



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

Efecto de la 4-hidroxicumarina sobre la organización  
del citoesqueleto de actina en células de melanoma  
murino B16.

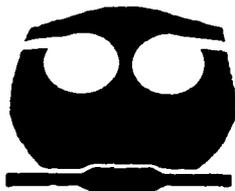
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A :

**CESAR ESPINOZA ORTEGA**



MEXICO, D.F.



2002

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**EXÁMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA**



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.

**Jurado asignado:**

Presidente	Profa. Ana María Vázquez Álvarez.
Vocal	Profa. Mireya Rodríguez Penagos
Secretario	Prof. Marco Antonio Velasco Velásquez
1er. Suplente	Prof. Alejandro Ortiz Osornio
2do. Suplente	Profa. María Manuela Najera Martínez.

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

Este trabajo fue apoyado parcialmente por el proyecto IN206599.

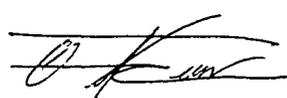
Asesor de tema:

  
Q.F.B. Marco Antonio Velasco Velázquez.

Supervisor técnico:

  
Dr. José Agramonte Hevia.

Sustentante:

  
César Espinoza Ortega.

## **AGRADEZCO:**

A Dios, por darme todo lo que tengo y permitir que esto sea posible.

A mi madre Leonor Ortega Álvarez y mi padre Agustín Espinoza Barrios, por todo lo que de ellos he recibido y enseñarme lo inolvidable.

A mis tíos José Luis Mújica Hernández y Leonides Ortega Álvarez por su apoyo incondicional durante mis estudios de licenciatura. A mis primos Eduardo, Erika y Edgar por su paciencia y amistad.

A mi Universidad, la UNAM y a la Facultad de Química, por todo lo que ahí aprendí, por los momentos inolvidables dentro y fuera de las aulas, por ser como mi hogar, por los amigos que me brindo, por...

Al QFB Marco Velasco Velásquez por todas sus enseñanzas, por su confianza y sobre todo por permitirme ser su amigo.

A la QFB Diana Barrera Oviedo por su valiosa ayuda.

A la QFB Juana García Mondragón por su aliento y compañía.

Al grupo de investigación encabezado por el Med. Cir. J. J. Mandoki; al Med. Cir. Nicandro Mendoza, al M en C. Juan Molina y en especial al M en C. Alejandro Jiménez Orozco y a Estela Estrada por permitir que mi estancia en el laboratorio fuera más agradable y fructífera.

A todos los profesores, que en las diferentes etapas fueron de gran importancia en mi formación académica.

A los Sinodales por sus aportaciones.

## **DEDICO ESTE TRABAJO:**

A mi madre Leonor Ortega Álvarez, mi padre Agustín Espinoza Barrios, a mis hermanos, Oscar, Isaac, y Patricia, con todo mi cariño.

Con admiración y respeto a la mujer que desde mi infancia ha sido un ejemplo a seguir y un aliento para continuar. A quien he dedicado muchos de mis logros y esfuerzos.

Con mucha ilusión: a César.

## INDICE.

### CONTENIDO

página.

I.- ANTECEDENTES	1
*1. CÁNCER	1
-1.1 Epidemiología	1
-1.2 Definición y origen	1
-1.3 Melanoma	2
-1.4 Oncogenes y Genes Supresores de Tumores	3
-1.4.1. Oncogenes	3
-1.4.2. Clasificación de los Oncogene	4
-1.4.3. Genes Supresores de Tumores (GST)	4
-1.4.4. Clasificación de GST	4
-1.4.5. Otros Genes Supresores	5
-1.5 Formación de tumores secundarios	5
-1.5.1 Angiogénesis	6
-1.5.2 Invasión	7
-1.5.3 Intravasación	7
-1.5.4 Interacción con células circulantes	8
-1.5.5 Extravasación	8
-1.5.6 Proliferación	9
*2. CITOESQUELETO	10
-2.1 Definición y función	10
-2.2 Actina	12
-2.2.1 Polimerización de Actina	13
-2.2.2 Moléculas reguladoras de la polimerización de actina	14
*3. MOVIMIENTO	18
-3.1 Señales Intracelulares que Coordinan el Movimiento	19
-3.2 Rac, Rho y Cdc42	20
*4. CUMARINA	22
II.-OBJETIVOS	25
*Objetivo General	25
*Objetivos Particulares	25
III.-HIPÓTESIS	25
IV.- MATERIAL Y MÉTODOS	26
-Material Biológico	26
-Características de la exposición	26
-Análisis de la morfología	26
-Prueba de viabilidad por reducción de Metiltetrazolio (MTT)	27
-Tinción con falotoxina fluorescente	27
-Ensayos de adhesión	28
-Inmunolectroforesis (Western Blot)	28
-RT-PCR	29
V.- RESULTADOS	31
-Morfología	31

-Viabilidad	.....	32
-Contenido de microfilamentos de actina.....		33
-Ensayos de adhesión	.....	36
-Inmunoelectroforesis	.....	37
-RT-PCR.	.....	38
VI.-DISCUSIÓN	.....	39
VII.-CONCLUSIONES	.....	42
VIII.-BIBLIOGRAFIA	.....	43

## I. ANTECEDENTES.

### 1. CÁNCER.

#### 1.1 EPIDEMIOLOGÍA.

El cáncer es un importante problema de salud pública. Los tumores malignos fueron la segunda causa de muerte en México en 1999 con 53,662 casos (Fuente: INEGI, SS/ DGEI, 1999). Se determinó como la principal causa de mortalidad en personas en edad productiva entre 15 y 64 años. A pesar de los avances en el manejo de la enfermedad, la sobrevida a 5 años para todos los tipos de cáncer de pulmón es de 13% y la de melanoma metastásico es de 16%.

#### 1.2 DEFINICIÓN Y ORIGEN.

La palabra cáncer se utiliza para nombrar un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento anormal de células. Se manifiesta por la reducción o pérdida del control en el crecimiento y función celular. En términos moleculares y biológicos, todos los tipos de cáncer tienen defectos parecidos en la regulación de la proliferación y de la muerte celular (Tannock I. 1999).

Las células cancerosas pueden distinguirse de las células normales por examen microscópico, ya que las primeras se observan con menor diferenciación. Las células malignas presentan una alta relación núcleo-citoplasma, nucleolo prominente, varias mitosis y estructuras relativamente poco diferenciadas. La presencia de células con capacidad invasiva, es diagnóstico suficiente para indicar malignidad (Lodish H. 2000).

La carcinogénesis es un proceso de varias etapas que desemboca en el cambio de una célula normal en una célula cancerosa. La conversión de una célula normal en una neoplásica requiere de múltiples mutaciones, principalmente en genes que codifican proteínas que participan en el control de la proliferación. Las mutaciones que inducen la formación de cáncer pueden ocurrir en células en división y pasar a la progenie. Los principales mecanismos que inducen cambios genéticos incluyen mutaciones puntuales, deleciones, amplificación genética, y translocaciones. Los factores que promueven la carcinogénesis pueden ser externos, como químicos ambientales, tabaquismo, radiación o infecciones virales; o internos, como defectos en el sistema inmune y predisposición genética. Dado que existen diferentes mecanismos que promueven la carcinogénesis, las neoplasias generadas son diferentes; varían en tiempo de crecimiento, grado de diferenciación celular, detectabilidad, invasividad, potencial metastásico, respuesta a tratamientos y pronóstico (Franks L.M. 1998, Balmer C. 1998, Ruddon W. R. 1995).

La formación de tumores requiere de diversos estadios conocidos como iniciación, promoción y progresión. La iniciación debida a alguna causa procarcinogena resulta en la alteración específica de genes susceptibles. La célula mutada incrementa su capacidad de proliferación, lo cual le permite entrar al ciclo celular para proliferar. Este fenómeno teóricamente es definido como irreversible y los cambios moleculares pueden permanecer latentes hasta que otro estímulo induzca la proliferación (Ruddon W. R. 1995).

