

135  
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO *in vitro* DEL EFECTO  
INMUNOESTIMULANTE DE 5 CUMARINAS, EN  
MACROFAGOS MURINOS.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**B I O L O G O**

**P R E S E N T A**

**ANGELA GERMANA RAMIREZ GARCIA**



DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. JUAN ARCADIO MOLINA GUARNEROS

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
FACULTAD DE CIENCIAS  
1998  
CON ESCOLAR

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

267001



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: Estudio in vitro del efecto  
inmunoestimulante de 5 cumarinas, en macrófagos murinos.

realizado por Ramírez García Angela Germana

con número de cuenta 8504346-8 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario M. en C. Juan Arcadio Molina Guarneros

Propietario Med. Cir. Juan José Mandoki Weitzner

Propietario Dra. Yolanda Caballero Arroyo

Suplente Dr. Luis Felipe Jiménez García

Suplente Q.F.B. Fernando Ramos Reyes

*J. Arcadio Molina*  
*Juan José Mandoki Weitzner*  
*Yolanda Caballero Arroyo*  
*Luis Felipe Jiménez García*  
*Fernando Ramos Reyes*

FACULTAD DE CIENCIAS  
M.

Consejo Departamental de Biología

*P. a. Edna María Suárez Díaz*  
DRA. EDNA MARÍA SUÁREZ DÍAZ DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGÍA

**A mis padres, Micaela García Avendaño y Rafael Ramírez Espítia, por todo su apoyo, amor y comprensión que me han brindado durante todo este tiempo. Gracias por hacer posible mi existencia.**

**A mis hermanos, a Paty, por convertirte en mi mejor amiga y ser la mejor de las hermanas; a Mario por hacer realidad la presencia de dos princesitas maravillosas.**

**A Danis y Sandy, por darme su amor y ternura, por añadir un poco de magia y fantasía a los momentos que pasamos juntas. Las quiero mucho.**

**A Alvaro, por tu amor y amistad, sobre todo, por aguantarme con todas mis locuras.**

**Al M. en C. Juan A. Molina Guarneros, por su dedicación y paciencia en la realización de este trabajo.**

**A Juanita García Mondragón, por todas sus enseñanzas, consejos, y por ser la mamá del laboratorio.**

**A Armando Orozco Arriaga, por su ayuda.**

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>3</b>
<b>GLOSARIO</b>	<b>3</b>
<b>INDICE DE TABLAS, ESQUEMAS Y FIGURAS</b>	<b>4</b>
<b>I.-RESUMEN</b>	<b>6</b>
<b>II.-INTRODUCCION</b>	
Historia de la cumarina	8
Usos de la cumarina y algunos de sus derivados	9
Biotransformación de la cumarina	10
Macrófagos	11
Función del macrófago	12
Factor de necrosis tumoral alfa	13
Complejo principal de histocompatibilidad(CPH)	14
Cumarina y el sistema inmune	15
<b>III.-OBJETIVO</b>	<b>16</b>
<b>IV.-HIPOTESIS</b>	<b>16</b>
<b>V.-MATERIAL Y METODOS</b>	
Compuestos cumarínicos a evaluar en los bioensayos <i>in vitro</i>	17
Síntesis de la 3-hidroxycumarina	18
Síntesis de la 6-monohidroxycumarina	19
Obtención del material biológico	20
Inducción de los macrófagos peritoneales	20
Obtención de las células	20
Exposición a los fármacos	21
Estimación de la viabilidad celular posterior a la exposición a los Fármacos mediante la reducción del tetrazolio de dimetilo (MTT)	21
Actividad fagocitaria	22
Evaluación de la actividad fagocitaria	23
Estimación de la producción de TNFalfa (ELISA indirecto)	24
ELISA en célula	27
Elaboración de gráficas y análisis estadístico	30
<b>VI.-RESULTADOS</b>	
Actividad fagocitaria en macrófagos peritoneales	31
Secreción del factor alfa necrosante de tumores	32

Expresión de los antígenos-la (CPH clase II)	33
<b>VII.-DISCUSION</b>	<b>62</b>
<b>VIII.-AGRADECIMIENTOS</b>	<b>67</b>
<b>IX.-REFERENCIAS</b>	<b>68</b>

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>3</b>
<b>GLOSARIO</b>	<b>3</b>
<b>INDICE DE TABLAS, ESQUEMAS Y FIGURAS</b>	<b>4</b>
<b>I.-RESUMEN</b>	<b>6</b>
<b>II.-INTRODUCCION</b>	
Historia de la cumarina	8
Usos de la cumarina y algunos de sus derivados	9
Biotransformación de la cumarina	10
Macrófagos	11
Función del macrófago	12
Factor de necrosis tumoral alfa	13
Complejo principal de histocompatibilidad(CPH)	14
Cumarina y el sistema inmune	15
<b>III.-OBJETIVO</b>	<b>16</b>
<b>IV.-HIPOTESIS</b>	<b>16</b>
<b>V.-MATERIAL Y METODOS</b>	
Compuestos cumarínicos a evaluar en los bioensayos <i>in vitro</i>	17
Síntesis de la 3-hidroxycumarina	18
Síntesis de la 6-monohidroxycumarina	19
Obtención del material biológico	20
Inducción de los macrófagos peritoneales	20
Obtención de las células	20
Exposición a los fármacos	21
Estimación de la viabilidad celular posterior a la exposición a los Fármacos mediante la reducción del tetrazolio de dimetilo (MTT)	21
Actividad fagocitaria	22
Evaluación de la actividad fagocitaria	23
Estimación de la producción de TNFalfa (ELISA indirecto)	24
ELISA en célula	27
Elaboración de gráficas y análisis estadístico	30
<b>VI.-RESULTADOS</b>	
Actividad fagocitaria en macrófagos peritoneales	31
Secreción del factor alfa necrosante de tumores	32

## ABREVIATURAS

**ANOVA.**-Análisis de varianza  
**ANTIGENOS-Ia.**-Antígenos asociados a la región de la respuesta inmune  
**CYP2A5.**-Isoforma del citocromo P-450  
**DMSO.**-Dimetilsulfóxido.  
**D-MEM.**-Medio de Eagle modificado por Dulbecco  
**ELISA.**-Inmunoensayo enzimático en fase sólida  
**IFN- $\gamma$ .**-Interferon gamma  
**LPS.**-Lipopolisacárido de *E. coli*  
**LTC.**-Linfocitos T citotóxicos  
**MTT.**-Tetrazolio de dimetilo  
**NBT.**-Azul de tetrazolio  
**OPD.**-Ortofenilendiamina  
**PBS.**-Amortiguador de fosfato-salina  
**PBS-T20.**-amortiguador de fosfato-salina-tween 20  
**SBF.**-Suero bovino fetal  
**TNF $\alpha$ .**-Factor alfa necrosante de tumores

## GLOSARIO

**ANOVA.**-Prueba estadística que permite comparar las varianzas de varios grupos con diferentes tratamientos entre sí.  
**ANTIGENOS DR, DQ.**-Proteínas de superficie expresadas en células humanas presentadoras de antígeno (*dendriticas, macrófagos o linfocitos B*), codificadas en las subregiones DR y DQ del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (HLA).  
**CLASE II DEL CPH.**-Región del complejo H-2I del cromosoma 17 murino (región asociada a la respuesta inmune murina), en donde están los locus de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de las subregiones A e I, que conforman el dímero del antígeno Ia.  
**INMUNOMODULACION.**-Desaparición de proteínas de la superficie de membranas citosólica de células vivas, después de combinarse con su *ligando específico o con un anticuerpo específico, debido a internalización de estos complejos.*  
**MACROFAGO PERITONEAL INDUCIDO.**-Célula fagocítica mononuclear inducida a arriar a la cavidad peritoneal, mediante algún agente químico o biológico que presenta un estado de sensibilización.  
**MACROFAGO PERITONEAL RESIDENTE.**-Célula fagocítica mononuclear residente en la cavidad peritoneal.  
**PRUEBA DE DUNNETT.**-Prueba estadística de comparación múltiple de promedios, en la que se comparan varios grupos con un grupo control.  
**SINERGISMO.**-Resultado de una interacción entre dos o más sustancias, cuyo efecto es mayor cuando se administran juntas, del que tienen cada una cuando se utilizan por separado.

## ABREVIATURAS

- ANOVA.**-Análisis de varianza  
**ANTIGENOS-Ia.**-Antígenos asociados a la región de la respuesta inmune  
**CYP2A5.**-Isoforma del citocromo P-450  
**DMSO.**-Dimetilsulfóxido.  
**D-MEM.**-Medio de Eagle modificado por Dulbecco  
**ELISA.**-Inmunoensayo enzimático en fase sólida  
**IFN- $\gamma$ .**-Interferon gamma  
**LPS.**-Lipopolisacárido de *E. coli*  
**LTC.**-Linfocitos T citotóxicos  
**MTT.**-Tetrazolio de dimetilo  
**NBT.**-Azul de tetrazolio  
**OPD.**-Ortofenilendiamina  
**PBS.**-Amortiguador de fosfato-salina  
**PBS-T20.**-amortiguador de fosfato-salina-tween 20  
**SBF.**-Suero bovino fetal  
**TNF $\alpha$ .**-Factor alfa necrosante de tumores

## GLOSARIO

- ANOVA.**-Prueba estadística que permite comparar las varianzas de varios grupos con diferentes tratamientos entre sí.
- ANTIGENOS DR, DQ.**-Proteínas de superficie expresadas en células humanas presentadoras de antígeno (dendríticas, macrófagos o linfocitos B), codificadas en las subregiones DR y DQ del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (HLA).
- CLASE II DEL CPH.**-Región del complejo H-2I del cromosoma 17 murino (región asociada a la respuesta inmune murina), en donde están los locus de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de las subregiones A e I, que conforman el dímero del antígeno Ia.
- INMUNOMODULACION.**-Desaparición de proteínas de la superficie de membranas citosólica de células vivas, después de combinarse con su ligando específico o con un anticuerpo específico, debido a internalización de estos complejos.
- MACROFAGO PERITONEAL INDUCIDO.**-Célula fagocítica mononuclear inducida a arriar a la cavidad peritoneal, mediante algún agente químico o biológico que presenta un estado de sensibilización.
- MACROFAGO PERITONEAL RESIDENTE.**-Célula fagocítica mononuclear residente en la cavidad peritoneal.
- PRUEBA DE DUNNETT.**-Prueba estadística de comparación múltiple de promedios, en la que se comparan varios grupos con un grupo control.
- SINERGISMO.**-Resultado de una interacción entre dos o más sustancias, cuyo efecto es mayor cuando se administran juntas, del que tienen cada una cuando se utilizan por separado.

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<b>Esquema 1.</b> -Estructura química de la cumarina	8
<b>Tabla 1.</b> -aplicación de la cumarina y algunos de sus derivados.	10
<b>Esquema 2.</b> -Estadios del desarrollo de los macrófagos a partir de médula ósea	11
<b>Tabla II.</b> -Tipos de macrófagos	12
<b>Esquema 3.</b> -Compuestos cumarínicos a evaluar en los bioensayos	17
<b>Esquema 4.</b> -Síntesis de la 3-hidroxycumarina	18
<b>Esquema 5.</b> -Síntesis de la 6-hidroxycumarina	19
<b>Esquema 6.</b> -Ensayo inmunoenzimático "ELISA" indirecto para Estimar TNF $\alpha$	26
<b>Esquema 7.</b> -Ensayo inmunoenzimático "ELISA en célula" para estimar moléculas de clase II del CPH	29
<b>Figura 1.</b> -Curva estándar del número de macrófagos peritoneales y su actividad fagocitaria evaluado mediante la reducción del azul de tetrazolio/zymosan-A	37
<b>Figura 2.</b> -Efecto de la cumarina (exposición 24 h) en la actividad fagocitaria de macrófagos peritoneales inducidos de ratón Balb/c	38
<b>Figura 3.</b> -Efecto de la 3-hidroxycumarina (exposición 24h) en la actividad fagocitaria de macrófagos peritoneales inducidos de ratón Balb/c	39
<b>Figura 4.</b> -Efecto de la 6-hidroxycumarina (exposición 24h) en la actividad fagocitaria de macrófagos peritoneales inducidos de ratón Balb/c	40
<b>Figura 5.</b> -Efecto de la 7-hidroxycumarina (exposición 24h) en la actividad fagocitaria de macrófagos peritoneales inducidos de ratón Balb/c	41
<b>Figura 6.</b> -Curva estándar de TNF $\alpha$ recombinante de ratón mediante ELISA indirecto tipo sandwich	42
<b>Figura 7.</b> -Efecto de la 3-hidroxycumarina (exposición 24 h) en la secreción de TNF $\alpha$ por macrófagos peritoneales inducidos de ratón Balb/c	43
<b>Figura 8.</b> -Efecto de la 4-hidroxycumarina (exposición 24 h) en la secreción de TNF $\alpha$ por macrófagos peritoneales inducidos de ratón Balb/c	44
<b>Figura 9.</b> -Efecto de la 6-hidroxycumarina (exposición 24 h) en la secreción de TNF $\alpha$ por macrófagos peritoneales inducidos de ratón Balb/c	45
<b>Figura 10.</b> -Efecto de la 7-hidroxycumarina (exposición 24 h) en la secreción de TNF $\alpha$ por macrófagos peritoneales inducidos de ratón Balb/c	46
<b>Figura 11.</b> -Curva estándar de titulación del anticuerpo monoclonal anti Ia en macrófagos peritoneales inducidos expuestos 2h a ovoalbúmina	47

<b>Figura 12.-</b> Expresión de antígenos-la (CPH-II) por macrófagos peritoneales inducidos expuestos 60 min. a ovoalbúmina	48
<b>Figura 13.-</b> Expresión de antígenos-la (CPH-II) por macrófagos peritoneales inducidos expuestos 120 min. a ovoalbúmina	49
<b>Figura 14.-</b> Efecto <i>in vitro</i> de la cumarina (exposición 24h) en la expresión de antígenos-la por macrófagos peritoneales inducidos.	50
<b>Figura 15.-</b> Efecto <i>in vitro</i> de la 3-hidroxicumarina (exposición 24h) en la expresión de antígenos-la por macrófagos peritoneales inducidos.	51
<b>Figura 16.-</b> Efecto <i>in vitro</i> de la 4-hidroxicumarina (exposición 24h) en la expresión de antígenos-la por macrófagos peritoneales inducidos.	52
<b>Figura 17.-</b> Efecto <i>in vitro</i> de la 6-hidroxicumarina (exposición 24h) en la expresión de antígenos-la por macrófagos peritoneales inducidos.	53
<b>Figura 18.-</b> Efecto <i>in vitro</i> de la 7-hidroxicumarina (exposición 24h) en la expresión de antígenos-la por macrófagos peritoneales inducidos.	54
<b>Figura 19.-</b> Curso temporal de la expresión <i>in vitro</i> de antígenos-la por macrófagos peritoneales inducidos estimulada con interferon- $\gamma$ detectado mediante ELISA en célula	55
<b>Figura 20.-</b> Efecto <i>in vitro</i> de la cumarina (exposición 24h) en la expresión de antígenos-la por macrófagos peritoneales inducidos.	56
<b>Figura 21.-</b> Efecto <i>in vitro</i> de la cumarina (exposición 72h) en la expresión de antígenos-la por macrófagos peritoneales inducidos.	57
<b>Figura 22.-</b> Efecto <i>in vitro</i> de la cumarina (exposición 72h) en la viabilidad de macrófagos peritoneales inducidos evaluado mediante la reducción de Tetrazolio de dimetilo	58
<b>Figura 23.-</b> Efecto <i>in vitro</i> de la 3-hidroxicumarina (exposición 72h) en la expresión de antígenos-la por macrófagos peritoneales inducidos.	59
<b>Figura 24.-</b> Efecto <i>in vitro</i> de la 6-hidroxicumarina (exposición 72h) en la expresión de antígenos-la por macrófagos peritoneales inducidos.	60
<b>Figura 25.-</b> Efecto <i>in vitro</i> de la 7-hidroxicumarina (exposición 72h) en la expresión de antígenos-la por macrófagos peritoneales inducidos.	61

## RESUMEN

La cumarina (1,2-benzopirona) es una molécula de origen vegetal, aislada y purificada por Vogel en 1822 del haba de tonka (*Dipterix odorata*), obtenida por síntesis química mediante el tratamiento de sales de sodio de orto-hidroxibenzaldehído, con anhídrido acético ó síntesis de Perkin. Esta molécula como algunos de sus derivados, se utilizan actualmente en la industria de los cosméticos, farmacéutica, y alimenticia. En la medicina se utiliza para el tratamiento de algunos tipos de neoplasias malignas y sus metástasis: como en el melanoma, en el carcinoma de la próstata, en el carcinoma renal y en el carcinoma pulmonar de células pequeñas.

La cumarina así como su principal producto de biotransformación en humanos, la 7-hidroxycumarina, han mostrado actividad inmunomoduladora *in vitro* en células del sistema inmune (fagocitos polimorfonucleares y mononucleares y linfocitos de sangre periférica), sin embargo no se conocen las acciones directas de otros de sus productos de biotransformación monohidroxilados (3-, 4-, y 6-monohidroxycumarinas) en el sistema inmune, por lo que para conocer estas acciones es necesario simplificar este estudio llevándolo a cabo en un sistema *in vitro*. Como consecuencia de la facilidad de obtener células murinas en un gran número y provenir estas de individuos genéticamente semejantes, optamos por emplear macrófagos de exudado peritoneal en el presente estudio. Se evaluaron tres funciones propias de los macrófagos de exudado peritoneal luego de haberlos expuesto *in vitro* a cada una de cinco cumarinas: a) el "estallido respiratorio" como estimación indirecta de la actividad fagocitaria, mediante el

ensayo colorimétrico de la reducción del azul de tetrazolio acoplado a partículas de zymosan, b) la secreción del factor alfa necrosante de tumores, mediante el ensayo inmunoenzimático "ELISA" tipo sandwich, empleando anticuerpos monoclonales y c) la expresión de moléculas de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (H2-IA, e IE), mediante el ensayo inmunoenzimático "ELISA en célula", empleando también anticuerpos monoclonales. Mis resultados muestran: a) un incremento en la actividad fagocitaria con la 3-, y 6-monohidroxycumarinas del 51 y 81% respectivamente con la exposición durante 24 horas ( $p < 0.05$ ), b) un incremento en la secreción de factor alfa necrosante de tumores del 63% con la exposición a la 7-monohidroxycumarina durante 24 horas, en presencia de lipopolisacárido de *E. coli* ( $p < 0.05$ ), c) la cumarina produjo luego de 72 horas de exposición de las células peritoneales a la misma, un incremento de 40% en la expresión de moléculas de clase II del complejo principal de histocompatibilidad, en presencia del inductor de la expresión de estas moléculas (interferon- $\gamma$  recombinante murino), y un incremento de 82% en ausencia de este inductor. Mis resultados muestran que el tratamiento *in vitro* con diferentes cumarinas, incrementa o inhibe diferentes funciones de los macrófagos peritoneales murinos, por lo que existe la posibilidad de poder modular farmacológicamente *in vivo* con cumarinas, algunas de las respuestas de estas células mononucleares del sistema inmune murino al administrarlas solas o en alguna combinación con fines terapéuticos.

