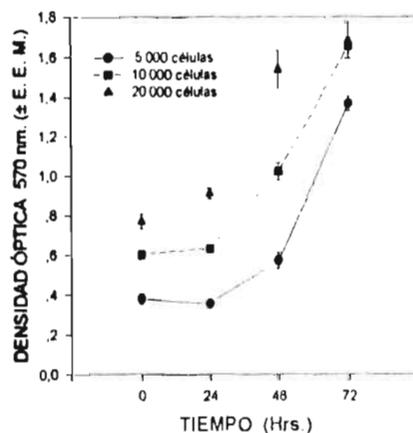
4.3.2. SINCRONIZACIÓN

Para los ensayos de citostasis, es importante iniciar el experimento con células que se encuentren en la misma fase del ciclo celular. Para lograr su "sincronización" las células se mantienen en un medio restringido, es decir, libre de suero fetal bovino. En botellas de cultivo con superficie de 25 cm² (Nunc) se mantuvieron las células durante 24 horas. El medio RPMI-1640 fue complementado con 1 % de aminoácidos no esenciales, 1 % de piruvato de sodio y antibióticos (Sigma). Se verificó que en estas condiciones no se había incrementado el número de células y que conservaron su viabilidad (datos no mostrados).

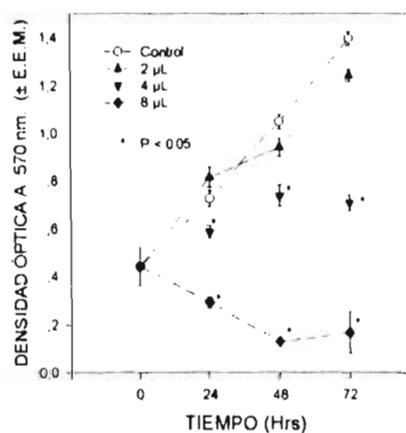
4.3.3 NÚMERO ÓPTIMO DE CÉLULAS

El número óptimo de células para los ensayos se determinó por medio de curvas de crecimiento (gráfica 3). Después de cosechar las células de las cajas de cultivo, se estimó su viabilidad mediante la exclusión de tripán azul. En placas estériles (Nunc) con 96 pozos se sembró por sextuplicado diferente número de células (5×10^3 , 10^4 y 2×10^4 células/pozo) en un volumen de 300 μ L de medio por pozo. Se dejaron adherir durante 4 horas y se estimó el número de células al tiempo 0, a las 24, 48 y 72 hrs. En la gráfica 3 se observa que 10 000 y 5 000 células por pozo crecen adecuadamente, durante 3 días en 300 μ L de medio.

GRÁFICA 3
CURVAS DE CRECIMIENTO DE
CÉLULAS DEL MELANOMA B16 (F1-5ab1)



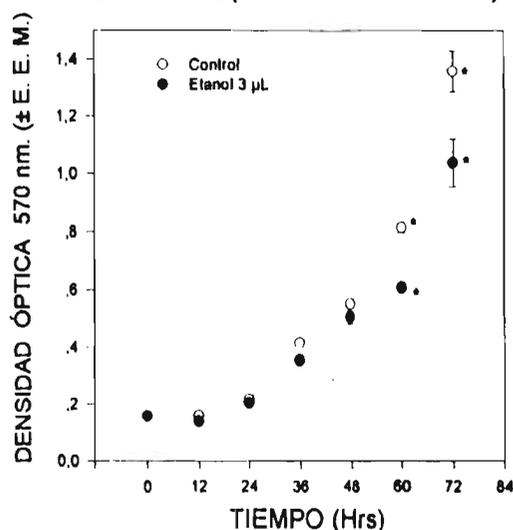
GRÁFICA 4
CURVAS DE CRECIMIENTO EN
PRESENCIA DE ETANOL



4.3.4 CONCENTRACIÓN DEL VEHÍCULO (ETANOL)

Los compuestos que se probaron son solubles en etanol. Para determinar la concentración del vehículo que no afecta importantemente el crecimiento celular, se incubaron 5 000 y 10 000 células por pozo con diferentes volúmenes de etanol durante 72 hrs. Como se puede observar en la gráfica 4, las células tratadas con 2 μL de etanol crecen adecuadamente y su número no difiere en forma estadísticamente significativa con respecto al número de células control. 1×10^4 células tratadas con 3 μL de etanol crecieron adecuadamente (gráfica 5), aunque a las 60 y 72 horas su crecimiento fue un poco menor al de las células que crecieron en ausencia de etanol.

GRÁFICA 5
CURSO TEMPORAL DE 3 μL
DE ETANOL (10 000 CÉLULAS/POZO)

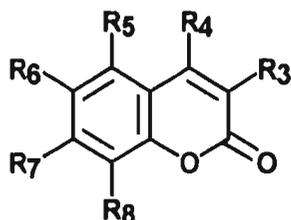


4.4 COMPUESTOS

Para la síntesis de los compuestos se obtuvo la colaboración del grupo de la Dra. Elvira Santos, bajo la dirección del Maestro Fernando León Cedeña de la Facultad de Química. Los compuestos se obtuvieron por síntesis química y se purificaron por cromatografía en columna de gel de sílice. La pureza de los compuestos se determinó por cromatografía de líquidos de alta resolución (99 % de pureza) y su estructura se comprobó por espectroscopía de rayos infrarrojos y resonancia magnética nuclear de protones y de carbono 13.

Se obtuvieron los derivados monohidroxilados en las posiciones 3-, 4-, 6-, 7- y 8-, así como sus acetatos y éteres metílicos. En la tabla 2 se presentan las estructuras químicas de los compuestos que se probaron.