El segundo estadio conocido como promoción se caracteriza por un estado de hiperproliferación o hiperplasia. Esta proliferación es selectiva sobre células iniciadas activadas por un estímulo promotor y da origen a lesiones premalignas o tumores benignos. Los promotores son generalmente sustancias químicas exógenas, estímulos físicos o agentes endógenos como hormonas. Adicionalmente a la proliferación excesiva, la descendencia de estas células, presenta apariencia anormal en estructura y orientación, condición que se denomina displasia. Los tumores denominados "in situ", que normalmente derivan de epitelios, son tumores benignos pues la mayoría de las veces son de tamaño pequeño, se encuentran encapsulados y no invaden el tejido que los rodea. Causan daño al ejercer presión local u obstrucción en órganos vitales, por lo que el tratamiento quirúrgico constituye una solución efectiva (Andrés J.P. 1999).

La tercer etapa se refiere a la conversión de lesiones premalignas en tumores malignos y su progresión. Durante esta etapa las células neoplásicas adquieren gradualmente características cada vez más agresivas, es decir un fenotipo invasivo y metastático. Si los cambios genéticos permiten que el tumor comience a invadir la membrana basal y a diseminar a través del flujo sanguíneo o linfático, se considera que el tumor ha llegado a ser maligno (Andrés J.P. 1999, Weinberg R. 1996, Rouslahti E. 1996).

### 1.3 MELANOMA.

El melanoma es un tumor maligno de los melanocitos, células encargadas de dar la coloración a la piel. La mayoría de los melanomas se localizan en la piel, pero también pueden localizarse en otros lugares, como mucosas y retina. La piel está constituida por dos capas principales: la epidermis (exterior) y dermis (interior); los melanocitos se encuentran en la epidermis. El factor etiopatogénico más importante en el desarrollo del melanoma maligno es la radiación solar. La radiación ultravioleta tiene mayores consecuencias en personas con fenotipos de piel clara (Lodish H. 2000).

El melanoma tiene un comportamiento biológico que presenta dos fases de crecimiento, una radial y otra vertical. La fase de crecimiento radial, puede durar meses o años. La tumoración está limitada a la epidermis y no presenta capacidad de producir metástasis. En la fase de crecimiento

vertical, la tumoración invade la dermis y adquiere capacidad de producir metástasis linfáticas o sanguíneas. Cuando es posible establecer en que fase de crecimiento se encuentra el melanoma, es más fácil determinar un pronóstico y proponer el tratamiento (Ruddon W. R. 1995).

#### 1.4 ONCOGENES Y GENES SUPRESORES DE TUMORES.

El ciclo celular está dividido en cuatro etapas: una fase de síntesis de ADN, llamada fase S, otra fase de división celular denominada fase M, y dos estadios llamados G1 y G2 que separan las dos etapas anteriores. Cuando la célula se encuentra en un estado estacionario, se dice que se encuentra en una etapa especial llamada G0. Una vez que la célula ha sido estimulada para entrar a un nuevo ciclo, abandona la fase G0 y pasa al primer punto de restricción G1. Este punto se considera como el principal punto de control dentro del ciclo celular. Todas las células poseen mecanismos similares para regular el ciclo celular. Estos mecanismos de control se encargan de detectar fallas en la replicación, reparación del DNA, el ensamblaje del huso o algún otro mecanismo implicado en la división celular, regulando así el ciclo celular (Lodish H. 2000, Garibay M.A. 1998).

La falla en los mecanismos de control contribuye a la generación de cáncer. Prácticamente en todos los cánceres humanos, existen mutaciones que inactivan proteínas con funciones cruciales en el desarrollo del ciclo celular. Los dos tipos principales de genes, cuya mutación puede inducir la formación de tumores o dar lugar a transformaciones malignas, se conocen como proto-oncogenes y genes supresores de tumores. Mediante análisis de ADN en varias etapas del desarrollo del cáncer, se ha realizado estudios epidemiológicos que indican la sobreexpresión de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores en diferentes tipos de neoplasia (Franks L.M. 1998).

##### 1.4.1 Oncogenes.

Un oncogen es la forma mutada del proto-oncogen. Los proto-oncogenes codifican proteínas que estimulan la división celular. La conversión de proto-oncogen a un oncogen, mediante mutación, generalmente significa ganancia funcional en la proteína que codifica. Existen tres mecanismos principales para producir un oncogen desde su correspondiente proto-oncogen:

El primero requiere mutaciones puntuales en el proto-oncogen, que producen proteínas constitutivamente activas.

El segundo necesita la amplificación de un segmento del DNA donde está incluido el proto-oncogen, provocando la sobreexpresión de la proteína codificada.

El tercer mecanismo propone la translocación del cromosoma que contiene un gen regulador de crecimiento, bajo el control de un promotor diferente causando una expresión inadecuada del gen (Franks L.M. 1998, Lodish H. 2000).

#### 1.4.2 Clasificación de los Oncogenes.

De acuerdo con la función que realiza el producto génico, los oncogenes se clasifican en: genes que codifican factores de crecimiento o sus receptores (por ejemplo, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, PDGF); genes que codifican proteínas citoplasmáticas, involucradas en la transducción de señales estimulantes (proteínas de la familia Ras); genes codificantes de factores de transcripción y que activan genes promotores de crecimiento (c-myc); y genes que codifican moléculas cuya función aún no está especificada (mdm2) (Varmus H. 1993, Weinberg R. 1996).

#### 1.4.3 Genes supresores de tumores (GST).

Los GST generalmente codifican proteínas que inhiben la proliferación celular por diferentes vías. Las mutaciones pueden causar que las proteínas producidas por este tipo de genes sean inactivas, evitando la regulación del crecimiento celular. La pérdida de uno o más de estos bloqueadores contribuye en el desarrollo de muchos tipos de neoplasias. Los individuos con mutaciones hereditarias en GST tienen una mayor predisposición para ciertos tipos de cáncer (Varmus H. 1993).

#### 1.4.4 Clasificación de GST.

Las proteínas producidas por los GST se han clasificado en 5 grupos:

- Proteínas intracelulares. Por ejemplo, p16 inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas, la cual regula una etapa específica del ciclo celular.
- Receptores a hormonas. Por ejemplo factor de crecimiento derivado de tumor  $\beta$ , que inhibe la proliferación celular.
- Proteínas de puntos de inspección que detienen el ciclo celular cuando el ADN está dañado o existen anomalías en los cromosomas.
- Proteínas que promueven apoptosis.
- Enzimas que participan en la reparación de ADN (Weinberg R. 1996, Lodish H. 2000).

Dentro los GST, el p53 es el que más frecuentemente se ha encontrado alterado en tumores avanzados, de mal pronóstico, o en metástasis. Las alteraciones moleculares de este gen parecen iniciar en distintas etapas del desarrollo tumoral, dependiendo del tipo de tumor que se trate. Las mutaciones de p53 en tumores metastáticos de próstata son características de este cáncer en comparación con carcinomas primarios que no presentan mutaciones en este gen (Lodish H. 2000).

#### 1.4.5 Otros Genes Supresores.

Se describen otros grupos de genes que se relacionan con la producción y progresión tumoral, dentro de los que destacan los genes supresores de metástasis. Además, se mencionan genes reguladores de interacciones de la célula con elementos de la matriz extracelular, célula-célula y genes reguladores de la degradación de matriz extracelular. Muchos de estos genes han sido descritos recientemente y aún no se conoce completamente su función (Andrés J.P. 1999).

Respecto a genes supresores de metástasis (GSM) el más conocido es el nm23. Este gen fue identificado por su escasa o nula expresión en células murinas de melanoma metastático y en metástasis de carcinoma de mama. La expresión de nm23 en los respectivos tumores primarios es normal. Su función como GSM se comprobó con experimentos de transfección en células de melanoma altamente metastático (Andrés J.P. 1999).