## INTRODUCCION

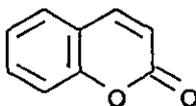
### **HISTORIA DE LA CUMARINA**

La cumarina (1,2-benzopirona) es un compuesto heterocíclico; es la lactona del ácido orto-hidroxifenil-propiónico. Es una molécula que se encuentra distribuída en el reino vegetal, principalmente en las leguminosas (*Leguminosae*), las orquídeas (*Orchidaceae*), las rutáceas (*Rutaceae*), y umbelíferas (*Umbelliferae*) (1, 2). Tiene un peso molecular de 146.15, un punto de fusión de 68-70°C y un punto de ebullición de 303°C. Presenta una absorción máxima en el rango del ultravioleta a 272 nm disuelta en cloroformo. La cumarina es soluble en etanol, cloroformo y aceites, y forma cristales incoloros de olor agradable (3).

La cumarina fué aislada y purificada por primera vez por Vogel del haba de tonka (*Dipterix odorata*) en 1822. Posteriormente W.H Perkin, la sintetizó mediante el tratamiento de sales de sodio de ortho-hidroxibenzaldehído, con anhídrido acético; este procedimiento se conoce actualmente como la síntesis de Perkin (4).

La cumarina se incluye dentro de los compuestos llamados benzopironas debido a que su estructura consiste en la unión de un benceno y un anillo de  $\alpha$ -pirona (5).

#### **ESQUEMA 1**



**Estructura química de la cumarina.**

## **USOS DE LA CUMARINA Y ALGUNOS DE SUS DERIVADOS**

La cumarina como algunos de sus derivados tienen una gran variedad de usos, en la industria y en el área biomédica. En la industria la cumarina se ha usado en el ramo de la perfumería debido a que presenta un aroma agradable como a heno recién cortado, por lo que se utilizó como el primer perfume natural que se sintetizó a partir de un producto químico del alquitrán de hulla (3).

También se ha utilizado como aditivo de alimentos en combinación con la vainilla, como estabilizador del olor en el tabaco americano y para enmascarar olores en la elaboración de cosméticos (3).

En el área biomédica se ha encontrado que la cumarina se utiliza en el tratamiento de varios padecimientos como son: el linfedema de alto contenido de proteínas, infecciones crónicas; como la brucelosis, micoplasmosis, toxoplasmosis, fiebre Q; y en enfermedades reumáticas debido a que presenta una actividad antipirética y antiinflamatoria (3). *In vitro*, la cumarina aumenta la actividad fagocitaria de macrófagos peritoneales murinos (6), y la 7-hidroxycumarina lo hace en granulocitos humanos de sangre periférica y macrófagos peritoneales de ratón (7).

**Tabla I Aplicación de la cumarina y algunos de sus derivados.**

Compuesto	APLICACIÓN
Cumarina	Fijador, saborizante, estabilizador, aditivo, inmunomodulador y tumoristático
4-hidroxycumarina	Anticoagulante, producción de dicumarol,
Warfarina	Rodenticida, anticoagulante oral.
3-, 4-hidroxycumarina	Industria de perfumes
6-metilcumarina	Industria alimenticia, para aumentar el sabor. Aromatizante. En dermatología en filtros solares.
7-Hidroxycumarina	Dermatología, como filtro solar.

### **BIOTRANSFORMACION DE LA CUMARINA**

El metabolismo de la cumarina es diferente dependiendo de la especie biológica. En el caso de los seres humanos la cumarina es metabolizada hasta en un 70% a 7-hidroxycumarina, al igual que en primates y mandriles(8). Este primer paso en el metabolismo de la cumarina es catalizado por la fase 1 del sistema citocromo p450 isoforma CYP2A6 (9).

Varios estudios han demostrado que esta misma reacción es llevada a cabo en los ratones por la isoforma CYP2A5 (9), en una proporción menor la cumarina es hidroxilada en la posición 3 resultando la 3 -hidroxycumarina. En el ratón la 3-

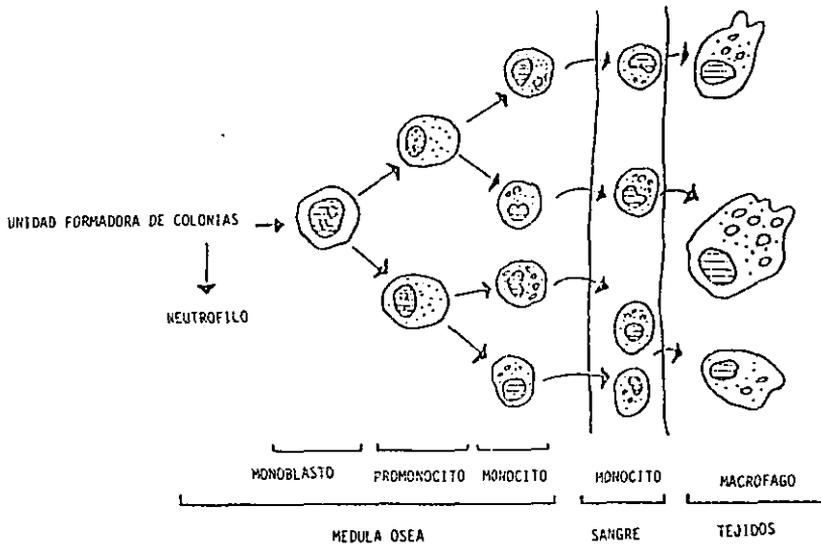
hidroxicumarina es el principal producto de biotransformación de la cumarina (3, 8).

## MACROFAGOS

El sistema inmune tiene un papel muy importante en la prevención y curación de enfermedades y procesos infecciosos. Un grupo muy importante de células del sistema inmune lo constituye el sistema fagocítico mononuclear, que se origina en la médula ósea y que tras su posterior maduración y activación adquieren diferentes formas morfológicas como son: monoblasto, promonocito y monocito (10, 11).

### ESQUEMA 2

#### ESTADIOS DEL DESARROLLO DE LOS MACROFAGOS A PARTIR DE LA MEDULA OSEA



Los monocitos maduros migran a la circulación donde permanecen por poco tiempo, para después poblar diferentes tejidos donde se transforman en histiocitos o macrófagos (12), que generalmente son grandes irregulares de 25 a 50  $\mu\text{m}$ . Dependiendo del organo o tejido conectivo al que migre este tipo celular recibe un nombre particular para designar su localización específica (14, tabla II).

**Tabla II**

**Tipos de Macrófagos.**

ORGANO	NOMBRE
Hígado	Células de Kupffer
Pulmón	Macrófagos alveolares
Tejido conectivo	Histiocitos
Médula ósea	Histiocitos
Bazo, ganglios linfáticos	Macrófagos circulantes
Sistema nervioso central	Células microgliales
Reacciones inflamatorias	Macrófagos, células epitelioides.

***FUNCION DEL MACROFAGO***

Los macrófagos pueden desempeñar diferentes funciones, como el de reconocer y fagocitar microorganismos incluyendo bacterias, virus, hongos y protozoarios(13, 14). Además tienen una actividad microbicida, basada en la producción de intermediarios reactivos de oxígeno (15).

Los macrófagos además secretan alrededor de 100 sustancias como son: enzimas, inhibidores de enzimas, componentes del complemento, intermediarios

reactivos de oxígeno y de ácido araquidónico, factores de la coagulación (16), proteínas de la matriz extracelular, proteínas acarreadoras, lípidos bioactivos, hormonas de tipo esteroide, intermediarios reactivos de nitrógeno y citocinas (17). Los macrófagos pueden además actuar como células procesadoras y presentadoras de antígeno, en combinación con las moléculas de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (CPH). Pueden eliminar células neoplásicas mediante la producción de sustancias citotóxicas para células tumorales como el factor de necrosis tumoral ( $TNF \alpha$ ) e interferones  $\alpha$ ,  $\beta$ .

### ***FACTOR DE NECROSIS TUMORAL $TNF\alpha$***

El factor de necrosis tumoral (TNF, del inglés tumor necrosis factor) es el principal mediador de las respuestas del huésped frente a las bacterias y otros microorganismos infecciosos (18). Las principales fuentes celulares del  $TNF\alpha$  son los fagocitos mononucleares activados por Lipopolisacárido (19, 20), células T activadas por antígeno, células NK y mastocitos activados. El IFN  $\gamma$  producido por las células T aumenta la síntesis de  $TNF\alpha$  por los fagocitos mononucleares estimulados por LPS (19). De este modo, el  $TNF\alpha$  es un mediador de la inmunidad natural y adquirida, y un importante nexo entre las respuestas inmunitarias específicas y la inflamación aguda.

Se conocen dos tipos de  $TNF \alpha$  y  $\beta$ , este último se conoce como linfotoxina (20). El gen del  $TNF \alpha$  o caquectina está ubicado en el cromosoma 6 en humanos y en el cromosoma 17 en ratones, en la región tres del complejo principal de histocompatibilidad (CPHIII, 21). Este gen tiene 4 exones, el peso molecular de la

proteína inmadura es de aproximadamente 25 KDa, y el de la proteína madura es de 17.4 KDa . Esta proteína está conservada entre especies, con 79% de homología entre la del hombre y la del ratón (22).

### ***COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (CPH)***

El CPH es una región genética grande que codifica las moléculas de clase I, II y III del CPH así como otras proteínas. Las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad son extremadamente polimorfas, con más de 40 alelos comunes en cada gen individual (23).

A las moléculas de clase I y II del CPH se les reconoce por desencadenar las respuestas de células T en el rechazo de transplante de tejidos. Ahora se sabe que las moléculas de clase I y II se unen a antígenos proteicos extraños y forman complejos que son reconocidos por los linfocitos T específicos para el antígeno (11). Los antígenos asociados a las moléculas de clase I son reconocidos por los linfocitos citotóxicos (LTC o CD8), mientras que los antígenos asociados a la clase II son reconocidos por las células T cooperadoras (CD4).

Los productos de clase II contienen dos cadenas polimorfas. Esta molécula comprende varias regiones; a) la región de unión al antígeno similar a las inmunoglobulinas, b) la regiones transmembranal y citoplasmática. A ciertas células como los fagocitos mononucleares, se les puede inducir la expresión de moléculas de clase II mediante citocinas, particularmente IFN- $\gamma$  (19).

## CUMARINA Y EL SISTEMA INMUNE

Zlabinger en 1994 describió la presencia de proteínas de unión a la cumarina en monocitos humanos (24), en un número relativamente alto ( $7.5 \times 10^8$  /célula) pero de baja afinidad. Estudios de inhibición con la 7-hidroxycumarina mostraron que es necesaria la presencia de cantidades molares 4 veces mayores que la de la cumarina para desplazar el 50% de cumarina marcada radioactivamente con  $C^{14}$ .

Hardt (6) reportó que la cumarina tiene un efecto estimulante de la fagocitosis en macrófagos peritoneales murinos expuestos a concentraciones de 20  $\mu\text{g/ml}$ , y que la 7-OHC no mostró ningún efecto. En contraste Roskopf (7), en granulocitos humanos de sangre periférica, observó que la cumarina disminuye la actividad fagocitaria en más del 50% y que la 7-OHC produce un incremento en la actividad fagocitaria de 120% en concentración de 20  $\mu\text{g/ml}$ .

Se ha observado que la cumarina y algunos de sus derivados presentan una actividad inmunomoduladora (25-28): en el caso de células mononucleares humanas de sangre periférica el tratamiento *in vitro* con cumarina aumenta la expresión de antígenos DR y DQ de sujetos sanos (26); y también el tratamiento *in vivo* con cumarina incrementa la expresión del antígeno DR en monocitos de sangre periférica de pacientes en estado avanzado de cáncer (28); también aumenta *in vitro* la respuesta de linfocitos humanos de sangre periférica de pacientes con cáncer a la fitohemaglutinina; y la actividad fagocitaria en macrófagos peritoneales murinos (6).

Por otra parte la 7-hidroxycumarina aumenta la producción de IL-1 $\beta$  (29, 30), e IL-6 (30).

Como no se conoce todavía el mecanismo de acción de los compuestos cumarínicos como agentes antitumorales, es necesario estudiar en sistemas *in vitro* la acción inmunomoduladora de la cumarina y de algunos de sus productos de biotransformación.

## OBJETIVO

El objetivo de esta tesis fué efectuar una caracterización preliminar de las acciones *in vitro* de la cumarina y de los principales productos de biotransformación en la actividad fagocitaria, la secreción de factor alfa necrosante de tumores y en la expresión de antígenos la del complejo principal de histocompatibilidad, en macrófagos murinos.

## HIPOTESIS

Los productos de biotransformación de la cumarina pudieran tener acciones inmunomoduladoras *in vitro* en macrófagos peritoneales murinos: a) en la actividad fagocitaria, b) en la secreción del factor alfa necrosante de tumores y c) en la expresión de antígenos la del complejo principal de histocompatibilidad.

Por otra parte la 7-hidroxycumarina aumenta la producción de IL-1 $\beta$  (29, 30), e IL-6 (30).

Como no se conoce todavía el mecanismo de acción de los compuestos cumarínicos como agentes antitumorales, es necesario estudiar en sistemas *in vitro* la acción inmunomoduladora de la cumarina y de algunos de sus productos de biotransformación.

## OBJETIVO

El objetivo de esta tesis fué efectuar una caracterización preliminar de las acciones *in vitro* de la cumarina y de los principales productos de biotransformación en la actividad fagocitaria, la secreción de factor alfa necrosante de tumores y en la expresión de antígenos la del complejo principal de histocompatibilidad, en macrófagos murinos.

## HIPOTESIS

Los productos de biotransformación de la cumarina pudieran tener acciones inmunomoduladoras *in vitro* en macrófagos peritoneales murinos: a) en la actividad fagocitaria, b) en la secreción del factor alfa necrosante de tumores y c) en la expresión de antígenos la del complejo principal de histocompatibilidad.

Por otra parte la 7-hidroxycumarina aumenta la producción de IL-1 $\beta$  (29, 30), e IL-6 (30).

Como no se conoce todavía el mecanismo de acción de los compuestos cumarínicos como agentes antitumorales, es necesario estudiar en sistemas *in vitro* la acción inmunomoduladora de la cumarina y de algunos de sus productos de biotransformación.

## OBJETIVO

El objetivo de esta tesis fué efectuar una caracterización preliminar de las acciones *in vitro* de la cumarina y de los principales productos de biotransformación en la actividad fagocitaria, la secreción de factor alfa necrosante de tumores y en la expresión de antígenos la del complejo principal de histocompatibilidad, en macrófagos murinos.

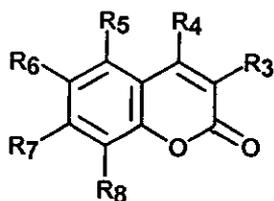
## HIPOTESIS

Los productos de biotransformación de la cumarina pudieran tener acciones inmunomoduladoras *in vitro* en macrófagos peritoneales murinos: a) en la actividad fagocitaria, b) en la secreción del factor alfa necrosante de tumores y c) en la expresión de antígenos la del complejo principal de histocompatibilidad.

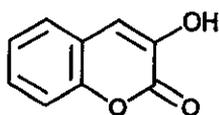
## MATERIAL Y METODOS

*Compuestos cumarínicos a evaluar en los bioensayos "in vitro"*

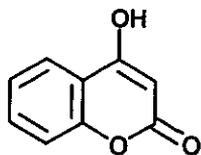
### ESQUEMA 3



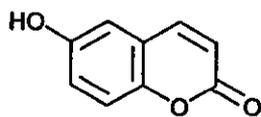
### HIDROGENOS SUSTITUIBLES POR HIDROXILOS



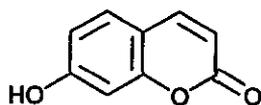
3-MONOHIDROXICUMARINA



4-MONOHIDROXICUMARINA



6-MONOHIDROXICUMARINA

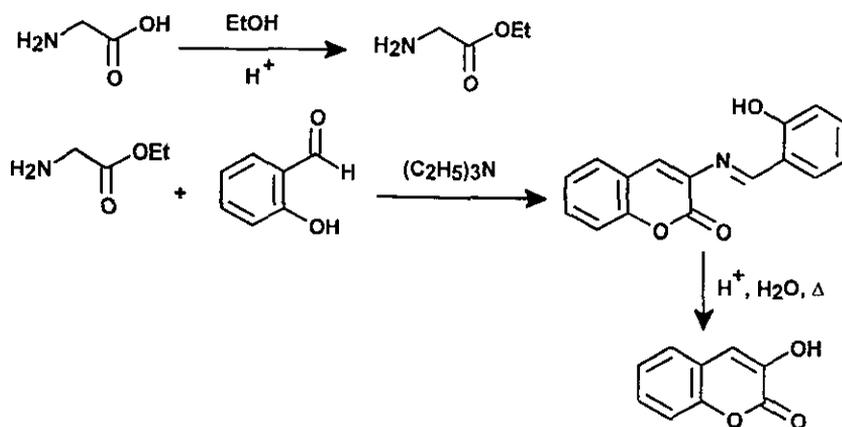


7-MONOHIDROXICUMARINA

La cumarina, la 4-, y 7-monohidroxicumarina se obtuvieron de Aldrich, la 3-, y 6-monohidroxicumarina se obtuvieron mediante síntesis orgánica en el laboratorio 203 del Departamento de Química Orgánica, División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la U.N.A.M.(31), esquemas 4 y 5.