DERIVADOS CUMARÍNICOS



	R ₃	R ₄	R ₆	R ₇	R ₈
3-HIDROXICUMARINA	-OH	-H	-H	-H	-H
4-HIDROXICUMARINA	-H	-OH	-H	-H	-H
6-HIDROXICUMARINA	-H	-H	-OH	-H	-H
7-HIDROXICUMARINA	-H	-H	-H	-OH	-H
8-HIDROXICUMARINA	-H	-H	-H	-H	-OH
3-ACETOXICUMARINA	-OCOCH ₃	-H	-H	-H	-H
4-ACETOXICUMARINA	-H	-OCOCH ₃	-H	-H	-H
6-ACETOXICUMARINA	-H	-H	-OCOCH ₃	-H	-H
7-ACETOXICUMARINA	-H	-H	-H	-OCOCH ₃	-H
8-ACETOXICUMARINA	-H	-H	-H	-H	-OCOCH ₃
3-METOXICUMARINA	-OCH ₃	-H	-H	-H	-H
4-METOXICUMARINA	-H	-OCH ₃	-H	-H	-H
6-METOXICUMARINA	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H
7-METOXICUMARINA	-H	-H	-H	-OCH ₃	-H
8-METOXICUMARINA	-H	-H	-H	-H	-OCH ₃

Por sus características hidrofóbicas, los compuestos se diluyeron en alcohol etílico absoluto. En caso necesario se sonicaron durante 5 minutos y se filtraron por poro de 0.22 μ (Millipore). Se realizaron pruebas iniciales para conocer los rangos de concentraciones que podían utilizarse. De cada fármaco se prepararon soluciones para alcanzar concentraciones finales de 10, 20, 40, 80 y 160 μ g/ml. Las células control fueron expuestas a 3 μ l de etanol por cada 100 ml de medio y las células tratadas fueron expuestas a 3 μ l de la solución correspondiente para alcanzar la concentración deseada.

4.5 EXPOSICIÓN A LOS FÁRMACOS

Se ha reportado que los efectos de la cumarina y de la 7-hidroxycumarina son dependientes del tiempo y de la concentración (Marshall ME, et al. 1994). Nuestros resultados han confirmado este hecho, por lo que se emplearon dos diseños diferentes de exposición. En el diseño de exposición única (ver inciso 4.5.1) se agregó el total de fármaco desde el principio de la incubación y se valoró el efecto a las 24, 48 y 72 horas. En el diseño de exposiciones repetidas (ver inciso 4.5.2), se agregó una tercera parte del fármaco cada día y la tercera parte del medio (100 μ L). Se valoró la magnitud del efecto a las 24, 48 y 72 horas. El efecto para cada tiempo y cada concentración se estimó por cuadruplicado. Con la exposición repetida se calculó la concentración inhibitoria 50 (CI50).

4.5.1 EXPOSICIÓN ÚNICA

En este diseño, se determinó la cantidad de medio necesario para el crecimiento de las células durante 72 horas (300 μ l). Al tiempo "0" se adicionaron 9 μ L de la solución del fármaco para alcanzar la concentración deseada. Se determinó el número de células a cada tiempo por medio del método de reducción de MTT. Se eliminaron 200 μ L de medio y a los 100 μ L de medio restantes se agregaron 20 μ l de solución de MTT al 5 %.

4.5.2 EXPOSICIÓN REPETIDA

En este diseño cada 24 horas se agregó la cantidad de medio necesario para el crecimiento de las células (100 μ L) y su respectivo fármaco (3 μ L de la solución correspondiente). A las 24 horas se estimó el número de células en algunos pozos y a los pozos restantes se agregó medio y su respectivo fármaco. A las 48 horas se estimó el número de células en algunos pozos y a los pozos restantes se agregó medio y su respectivo fármaco. A las 72 horas se estimó el número de células. Los pozos en los que se estimó el número de células a las 24 ó 48 horas recibieron por tanto un tercio y dos tercios respectivamente de la cantidad de fármaco que recibieron los pozos en que se estimó el número de células a las 72 horas.

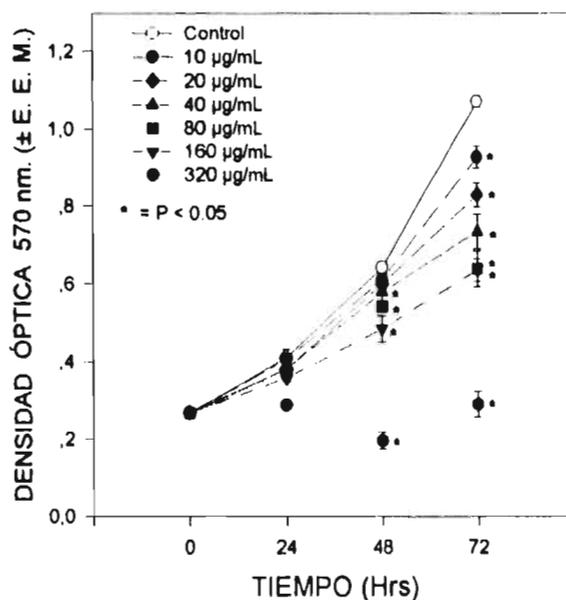
Las diferencias entre el curso temporal de diferentes compuestos se redujo notablemente con este diseño. La dispersión de las lecturas de MTT, también fueron considerablemente menores. En la tabla 2 (página 21) se presentan los coeficientes de variación de las lecturas de MTT en experimentos con cumarina con exposición única y exposición repetida.

Con este diseño se calculó la inhibición porcentual del crecimiento (porcentaje de inhibición = $(1-(T/C)) \times 100$) y se obtuvieron las CI50 para cada compuesto, a cada tiempo.

4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La significancia estadística de los efectos de todos los compuestos se estimó en base a las lecturas de MTT. La gráfica 6 muestra las lecturas de densidad óptica (MTT), para cada concentración de cumarina, a las a 24, 48 y 72 horas. Cada grupo tratado representa el promedio de cuatro pozos.

GRÁFICA 6
CRECIMIENTO DE CÉLULAS EXPUESTAS
A CUMARINA



Para cada tiempo de exposición se realizó un análisis de varianza (ANOVA) entre las lecturas del grupo control y las lecturas de los grupos tratados. Cuando se encontraron diferencias estadísticamente significativas, se aplicó la prueba de Dunnett (Zar JH 1984). Se empleó el programa Sigma stat, versión 1 para Windows.