#### 1.5 FORMACIÓN DE TUMORES SECUNDARIOS.

El proceso de metástasis se refiere a la diseminación de células cancerosas desde su sitio original a otras áreas del cuerpo. Las células cancerosas pueden invadir el tejido adyacente por extensión del tumor. También pueden romper el contacto con otras células del tejido de origen, atravesar la barrera de la lámina basal y entrar a la circulación para formar tumores secundarios en sitios lejanos al de origen. Las células con esta capacidad son llamadas células metastásicas. Sólo los tumores malignos tienen la capacidad de producir metástasis, invadir tejido adyacente y destruirlo. Este proceso requiere transformaciones adicionales de la célula tumoral, alterando la capacidad migratoria y la expresión de otras proteínas. Dentro de los receptores que alteran su expresión son de gran importancia las moléculas de adhesión. Comúnmente hay una disminución de cadherinas, moléculas responsables de la interacción célula-célula, y cambios en la expresión de integrinas, las cuales median interacciones de la célula con la matriz extracelular (Yamada K.M. 1995). Las integrinas también controlan la metástasis de células tumorales por permitir la adhesión en los vasos sanguíneos. En algunos casos como en melanoma maligno, la expresión de integrinas determina el fenotipo de malignidad (Armitage P. 1954, Garibay M.A. 1998, Liotta L. 1986).

El sitio anatómico del tumor proporciona datos sobre el curso clínico del mismo. Además, indica la probabilidad y ruta de producir metástasis, los efectos del tumor sobre las funciones del cuerpo y el tipo de tratamiento que puede aplicarse. Se ha demostrado que cada tipo de célula cancerosa tiene afinidad para metastatizar a ciertos órganos. Los sitios secundarios más comunes para la proliferación de la metástasis de cualquier tipo de cáncer son los pulmones, el hígado, nódulos linfáticos, medula ósea y el cerebro. En general, el sitio inicial de formación de tumores secundarios tiende a ser el órgano que contiene la primera red capilar encontrada por las células después de ser liberadas del tumor (Liotta L. 1974). Cuando las células tumorales entran en el sistema linfático, pasan por los nodos linfáticos regionales donde pueden ser retenidas y provocar un crecimiento metastático. Una vez que las células cancerosas alcanzan los vasos sanguíneos, pueden llegar a tejidos distantes mediante el torrente circulatorio; pero solo el 0.1 % de las células que entran en la circulación tiene la capacidad de formar un tumor metastático secundario (Lodish H. 2000). Dada la ineficiencia de este paso, encontrar células cancerosas en el torrente sanguíneo, no es indicativo de la formación de metástasis. Sin embargo las explicaciones hemodinámicas de la selectividad, no aclaran totalmente la predilección de las células tumorales por un órgano específico. Otra teoría postula la existencia de interacciones diferenciales entre la célula tumoral y el órgano hospedero. La alta proporción de metástasis de los cánceres de mama, próstata y pulmón hacia el hueso son ejemplos de este tipo de establecimiento (Weiss L. 1990, Chambers F.A. 2000).

### 1.5.1 Angiogénesis.

La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos que invaden la extensión del tumor para proporcionar los elementos necesarios en su desarrollo. La formación de los nuevos vasos sanguíneos relaciona varios procesos que incluyen: la degradación de la lámina basal que recubre los capilares cercanos, la migración de células endoteliales que forman los capilares en el tumor, la división de estas células endoteliales, y la formación de una nueva membrana basal sobre el capilar que se va formando. Algunas células tumorales producen proteínas que estimulan el crecimiento de vasos sanguíneos dentro del tumor, estas proteínas son llamadas factores angiogénicos. Se ha demostrado que existen varios estímulos para la producción de estos factores; algunos estímulos incluyen condiciones tales como hipoxia, disminución de pH, hipoglucemia, y en casos de respuestas inflamatorias, la expresión de ciclooxigenasa-2 y síntesis de prostaglandinas (Warren R. A. 2000, Lu C. 1994, Weidner N. 1993).

Ejemplos de factores angiogénicos secretados por diversos tipos de células tumorales son: factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor

de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento transformante  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ), interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Los factores de crecimiento con mayor actividad angiogénica son VEGF, FGF y PDGF. El VEGF tiene varios efectos sobre las células del endotelio; puede iniciar directamente el proceso de angiogénesis al estimular la proliferación y migración de las células endoteliales. Además, de manera indirecta, contribuye a incrementar la angiogénesis por la inducción de una mayor permeabilidad vascular. Una vez que se ha desarrollado la angiogénesis y se logra un estado de maduración, el potencial metastático del tumor se incrementa (Lu C. 1994).

### 1.5.2 Invasión.

Es la penetración de las células tumorales a través de las barreras de matriz extracelular (MEC). Las membranas basales de los tejidos, de los vasos sanguíneos y linfáticos, constituyen las barreras que deben superar las células tumorales para lograr la invasión (Lodish H. 2000).

Los mecanismos que utiliza la célula tumoral para invadir, son similares a aquellos utilizados por células normales con capacidad para cruzar las barreras de tejidos en condiciones fisiológicas. La invasión requiere necesariamente que las células tumorales sean móviles. La motilidad, a su vez, requiere del rearrreglo del citoesqueleto y de la existencia de señales coordinadas; por lo tanto, la estimulación de la motilidad contribuye a la formación de metástasis (Ruddon W. R. 1995, Schoenwaelder M. S. 1999). Los factores que favorecen la motilidad se han clasificado en tres grupos: el primero comprende factores secretados por las propias células tumorales, llamados factores de motilidad autócrinos. Se han identificado al menos 11 de estos factores. El segundo grupo corresponde a péptidos derivados de proteínas de la matriz extracelular que se generan por acción de enzimas hidrolíticas. El tercer grupo, está constituido por los factores de crecimiento, denominados factores de motilidad parácrinos y han sido clasificados como factores internos porque causan que las células tumorales se muevan hacia los órganos que los produce (Armitage P. 1954, Edward M. 1993).

### 1.5.3 Intravasación.

Es el mecanismo de invasión de las células tumorales para llegar a la circulación que involucra procesos mecánicos, como el aumento de la presión sobre el tejido adyacente o el proceso de movimiento celular, y procesos enzimáticos, como expresión de proteasas. El incremento de la actividad proteolítica promueve la degradación de la lámina basal y permite que las células tumorales

penetren en los tejidos adyacentes o directamente en la circulación. Muchas células tumorales, secretan una proteasa llamada factor activador de plasminógeno; esta proteasa degrada enlaces peptídicos en el plasminógeno, que es una proteína abundante en el suero, induciendo la formación de una proteasa activa llamada plasmina, la cual contribuye a facilitar la migración de la célula tumoral (Garibay M.A. 1998).

En la etapa de angiogénesis, los nuevos vasos no están bien formados, por lo que son más vulnerables a la actividad proteolítica y mecánica de las células metastásicas, facilitando su entrada en la circulación; este mecanismo proporciona la vía de intravasación más común. Se ha demostrado que la intravasación es un proceso con alta eficiencia, pues más del 80% de las células que inician el proceso, lo terminan satisfactoriamente. En un modelo de metástasis experimental, se ha observado que, hasta esta etapa, el proceso es eficiente, y no hay diferencias entre diferentes líneas tumorales (Chambers F. A. 2000).

#### 1.5.4 Interacción con células circulantes.

Después de que células tumorales invaden los vasos linfáticos o vasculares, interactúan con plaquetas, linfocitos y neutrófilos, estimulando el depósito de fibrina para formar un agregado. Cuando se ha formado este agregado y se adhiere en alguna red capilar de un órgano distante, se induce la formación de una matriz de fibrina que contribuye al desarrollo de metástasis. El establecimiento de las células tumorales en los capilares de los órganos, ha sido asociado con la formación de trombos, los cuales involucran la interacción de las células tumorales con plaquetas y leucocitos. Aunque estas interacciones no son indispensables para el proceso metastásico, la administración de anticoagulantes en modelos de metástasis experimentales, puede reducir el número de metástasis después de una inyección intravenosa de células malignas. Los anticoagulantes son menos efectivos en experimentos de metástasis espontáneas, donde se generan tumores secundarios a partir de la implantación subcutánea de células tumorales (Hilgard P. 1984). Es en esta etapa del proceso de metástasis donde la eficiencia comienza a decaer (Chambers F. A. 2000).