#### ESQUEMA 4

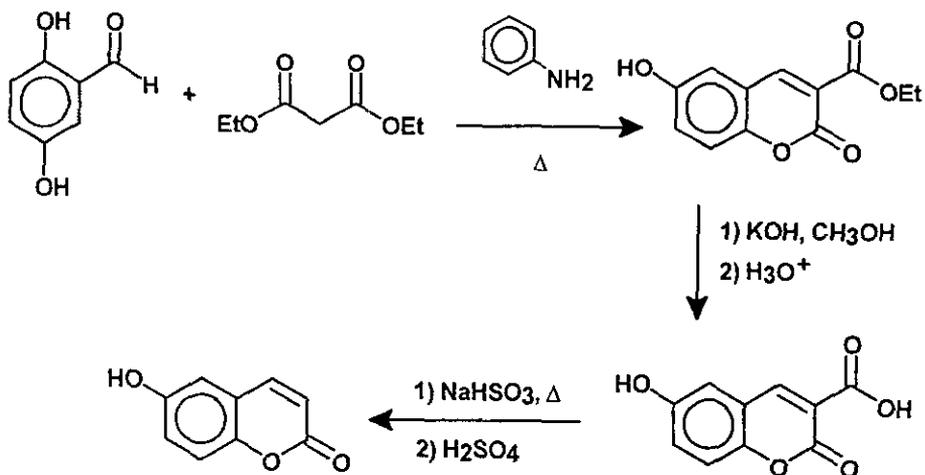
##### Síntesis de la 3-monohidroxicumarina



Se llevó a cabo la reacción de condensación de Knoevenagel, utilizando como materia prima el éster etílico de la glicina, el cual se tuvo que sintetizar. Una vez que se obtuvo el glicinato de etilo, este se hizo reaccionar con el salicilaldehído para que bajo las condiciones de la reacción de Knoevenagel, se obtuviera como intermediario la 3-salicilaldenaminocumarina. El producto se caracterizó en base a sus propiedades espectroscópicas I.R. y RMN- $^1\text{H}$ .

## ESQUEMA 5

### Síntesis de la 6-monohidroxicumarina



La obtención de la 6-monohidroxicumarina se muestra a través de la ruta sintética descrita en el esquema 2, la cual tiene como reacción principal una reacción de condensación de Knoevenagel. Se utilizaron como materias primas el 2, 5-dihidroxi-benzaldehído y el malonato de dietilo en presencia de piperidina, para dar la 3-etoxicarbonil-6-hidroxicumarina. La saponificación de la 3-etoxicarbonil-6-hidroxicumarina se realizó con una solución de KOH en metanol con calentamiento a reflujo y la liberación de la sal 3-(6-hidroxicumarin)carboxilato de potasio por su acidulación con ácido clorhídrico concentrado, lo cual dió lugar al ácido 3-(6-hidroxicumarin)carboxílico. La reacción de descarboxilación del compuesto anterior se llevó a cabo al tratar el ácido 3-(6-monohidroxicumarin)carboxílico con una solución de NaHSO<sub>3</sub> y calentando la mezcla de reacción. Después se adicionó H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> concentrado y se continuó el calentamiento a reflujo. La 6-hidroxicumarina cruda se obtuvo con un rendimiento de 93%. Al recristalizar el producto crudo con agua, se obtuvo el compuesto puro con un rendimiento del 85%.

Ambas cumarinas se purificaron por cromatografía en columna de gel de sílice, la pureza de los compuestos se determinó por cromatografía de líquidos de alta resolución siendo mayor a 99% (HPLC), las estructuras se comprobaron por espectroscopía de rayos infrarrojos (I.R.) y resonancia magnética nuclear de protones ( R.M.N.-<sup>1</sup>H) y de carbono <sup>13</sup>.

### ***Obtención del material biológico***

Se utilizaron ratones machos Balb/c de 12 semanas de edad, de 20 a 30 gramos de peso corporal, con agua y alimento *ad libitum* , sometidos a un ciclo de luz/obscuridad de 12 x 12 horas y a una temperatura de 22 a 24°C.

### ***Inducción de los macrófagos peritoneales.***

Se escogieron aleatoriamente de dos a tres ratones a los que 72 horas antes de sacrificarlos por dislocación cervical, se les administró por vía intraperitoneal 3 ml de medio estéril de tioglicolato al 1 %.(Bioxon).

### ***Obtención de células***

A los animales después de haberlos sacrificado, se les hizo un lavado intraperitoneal inyectándoles 10 ml de solución balanceada de Hank a 5°C con 50 U/ml de heparina. 5 minutos después de haberles practicado un masaje abdominal, se les extrajo el medio administrado y se reunieron las células peritoneales de estos animales en un solo tubo (32), las células fueron lavadas con medio de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM), centrifugando a 300Xg durante 10 minutos. Las células se resuspendieron en medio (D-MEM) complementado con suero bovino fetal al 10% (SBF) y se contaron en una cámara de Neubauer, y se estimó el porcentaje de células vivas mediante la exclusión de azul tripán, siendo este mayor de 95%.

## **EXPOSICION A LOS FARMACOS**

Se sembraron  $2.5 \times 10^5$  células / pozo en placas estériles (Delta/Nunc) de 96 pozos por octuplicado, las células se dejaron adherir durante dos horas. Los derivados cumarínicos fueron disueltos en etanol absoluto. La cumarina, la 3-, 4-, y 7-monohidroxycumarina se estudiaron en el rango de concentraciones entre 5 a 300  $\mu\text{g/ml}$ ; la 6-monohidroxycumarina se estudió a concentraciones en el rango de 0.8 y 50  $\mu\text{g/ml}$ , debido a su menor solubilidad. Se hicieron soluciones madre y a partir de estas se hicieron diluciones al doble en progresión geométrica. Como grupo control se utilizaron células tratadas con el disolvente, cuya concentración final fué de 3%. El tiempo de exposición a los fármacos fué de 24 horas para los ensayos de actividad fagocitaria y secreción de  $\text{TNF}\alpha$ , y de hasta 72 horas para la expresión de antígenos-la del complejo principal de histocompatibilidad (CPH-II). Las exposiciones se hicieron a cabo en ambiente húmedo a  $37^\circ\text{C}$  conteniendo 5 % de  $\text{CO}_2$ .

### ***Estimacion de la viabilidad celular posterior a la exposición a los fármacos, mediante la reduccion del tetrazolio de dimetilo (MTT).***

Este método (33, 34), se basa en la capacidad que presentan las células en convertir el tetrazolio de dimetilo (MTT), a su producto Formazán de tetrazolio de dimetilo, mediante el sistema de hidrogenesas presentes en las mitocondrias. Este producto puede ser cuantificado espectrofotométricamente. En est método se utiliza la sal de tetrazolio de dimetilo, que presenta un color amarillo en su forma no reducida y es soluble en amortiguador de fosfato-salina 15 mM, pH 7.2 (PBS). Este compuesto al ser reducido a formazán de MTT, produce un color púrpura intenso, los cristales de formazán de MTT permanecen en las mitocondrias de la célula. Se agrega dimetilsulfóxido (DMSO), que

disuelve las membranas mitocondriales y los cristales de formazán de MTT y se cuantifica la concentración de formazán de MTT, que es proporcional al número de células viables, por espectrofotometría en el espectro visible.

Al término de la exposición a los fármacos se agregaron 20  $\mu\text{l}$ /pozo (100  $\mu\text{g}$ ) de una solución de tetrazolio de dimetilo (MTT), a la concentración de 5 mg / ml. Después de un periodo de incubación de dos horas, se retiró el sobrenadante y se agregó dimetilsulfóxido (DMSO) 100  $\mu\text{l}$ /pozo, agitando vigorosamente la placa durante 5 minutos. Enseguida se efectuaron las lecturas en un lector de microplacas Biotek EL311 a una longitud de onda de 570 nm, se hicieron las gráficas correspondientes y se hicieron las comparaciones estadísticas con respecto al control de disolvente.

### **ACTIVIDAD FAGOCITARIA**

Existen varios métodos para valorar la actividad fagocitaria *in vitro*, que se agrupan en dos clases principales:

A) Los que se basan en la ingestión de partículas o lípidos marcados con ( $^{131}\text{I}$ ) o células marcadas con radioisotopos ( $^{51}\text{Cr}$ ). Las técnicas que no usan marca radiactiva presentan diversos inconvenientes: son procedimientos muy laboriosos y requieren además de largo tiempo para su lectura (p. ej. contar partículas o células fagocitadas en innumerables frotis), lo que imposibilita procesar un número grande de muestras, además la valoración tiene un componente subjetivo alto, debido a que al observador le es difícil discernir entre las células o partículas que fueron fagocitadas y las que se encuentran adheridas a la superficie externa de la membrana celular.

B) Los que se basan en la ingestión de partículas o células sin marca o con marca no isotópica (35).

El método utilizado en este trabajo es un ensayo colorimétrico que se basa en la reducción del azul de tetrazolio (NBT), a su producto formazán de NBT. Este método fué originalmente descrito para el diagnóstico de la deficiencia en la actividad microbicida de los leucocitos polimorfonucleares (Enfermedad granulomatosa crónica; 36). Durante el estallido respiratorio provocado por la actividad fagocitaria, de la vía de la hexosa monofosfato se genera NADPH el cual a su vez es reoxidado a NADP por la enzima NADPH-oxidasa, quien *transfiere un par de electrones al oxígeno generando así el anión superóxido, quien es el responsable de la reducción del NBT a su producto formazán de NBT (37).*

### ***EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FAGOCITARIA***

Para llevar a cabo este ensayo se sembraron  $2.5 \times 10^5$  células/pozo en placas de 96 pozos estériles (Delta/ Nunc) por octuplicado. Las células se dejaron adherir durante dos horas y luego fueron expuestas a los fármacos, como se describió anteriormente (ver exposición a los fármacos).

Al término de la exposición a los derivados cumarínicos, el medio de cultivo se retiró y fue sustituido por una mezcla de zymosan-A/azul de tetrazolio, llevando a cabo las células la actividad fagocitaria durante 2 horas. Estos reactivos previamente se incubaron durante 2 horas en agitación a 37°C en baño María, se disolvió 1 mg/ml de azul de tetrazolio en amortiguador de fosfato-salina (PBS), a esta solución se le agregó 1 mg de zymosan-A por ml de solución (36). Posteriormente se retiró la mezcla y las células se lavaron y fijaron con metanol al 70% para eliminar el exceso de Zymosan-A/NBT y se dejaron secar al aire. Una vez secas se agregó 120µl de hidróxido de potasio 2M dejando incubar por 90 min a

temperatura ambiente en agitación. Por último se adicionó 140µl de dimetil sulfóxido (DMSO). Se agitaron nuevamente durante 10 min., se leyeron las placas en un lector de microplacas Biotek EL311 a una longitud de onda de 630 nm (38).

La absorbancia es directamente proporcional al número de partículas fagocitadas.

### ***ESTIMACION DE LA PRODUCCION DE TNF $\alpha$ .***

Se sembraron  $2 \times 10^5$  células por pozo en placas estériles de 96 pozos (Delta/Nunc) en medio de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) complementado con suero bovino fetal al 10% (SBF). Se dejaron adherir las células durante dos horas a 37°C en atmósfera conteniendo 5% de CO<sub>2</sub>, las células fueron luego tratadas como se describió anteriormente (ver exposición a los fármacos).

Después del período de exposición a los fármacos, se retiraron los sobrenadantes de las células tratadas y se transfirieron a otra placa de 96 pozos para realizar un "ELISA indirecto tipo sandwich" (39, esquema 6). Esta microplaca previamente se cubrió con el primer anticuerpo (Monoclonal hámster anti TNF- $\alpha$  de ratón, Genzyme; 0.5 µg /pozo en amortiguador de carbonatos 0.05 M pH 9.6 durante toda la noche a 4°C ) anti-TNF $\alpha$  de ratón. Se bloquearon los espacios vacíos en los pozos, con albúmina bovina fracción V al 1% en el mismo amortiguador de carbonatos a 4°C, también durante toda la noche. Los sobrenadantes se dejaron incubar por 12 horas a 4°C, posteriormente se lavó con amortiguador de PBS-T20 (tween 20 al 0.05 %).

En seguida se agregó 100  $\mu$ l de una dilución 1:500 en amortiguador de fosfatos, del segundo anticuerpo anti-TNF $\alpha$  murino (Genzyme), hecho en conejo. Se realizó una *incubación de dos horas a temperatura ambiente, al término de esta se lavó con PBS-T20.*

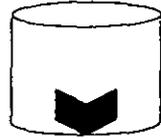
Posteriormente se agregó 100  $\mu$ l/pozo a la dilución 1:2,000, de un tercer anticuerpo marcado con peroxidasa (IgG de cabra), anti-IgG de conejo, dejando incubar durante 60 minutos, en seguida se lavó con PBS T-20 aproximadamente cinco veces.

Al término del lavado se agregó 100  $\mu$ l de una mezcla de ortofenilendiamina 2 mM (cromógeno ) y 15 mM de peróxido de hidrógeno (sustrato), disueltos en amortiguador de citrato-fosfato (0.1 M de ácido cítrico y 0.2 M de fosfato de sodio dibásico) a pH 5.4, la reacción se detuvo a los 30 minutos con 50 $\mu$ l /pozo de ácido sulfúrico 2M y se leyó la microplaca en un lector de microplacas Biotek EL311 a una longitud de 490 nm.

## ESQUEMA 6 "ELISA TIPO SANDWICH"

1.- Cubrir los pozos con el anticuerpo Monoclonal:hámster anti-TNF $\alpha$  de ratón

LAVAR CON PBS-T20



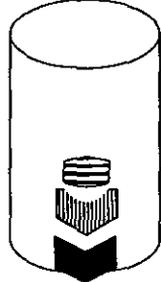
2.- Agregar el sobrenadante de las células tratadas e incubar 12h a 4°C.

LAVAR CON PBS-T20



3.- Agregar el segundo anticuerpo: IgG de conejo anti-TNF $\alpha$  de ratón.

LAVAR CON PBS-T20



4.- Agregar el tercer anticuerpo: IgG-POD de cabra, anti-IgG de conejo.

LAVAR CON PBS-T20



5.- Agregar sustrato-cromóforo (OPD 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15 mM).



## ELISA EN CELULA

Este método se utilizó para estimar la expresión de los antígenos-Ia (moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II) de ratones del haplotipo H-2<sup>d</sup>, mediante la técnica inmunoenzimática ELISA en célula (40, esquema 7).

Se sembraron  $2.5 \times 10^5$  células/pozo en placas estériles (Delta/Nunc) de 96 pozos, por octuplicado y se dejaron adherir por 2 horas, luego se trataron con las cumarinas en diferentes experimentos y en las mismas condiciones utilizando el mismo rango de concentraciones y el mismo tiempo de exposición a los fármacos que en los experimentos arriba descritos.

Se retiraron los sobrenadantes y se fijaron las células con glutaraldehído al 0.05% en amortiguador de fosfato-salina 15 mM, pH7.2 (PBS), a una temperatura de 4°C durante 30 minutos. Al terminar esta incubación, se lavó con PBS y los pozos se bloquearon con albúmina bovina fracción V al 1 % en amortiguador de carbonatos 0.05 M pH 9.6 a una temperatura de 4°C durante 24 horas.

Se lavó con PBS-T20, enseguida se agregó una solución 50 µl/pozo del primer anticuerpo monoclonal (clona M5/114, Boehringer) rata anti-Ia murino a una dilución 1:1500 en PBS. La placa se dejó incubar durante 3 horas a temperatura ambiente. Este anticuerpo monoclonal reconoce los antígenos-Ia codificados por las subregiones I-A (A $\alpha$ , A $\beta$ ) e I-E (E $\alpha$ , E $\beta$ ), de ratones que tienen los haplotipos H-2<sup>b</sup> y H-2<sup>d</sup> (C57BL/6 y Balb/c, respectivamente). A continuación se agregó 50 µl/pozo del segundo anticuerpo borrego-biotinilado anti-IgG de rata a una dilución de 1:20,000, dejando incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente. Al término de la misma se lavó con PBS T20, enseguida se agregó 50 µl/pozo de extravidina-peroxidasa (Sigma Chemical ) a la dilución de 1:1,000 y se dejó

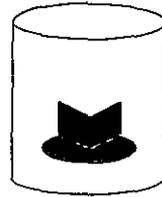
incubar por 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron los pozos y por último se adicionó 100  $\mu$ l de una solución que contenía ortofenilendiamina 2 mM (Sigma) y 15 mM de peróxido de hidrógeno en amortiguador de citrato de fosfatos (0.1 M de ácido cítrico y 0.2 M de fosfato de sodio dibásico) a pH 5.4.

La reacción se detuvo a los 60 minutos con 50  $\mu$ l / pozo de ácido sulfúrico 2M. La placa se leyó en un lector de microplacas Biotek EL311a una longitud de onda de 490 nm con un filtro de referencia de 630nm.

## ESQUEMA 7 "ELISA EN CÉLULA"

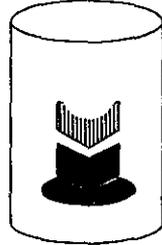
1.- Fijar las células con PBS-Glutaraldehído  
0.05% a 4°C durante 30 minutos.

LAVAR CON PBS-T20



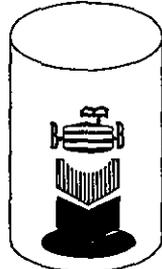
2.- Agregar el anticuerpo monoclonal:  
IgG de rata anti-la de ratón

LAVAR CON PBS-T20



3.- Agregar el segundo anticuerpo:  
IgG-biotina de borrego, anti-IgG de rata.

LAVAR CON PBS-T20



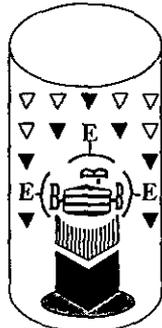
4.- Agregar Extravidina-POD

LAVAR CON PBS-T20



5.- Agregar sustrato-cromóforo:  
OPD 2 mM y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15 mM.

6.- Leer a 490nm en el lector de microplacas.



## ***ELABORACION DE GRAFICAS Y ANALISIS ESTADISTICO***

En los tres tipos de bioensayos las absorbancias se graficaron con el software SigmaPlot V. 3.0 y se aplicó análisis de varianza (ANOVA) para saber si existían diferencias entre los tratamientos, en caso de haberlas se compararon contra el grupo control mediante la prueba de Dunnett, con el software SigmaStat V. 2.0 (Jandel Scientific), tomando como límite un  $\alpha$  menor de 0.05 y un poder de 0.8.