5. RESULTADOS

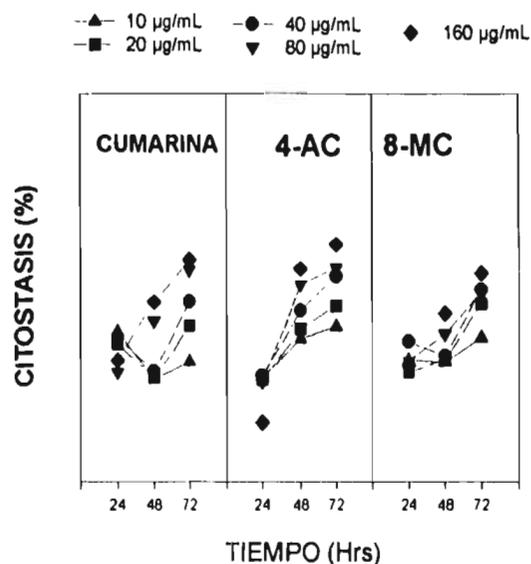
5.1 EXPOSICIÓN ÚNICA: CURSO TEMPORAL DEL EFECTO CITOSTÁTICO.

A exposición única se observó que el curso temporal del efecto citostático es diferente para los compuestos.

En la gráfica 7 se presentan los cursos temporales de cumarina, 4-acetoxicumarina (4A), 8-hidroxycumarina (8-HC) y 8-metoxicumarina (8-MC). Estos compuestos, no produjeron efectos citostáticos sino hasta las 48 horas y la magnitud de los efectos se incrementaron a las 72 horas.

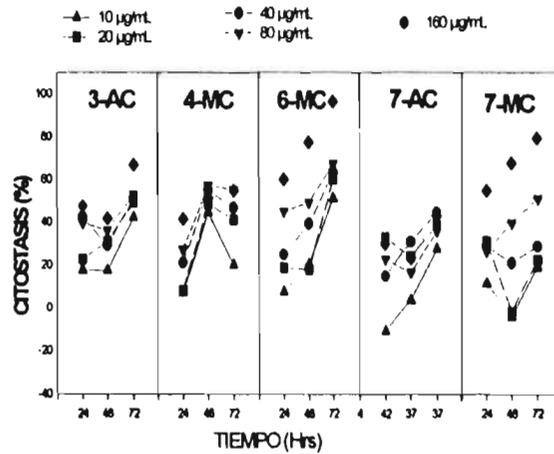
8-Acetoxicumarina no inhibió significativamente el crecimiento (datos no mostrados).

GRÁFICA 7



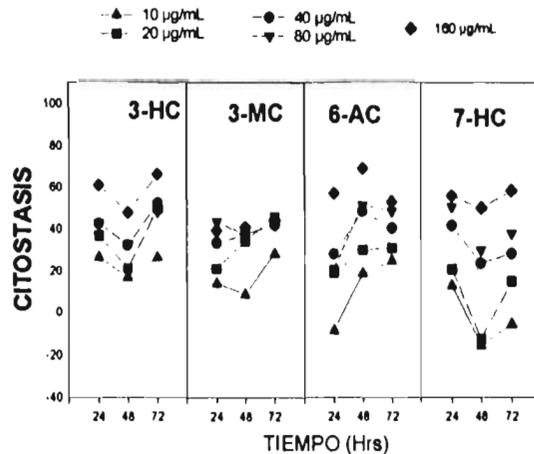
En la gráfica 8 se presentan los cursos temporales de 3-acetoxicumarina (3-AC), 4-metoxicumarina (4-MC), 6-metoxicumarina (6-MC), 7-acetoxicumarina (7-AC) y 7-metoxicumarina (7-MC). Estos compuestos inhibieron el crecimiento de las células *desde las 24 horas y su magnitud se incrementó en el tiempo.*

GRÁFICA 8



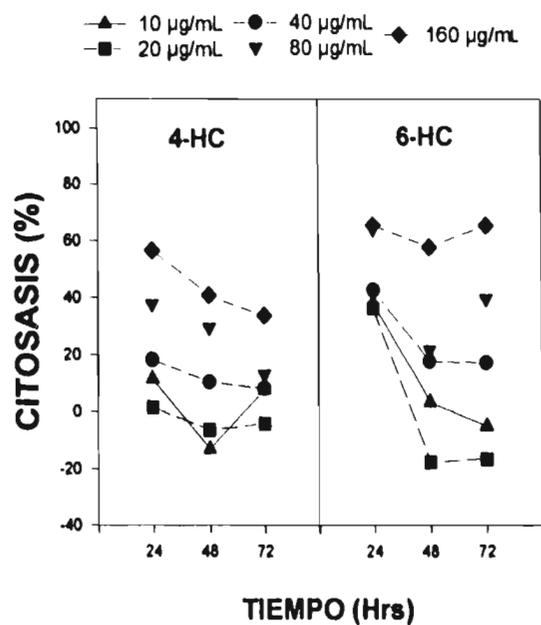
En la gráfica 9 se presentan los cursos temporales de 3-hidroxycumarina (3-HC), 3-metoxicumarina (3-MC), 6-acetoxicumarina (6-AC) y 7-hidroxycumarina (7-H). Estos compuestos *tuvieron efecto desde las 24 horas y su magnitud se mantiene estable en el tiempo.*

GRÁFICA 9



La 4-hidroxicumarina y 6-hidroxicumarina presentaron efecto **desde las 24 horas y su magnitud disminuye en el tiempo** (Gráfica 10).

GRÁFICA 10



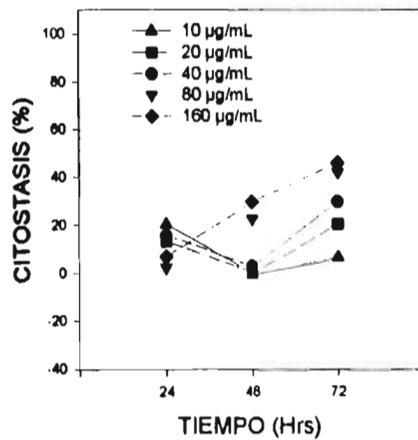
De acuerdo con nuestros resultados, el curso temporal de la acción citostática difirió entre los diferentes compuestos.