#### 1.5.5 Extravasación.

Luego de la adhesión de las células tumorales sobre el endotelio capilar de órganos susceptibles, se inicia el daño sobre la pared de los vasos. Los neutrófilos, linfocitos y plaquetas presentes en el agregado, atraviesan por los espacios intercelulares e inducen el paso de las células tumorales. En el caso de las plaquetas, éstas liberan histamina que promueve la permeabilidad capilar y la subsecuente migración de las células tumorales (Franks L.M. 1998).

El porcentaje de eficiencia de las células que logran extravasar disminuye considerablemente. La eficiencia del proceso de extravasación está directamente relacionada con el grado de malignidad del tumor primario y el órgano blanco. Aunque se ha demostrado que no todas las células de un tumor con alto grado de malignidad, mantienen el mismo fenotipo después de la extravasación (Chambers F. A. 2000).

#### 1.5.6 Proliferación.

Una vez que la célula tumoral ha migrado a través de la pared vascular, se establece en el nuevo ambiente e inicia la proliferación. Esta etapa también se favorece por la liberación de factores angiogénicos provenientes de linfocitos, macrófagos, o la misma célula tumoral. Por ejemplo, las células de melanoma producen muchos reguladores positivos de crecimiento, como la interleucina 8, que funciona como factor de crecimiento autócrino (Edward M. 1993).

## **2. CITOESQUELETO.**

### **2.1 DEFINICIÓN Y FUNCIÓN.**

El citoesqueleto es un sistema citoplásmico de proteínas fibrilares. Tiene por función estabilizar la estructura de la célula, organizar el citoplasma con todos sus organelos y dirigir el movimiento. El citoesqueleto no es una estructura permanente, sino que se construye y desmantela constantemente. Por ejemplo, el citoesqueleto es responsable de que algunas células pueden emitir pseudópodos en el proceso de fagocitosis; contribuye a que las células musculares se contraigan y a que los organelos se muevan de manera coordinada en el interior del citoplasma. Los polímeros proteicos que componen el citoesqueleto son microtúbulos, filamentos intermedios y microfilamentos de actina. Estas tres categorías de filamentos pueden ser diferenciadas por su diámetro, composición química y su función. Los tres polímeros proteicos están interconectados mediante proteínas accesorias y forman una red que se extiende desde el núcleo hasta la superficie celular. En el microscopio electrónico, el citoesqueleto aparece como una densa y aleatoria red de fibras (Carlier F.M. 1991, Lodish H. 2000, Ville C. 1996).

Los microtúbulos son polímeros con un diámetro de 24 nm de una proteína globular llamada tubulina. La tubulina es un heterodímero de 55 kDa de peso molecular que se encuentra en todas las células eucarióticas y presenta una secuencia altamente conservada. Los microtúbulos son responsables de varios movimientos celulares. Se relacionan directamente con movimiento de cilios, flagelos, transporte de vesículas en el citoplasma y la alineación y separación de cromosomas. Estos movimientos son resultado de la polimerización/despolimerización de microtúbulos, de la acción de proteínas motoras de microtúbulos o de ambos procesos. Algunos compuestos como colchicina, taxol y vinblastina, afectan los procesos que dependen de la dinámica de los microtúbulos. Estos compuestos se unen irreversiblemente al microtúbulo previniendo la unión o pérdida de subunidades. Como consecuencia de ello, se altera el equilibrio del estado estacionario, bloqueando la formación del huso mitótico e inhibiendo la mitosis, por lo que estos compuestos son utilizados como efectivos agentes antineoplásicos (Maecioni R.B. 1987, 1997, Jordan M. A. 1999).

Otro componente del citoesqueleto son los filamentos intermedios (FI), que tienen un diámetro entre 7 y 11 nm. Los filamentos intermedios se encuentran en prácticamente todas las células de organismos multicelulares. En células de la epidermis y en el axón de las neuronas, son más abundantes que los microtúbulos y los microfilamentos. Las propiedades más distintivas del

grupo de FI son su relativa insolubilidad y su resistencia a la desnaturalización. La función de los filamentos intermedios es estrictamente estructural; contribuyen a mantener la forma de la célula, la organización espacial de sus organelos y a promover las funciones mecánicas del citoplasma (Lodish H.2000).

Los FI también proporcionan soporte a la membrana para mantener el contacto con otras células o con la matriz extracelular. A diferencia de microtúbulos y microfilamentos, los FI no participan en la motilidad celular y no se conocen proteínas motoras que actúen sobre FI. Dependiendo del tejido, los FI se forman de diferentes proteínas (ver TABLA 1). La identificación del tipo de proteína que constituye los FI puede determinar el tejido de origen de un tumor. Por ejemplo, los tumor maligno de mama y los de tracto gastrointestinal contienen queratinas y carecen de vimentina, pues derivan de células epiteliales (Lodish H. 2000, Weidner N. 1993).

TABLA 1. Clasificación de proteínas de filamentos intermedios en células de mamífero.

CLASIFICACIÓN DE LOS FILAMENTOS INTERMEDIOS			
TIPO	PROTEÍNA	PESO MOLECULAR (kDa)	DISTRIBUCIÓN EN TEJIDOS
I	Queratinas ácidas	40-57	Epitelios
II	Queratinas básicas	53-67	Epitelios
III	Vimentina	57	Mesenquima
	Desmina	53	Músculo
	Proteína glial fibrilar ácida	50	Células gliales
	Periferina	57	Neuronas centrales y periféricas
IV	Neurofilamentos- L	62	Neuronas
	Neurofilamentos-M	102	
	Neurofilamentos-H	110	
	Internexina	66	Desarrollo del SNC
V	Laminina A	70	Núcleo de todas las células
	Laminina B	67	
	Laminina C	67	

El citoesqueleto de actina es el más abundante dentro de la célula y es esencial para la motilidad, el crecimiento, la división celular, la señalización, el desarrollo y el mantenimiento de la

forma celular. Los microfilamentos son el componente más importante de la maquinaria contráctil, por lo tanto, están involucrados en prácticamente todos los movimientos celulares incluyendo desplazamiento, corrientes citoplasmáticas, contracción y citocinesis. También contribuye a regular la adhesión, la organización de proteínas y el movimiento de receptores en la superficie celular (Lodish H. 2000, Pawlak G. 2001).

El citoesqueleto de actina es sustancialmente modificado en células transformadas. Estos cambios ocurren por variaciones en la organización de los filamentos de actina y proteínas reguladoras asociadas. Dichos cambios están directamente relacionados en el crecimiento anormal de células tumorales, su capacidad de adhesión al tejido y su habilidad para producir metástasis (Jordan M. A. 1999). El incremento de los niveles de actina soluble y la disminución de los de actina polimerizada, también aparece en eventos tempranos de la progresión de neoplasias (Krishna Rao K. M. 1991, Pawlak G. 2001). La cuantificación de los niveles relativos de estas dos formas de actina en la célula puede ser una prueba para evaluar e identificar el riesgo de cierto tipo de neoplasias. La posibilidad de que los filamentos de actina y muchas de sus proteínas reguladoras puedan ser utilizadas como blancos selectivos en quimioterapia contra el cáncer, es muy atractiva y prometedora. Las propiedades generales de los microfilamentos y los mecanismos que regulan su formación se describen a continuación (Condeelis J.S. 2001).

## 2.2 ACTINA.

Es una proteína globular compuesta por una cadena polipeptídica de aproximadamente 375 aminoácidos y un peso molecular de 42 kDa. Tiene propiedades típicas de una proteína globular, con un ligero exceso de aminoácidos ácidos, resultando en un punto isoelectrico alrededor de pH 5.5. Es la proteína intracelular más abundante en células eucarióticas, aproximadamente el 10% de la proteína total. Los polímeros de esta proteína son críticos para el crecimiento, división, motilidad, adhesión, señalización y mantenimiento de la forma celular (Barkalow K. 1995, Lodish H. 2000).