## RESULTADOS

### **ACTIVIDAD FAGOCITARIA EN MACROFAGOS PERITONEALES**

Para estudiar el estallido respiratorio en macrófagos peritoneales primero estandarizamos la técnica para poder realizar los ensayos de la actividad biológica de las monohidroxicumarinas. Estandarizamos la técnica colorimétrica de la reducción del azul de tetrazolio (NBT) acoplado a Zymosan-A (38).

En los ensayos con macrófagos peritoneales residentes o inducidos con tioglicolato, sembré diluciones de los mismos y obtuve así dos curvas estándar, en las que pude observar la diferencia entre ambos tipos de macrófagos para llevar a cabo esta actividad. Se puede observar en macrófagos inducidos, que entre 25 y 75 mil células por pozo hay una relación lineal entre el número de macrófagos y la respuesta de los mismos, esto no ocurre con los macrófagos peritoneales residentes, no se observa dicha relación lineal y el incremento de la absorbancia con el número de células es considerablemente menor (Figura 1). Consecuentemente los siguientes ensayos se hicieron con macrófagos peritoneales inducidos.

Los macrófagos inducidos fueron expuestos *in vitro* durante 24 horas a la cumarina, 3-, 6- o 7-monohidroxicumarina. La cumarina en el rango de concentraciones entre 38 y 300  $\mu\text{g}$  disminuyó la actividad fagocitaria hasta en un 31% ( $p < 0.05$ , prueba de Dunnett) con respecto al control (figura 2). La 3-monohidroxicumarina en el rango de concentraciones entre 5  $\mu\text{g}$  y 75  $\mu\text{g}$  /ml

aumentó la actividad fagocitaria en 51% ( $p < 0.05$ , prueba de Dunnett), en forma independiente de la concentración del fármaco (figura 3). De la misma manera la exposición de los macrófagos a la 6-monohidroxycumarina en el rango de concentraciones entre 0.78 y 6.25  $\mu\text{g/ml}$ , produjo un incremento en la actividad fagocitaria de hasta un 81% ( $p < 0.05$ , prueba de Dunnett) en forma dependiente de la concentración. Al aumentar las concentraciones por arriba de 6.25  $\mu\text{g/ml}$ , los incrementos observados fueron menores al máximo (figura 4). La 7-monohidroxycumarina no modificó la magnitud de la actividad fagocitaria (figura 5).

### **SECRECIÓN DEL FACTOR NECROSANTE DE TUMORES ALFA ( $\text{TNF}\alpha$ )**

Para evaluar el efecto *in vitro* de los derivados cumarínicos, se obtuvo una curva estándar con diferentes concentraciones de  $\text{TNF}\alpha$  recombinante de ratón, con el ensayo inmunoenzimático "ELISA" indirecto tipo sandwich. La curva estándar mostró una regresión lineal ( $r^2=0.96$ ) en un rango de concentraciones entre 0.5 ng y 8 ng de la proteína recombinante. Los resultados muestran que nuestro ensayo nos permite detectar  $\text{TNF}\alpha$  recombinante en los sobrenadantes de los cultivos de las células tratadas dentro de este rango de concentraciones de 0.5 ng y 8 ng (Figura 6).

Los macrófagos expuestos con lipopolisacárido de *E. coli* a la 3-monohidroxycumarina a concentraciones en el rango entre 2.3 a 75  $\mu\text{g/ml}$ , durante 24 horas disminuyó la secreción de  $\text{TNF}\alpha$  en forma lineal al logaritmo de la concentración de la cumarina ( $r^2=0.92$ , figura 7). La 4-monohidroxycumarina

también produjo una disminución progresiva en el rango de concentraciones entre 0.6 a 75  $\mu\text{g/ml}$  (figura 8). La exposición de las células estimuladas con lipopolisacárido de *E. coli* a la 6-monohidroxicumarina en el rango de concentraciones entre 0.8 a 25  $\mu\text{g/ml}$ , durante 24 horas produjo una disminución concentración-dependiente. La disminución fué lineal con respecto al logaritmo de la concentración del fármaco ( $r^2=0.90$ , figura 9). En contraste la 7-hidroxicumarina en el rango de concentraciones entre 2.3 y 9.4  $\mu\text{g/ml}$  aumentó la secreción de  $\text{TNF}\alpha$  hasta un 63% ( $p<0.05$ , prueba de Dunnett) en las células estimuladas por el lipopolisacárido de *E. coli* (figura 10).

#### ***EXPRESION DE LOS ANTIGENOS Ia (CPH clase II).***

Obtuvimos la curva de titulación del anticuerpo monoclonal que empleamos para la detección de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (CPH clase II), en el ensayo de ELISA en célula. En la figura 11 podemos observar que al diluir el anticuerpo monoclonal (en diluciones al doble), las señal va disminuyendo progresivamente en forma proporcional al logaritmo de la dilución, de manera independiente de la concentración del antígeno inductor de la expresión de estas moléculas (ovoalbúmina), cuando sembramos un número constante de células. Al obtener una curva estándar entre número de células y absorbancia, luego de haberlas incubado durante 60 minutos en presencia o ausencia de el antígeno inductor, podemos observar que la expresión de antígenos Ia, incrementa en forma lineal al aumentar el número de células

peritoneales (entre  $3.8 \times 10^{-4}$  y  $1.5 \times 10^{-5}$ , figura 12). De la misma manera realizamos el ensayo con 120 minutos de incubación en presencia o ausencia del antígeno inductor (ovoalbúmina) y observamos en las células peritoneales, el comportamiento descrito arriba (figura 13).

Al llevar a cabo las exposiciones de las células peritoneales a las cumarinas en el rango de concentraciones entre 9.4 a 300  $\mu\text{g/ml}$  durante 24 horas observamos que la cumarina y la 7-monohidroxycumarina produjeron una disminución concentración-dependiente de la expresión de las moléculas de clase II del CPH ( $r^2=0.83$ , figuras 14 y 18 respectivamente). La 3-, y la 4-monohidroxycumarina produjeron también disminuciones en forma independiente de la concentración ( $p<0.05$ , prueba de Dunnett) en el mismo rango de concentraciones que la cumarina y la 7-monohidroxycumarina (figuras 15 y 16). La 6-monohidroxycumarina en el rango de concentraciones entre 3.1 a 50  $\mu\text{g/ml}$ , disminuyó la expresión de los antígenos la en forma independiente de la concentración ( $p<0.05$ , prueba de Dunnett, figura 17).

Para determinar si las células eran capaces de expresar las moléculas de clase II del MHC, obtuvimos una curva estándar induciendo la expresión de estas moléculas utilizando interferon  $\gamma$  recombinante murino, y observé que concentraciones de interferon  $\gamma$  entre 1 y 8 unidades/pozo, incrementaron en forma significativa la expresión de moléculas de clase II del CPH a las 72 horas de exposición y no antes ( $p<0.05$ , prueba de Dunnett, figura 19), por lo que

tuvimos que repetir los ensayos con las cumarinas en presencia y ausencia de interferón  $\gamma$ .

Un ensayo en las condiciones descritas estimando la expresión del antígeno a las 24 horas, no reveló ningún efecto de la cumarina aún en la presencia del inductor (figura 20).

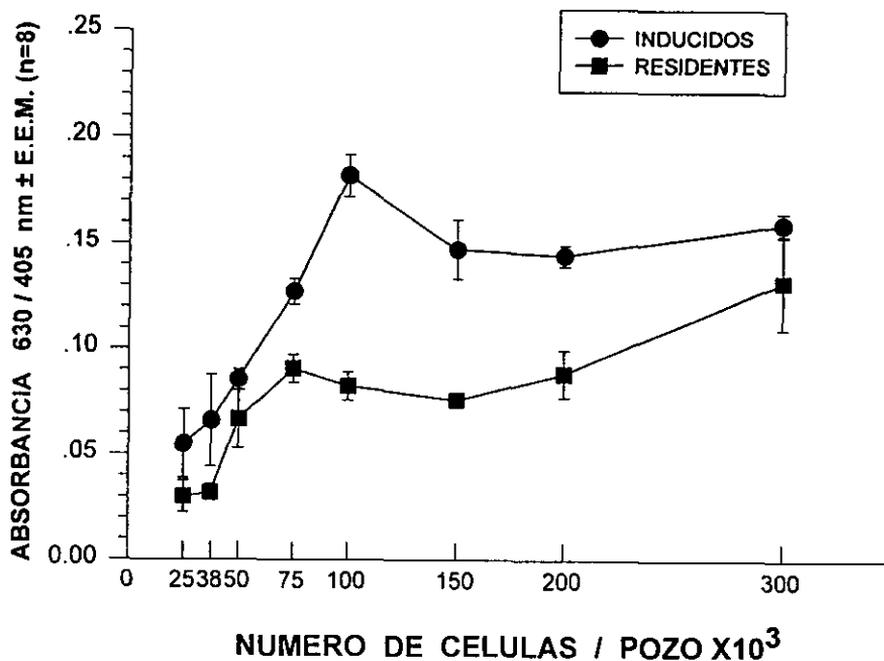
La exposición de las células peritoneales durante 72 horas, produjo los siguientes cambios en la expresión de antígenos Ia:

La cumarina en el rango de concentraciones entre 5 y 150  $\mu\text{g/ml}$  incrementó la expresión de antígenos Ia en 82% ( $p < 0.05$ , prueba de Dunnett), en las células peritoneales en ausencia del inductor, en el rango de concentraciones entre 5 y 75  $\mu\text{g/ml}$ , incrementó en 40% ( $p < 0.05$ , prueba de Dunnett), en presencia del inductor en ambos caso en forma independiente de la concentración (figura 21).

Al evaluar la citotoxicidad de la cumarina en forma simultánea al ensayo descrito anteriormente, podemos observar que solamente la concentración de 300  $\mu\text{g/ml}$ , presenta citotoxicidad, ya que disminuye la viabilidad significativamente (figura 22).

La 3-monohidroxycumarina produce un aumento discreto a la concentración de 9  $\mu\text{g/ml}$  en ausencia del inductor, las demás concentraciones estudiadas no produjeron efecto aún en presencia del inductor (figura 23). La 6-monohidroxycumarina no produjo ningún efecto en presencia o ausencia del inductor (figura 24). La 7-monohidroxycumarina no produjo ningún efecto en ausencia del inductor, a diferencia de el efecto observado de disminución de la

expresión de los antígenos la en presencia del inductor hasta un 36% ( $p < 0.05$ , prueba de Dunnett) en el rango de concentraciones entre 38 y 150  $\mu\text{g/ml}$  en forma independiente de la concentración (figura 25).



**FIGURA 1**  
**CURVA ESTANDAR DEL NUMERO DE MACROFAGOS**  
**PERITONEALES Y SU ACTIVIDAD FAGOCITARIA**  
**EVALUADO MEDIANTE LA REDUCCION DEL AZUL**  
**DE TETRAZOLIO/ZYMOSAN-A**

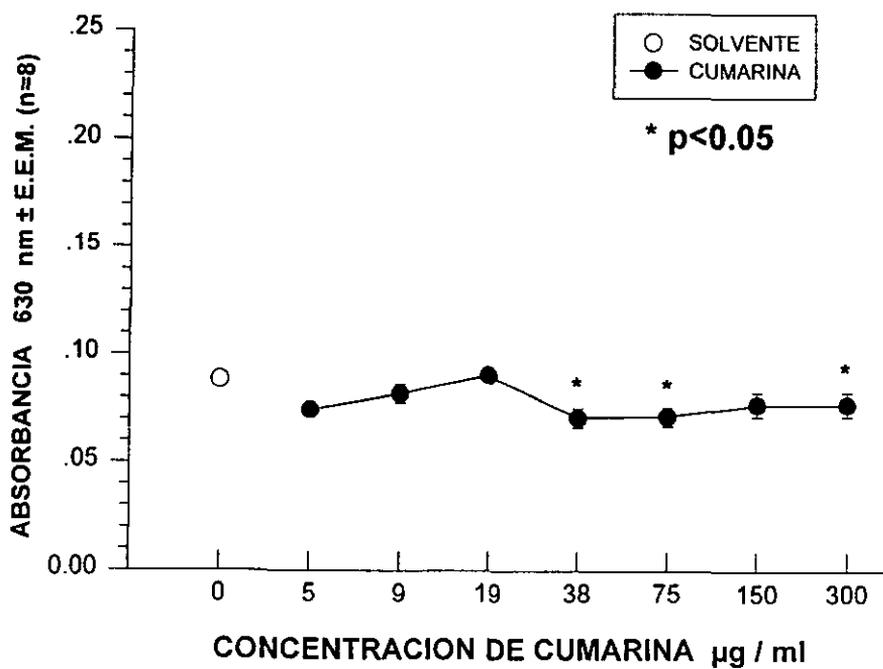


FIGURA 2

**EFFECTO DE LA CUMARINA (EXPOSICION 24h)  
EN LA ACTIVIDAD FAGOCITARIA DE MACROFAGOS  
PERITONEALES INDUCIDOS DE RATON Balb/c**

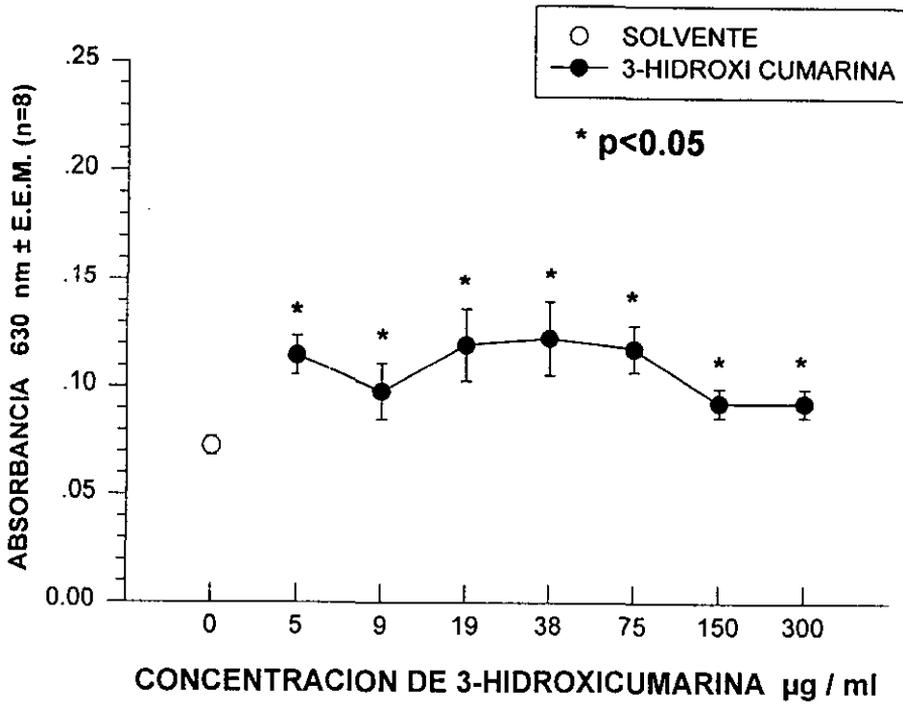


FIGURA 3

**EFFECTO DE LA 3-HIDROXICUMARINA (EXPOSICION 24 h)  
EN LA ACTIVIDAD FAGOCITARIA DE MACROFAGOS  
PERITONEALES INDUCIDOS DE RATON Balb/c.**

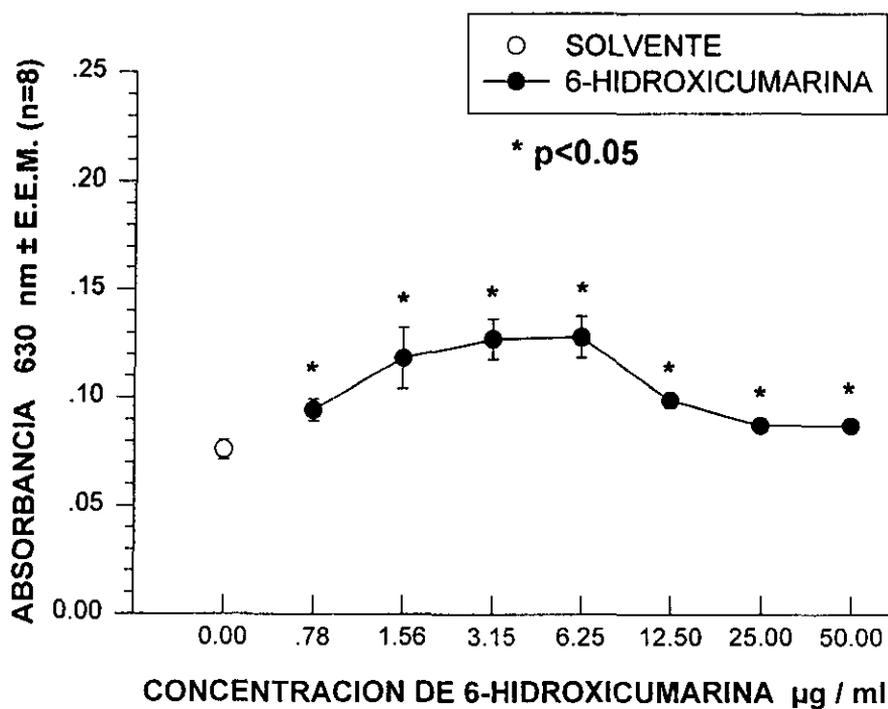


FIGURA 4

**EFFECTO DE LA 6-HIDROXICUMARINA (EXPOSICION 24 h)  
EN LA ACTIVIDAD FAGOCITARIA DE MACROFAGOS  
PERITONEALES INDUCIDOS DE RATON Balb/c.**