Las substituciones estudiadas, que corresponden a productos de biotransformación, unas probadas y otras potenciales, influyen en forma pronunciada sobre el patrón temporal y la magnitud de las acciones citostáticas de estos compuestos.

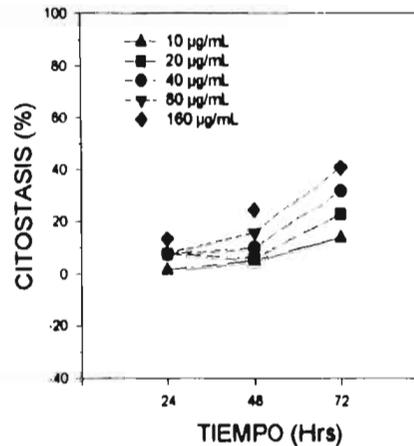
5.2 COMPARACIÓN DEL EFECTO CITOSTÁTICO DE LA CUMARINA A EXPOSICIONES ÚNICAS Y EXPOSICIONES REPETIDAS

Las gráficas 11 y 12 muestran el efecto citostático de la cumarina a diferentes concentraciones con exposición única y repetida, realizadas en experimentos simultáneos. Las gráficas 13 y 14 muestran la concentración inhibitoria 50 (CI50).

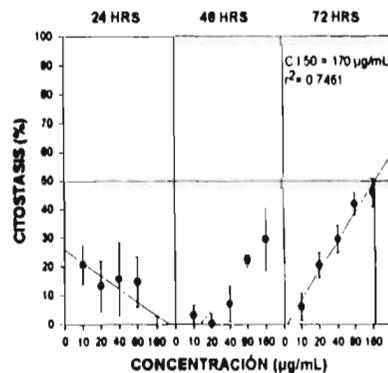
GRÁFICA 11
PORCENTAJE DE CITOSTASIS DE LA CUMARINA
A EXPOSICIÓN ÚNICA



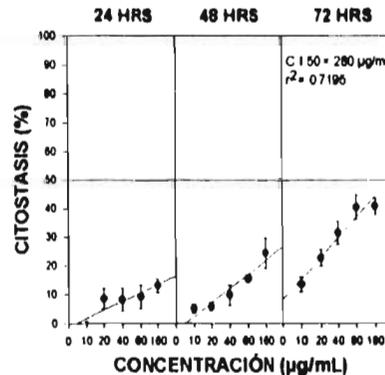
GRÁFICA 12
PORCENTAJE DE CITOSTASIS DE LA CUMARINA
EXPOSICIÓN REPETIDA



GRÁFICA 13
CONCENTRACIÓN INHIBITORIA 50 DE LA CUMARINA
EXPOSICIÓN ÚNICA



GRÁFICA 14
CONCENTRACIÓN INHIBITORIA 50 DE LA CUMARINA
EXPOSICIÓN REPETIDA



La dispersión de los valores fue menor con la exposición repetida y la CI50 fue mayor que en exposición única. Con exposición repetida el curso temporal mostró un patrón más uniforme que con la exposición única. En la tabla 2 se observa que el índice de variabilidad disminuyó considerablemente con el diseño de concentraciones repetidas.

TABLA 2: PORCENTAJE DEL COEFICIENTE DE VARIACIÓN DE LOS DOS DISEÑOS DE EXPOSICIÓN

CONC. µg/mL	EXPOSICIÓN ÚNICA				EXPOSICIONES REPETIDAS			
	24 HRS	48 HRS	72 HRS		CONC. µg/mL	24 HRS	48 HRS	72 HRS
CONTROL	31	6	8		CONTROL	10	4	3
10	16	7	10		10	8	3	6
20	17	7	11		20	8	2	7
40	30	13	14		40	10	8	12
80	25	4	19		80	1	3	14
160	26	30	18		160	5	9	5
320	25	25	60		320	5	20	22

5.3 EXPOSICIÓN REPETIDA. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA 50 (CI50)

Debido a las diferencias observadas entre los dos tipos de exposición con la cumarina, se estudiaron todos los compuestos con el diseño de exposiciones repetidas. Para cada uno se graficó la concentración contra el porcentaje de citostasis (%) a las 24, 48 y 72 horas, y se estimó la concentración inhibitoria 50 (CI50).

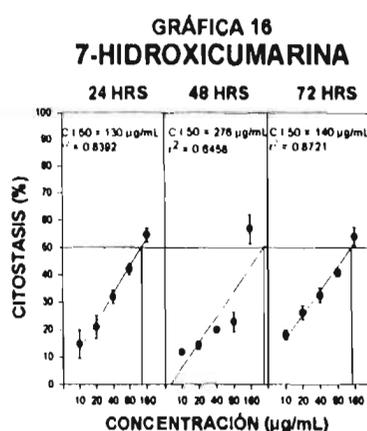
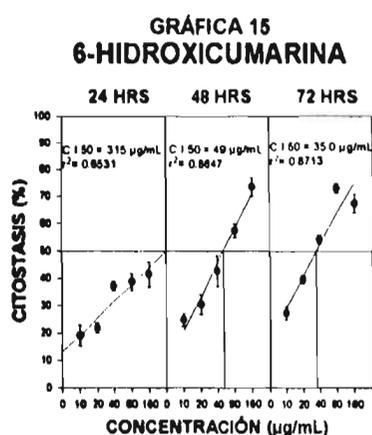
La latencia del efecto y la CI50 difirió para diferentes compuestos. A continuación se muestran los resultados de la cumarina y de los compuestos más activos.

CUMARINA

En la gráfica 14 se observa que la cumarina, a exposiciones repetidas sólo muestra efecto a las 72 horas, con una CI50 de 280 µg/mL.