Los monómeros de actina, conocidos como actina globular o G-actina, tienen dos dominios separados por una hendidura. Cada molécula de actina puede unir en esta hendidura una molécula de ATP o ADP y un catión, que puede ser  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$ . La estructura resultante de la unión de actina-ATP- $\text{Ca}^{2+}$ , es diferente a la unión actina-ATP- $\text{Mg}^{2+}$ . En el Humano existen 6 genes que codifican para diferentes isoformas de actina, se han identificado 4 isoformas  $\alpha$ , una  $\beta$  y una  $\gamma$ . Las isoformas presentes en tejidos humanos se clasifican de acuerdo a su punto isoelectrico y cada isoforma tiene

una distribución diferente en los tejidos. Al secuenciar estas isoformas se ha observado que es una proteína muy conservada, con pequeñas diferencias de entre 4 a 23 aminoácidos dependiendo del tejido. Cuando se comparan diferentes especies también se encuentra una alta homología.

La principal función de la actina es construir filamentos de dos cadenas de monómeros enrollados en espiral. Cada monómero de G-actina puede interaccionar de manera no covalente con otros dos monómeros, generando un filamento helicoidal de 7 a 9 nm de diámetro llamado filamento de actina, microfilamento o F-actina (Lodish H. 2000).

### 2.2.1 Polimerización de Actina

La formación de microfilamentos es energéticamente desfavorable, por lo tanto, la polimerización de G-actina esta acompañada por la hidrólisis de ATP en ADP. Se ha demostrado que las subunidades que contienen una molécula de ATP presentan mayor afinidad de unión a los filamentos que cuando están unidas a un ADP. Sin embargo, sólo en los extremos de los filamentos se encuentran monómeros unidos al ATP, mientras que en el resto hay G-actina-ADP.

La polimerización de actina es un proceso reversible; *in vitro* se ha demostrado que F-actina puede despolimerizar en G-actina cuando se cambian las condiciones del microambiente, por ejemplo, disminuyendo la concentración iónica en el medio. Esta habilidad de polimerizar y despolimerizar es una importante propiedad de la actina. Los filamentos obtenidos *in vitro* son idénticos a los que se aíslan de células, lo que indica que no se requieren de otros factores o proteínas accesorias para la polimerización *in vivo*. El mecanismo de polimerización de actina puede ser dividido en tres etapas: La primera está marcada por un periodo de nucleación, en el cual se requiere de la activación de los monómeros que sufren un cambio conformacional para formar un pequeño oligómero inestable; al unirse 3 o 4 subunidades puede actuar como un iniciador estable o núcleo. En la segunda etapa se presenta una rápida elongación por la unión de monómeros en ambos lados del núcleo. En la última etapa, conforme aumenta la longitud del filamento, la concentración de G-actina disminuye hasta que llega a un equilibrio con el filamento. Esta tercer etapa se conoce como estado estacionario, porque la cantidad de G-actina que se une al filamento es igual a la que se desprende (Lodish H. 2000, Condeelis J.S. 2001).

Las subunidades se orientan en la misma dirección, generando una polaridad en el filamento. En un extremo del filamento, el sitio de unión de ATP en el monómero de actina, queda expuesto al medio externo; este extremo es designado como extremo negativo (-). En el otro extremo, el sitio de unión a ATP esta en contacto con la subunidad adyacente y es denominado extremo positivo (+).

En la literatura también se les llama barbed end y pointed end, respectivamente, basándose en la unión a fragmentos de miosina (Schafer D.A. 1995). El extremo positivo crece de cinco a diez veces más rápido que el negativo por que tiene mayor afinidad para unir monómeros. *In vitro* la polimerización depende de que la concentración de monómeros de G-actina sea suficiente para promover la nucleación y elongación de los filamentos, esta condición se conoce como concentración crítica (Cc). Si la concentración de monómeros es mayor que la concentración crítica, los filamentos se ensamblan hasta llegar a un estado estacionario (Lodish H. 2000). Sin embargo, dado que los sitios de unión en los extremos del filamento son diferentes, las concentraciones que se requieren para la elongación en cada extremo también son diferentes.

### 2.2.2 Moléculas Reguladoras de la Polimerización de Actina.

La forma y los movimientos de la célula son dependientes en gran medida del citoesqueleto de actina. Sin embargo, éste no funciona independientemente del resto de la célula, es regulado por un conjunto de moléculas y enzimas. Aunque se conoce poco de los mecanismos de señalización para la polimerización de actina en la célula, se piensa que este proceso puede ser regulado por fosforilación reversible de proteínas, a través de varias proteínas cinasas. La interacción de factores solubles con receptores de membrana, se relaciona con señalización intercelular y tiene particular importancia para controlar la polimerización de actina en la membrana plasmática. Por ejemplo, en respuesta a mediadores de la inflamación, se activan segundos mensajeros como AMP cíclico, iones  $Ca^{2+}$ , o fosfatidilinositol bifosfato, que proporcionan vías de señalización para modular el citoesqueleto de actina y alterar la barrera endotelial (Condeelis J.S. 2001).

Uno de los mecanismos descritos está basado en la fosforilación de la proteína cinasa C (PKC) para promover las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular. El ácido 12(S)-hidroxi-eicosatetraenoico [12(S)-HETE] (un metabolito del ácido araquidónico, producido por la lipooxigenasa) estimula respuestas celulares dependientes del citoesqueleto, tales como adhesión, motilidad e invasión, en células tumorales y endoteliales. Se ha demostrado que este metabolito produce alteraciones en la distribución de monómeros y filamentos de actina, con un incremento de F-actina en el citoesqueleto, lo que sugiere que 12(S)-HETE puede inducir directamente la polimerización de los filamentos de actina. Otras moléculas reguladoras del citoesqueleto también están involucradas en otros procesos como síntesis de proteínas y expresión de genes (Rice L.R. 1998).

Además, dentro de la célula existen proteínas que promueven o inhiben la polimerización de actina mediante su interacción directa con actina. Las proteínas que controlan la longitud de los filamentos actúan regulando la adición o pérdida de monómeros en los extremos del filamento, cortando los microfilamentos para crear nuevos sitios de elongación o secuestrando monómeros. A continuación se describen ejemplos particulares de cada uno de los mecanismos.

*Inhibición del Ensamble de los Microfilamentos.* Una posibilidad para inhibir la polimerización de actina es que los monómeros de G-actina sean secuestrados. Por ejemplo, timosina  $\beta_4$  es una proteína intracelular pequeña (5 kDa aproximadamente) considerada como la principal proteína celular secuestradora de actina. Es abundante en el citosol y presenta habilidad para unirse al complejo G-actina-ATP, impidiendo su polimerización. Un incremento en la concentración citosólica de timosina  $\beta_4$ , puede disminuir la concentración de actina disponible y por lo tanto disminuir el contenido de F-actina (Schafer D.A. 1995).

*Activación del Ensamble de los Microfilamentos.* Existen proteínas capaces de promover la polimerización actuando como factores de intercambio de nucleótidos. Cuando G-actina esta unida a otras proteínas, se bloquea el sitio de unión a ATP, pero en el caso particular de profilina, se une en el lado opuesto del sitio de unión de ATP facilitando la polimerización. profilina es una proteína citosólica con un peso molecular de 15 kDa que forma complejos estables con ATP-actina. Es la única proteína que se une a actina permitiendo el intercambio de ATP por ADP. La función principal de profilina es promover la polimerización de los filamentos de actina en la célula (Schafer D.A. 1995).