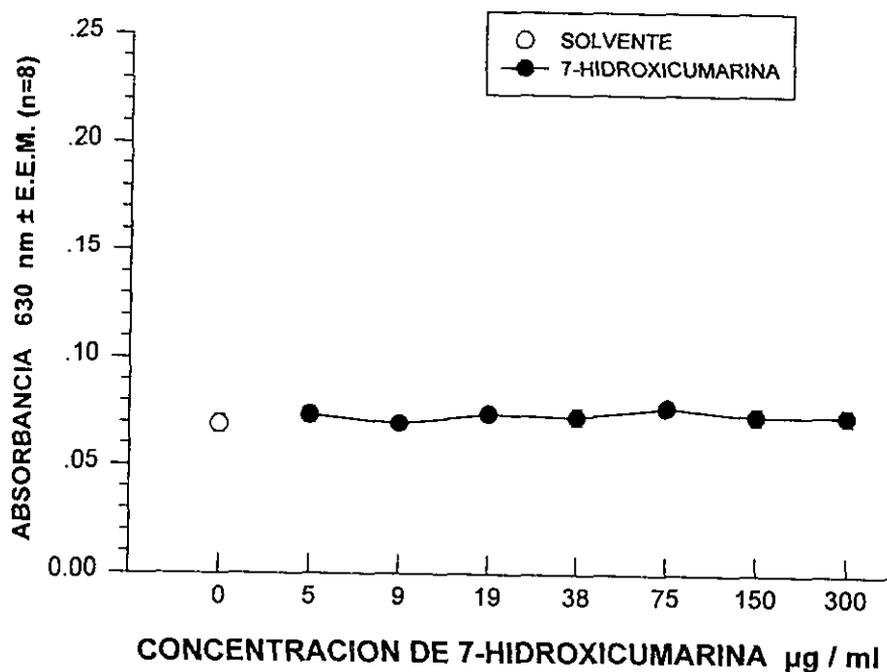
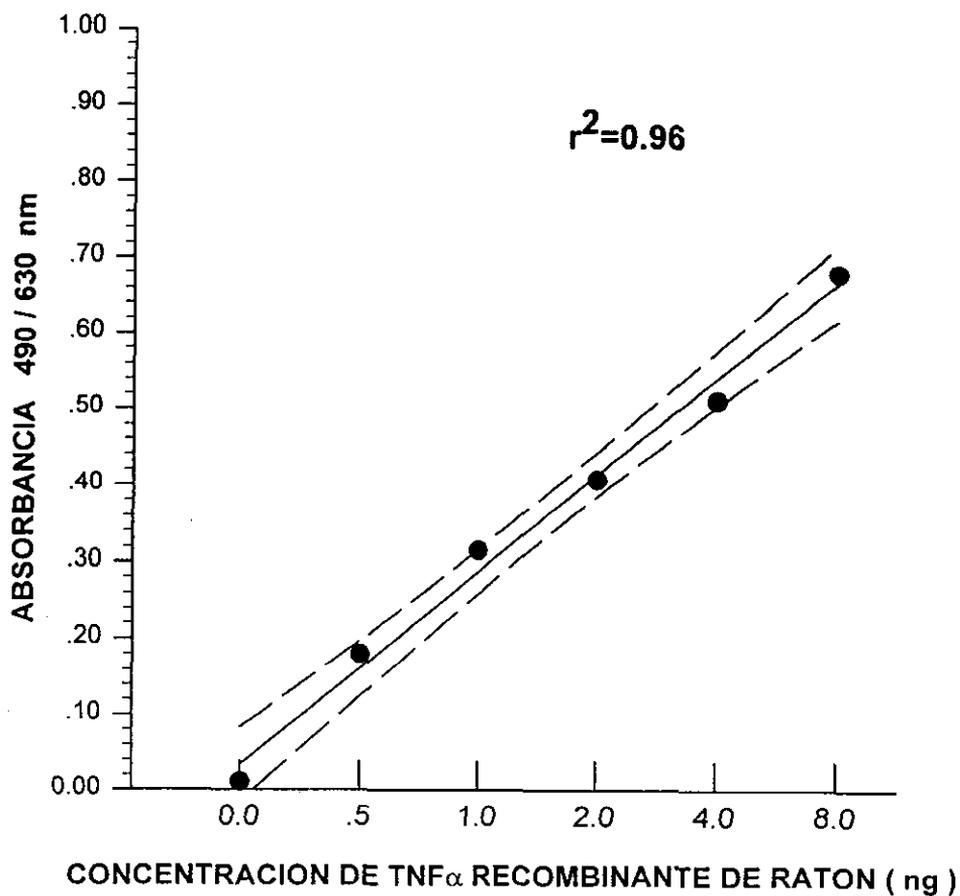
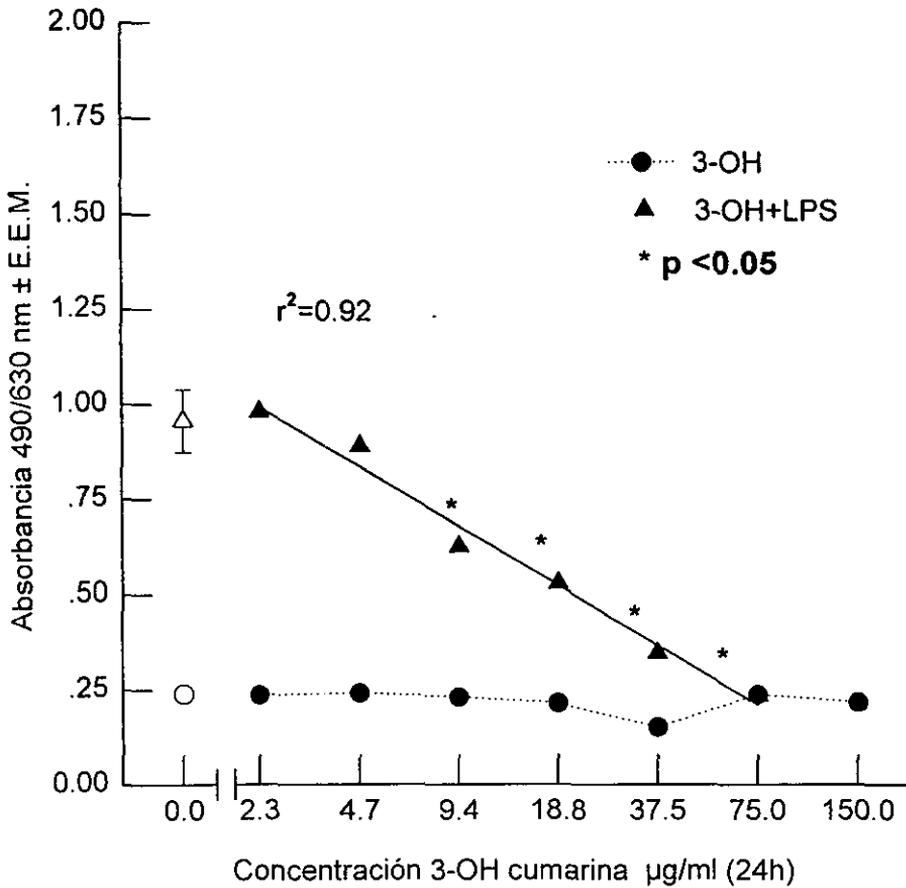


FIGURA 5

**EFFECTO DE LA 7-HIDROXICUMARINA (EXPOSICION 24 h)  
EN LA ACTIVIDAD FAGOCITARIA DE MACROFAGOS  
PERITONEALES INDUCIDOS DE RATON Balb/c.**

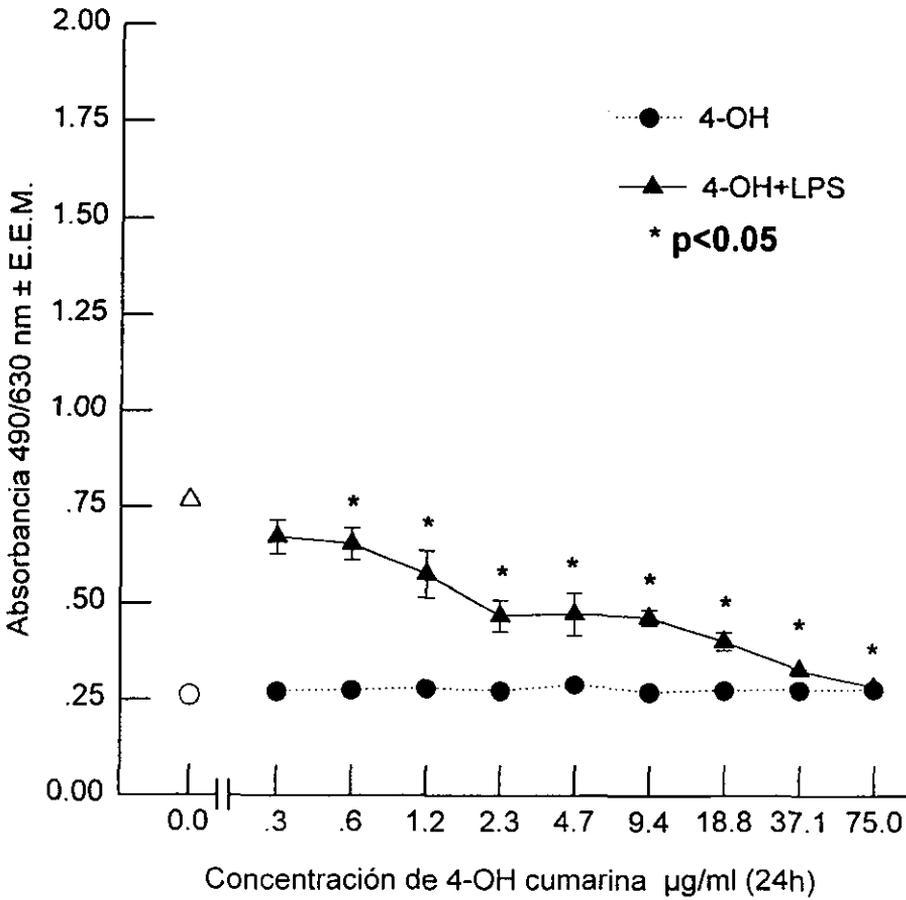


**FIGURA 6**  
**CURVA ESTANDAR DE TNF $\alpha$  RECOMBINANTE DE RATON**  
**MEDIANTE ELISA INDIRECTO TIPO SANDWICH**



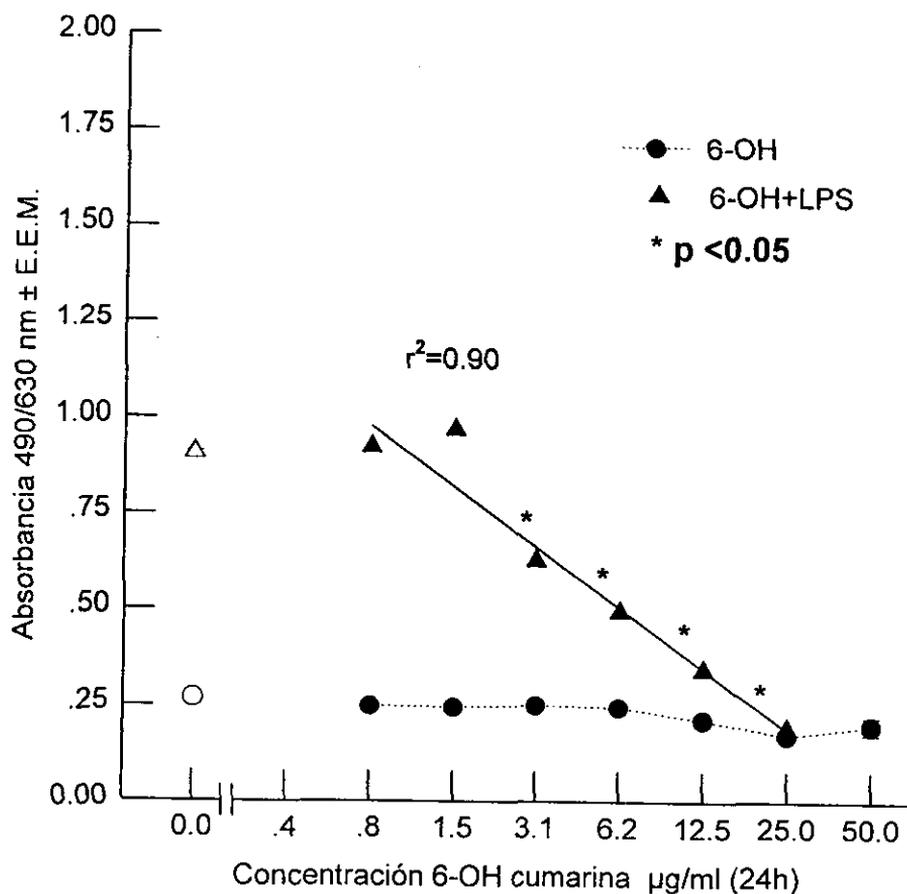
**FIGURA 7**

**EFFECTO DE LA 3-HIDROXICUMARINA EN LA  
SECRECIÓN DE TNF $\alpha$  POR MACROFAGOS PERITONEALES  
INDUCIDOS DE RATON Balb/c**



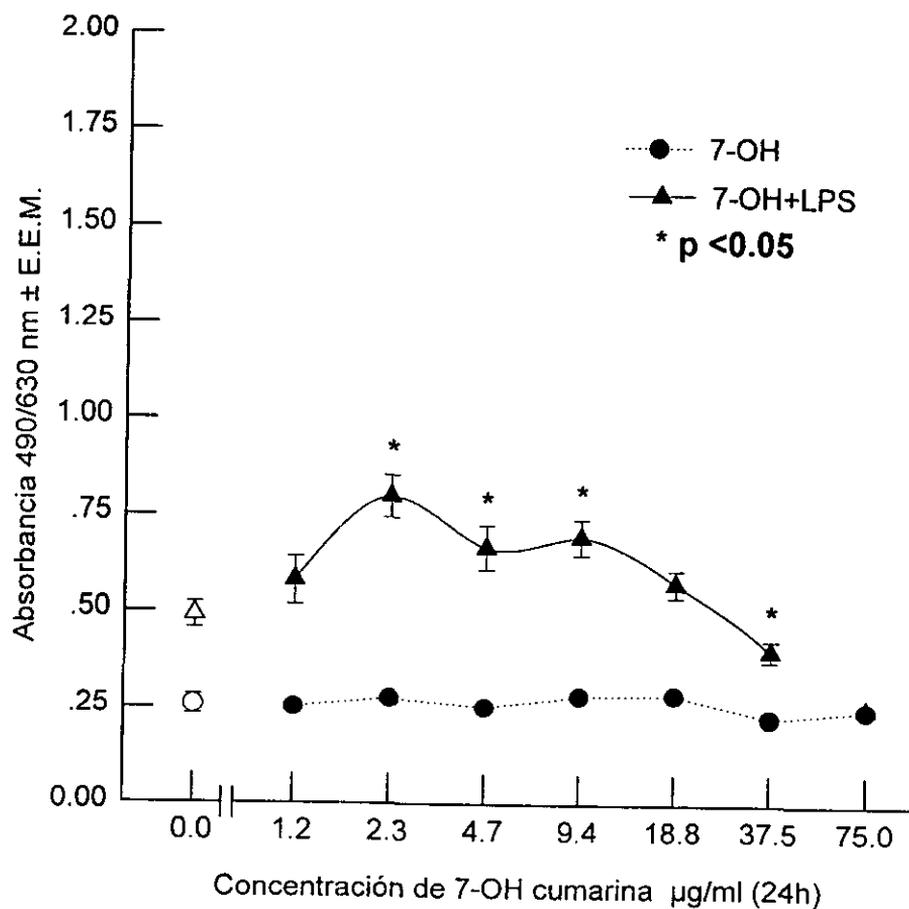
**FIGURA 8**

**EFFECTO DE LA 4-HIDROXICUMARINA EN LA  
SECRECIÓN DE  $\text{TNF}\alpha$  MACROFAGOS PERITONEALES  
INDUCIDOS DE RATON Balb/c**



**FIGURA 9**

**EFFECTO DE LA 6-HIDROXICUMARINA EN LA  
SECRECION DE  $\text{TNF}\alpha$  MACROFAGOS PERITONEALES  
INDUCIDOS DE RATON Balb/c**



**FIGURA 10**  
**EFFECTO DE LA 7-HIDROXICUMARINA EN LA**  
**SECRECIÓN DE TNF $\alpha$  MACROFAGOS PERITONEALES**  
**INDUCIDOS DE RATON Balb/c**