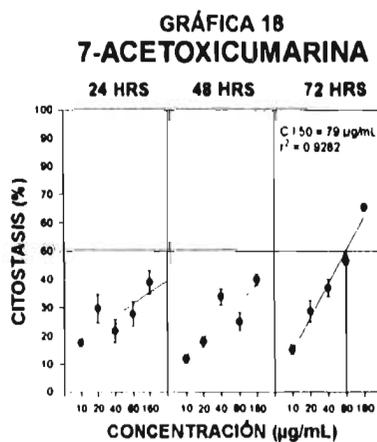
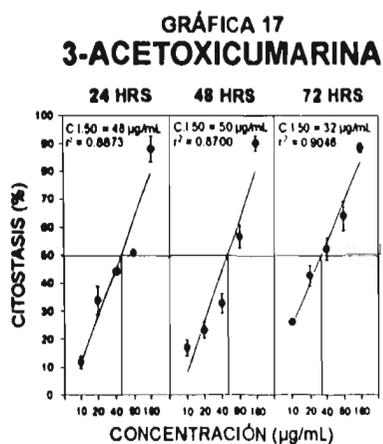
COMPUESTOS HIDROXILADOS

De los compuestos hidroxilados la molécula más activa fue la 6-hidroxicumarina. En la gráfica 15 se observa que el compuesto mostró actividad desde las 48 horas y fue 8 veces más potente que la cumarina. La gráfica 16 muestra que la 7-hidroxicumarina tuvo efecto desde las 24 horas pero sólo fue 2 veces más potente que la cumarina.



COMPUESTOS ACETOXILADOS

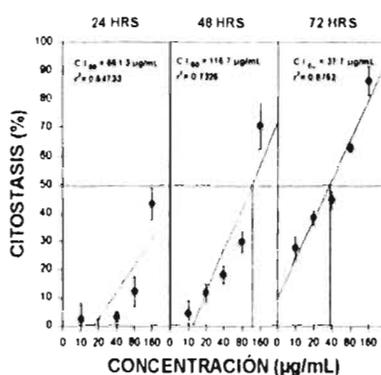
De los compuestos acetoxilados, la 3-acetoxicumarina fue la más activa. Mostró actividad desde las 24 horas y su CI₅₀ fue 8 veces menor que la de la cumarina (gráfica 17). La 7-acetoxicumarina solo mostró actividad desde las 72 horas (gráfica 18).



COMPUESTOS METOXILADOS

La 4 metoxicumarina fue la más potente (gráfica 19). En general los compuestos metoxilados fueron más potentes que la cumarina, ya que presentaron una CI50 menor que la de la cumarina. Sólo la 3 metoxicumarina mostró una CI50 mayor que la cumarina.

GRÁFICA 19
4-METOXICUMARINA



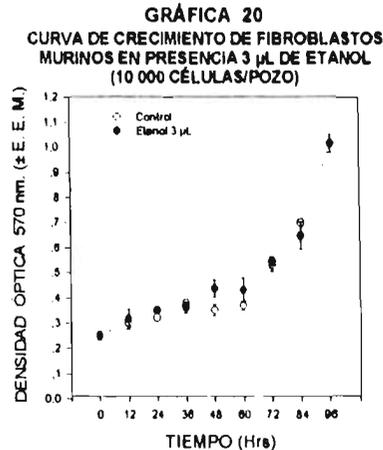
A continuación se presentan las concentraciones inhibitorias 50 (CI50) de todos los compuestos

COMPUESTO	CI50		
	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
CUMARINA	-	-	280
3-HIDROXICUMARINA	-	-	181
4-HIDROXICUMARINA	-	-	113
6-HIDROXICUMARINA	-	49	35
7-HIDROXICUMARINA	130	175	140
8-HIDROXICUMARINA	-	-	96
3-ACETOXICUMARINA	48	50	32
4-ACETOXICUMARINA	-	-	208
6-ACETOXICUMARINA	-	-	-
7-ACETOXICUMARINA	-	-	79
8-ACETOXICUMARINA	-	-	-
3-METOXICUMARINA	-	-	-
4-METOXICUMARINA	-	117	38
6-METOXICUMARINA	-	126	86
7-METOXICUMARINA	-	116	73
8-METOXICUMARINA	-	133	124

5.4 ENSAYOS EN FIBROBLASTOS MURINOS. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA 50 (C.I.50)

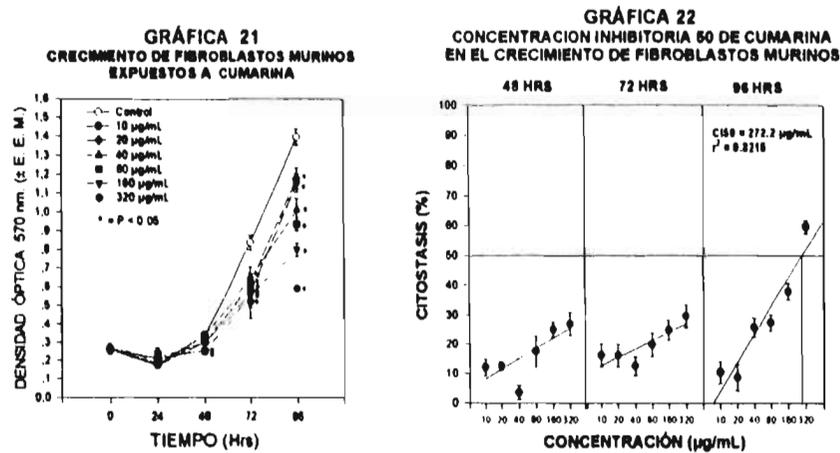
Utilizando el diseño de exposición única (inciso 4.5.2) se ensayó la actividad citostática de cumarina, 3-acetoxicumarina, 4-metoxicumarina y 6-hidroxycumarina en el crecimiento de fibroblastos murinos B82, de la colección Human Genetic Mutant Cell Repositori (Institute for Medical Research, Copewood, St Camde W, 08103, 609/966-7377, NIGMS) generados en ratones H2^K. Dichos fibroblastos fueron generosamente proporcionados por el Dr. Guillermo Alfaro. Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino con complemento inactivado por calor (SIGMA). Se sincronizaron y cultivaron en condiciones similares a los ensayos realizados con las células del melanoma murino B16 F10-5ab1 (inciso 4.1 al 4.3).

En la gráfica 20 se observa que los fibroblastos murinos crecen adecuadamente en presencia del vehículo (3 μ L de etanol por cada 100 μ L de medio). El crecimiento es exponencial solo a partir de las 48 horas.