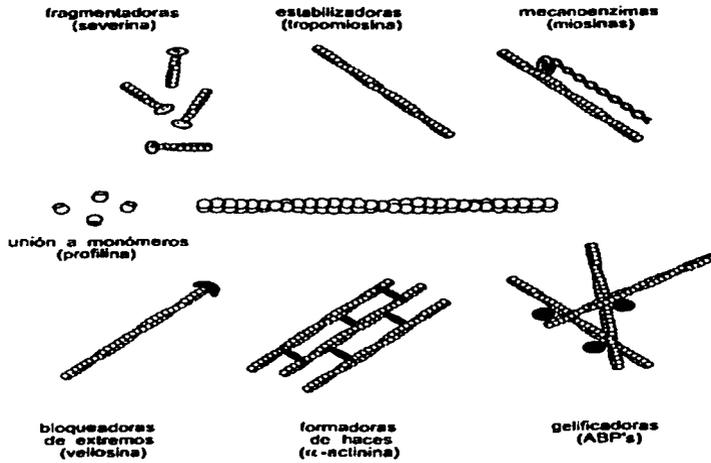
*Proteínas de Corte y/o Bloqueo.* Las proteínas de esta categoría, se unen a los filamentos de actina y controlan su longitud al romperlo en fragmentos cortos. Algunas investigaciones proponen que las proteínas de corte cambian la conformación en la subunidad a la cual se unen, causando tensión y la subsecuente rotura de la unión intersubunidades. Por ejemplo, las proteínas gelsolina y cofilina actúan cortando los filamentos, generando con ello nuevos extremos libres con posibilidad de elongación. Se ha demostrado que muchas proteínas de corte también se unen en algún extremo de los filamentos formados. Después de que la proteína de corte rompe en algún lugar del filamento, ésta permanece unida al extremo positivo de un fragmento resultante, impidiendo la adición o intercambio de subunidades de actina, esta actividad se denomina "capping" o bloqueo. Cuando el extremo positivo permanece bloqueado y el extremo negativo se mantiene libre, el filamento tiende a despolimerizarse. Las proteínas bloqueadoras como vellosina, se unen a los extremos de los

filamentos de actina con gran afinidad y con una estequiometría 1:1. De acuerdo al extremo de unión, se previene la pérdida o adición de monómeros de actina. En general las proteínas de bloqueo se unen débilmente a los monómeros de actina, pero contribuyen a estabilizar los núcleos, para iniciar la polimerización. La gelsolina corta los filamentos en un proceso dependiente de  $Ca^{2+}$  y bloquea un extremo del nuevo fragmento en el sitio de corte. Se han realizado experimentos *in vivo* que indican que la gelsolina no es esencial para la generación de extremos terminales libres. En general las proteínas que cortan y bloquean, se encuentran reguladas por varias vías de señalización. En el caso de cofilina y gelsolina, se unen a un fosfolípido de membrana llamado fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato ( $PIP_2$ ) en una vía que inhibe su interacción con los filamentos de actina y con ello su actividad de corte. Al hidrolizarse el  $PIP_2$  las proteínas inician su actividad (Schafer D.A. 1995, Onuma E.K. 1988)

Otro grupo de proteínas bloqueadoras, diferentes a las proteínas de corte, no pueden romper los filamentos para crear nuevos extremos. Por ejemplo, Cap Z se une al extremo positivo del filamento independientemente de la concentración de calcio y previene la adición o pérdida de monómeros de actina en este extremo. El bloqueo de esta proteína es inhibido por  $PIP_2$  (Schafer D.A. 1995).

La célula es capaz de manipular la polimerización y despolimerización de los filamentos de actina, adquiriendo la capacidad para producir varios tipos de movimiento. Por ejemplo, la polimerización de actina estimulada por profilina es un mecanismo común que utilizan bacterias intracelulares para producir movimiento. Además, se propone que la profilina tiene un papel importante por localizarse en el extremo principal de la membrana donde ocurre la polimerización. (Schafer D.A. 1995).

Los microfilamentos interaccionan con otras moléculas dependiendo del tipo de célula y de la función que realice. En células musculares, por ejemplo, la actina interacciona con miosina para producir la contracción muscular. En la red y las cadenas, los filamentos se encuentran acopladas por proteínas de unión. La longitud y flexibilidad de estas proteínas determina el arreglo de los filamentos. Generalmente las proteínas de unión cortas, obligan a los filamentos a mantener una alineación paralela y compacta, característico en las cadenas. Cuando la proteína de unión es larga, permite un arreglo flexible, dando lugar a la formación de redes; de este tipo de proteínas se conocen la ABP, gelsolina y severina (Schafer D.A. 1995, Condeelis J.S. 2001).



Esquema 1. Representación de algunas de las proteínas que se unen específicamente a filamentos y monómeros de actina para darles diferentes organizaciones dentro de la célula.

### 3. MOVIMIENTO.

Para que la célula pueda avanzar sobre un sustrato se requiere la presencia y activación de las moléculas de adhesión que reconocen dicho sustrato. Los receptores a moléculas de matriz extracelular (MEC), al contrario de los receptores a moléculas solubles, tienen relativamente baja afinidad por su ligando; por lo tanto se requiere la interacción simultánea de múltiples receptores con múltiples ligandos para que exista la suficiente fuerza de unión. Las proteínas de matriz extracelular tienen, dentro de una misma proteína, varios dominios de unión a receptores de adhesión, esto permite que una misma molécula pueda unir más de un receptor. Sin embargo, la interacción de las moléculas de MEC con sus correspondientes receptores de membrana no es suficiente para soportar la adhesión celular. Se ha demostrado que tanto cadherinas (involucradas en la adhesión célula-célula) como integrinas (involucradas principalmente en la adhesión célula sustrato) requieren la unión al citoesqueleto en el interior de la célula para funcionar adecuadamente. Esta unión necesita de la presencia de proteínas de unión agregadas en complejos multimoleculares. La función del citoesqueleto en los procesos adhesivos es promover y estabilizar la agregación de receptores de adhesión para facilitar el reconocimiento de múltiples ligandos. Además, la unión de las moléculas de adhesión al citoesqueleto permite a la célula tener suficiente tracción para desplazarse. Por lo tanto, la capacidad de adherirse a un sustrato determinado depende tanto de receptores de adhesión presentes en la célula como del adecuado rearrreglo del citoesqueleto (Alberts B. 1994, Burridge K. 1996)

Una vez que la célula se ha unido a su sustrato, el citoesqueleto de actina se reorganiza formando estructuras con papeles especializados. Existen tres tipos principales de estructuras generadas por cambios en la polimerización de actina, éstas estructuras se han denominado filipodios, lamelipodios y fibras de estrés. Los mecanismos que regulan el ensamble y disposición espacial de éstas tres estructuras con alta actividad dinámica, son de gran interés en Biología Celular (Nobes D. C. 1995).

Los lamelipodios y filipodios son estructuras altamente móviles, frecuentemente se unen y desprenden del sustrato para producir movimiento, retracción o pliegues en la membrana. Los filipodios y sus precursores se presentan como estructuras alargadas o puntiagudas en la membrana y se forman con cadenas de microfilamentos de actina en la superficie celular. Los lamelipodios se forman debido a la presencia de una gran cantidad de filamentos de actina en forma de redes que se van formando en el extremo líder de la célula para producir movimiento. Cuando se adicionan factores quimiotácticos, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o insulina, se

induce la polimerización de actina en la membrana originando la formación de lamelipodios (Lodish H. 2000).

Las fibras de estrés consisten en largas redes de filamentos que atraviesan la célula. Se encuentran unidas en la matriz extracelular por medio de integrinas (receptores de membrana) y complejos de adhesión focal. Se ha demostrado que las fibras de estrés y las placas de adhesión focal son rápidamente inducidas por activadores séricos o ácido lisofosfatídico (LPA), que es una citocina sérica, mitogénica y potente agregador de plaquetas (Condeelis J.S. 2001, Lodish H. 2000).

La célula requiere diferentes mecanismos para producir movimientos, desde el ensamble de filamentos de actina y la formación de redes y cadenas de estos filamentos, hasta la contracción de las cadenas de actina por el deslizamiento inducido por la actividad de las moléculas de miosina a lo largo del filamento. Este último es el principal mecanismo que realiza la célula para producir la fuerza necesaria en la migración. En términos generales un movimiento celular implica una secuencia de cambios en su morfología, desde la extensión inicial de la membrana, la adhesión al sustrato, adelantar el contenido citoplasmático y retraer la parte posterior de la célula. En el paso inicial, la formación de un lamelipodio es acompañado por la polimerización controlada de filamentos de actina en el extremo líder y la subsecuente unión de estos filamentos en redes y cadenas. Una vez que la membrana se ha extendido y el citoesqueleto se ha ensamblado, la membrana queda firmemente unida en el sustrato. Se ha demostrado que las redes de actina del extremo líder, propician el anclaje en el sitio de unión, el cual rápidamente se desarrolla como una placa de adhesión focal (Lodish H. 2000, Pawlak G. 2001).