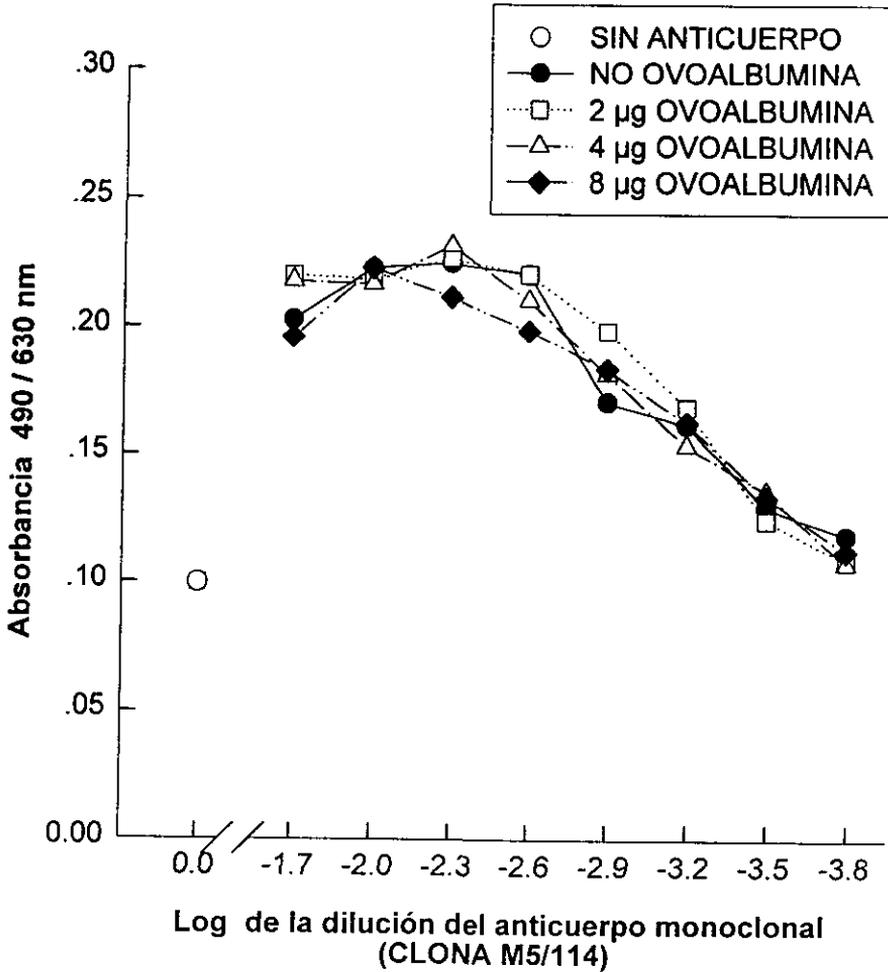
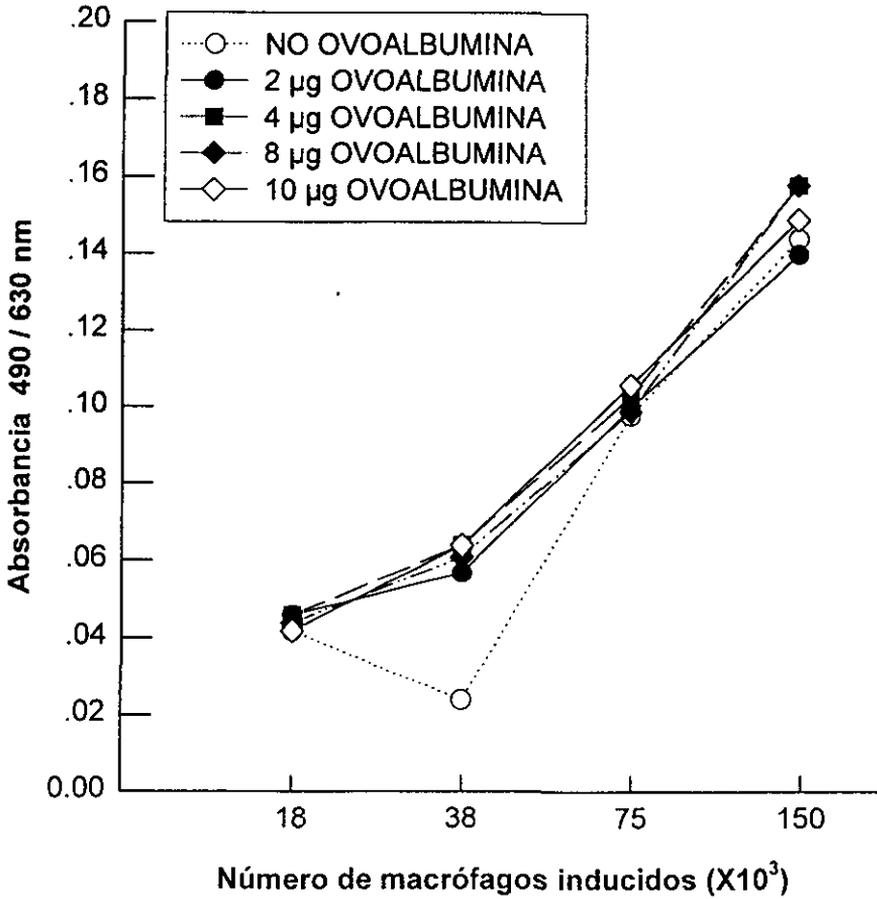
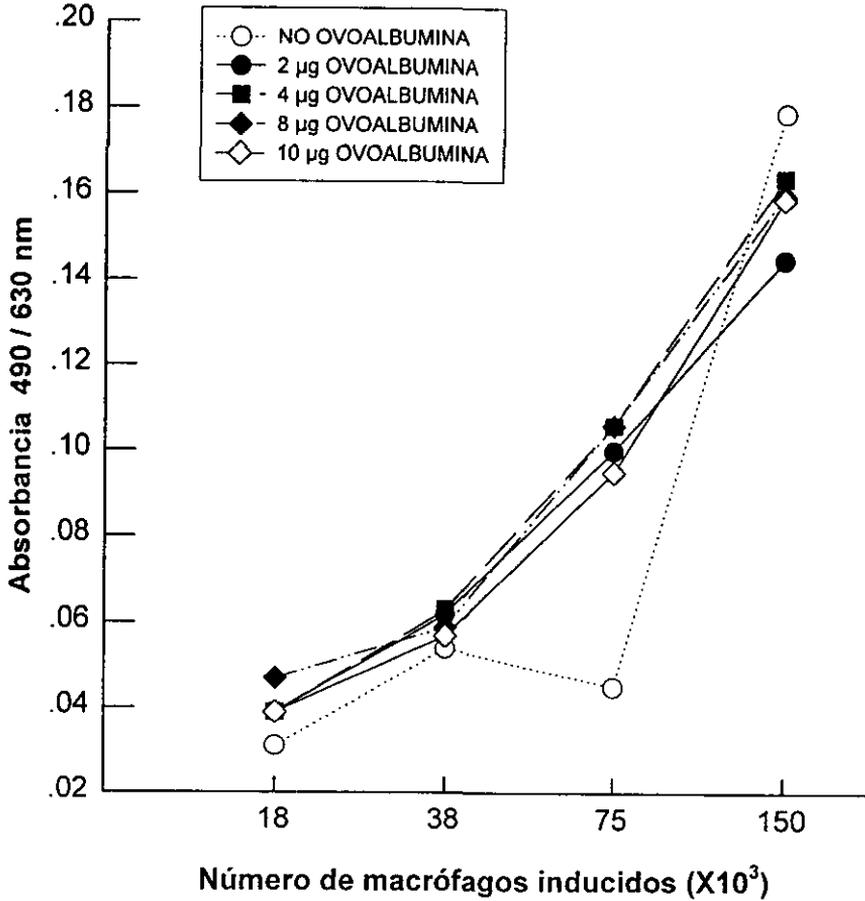


FIGURA 11

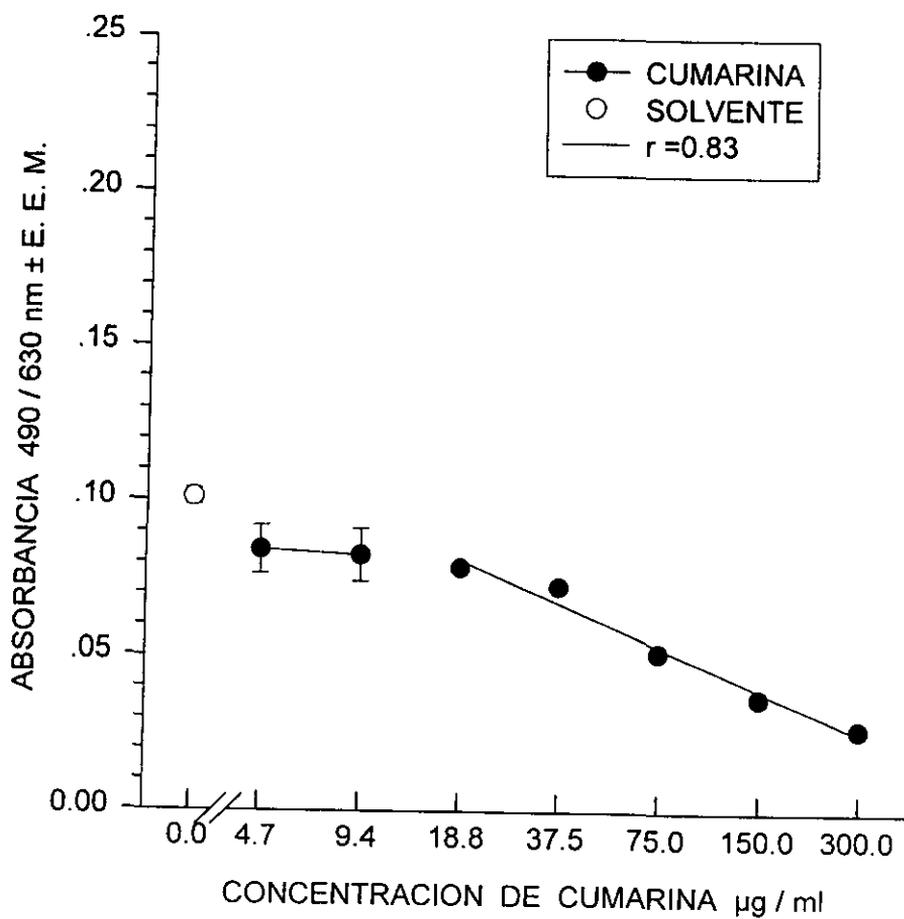
**CURVA ESTANDAR DE TITULACION DEL  
ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-Ia  
EN MACROFAGOS PERITONEALES INDUCIDOS  
EXPUESTOS 2h A OVOALBUMINA**



**FIGURA 12**  
**EXPRESION DE ANTIGENOS-Ia (CPH-II)**  
**POR MACROFAGOS PERITONEALES INDUCIDOS**  
**EXPUESTOS 60 min A OVOALBUMINA**



**FIGURA 13**  
**EXPRESION DE ANTIGENOS-Ia (CPHII)**  
**POR MACROFAGOS PERITONEALES INDUCIDOS**  
**EXPUESTOS 120 min A OVOALBUMINA**



**FIGURA 14**  
**EFFECTO *IN VITRO* DE LA CUMARINA**  
**(EXPOSICION 24 h) EN LA EXPRESION DE ANTIGENOS-Ia**  
**POR MACROFAGOS PERITONEALES INDUCIDOS**

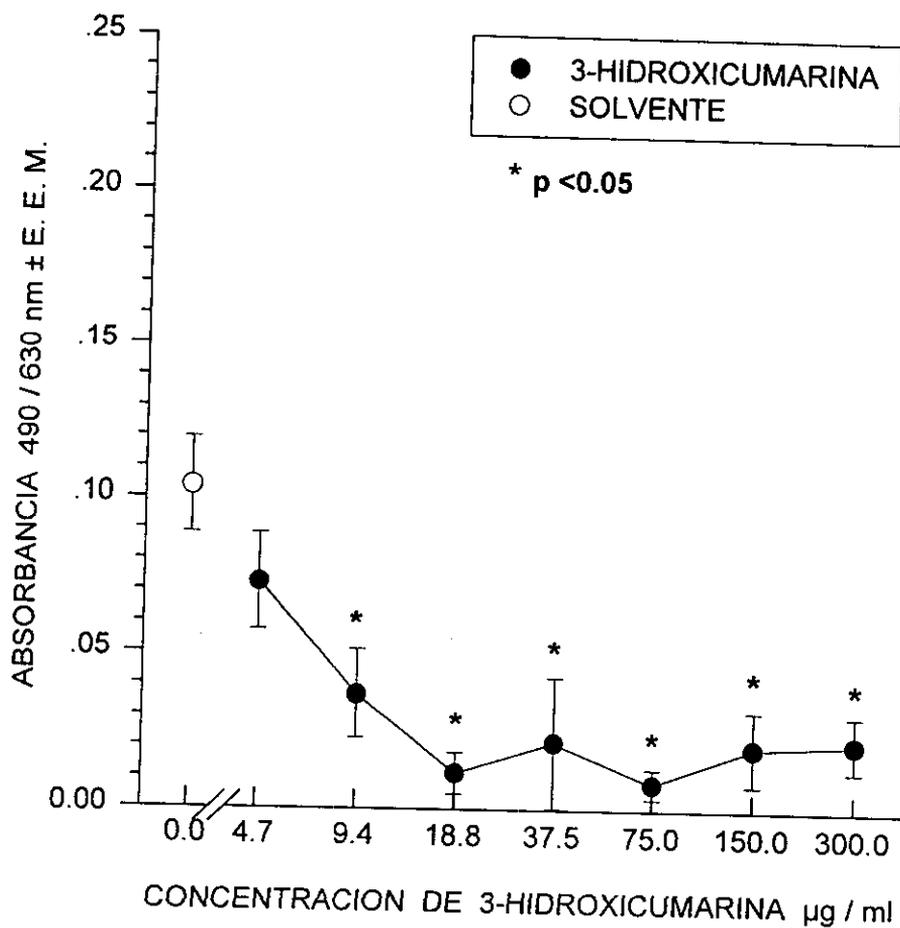


FIGURA 15

**EFFECTO *IN VITRO* DE LA 3-HIDROXICUMARINA  
(EXPOSICION 24h) EN LA EXPRESION DE ANTIGENOS-Ia  
POR MACROFAGOS PERITONEALES INDUCIDOS**

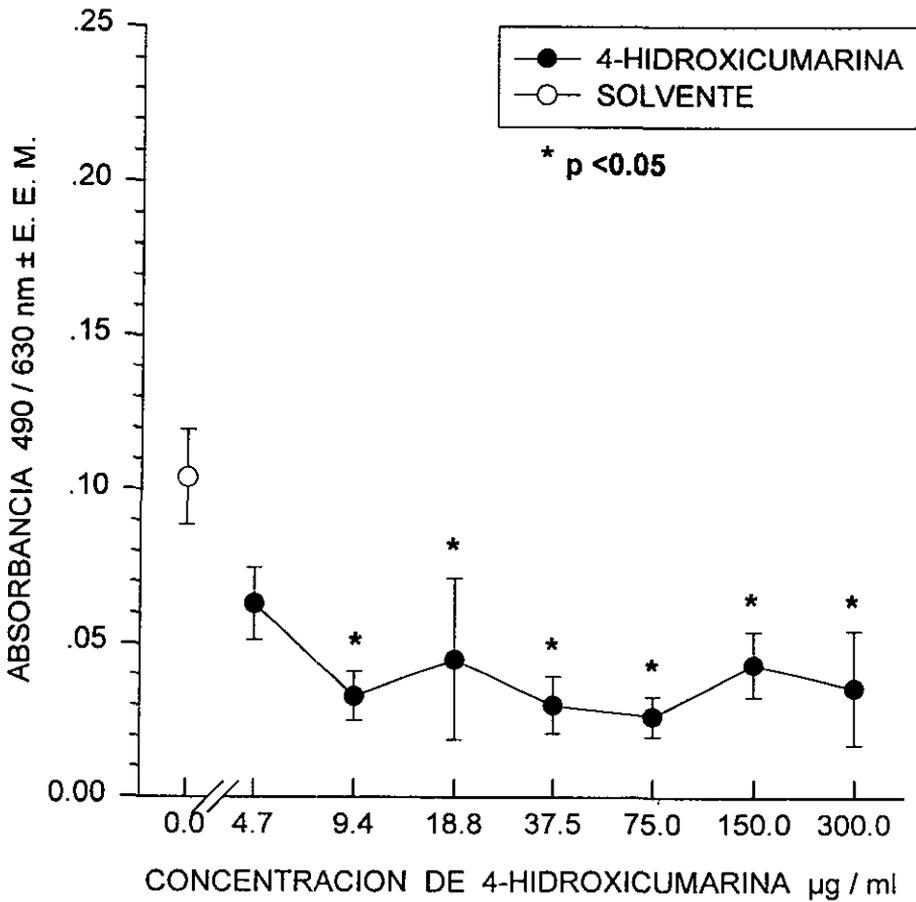


FIGURA 16

**EFFECTO *IN VITRO* DE LA 4-HIDROXICUMARINA  
(EXPOSICION 24h) EN LA EXPRESION DE ANTIGENOS-Ia  
POR MACROFAGOS PERITONEALES INDUCIDOS**

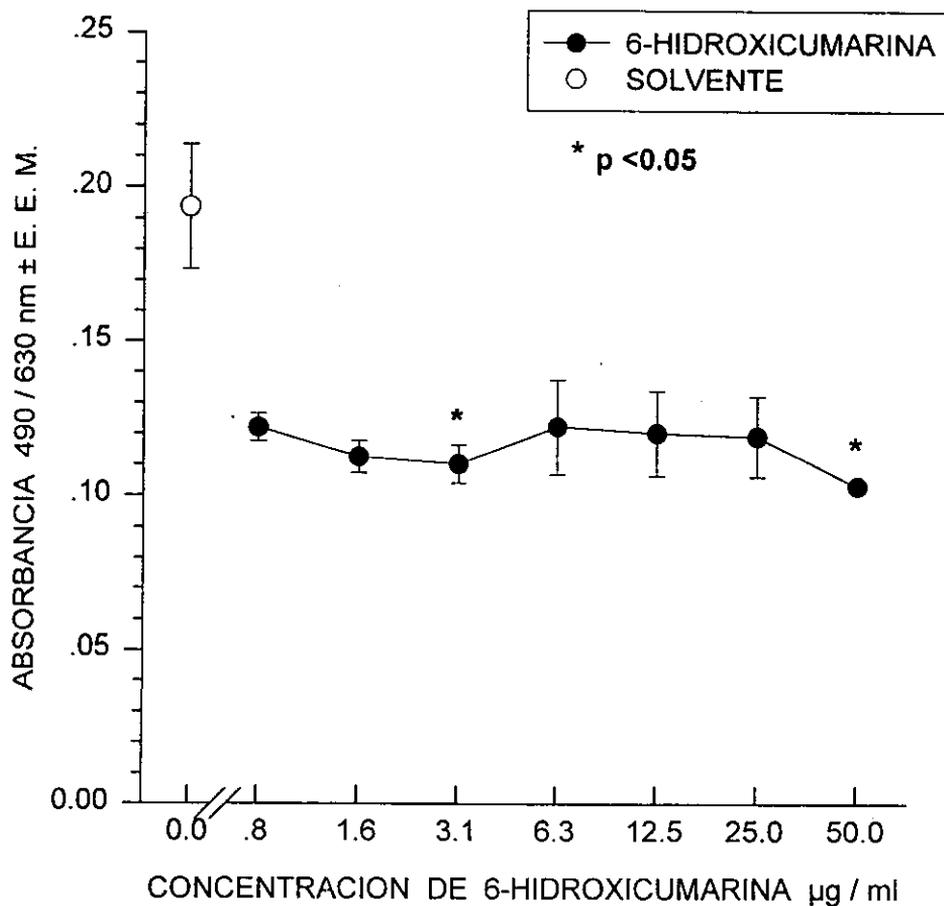


FIGURA 17

**EFFECTO *IN VITRO* DE LA 6-HIDROXICUMARINA  
(EXPOSICION 24h) EN LA EXPRESION DE ANTIGENOS-1a  
POR MACROFAGOS PERITONEALES INDUCIDOS**