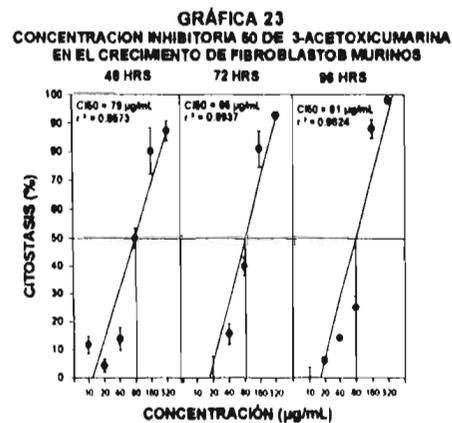


Al probar la cumarina (gráfica 21) se observa un efecto modesto a las 72 horas que se hace más evidente a las 96 horas. En la gráfica 22 se presentan las curvas concentración-respuesta correspondientes del mismo experimento.

Solo se observa una respuesta lineal al las 96 horas, con una CI50 de 270 μ g/mL. La potencia de la cumarina en el crecimiento de los fibroblastos murinos a las 96 horas, es similar a la observada a las 72 horas en el crecimiento de células del melanoma murino B16 F10-5ab1.

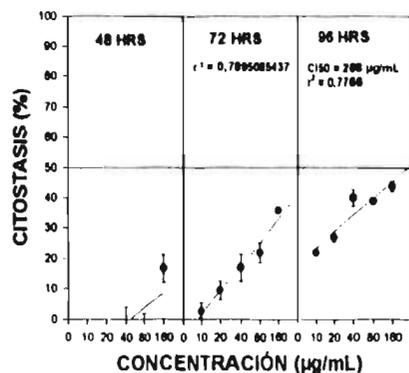


La 3-acetoxicumarina presentó efecto citostático desde las 24 horas. En la gráfica 23 se presentan las CI50 a partir de las 48 horas. Estos resultados concuerdan con los encontrados en las células del melanoma murino B16 F10-5ab1.

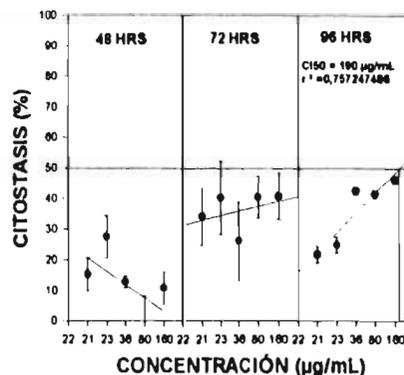


En las gráficas 24 y 25 se presentan los resultados obtenidos con 4-metoxicumarina y 6-hidroxycumarina respectivamente. Solo se observan efectos citostáticos a las 96 horas. Se requieren concentraciones hasta 7 más para alcanzar los efectos que en las células del melanoma murino B16 F10-5ab1 se alcanzan con concentraciones de 35 µg/mL.

GRÁFICA 24
CONCENTRACIÓN INHIBITORIA 50 DE 4 METOXICUMARINA
EN EL CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS MURINOS



GRÁFICA 25
CONCENTRACIÓN INHIBITORIA 50 LA 6 HIDROXICUMARINA
EN EL CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS MURINOS



6. DISCUSIÓN

Las discrepancias reportadas por varios autores sobre efectos citostáticos de cumarina y 7-hidroxycumarina se aclaran en el presente trabajo. Se deben a las diferentes concentraciones y tiempos de exposición empleados por los diferentes autores.

Algunos autores han reportado que la cumarina carece de efectos citotóxicos o citostáticos (Maucher et al, 1993; Angerer et al, 1994). Otros describen sólo un efecto citostático moderado (Roskopf et al, 1992). El grupo de Marshall en 1994 reportó que la cumarina y la 7-hidroxycumarina tienen efectos citostáticos reversibles en 14 líneas celulares humanas (Marshall et al, 1994).

Maucher y Angerer sólo estudiaron el efecto de la cumarina a las 24 horas y no observaron efectos. Nuestros resultados coinciden con estas observaciones

Roskopf y colaboradores midieron el efecto a las 47 horas, usando concentraciones de 0.1 a 200 µg/mL y observaron efectos moderados. Resultados similares reportaron con 4-hidroxycumarina y 7-hidroxycumarina. Nuestros resultados fueron semejantes a los de estos autores.

Marshall y colaboradores realizaron las mediciones cada 48 horas, durante una semana, y emplearon concentraciones hasta de 500 µg/mL. Este grupo concluyó que el efecto es dependiente de la concentración y el tiempo de exposición. Las concentraciones inhibitorias 50 (CI50) calculadas por estos autores fueron de 250 a 300 µg/mL. Nuestros resultados concuerdan con los de estos autores.

Varios autores han sugerido que, por su corta vida media, la cumarina actúa como una prodroga con respecto a su efecto antineoplásico (Egan et al, 1990). Nuestros resultados son consistentes con esta hipótesis, ya que a **exposiciones únicas**, las latencias y duraciones de los efectos de algunos productos de biotransformación son más breves que las de la cumarina. Estos hechos sugieren, que algunos productos de biotransformación pudieran ser activos por sí mismos, y que la cumarina pudiera requerir ser transformada en un compuesto activo.

Como la 7-hidroxycumarina es el producto cuantitativamente más importante en el humano (Cohen 1978), se ha sugerido que el efecto antineoplásico de la cumarina pudiera deberse a este compuesto (Marshall et al, 1994). Con **exposiciones repetidas** hemos observado que la CI50 de la 7-hidroxycumarina es aproximadamente la mitad del de la cumarina. Otros derivados de la cumarina también tienen una actividad mayor; 3-acetoxicumarina, 4-metoxicumarina y 6-hidroxycumarina tienen CI50 de aproximadamente al de 1/8 de la cumarina.

La concentración inhibitoria 50 (CI50) de la cumarina fue semejante en células de melanoma y fibroblastos murinos. En cambio, con la 3-acetoxicumarina la CI50 en fibroblastos es el doble de la CI50 en células del melanoma. Aparentemente la 3-acetoxicumarina tiene efectos tóxicos tanto en fibroblastos como en células de melanoma, puesto que presenta efectos desde las 24 horas.