Esta unión tiene dos funciones principales, mantener unida a la célula con el sustrato y preparar el extremo líder para la retracción del resto de la célula. Por lo tanto, después de que se ha realizado el proceso de adhesión, el contenido celular es desplazado hacia adelante. El siguiente paso del movimiento, es la separación de la parte de adhesión focal en el extremo posterior, y el traslado del resto de la célula hacia adelante.

### *3.1 Señales Intracelulares que Coordinan el Movimiento.*

Una característica importante del movimiento celular es su polaridad, pues presenta un frente y una parte trasera. El nuevo lamelipodio, o en su caso un pseudópodo, se forma en el frente de la nueva dirección. Para mantener una dirección de movimiento, la célula requiere de señales para coordinar los eventos en ambos extremos y necesariamente señales que diferencien cual es el frente de movimiento. Por lo tanto, existen señales externas que activan el movimiento celular y controlan la dirección del movimiento. El citoesqueleto y la migración celular son coordinados por la activación de GTPasas y segundos mensajeros mediante diferentes vías de transducción de señales.

### 3.2 *Rac, Rho, Cdc42.*

El rearreglo del citoesqueleto involucra diversas vías de señalización. Una de ellas está dirigida por tres GTPasas relacionadas con la familia de Ras, las cuales son Rho, Rac y Cdc42. Se ha demostrado que el movimiento de la célula requiere de la activación coordinada de estas tres GTPasas, además de la activación de segundos mensajeros y otras cinasas que modifican la organización del citoesqueleto de actina. La actividad de estas proteínas de la superfamilia Ras ha sido revelada por experimentos de microinyección (Lodish H. 2000, Nobes D. C. 1995).

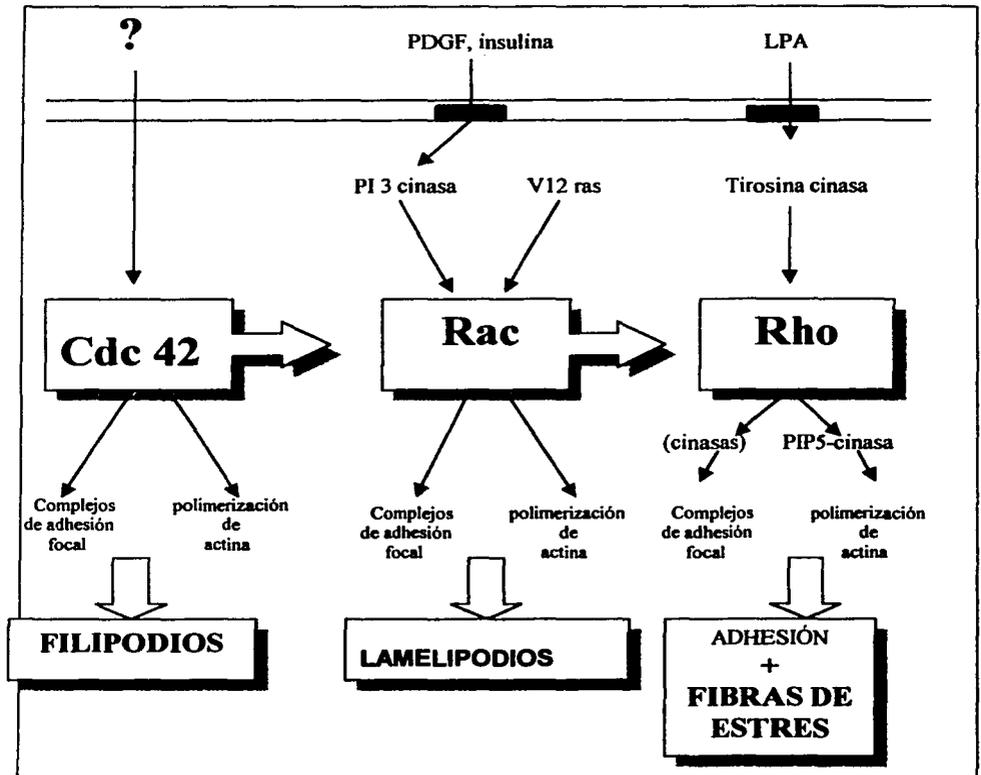
Cuando se microinyecta la proteína Rac en fibroblastos la membrana se contrae de inmediato, formando fibras de estrés y placas de adhesión focal. Al microinyectar una forma inactiva de Rac junto con factores de crecimiento, se inhibe toda la reorganización del citoesqueleto de actina y el movimiento de la membrana. Aunque la relación de Rac con la regulación de la polimerización de actina en el extremo líder para formar lamelipodios está demostrada, aún no se conocen las proteínas mediadoras sobre las que actúa para realizar este efecto (Nobes D. C. 1995).

Utilizando la proteína Rho, se demostró que es responsable de regular una vía de transducción de señales, proporcionando una explicación para las características observadas, que se relacionan directamente con la formación de placas de adhesión focal y de fibras de estrés activando la polimerización de actina. Cuando se adiciona la proteína Rho antes que Rac, el efecto es la inducción del ensamble de fibras de estrés y placas de adhesión focal, pero no activa la contracción de la membrana; éste efecto es parecido al que produce el ácido lisofosfatídico (LPA). La inducción de placas de adhesión focal y fibras de estrés debidas a Rho, puede ser bloqueada por genisteína, que es un compuesto inhibidor de cinasas, lo que sugiere que una cinasa es requerida para la regulación de esta vía. Algunas proteínas que probablemente están involucradas incluyen la proteína cinasa Ca (PKC $\alpha$ ), Src (pp60<sup>src</sup>) y la cinasa de adhesión focal (FAK), las cuales se encuentran abundantemente en las placas de adhesión junto con algunas proteínas como la talina y la vinculina. Otra propuesta es que la fosfatidilinositol-4-fosfato-5- cinasa sea un blanco de la proteína Rho, ya que esta cinasa puede controlar la polimerización de actina por medio del incremento localizado de los niveles de PIP<sub>2</sub> (Nobes D. C. 1995).

Al analizar el tercer miembro de este subgrupo de GTPasas, llamado Cdc42, se ha demostrado que es esencial para el ensamble de los brotes de gemación en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y, consecuentemente, es necesaria para polarizar células en crecimiento y organizar el citoesqueleto de actina en estos organismos. Una función de la proteína Cdc42 demostrada en células de mamífero, es que se encarga de coordinar la formación de filopodios. Además, la polimerización de actina en lamelipodios inducidos por Rac y los filopodios inducidos

por Cdc42 se relacionan de manera similar con los complejos de adhesión focal. Su función en células de mamífero no se conoce completamente (Nobes D. C. 1995).

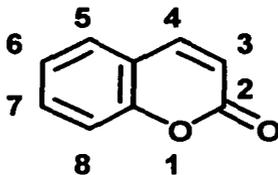
Se ha demostrado que existe una relación secuencial entre estas tres GTPasas, desde la activación de Cdc42 que dirige la activación de Rac y subsecuentemente de Rho. Esta interrelación es bastante compleja, por lo que es necesaria una adecuada organización espacio-temporal de cada GTPasa y su interrelación.



Esquema 2. Vías de transducción de señales propuestas para Rho, Rac y Cdc42 (Nobes D. C. 1995).

#### 4. CUMARINA

La cumarina es un producto natural que se encuentra en diversas plantas como el haba de tonka, el clavo, el trébol dulce y en algunos aceites esenciales como el de lavanda (Nair R. Y. 1991) Químicamente es una lactona llamada 1,2-benzopirona del ácido orto-hidroxifenil-propenoico; tiene un peso molecular de 146.15 g/mol, un punto de fusión de 68-70°C y un punto de ebullición de 303°C. Es soluble en etanol, cloroformo y aceites.



Esquema 3. Estructura química de la cumarina.