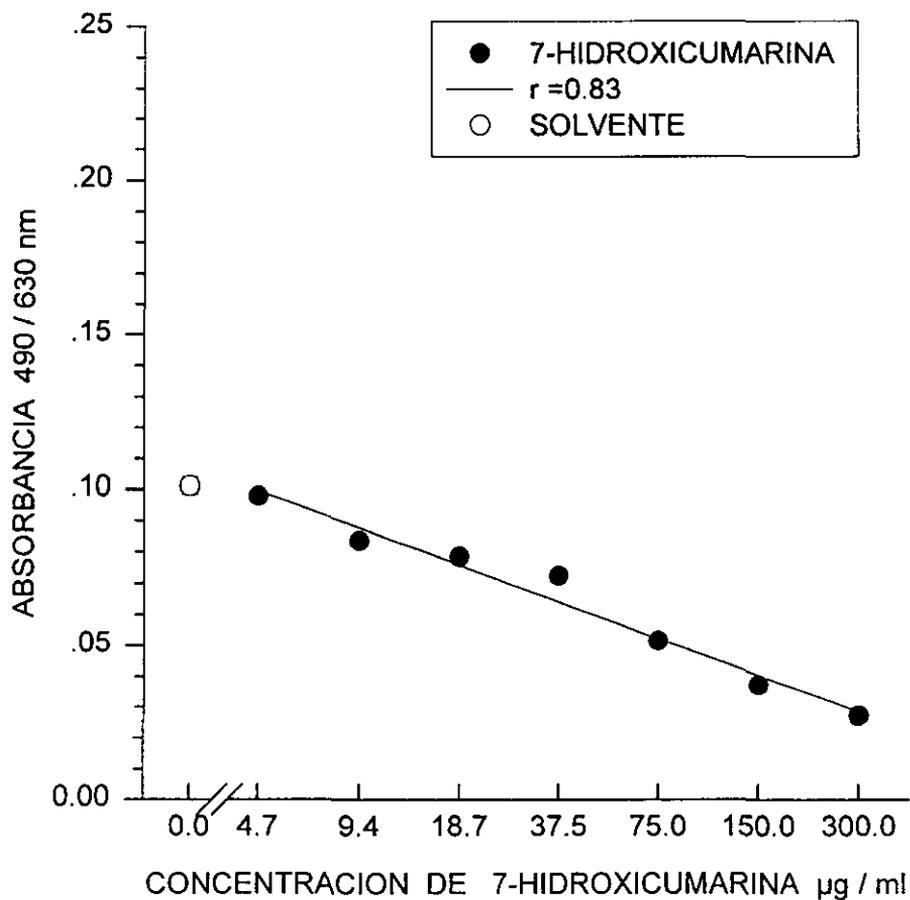


FIGURA 18

**EFFECTO *IN VITRO* DE LA 7-HIDROXICUMARINA  
(EXPOSICION 24h) EN LA EXPRESION DE ANTIGENOS-Ia  
POR MACROFAGOS PERITONEALES INDUCIDOS**

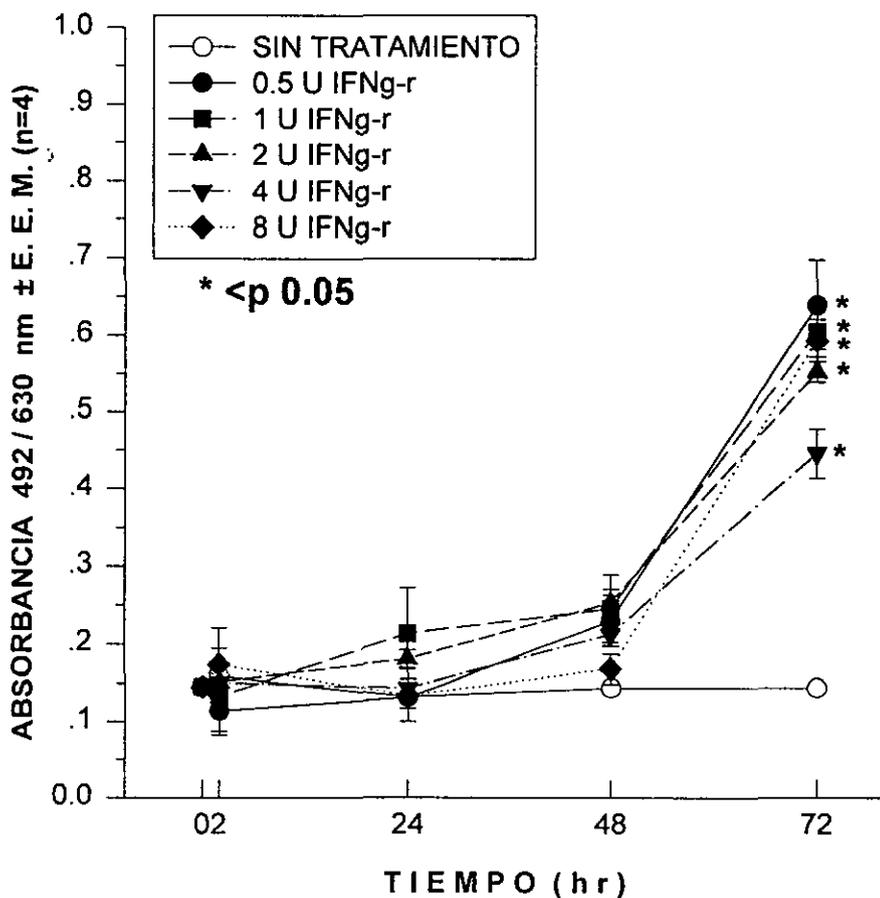


FIGURA 19

**CURSO TEMPORAL DE LA EXPRESION *IN VITRO* DE ANTIGENOS-Ia POR MACROFAGOS PERITONEALES INDUCIDOS ESTIMULADA CON INTERFERON $\gamma$  DETECTADO MEDIANTE ELISA EN CELULA**

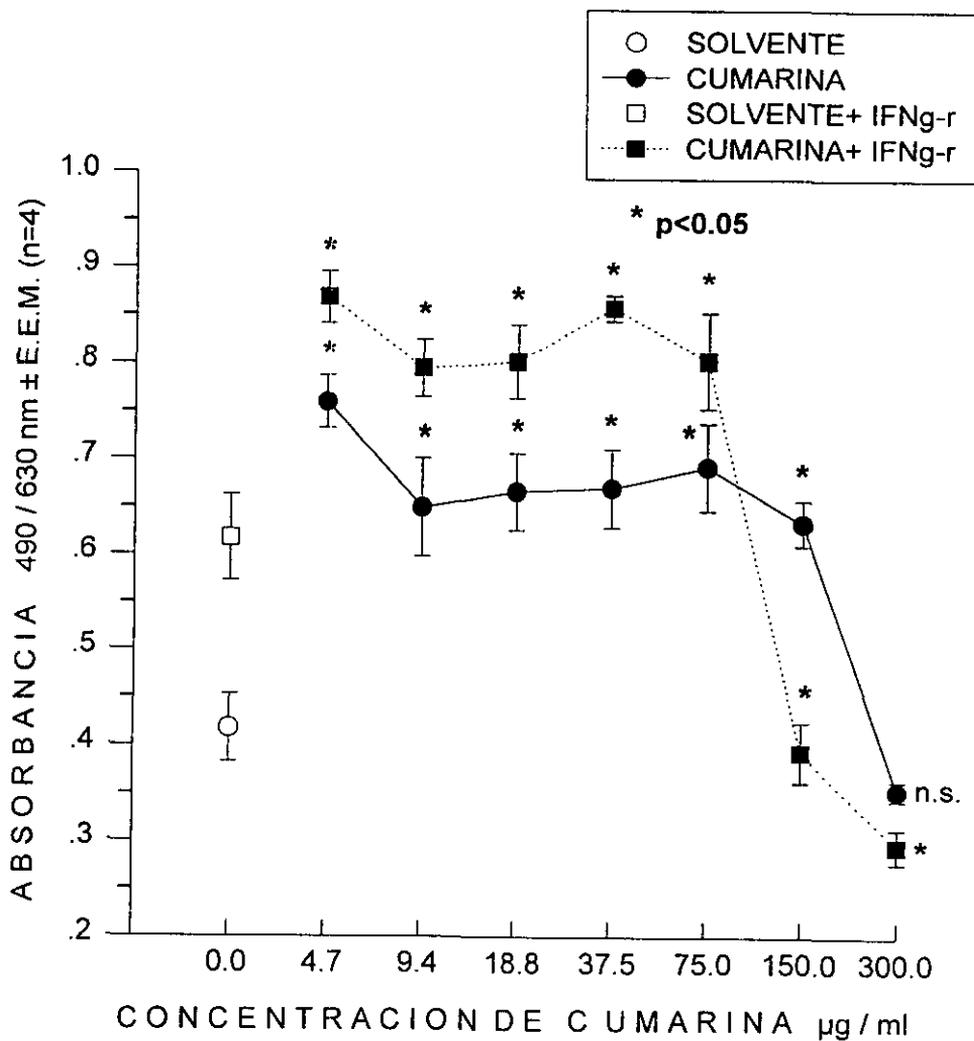
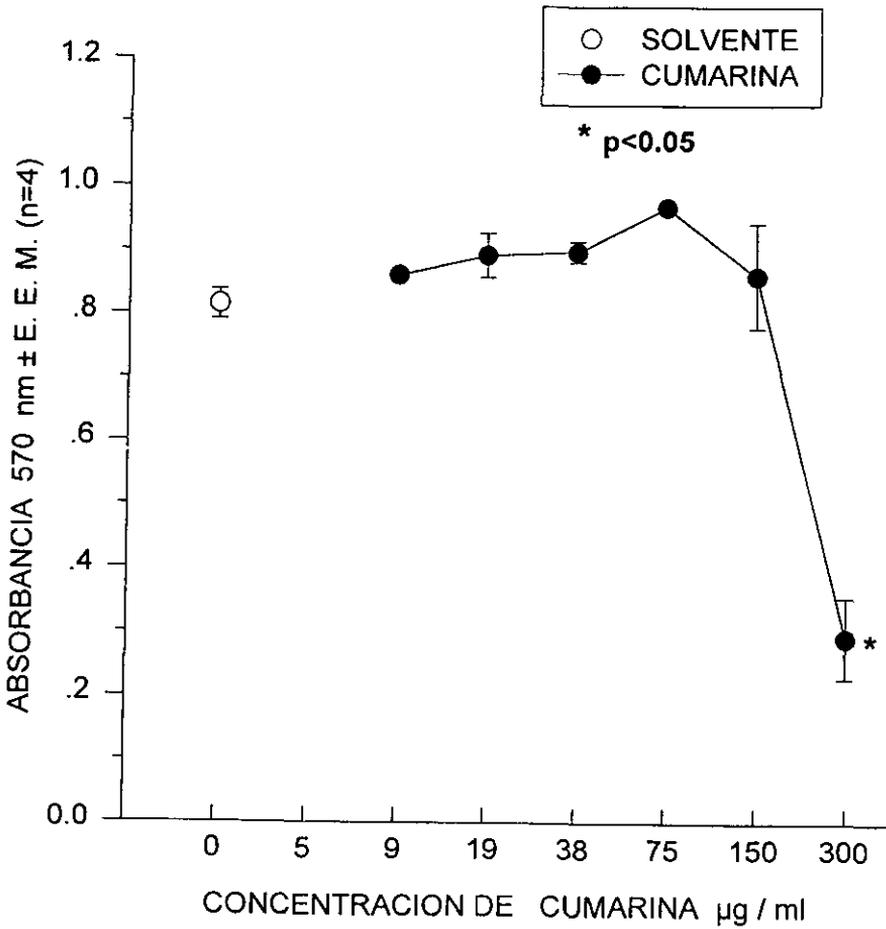


FIGURA 21

**EFFECTO *IN VITRO* DE LA CUMARINA EXPOSICION (72 h)  
EN LA EXPRESION DE ANTIGENOS Ia POR  
MACROFAGOS PERITONEALES INDUCIDOS**



**FIGURA 22**  
**EFFECTO *IN VITRO* DE LA CUMARINA**  
**(EXPOSICION 72h) EN LA VIABILIDAD DE**  
**MACROFAGOS PERITONEALES INDUCIDOS**  
**EVALUADO MEDIANTE LA REDUCCION DE MTT**

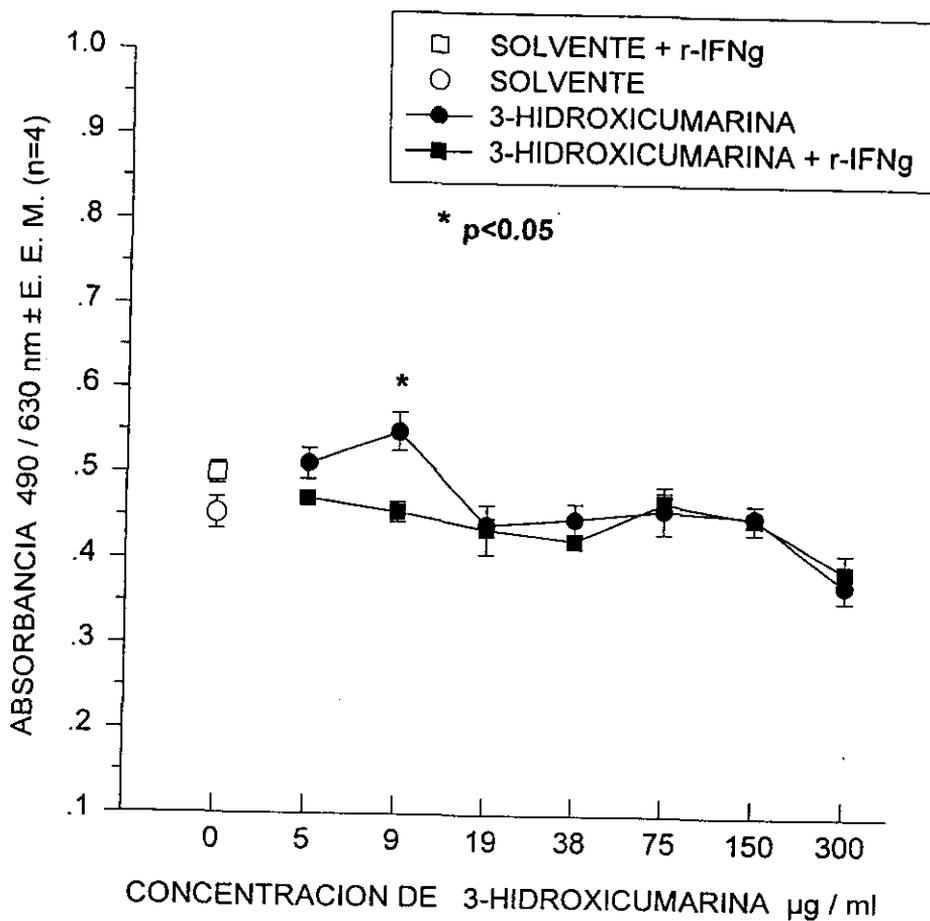
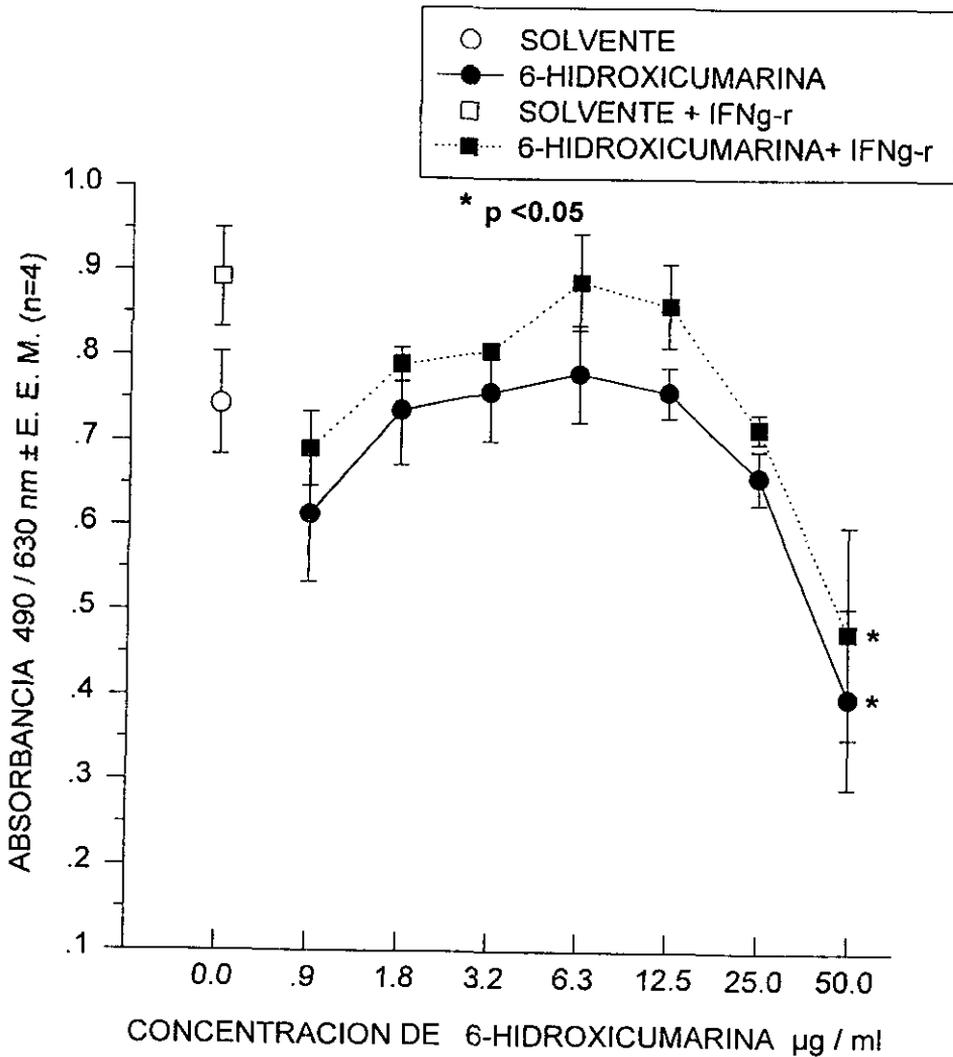
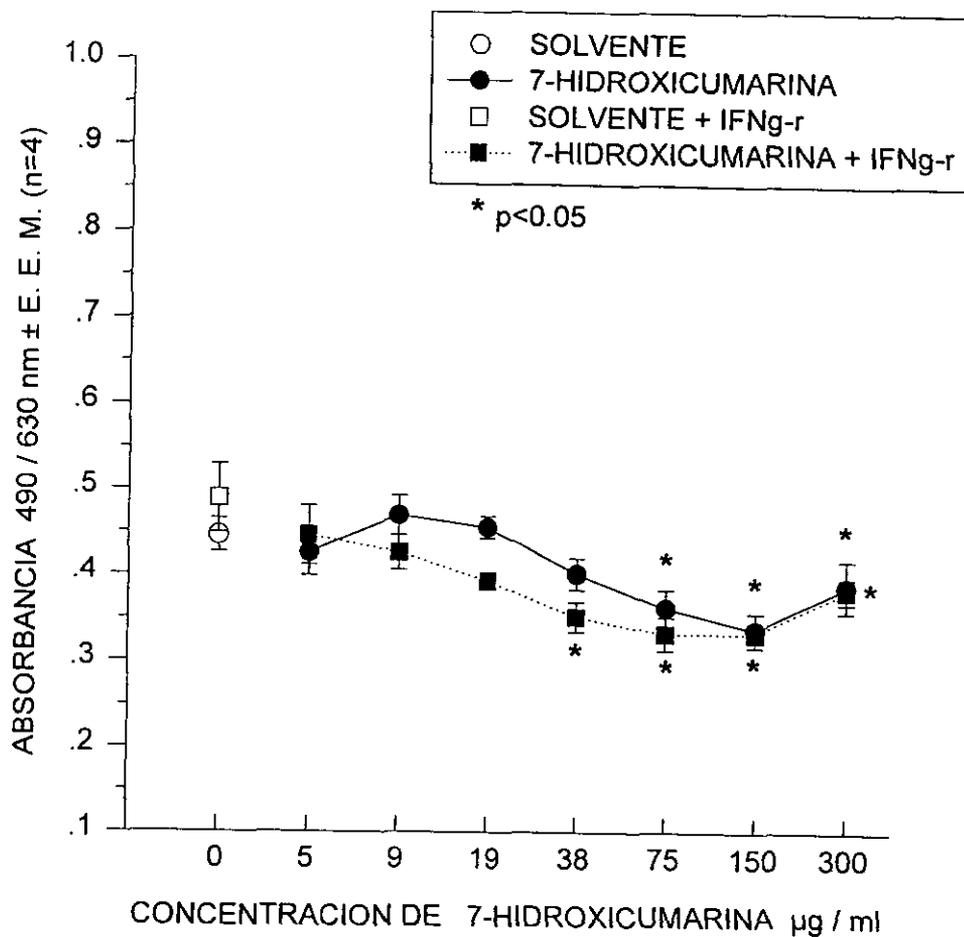