Como las CI50 de 6-hidroxycumarina y 4-metoxicumarina son considerablemente mayores en fibroblatos que en células de melanoma, estos compuestos podrían tener un margen terapéutico substancialmente mayor que la cumarina.

Estos hechos sugieren que las acciones celulares de la 3-acetoxicumarina podrían ser diferentes a las de las otras cumarinas estudiadas.

Para evaluar la posible actividad citotóxica o citostática de compuestos antineoplásicos, el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos de Norteamérica ha establecido protocolos de cernimiento en 60 líneas tumorales humanas (Weinstein et al, 1997; Monk et al, 1991). En estos cernimientos se mide tiempo de sobrevida a daño celular y son adecuados para evaluar fármacos muy tóxicos. Pese a las importantes acciones citostáticas que presenta tanto *in vivo* como *in vitro*, la cumarina no está en la lista sustancias antineoplásicas evaluadas por ese Instituto, ya que con los tiempos y condiciones que establece este protocolo no es posible medir la actividad citostática de la cumarina y sus derivados.

Las condiciones empleadas por nosotros permiten medir la actividad citostática de este tipo de compuestos.

Dada la importancia clínica de estas cumarinas, la información obtenida *in vitro* en este trabajo es una base para estudiar los efectos a nivel celular y los mecanismos de acción.

7. EXPECTATIVAS

Como se menciona en el inciso 1.3, se ha estudiado la acción de la cumarina y de la 7-hidroxycumarina en la expresión de algunos oncogenes. Se desconoce los mecanismos de acción implicada en dicho efecto. Tampoco se han estudiado las acciones de estos compuestos en la expresión de otras proteínas, como las que regulan la progresión del ciclo celular.

En los últimos años el estudio del ciclo celular ha permitido comprender con mayor profundidad algunos de los procesos que intervienen en la proliferación celular y la transformación a células neoplásicas (Hung DT, et al. 1996). Solo recientemente, se ha considerado el estudio del ciclo celular dentro de los protocolos de cernimiento de fármacos con posible actividad antineoplásica (Weinstein JN, et al. 1997).

Células expuestas a agentes citostáticos sufren arrestos en fases particulares del ciclo celular. Se pueden usar los puntos de arresto para mapear los mecanismos de acción de agentes citostáticos o citotóxicos (Darzynkiewicz et al. 1994).

8. REFERENCIAS

1. Angerer E von, Keger M, and Maucher A. "Antitumor activity of coumarin in prostate and mammary cancer models." *Cancer Research Clinical Oncology* 120 (1994): 14-16.
2. Berkarda B, Bouffard-Eyüboglu H, and Derman U. "The effect of coumarin derivatives on the immunological system of human." *Agents and Actions* 13 (1983): 50-52.
3. Cohen AJ. "Critical Review of the toxicology of coumarin with special reference to interspecies differences in metabolism and hepatotoxic response and their significance to man." *Fd. Cosmet Toxicol* 17 (1978): 277-289.

4. Conley D, & Marshall ME. "Effects of Coumarin on Human Tumor Cell Growth and Cell Cycle Analysis In Vitro". Proceedings of AACR (1987). 63p.
5. Cox D, O'Kennedy R, & Thornes RD. (1989). The Rarity of Liver Toxicity in Patients Treated with Coumarin (1,2-Benzopyrone). *Human Toxicol*, 8, 501-506.
6. Darzynkiewicz Z, Gong J, and Traganos F. "Analysis of DNA Content and Cyclin Protein Expression in Studies of DNA Ploid, Growth Fraction, Lymphocyte Stimulation, and the Cell Cycle". *Methods in Cell Biology* Academic Press (1994): 421-435
7. Egan D, et al. "The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarin-related compounds." *Drug Metabolism Review* 22 (1990): 503-529.
8. Fink PC and Kerékjarto Bv Z. "Comparativ study of coumarin metabolism." *Physiol Chem* 345 (1966): 272
9. Freshney RI. "Measurement of Viability and Cytotoxicity." *Culture of animal cells*". Wiley Liss ed. Third ed. New York: John Wiley & Sons, 1994. 287-298.
10. Goodman GA, et al. "Anticoagulantes, Trombolíticos y Antiplaquetarios." *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*". Hardman JG Ph.D. ed. Novena ED. ed. México: McGraw-Hill Interamericana, 1996. II. 1429-1434.
11. Hilgard P, et al. "Oral anticoagulation in the treatment of a spontaneously metastasising murine tumour (3LL)." *Br J Cancer* 35 (1977): 78-85.
12. Huang H-C, Lai M-W, and Wang H-R. "Antiproliferative effect of esculetin on vascular smooth muscles cells: possible roles of signal transduction pathways." *European J of Pharmacology* 237 (1993): 39-44.
13. Hung DT, Jamison TF, and Schreiber SL. "Understanding and controlling the cell cycle with natural products." *Chemistry & Biology* 3 (1996): 623-639.
14. Iersel van MLPS, et al. "Metabolism of [3-¹⁴C] coumarin by human liver microsomes." *Xenobiotica* 24 (1994): 795-803.
15. Kahn J, Preis P, Waldman F, & Tseng A Jr. Coumarin modulates the cell cycle progression of an MTV-EJras cell line. *Cancer Research Clinical Oncology*, 120 (1994). 19-22

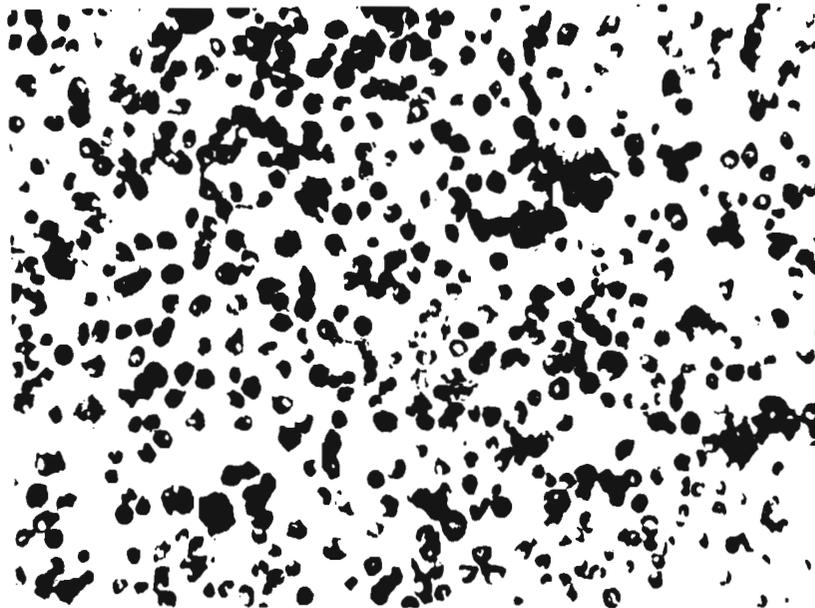
16. Maat B and Hilgard P. "Anticoagulants and Experimental Metastases Evaluation of Antimetastatic Effects in Different Model Systems." *Cancer Research Clinical Oncology* 101 (1981): 275-283.
17. Marshall ME and Mendelsohn L. "Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma With Coumarin (1,2 Benzopyrone) and Cimetidine: A Pilot Study." *J Clinical Oncology* 5 (1987): 862-866.
18. Marshall ME, Butler K, and Mendelsohn L. "Treatment of advanced malignant melanoma with coumarin and cimetidine: a pilot study." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 24 (1989): 65-66.
19. Marshall ME, Butler K, and Hermansen D. "Treatment of Hormone-Refractory Stage D Carcinoma of Prostate With Coumarin (1,2-Benzopyrone) and Cimetidine: A Pilot Study." *The Prostate* 17 (1990): 95-99.
20. Marshall ME, Butler K, and Fried A. "Phase I evaluation of coumarin (1,2-benzopyrone) and cimetidine in patients with advanced malignancies." *Mol Biother* 3 (1991): 170-178.
21. Marshall ME, Mohler JL, Edmonds K, et al. "An update review of the clinical development of coumarin (1,2 benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin. *Cancer Research Clinical Oncology* 120 (1994a): 39-42.
22. Marshall ME, et al. "Growth-inhibitory effects of coumarin (1,2 benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin on human malignant cell lines in vitro." *Cancer Research Clinical Oncology* 120 (1994b): 3-10.
23. Maucher A, Keger M, and Angerer E von. "Evaluation of the antitumour activity of coumarin in prostate cancer models." *Cancer Research Clinical Oncology* 119 (1993): 152-154.
24. Mohler JL, HGomella GL, and Crawford ED. "Phase II Evaluation of Coumarin (1,2-Benzopyrone) in Metastatic Prostatic Carcinoma." *The Prostate* 20 (1992): 123-131.
25. Mosmann T, "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. of Immunological Methods*, 65 (1983): 55-63
26. Morris DP, et al. "Characterization of the purified Vitamin K-dependient glutamil carboxylase." *J Biol Chem* 1993 (1993): 8735-8742.

27. Murray DHR, Méndez J, and Brown AS. "Chapter 1 Introduction: Historical Development." *The Natural Coumarins*. John Wiley & sons LTD ed. Chichester: Wiley Interscience Publication, 1982. 1-12.
28. Orozco AA, García MMJ, Velázquez MA, Jiménez OFA, Mendoza PN, Mandoki JJ, Molina GJA. "Modelo in vivo de melanoma maligno en ratón singénico C57BL/6 para evaluar fármacos antineoplásicos" *Memorias del XX Congreso Nacional de Farmacología* (1997). 55
29. Pelkonen O, et al. "Regulation of coumarin 7-hydroxylation in man." *Cancer Research Clinical Oncology* 120 (1994): 30-31.
30. Preuss U, Ueberschär S, & Grote W. "Reproduktionstoxicologische Untersuchungen an Ratten nach oraler Verabreichung eines Benzopyron Präparates". *Arzneim Forsh*, 34 (1984): 1305-1313.
31. Ritschel WA, et al. "Pharmacokinetics of Coumarin and its 7-Hydroxy-Metabolites upon Intravenous and Peroral Administration of Coumarin in Man." *European Journal of Clinical Pharmacology* 12 (1977): 457-461.
32. Roskopf F, Kraus J, and Franz G. "Immunological and antitumor effects of coumarin and some derivatives." *Pharmazie* 47 (1992): 139-142.
33. Sargent NS, Oestreicher M, Haidvogel, Madnick HM, Burger MM. "Growth regulation of cancer metastases by their host organ " *Proc Natl Acad Sci* 85 (1988) 19: 7251-5
34. Seliger B and Pettersson H. "7-Hydroxycoumarin inhibits oncogen-induced transformation of murine fibroblasts." *Cancer Research Clinical Oncology* 120 (1994): 23-27.
35. Shilling WH, Crampton FR, and Langland RC. "Metabolism of Coumarin in Man." *Nature* 221 (1969): 664-665.
36. Thornes RD. "Adjuvant therapy of cancer via the cellular immune mechanism or fibrin by induced fibrinolysis and oral anticoagulants." *Cancer* 35 (1975): 91-97.
37. Thornes RD, Lynch G, and Sheehan. "Cimetidine and Coumarin therapy of melanoma." *Lancet* (1982): 328
38. Thornes RD. "Prevention of early recurrence of high risk malignant melanoma by coumarin." *E J Surgical Oncology* 15 (1989): 431-435.

39. Thornes RD, et al. "Treatment with coumarin to prevent or delay recurrence of malignant melanoma." *Cancer Research Clinical Oncology* 120 (1994): 32-34.
40. Weinstein JN, Myers TG, and OConnor P. "An Information-Intensive Approach to the Molecular Pharmacology of Cancer." *Science* 275 (1997): 343-349.
41. Zacharski LR. "Effect of Warfarin on Survival in Small Cell Carcinoma of the Lung." *JAMA* 245 (1981): 831-835.
42. Zar JH. *Biostatistical Analysis*. 2^o ed. New York: Prentice Hall, Englewood Cliffs, 1984. 1. 194-195.



Fotografía 1: células en cultivo del melanoma murino B16 F10-5ab1



Fotografía 2: células del melanoma murino después de ser expuestas a MTT