FIGURA 23

**EFFECTO *IN VITRO* DE LA 3-HIDROXICUMARINA  
(EXPOSICION 72h) EN LA EXPRESION DE  
ANTIGENOS-Ia POR MACROFAGOS  
PERITONEALES INDUCIDOS**



**FIGURA 24**  
**EFFECTO *IN VITRO* DE LA 6-HIDROXICUMARINA**  
**(EXPOSICION 72h) EN LA EXPRESION DE**  
**ANTIGENOS-Ia POR MACROFAGOS**  
**PERITONEALES INDUCIDOS**



**FIGURA 25**  
**EFFECTO *IN VITRO* DE LA 7-HIDROXICUMARINA**  
**(EXPOSICION 72h) EN LA EXPRESION DE**  
**ANTIGENOS-Ia POR MACROFAGOS**  
**PERITONEALES INDUCIDOS**

## DISCUSION

Zlabinger (24), describió en monocitos humanos la presencia de proteínas de unión a la cumarina en un número relativamente alto ( $7.5 \times 10^8$  /célula) de baja afinidad. En sus estudios de desplazamiento mostró que es necesaria la presencia de cantidades molares 4 veces mayores de la 7-hidroxycumarina que de la cumarina para desplazar el 50% de la cumarina marcada con  $C^{14}$ .

Hardt (6), reportó que la cumarina tiene un efecto estimulante de la actividad fagocitaria en monocitos humanos de sangre periférica en concentraciones de 20  $\mu\text{g/ml}$  y que la 7-OHC no mostró ningún efecto. En contraste Roskopf (7), observó en granulocitos humanos de sangre periférica, que la cumarina disminuye la actividad fagocitaria en más del 50% y que la 7-hidroxycumarina en estas células, produce un incremento en la actividad fagocitaria de 120% en concentración de 20  $\mu\text{g/ml}$  utilizando azul de tetrazolio y quimioluminiscencia. Yo observé en forma semejante el mismo efecto inhibitor de la cumarina sobre la actividad fagocitaria en macrófagos murinos de exudado peritoneal y no observé efecto estimulante de esta actividad fagocitaria con la 7-hidroxycumarina utilizando el método colorimétrico de la reducción de azul de tetrazolio.

En el caso de la 3-, y la 6-hidroxycumarina observé un efecto estimulante de la actividad fagocitaria en los macrófagos peritoneales inducidos tratados *in vitro*. Se sabe que en el ratón el principal producto de biotransformación de la cumarina es la 3-hidroxycumarina, lo que posiblemente explique nuestra

observación. Por otra parte no son conocidas las acciones de estos dos productos de biotransformación, por lo que no podemos comparar nuestros resultados con los de otros investigadores, en esta tesis se aporta este nuevo conocimiento.

En cuanto a la secreción del factor alfa necrosante de tumores ( $TNF\alpha$ ), el cual es un producto génico del complejo principal de histocompatibilidad de clase III, observé que solamente el tratamiento *in vitro* de los macrófagos peritoneales con la 7-monohidroxicumarina muestra un efecto estimulante de la secreción de este factor soluble, pero únicamente en presencia de lipopolisacárido de *E. coli*. Stuhlmeier (30), reportó el sinergismo concentración-dependiente entre la cumarina o la 7-hidroxicumarina con lipopolisacárido de *E. coli*, en la inducción de la secreción de interleucina 1- $\beta$ , en células mononucleares humanas de sangre periférica. Este investigador solamente pudo demostrar el mismo sinergismo entre el lipopolisacárido y la cumarina en la secreción del factor alfa necrosante de tumores ( $TNF\alpha$ ) en un porcentaje 53%, o la de interleucina-6 en 32%. De manera semejante, en mis resultados se puede observar que existe un sinergismo entre la 7-monohidroxicumarina y lipopolisacárido de *E. coli* para incrementar la secreción del factor soluble  $TNF\alpha$  lo que significa que aparentemente este sinergismo no se limita únicamente al reportado en la literatura (interleucina 1 $\beta$ ), o a la especie humana.

Cabe hacer mención que la 7-hidroxicumarina es el mayor producto de biotransformación en el humano, y en el ratón es la 3-hidroxicumarina, sin embargo la 7-hidroxicumarina mostró también efecto en las células

mononucleares murinas, sin embargo no sabemos porque la 3-hidroxycumarina no mostró actividad estimulante.

Por otra parte Marshall (26) reportó que el tratamiento *in vitro* de células mononucleares humanas de sangre periférica con con cumarina, incrementa la expresión de los antígenos DR y DQ (moléculas de clase II del CPH), y que las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con cáncer avanzado tratados con cumarina, tienen aumentada la expresión de los antígenos DR (28).

Con respecto a la expresión de los productos génicos del complejo principal de histocompatibilidad murino de clase II (antígenos IA, e IE) en el haplotipo H-2<sup>d</sup>, observé que el tratamiento *in vitro* de macrófagos de exudado peritoneal murinos con cumarina, produjo el mismo efecto estimulante de la expresión de los antígenos-*Ia* reportado en humanos, luego de encontrar las condiciones apropiadas (72 horas de inducción y exposición a los compuestos por 72 horas).

Además, pude observar que la cumarina incrementa la expresión de los antígenos-*Ia* en forma más notable, que si se exponen las células simultáneamente a interferon- $\gamma$  y cumarina y que también la 3-hidroxycumarina incrementa dicha expresión, aunque en menor grado, a pesar de que como hemos dicho antes, esta última cumarina es el producto principal de biotransformación en el ratón.

De los numerosos estudios reportados en la literatura de los efectos de varias cumarinas en el sistema inmune, no se conoce a la fecha el mecanismo de acción para producir los efectos descritos.

La presencia de abundantes sitios de unión a cumarinas en las células del sistema inmune, se puede decir que indican que la unión de la cumarina a las células es mediante proteínas de alta capacidad pero baja afinidad, esto es compatible con la hipótesis de que la cumarina actúa en receptores ubicuos intracelulares que son capaces de interactuar con hidrocarburos aromáticos, lo cual conlleva las bases de la inducción enzimática y se relaciona con los efectos observados *in vivo* e *in vitro*.

Sin duda se puede decir que diferentes productos de biotransformación de la cumarina, producen efectos moduladores *in vitro* en los macrófagos murinos, en los procesos que estudiamos; en algunos casos inhibidores y en otros estimulantes.

Dada la importancia de modular al sistema inmune mediante fármacos en un sentido u otro (estimulación o inhibición), es importante conocer las diversas acciones de los productos de biotransformación de la cumarina, ya que los diversos procesos que lleva a cabo el sistema inmune se pueden convertir *in vivo* en blancos terapéuticos.

Además no debemos olvidar que estos fármacos son poco tóxicos cuando se administran en humanos y además su obtención química es muy económica comparada con otros inmunomoduladores.

Estudios adicionales *in vivo* permitirán conocer las verdaderas acciones de estos compuestos, de nuestros resultados podemos proponer estudiar con mayor profundidad las acciones de las cumarinas en otros procesos del sistema inmune de relevancia en la activación de otras estirpes celulares.

- 27- **Koh, M.S.**, Willoughby D.A. (1990). A comparison of coumarin and levamisole on parameters the inflammatory response. *Agents and Actions* 9:3;284-288.
- 28- **Marshall M.E.**, Riley LK., Rhoades J., Eichhorn T., Jennings DC., Cibull M., and Thompson J. (1989). Effects of Coumarin (1, 2-benzopyrone) and Cimetidine on Pheripheral Blood Lymphocytes, Natural Killer Cells, and Monocytes in Patients with Advanced Malinancies. *J. Biological Response Modifiers* 8:62-69.
- 29- **Zlabinger G.J.**, Stuhlmeier K.M., Theyer G.J. (1990). *J. Cancer Res Clin Oncol Suppl. Part II*:971.
- 30- **Stuhlmeier K.**, Theyer G., Baumgartner G., Zlabinger GJ. (1991). Synergistic effect of coumarin (1,2-benzopyrone) and endotoxin in the induction of human interleukin-1. *Clin. Exp. Immunol.* 84:317-323.
- 31- **Acevedo A.**, Juárez L., Lejarazo E., Flores B., Santos E., Elizalde P., Rojas E., León F. Obtención de derivados hidroxilados de la cumarina a través de la reacción de Knoevenagel y evaluación de su posible actividad inmunoestimulante. XXX Congreso Mexicano de Química, Cancún Quintana Roo, México, 16-20 de Octubre de 1994.
- 32- **McCarron R.M.** Goroff D. (1984). *Methods in Enzymology*, 108:274-297.
- 33- **Mosmann T.** (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival:Application to prolipheration and cytotoxicity assays *J. Immunol. Meth.* 65:55-63.

- 34- **Green L.M.**, Reade J.L., Ware C.F. (1984). Rapid Colorimetric Assay for Cell Viability: Application to the Quantitation of Cytotoxic and Growth Inhibitory Lymphokines. *J. Immunol. Meth.* 70: 257-268.
- 35- **Weisman R.A.**, Korn E.D. (1967). Phagocytosis of latex beads by *Acanthamoeba* I. Biochemical properties. *Biochemistry* 2:485-497.
- 36- **Nathan D. G.**, Baehner R.L., Weaver D.K. (1969). Failure of Nitro Blue Tetrazolium Reduction in the Phagocytic Vacuoles of Leukocytes in Chronic Granulomatous Disease. *J. Clinical Investigation* 48:1895-1904.
- 37- **Baehner, R.L.**, Boxer L. (1976). The Biochemical basis of Nitro Blue Tetrazolium Reduction in normal Human and chronic Granulomatous disease polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 48: 2;309-313.
- 38- **Rook, G.A.W.**, Steele J., Umar S., Dockrell H.M. (1985). A simple Method for the Solubilisation of reduced NBT, and its use as a colorimetric Assay for activation of Human Macrophages by  $\gamma$  interferon. *J. Immunol. Methods* 82:161-167.
- 39- **Engvall, E**, Perlman P. (1972). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA III. Quantification of Specific antibodies by Enzyme-Labelled Anti-Immunoglobulin in antigen coated Tubes. *J. Immunol.* 109:29-36.
- 40- **Nibbering P.H.**, Van de Gevel J.S., Van Furth R. (1990). A cell-ELISA for the quantification of adherent murine macrophages and the surface expression of antigens. *J. Immunol. Meth.* 131:25-32.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la colaboración a la presente tesis, de la síntesis de las monohidroxycumarinas que llevó a cabo el grupo de Química Orgánica del Departamento de Química Orgánica de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la U.N.A.M., encabezado por el Químico Fernando León Cedeño, al apoyo que brindó el proyecto D.G.A.P.A.-UNAM IN210294 e IN211396, y a la Q.F.B. Ma. Juana García Mondragón por su asesoría y supervisión técnica de la presente tesis.

## REFERENCIAS

- 1- **Domínguez, X.A.** Métodos de Investigación Fitoquímica. Ed. Limusa. México, **1973**. p. 124.
- 2- **Youngken, H.W.** Tratado de Farmacognosia. Ed. Aldate, S. A. México, **1951**. p. 12, .
- 3- **Egan, D. OKennedy, R. Moran, E. Cox, D. Prosser, E. Thornes, D. (1990).** The pharmacology, metabolism, analysis, and application of coumarin and coumarin-related compounds. Drug metabolism review 22;(5): 503-529.
- 4- **Murray D.H.R., Méndez J., and Brown AS.** Introduction:Historical Development" in: The natural coumarins. John Wiley & Sons LTD., ed., Chichester: Wiley Interscience Publication, **1982**, p.p. 1-12.
- 5- **Sethna, S.M. (1945).** Chem. Rev. 36:1-62.
- 6- **Hardt, T. J., Ritschel, W.A. (1983).** The effect of coumarin and 7-hidroxicoumarin on *in vitro* Macrophage phagocytosis of latex particles. Meth. and Find. Exp. Clin. Pharmacol. 5:39-43.
- 7- **Rosskopf, F. Kraus J. and Franz. G. (1992)** Immunological and antitumor effects of coumarin and some derivatives. Pharmazie 47:139-142.
- 8- **Van Iersel, M.L.P.S. Henderson, C.J. Walters, D.G. Price, R. Wolf, C.R. (1994).** Metabolism of (3-<sup>14</sup>C) coumarin by human liver microsomes. Xenobiotica 24:795-803.
- 9- **Pelkohnen, O. Rautio, A. Raunio, H. Maenpaa, J. Hakkola, J. (1994).** Regulation of coumarin 7-hidroxilation in man. Cancer Research Clinical Oncology 126; 4:30-31.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

- 10- **Auger M.J., and Ross J.A.** The Biology of Macrophage in: The Macrophage. Ed. Lewis C., and McGee J.O.D., IRL-Press, New York U.S.A., 1992. pp, 3-7.
- 11- **Abbas, A. Lichtman A.H., Pober J.S.,** Células y tejidos del sistema inmune, en: Inmunología Celular y Molecular. Ed. Interamericana McGraw-Hill. México, 1995, p. 22-24.
- 12- **Benjamini, E. Kowitz,S.** Immunology A Short Course. Ed. Wiley-liss, New York, 1993, pp. 18-23.
- 13- **Barret J.** Inmunología Médica. Interamericana McGraw-Hill. México 1991.
- 14- **Moran E. (1987).** Analysis of coumarin and its urinary metabolites by high-performance liquid chromatography. J. Of Chromatography 416:165-169.
- 15- **Rozenberg M., Hoepelman I., Verhoef J.** Antimicrobial Functions of Neutrophils. En Klempner M., Styr B, and Jo J. Phagocytes and Disease. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1989, pp. 43-58.
- 16- **Nathan, C.F. (1969).** Secretary Products of Macrophages. J. Clin. Invest., 48: 319- 326.
- 17- **Auger M.J., and Ross J.A.** The Biology of Macrophage in: The Macrophage. Ed. Lewis C., and McGee J.O.D., IRL-Press, New York U.S.A., 1992. pp, 37-47.
- 18- **Beutler, B. Cerami, A. (1989).** The Biology of cachectin /TNF- $\alpha$  primary mediator of the host response. Ann. Rev. Immunol. 7:625-635.

- 19- **Wynn, T.A., Freund Y.R., Paulnock D.M. (1992).** TNF $\alpha$  Differentially Regulates Ia antigen Expression and Macrophage Tumoricidal activity in two Murine Macrophage cell lines. *Cellular Immunology* 140:184-196.
- 20- **Austyn J. Wood K.J.,** Inflammatory mediators and soluble effectors mechanisms, in :Principles of Cellular and Molecular Immunology. Oxford University Press, New York 1993, pp.567-572.
- 21- **Austyn J. Wood K.J.** The Major histocompatibility complex, in :Principles of Cellular and Molecular Immunology. Oxford University Press, New York 1993, pp.63-114.
- 22- **Vassalli P. (1992).** The Pathophysiology of Tumor Necrosis factors. *Ann. Rev. Immunol.* 10: 411-52.
- 23- **Owen, M.** T-Cell Receptors and MHC Molecules, in: *Immunology*, Roitt I., Brostoff J., and Male D. Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, England, 1991, pp.87-91.
- 24- **Zlabinger G. J., Nohammer C., Bohmig A., Menzel J.E. (1994).** Mode of action of coumarin in immune cell. *J. Cancer Res. Clin Oncol* 120 (Suppl):S17-S18.
- 25- **Berkarda, B. Bouffard-Eyuboglu H., Derman U. (1983).** The effect of coumarin derivates on the immunological System of man. *Agents and Actions*, 13:50-52.
- 26- **Marshall, M.E., Rhoades J.L., Mattingly C., Jennings C.D. (1991).** Coumarin (1, 2-benzopyrone) enhances DR and DQ antigen expressions by peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Mol. Biother.* 3:204-206.