Se ha encontrado que posee actividad antipirética y anti-inflamatoria por lo que se ha utilizado en el tratamiento de enfermedades reumáticas. Dado que estimula la actividad fagocitaria en macrófagos y otras células del sistema inmune, ha sido utilizada en infecciones crónicas (brucelosis, micoplasmosis, toxoplasmosis).

Actualmente derivados cumarínicos como la warfarina y el dicumarol son utilizados como anticoagulantes. Estos derivados comenzaron a utilizarse en el tratamiento de neoplasias para prevenir la formación de estroma de fibrina alrededor del tumor. A mediados del siglo pasado se describió la asociación de la fibrina con los tumores y se postuló que ésta pudiera tener importancia en la producción de metástasis. Se ha demostrado que la warfarina en combinación con otros tratamientos, alarga al doble la sobrevivencia de pacientes con carcinoma pulmonar.

El efecto antineoplásico de los derivados cumarínicos, no se debe a sus propiedades anticoagulantes. La administración de vitamina K, antagoniza la acción anticoagulante de derivados cumarínicos como la warfarina, pero no antagoniza el efecto antineoplásico.

La cumarina tiene actividad antineoplásica e inhibe la activación metabólica de carcinógenos potenciales, aún cuando carece de efecto anticoagulante. Se ha demostrado que la cumarina tiene actividad antineoplásica *in vivo* en melanomas malignos (Zänker K. 1984), carcinoma renal metastático (Dexeus F. 1990) y en carcinoma prostático (Mohler J. 1994). En un estudio *in vitro* se observó que la cumarina inhibe el crecimiento de 14 diferentes líneas tumorales humanas (Marshall. M.E. 1994). La cumarina es considerablemente menos tóxica que la warfarina por lo que puede ser administrada a dosis mayores sin efectos teratógenos (Cox D. 1989). Estudios en humanos han demostrado la tolerancia de hasta 7 g diarios con efectos adversos de poca importancia y reversibles al suspender el tratamiento (Marshall M.E. 1994).

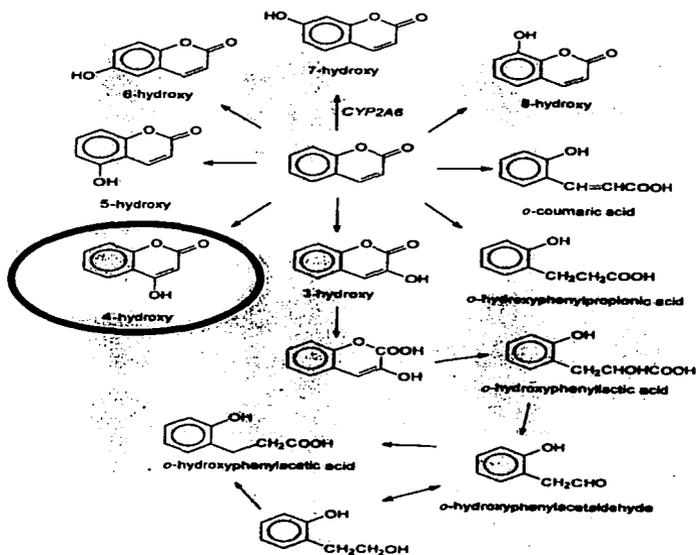
Se desconocen los mecanismos exactos involucrados en los efectos antineoplásico y antimetastásico de la cumarina. Para explicar sus acciones se han propuesto dos mecanismos principales: 1) la inhibición del crecimiento de algunas células tumorales; 2) la estimulación de ciertos componentes del sistema inmune que participan en la reacción contra el tumor. Respecto a la acción inmunoestimulante, se ha reportado que la cumarina tiene un efecto sinérgico *in vitro* con una endotoxina bacteriana estimulando la secreción de factores solubles (IL-1 $\beta$ , IL-6). En la cepa C57BL/6 la cumarina, a dosis de 80mg/Kg, incrementa la actividad fagocitaria de macrófagos peritoneales murinos hasta en un 160% respecto a los controles (Orozco A. A. 2000).

La vida media biológica de la cumarina es de 1.2 h si se administra por vía oral y de 0.8 h cuando es administrada por vía intravenosa. Se oxida tanto *in vitro* como *in vivo* en todas las posiciones de la molécula generando monohidroxicumarinas (Ritschel W.A. 1979, 1984). Además el anillo lactónico puede hidrolizarse y se han descrito como productos de excreción del ácido o-hidroxifenilacético y el ácido o-hidroxifeniláctico. Estos productos pueden estar acetilados, metoxilados, conjugados o sufrir otro tipo de transformación. Las principales vías metabólicas de la cumarina se ejemplifican en el esquema 4.

La cumarina es metabolizada por el sistema del citocromo P450 (isoforma CYP2A6 en humanos), produciendo derivados monohidroxilados. Los productos de biotransformación varían cuantitativamente dependiendo de la especie (Cohen A.J. 1979, Hadidi H. 1997). El principal producto de biotransformación en el humano es la 7-hidroxicumarina, mientras que en el ratón es la 3-hidroxicumarina. El metabolismo en ratón es semejante al humano ya que posee hidroxilasas hepáticas y los productos metabólicos son derivados hidroxilados, a diferencia de la rata en la que los derivados son ácidos hidroxifenilcarbónicos mucho más tóxicos. Se ha propuesto que algunos de los productos de biotransformación de la cumarina pueden tener actividad inmunoestimulante, antineoplásica y antimetastásica mayor que la cumarina (Moran E. 1987, Jiménez O. A. 1999).

Por ejemplo, la 7-hidroxycumarina (2 mM) inhibe el crecimiento *in vitro* de células del adenocarcinoma pulmonar humano línea A549. Este mismo compuesto es más potente inhibidor del crecimiento *in vitro* de líneas tumorales, que la cumarina misma. En estos ensayos se ha demostrado que en las células expuestas al fármaco se disminuye la incorporación de análogos de timidina, aunque se desconocen los mecanismos moleculares que modulan estos efectos. Se ha propuesto que la cumarina y la 7-hidroxycumarina pueden 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 RNA mensajero de dichos oncogenes.

Estos antecedentes sugieren que los productos de biotransformación de la cumarina pueden tener actividades que contribuyen en el efecto antineoplásico de la cumarina. El presente estudio se realiza con el fin de investigar el efecto de la 4-hidroxycumarina sobre el rearrreglo del citoesqueleto de actina, fundamental para la producción de metástasis.



Esquema 4. Vías metabólicas de la cumarina. En esta figura se muestran los metabolitos de la cumarina, producidos por diferentes vías metabólicas. En el círculo se muestra la estructura de la 4-Hidroxycumarina (Tomado de Thornes R. D. 1997).

## II. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL.

El presente estudio analizará el efecto del tratamiento *in vitro* con 4-hidroxicumarina sobre la organización del citoesqueleto de actina en células neoplásicas (células B16 de melanoma murino) y se comparará con el efecto sobre células normales (fibroblastos B82).

### OBJETIVOS PARTICULARES.

Analizar el efecto de la 4-hidroxicumarina sobre la morfología de ambas líneas celulares.

Analizar el efecto de la 4-hidroxicumarina sobre la viabilidad celular.

Analizar el efecto de la 4-hidroxicumarina sobre la cantidad de actina polimerizada en el citoesqueleto.

Evaluar la capacidad de adhesión a matriz extracelular de las células de melanoma murino B16 tratadas con 4-hidroxicumarina.

Analizar concentración celular de actina total y del mensajero que codifica para  $\beta$ -actina.

## III. HIPÓTESIS.

La 4-hidroxicumarina producirá desarreglo en el citoesqueleto de actina selectivamente sobre la línea de melanoma murino B16 sin alterar la viabilidad de las células. Este desarreglo será debido a diferencias en la concentración celular de actina y afectará la morfología de dichas células.

## IV. MATERIAL Y MÉTODOS.

### MATERIAL BIOLÓGICO.

Se utilizaron las líneas celulares B16 de melanoma murino y fibroblastos de ratón B82. Ambas líneas fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado al 10% con suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor (Sigma). Se incubaron en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% a una temperatura constante de 37°C (NUAIRE). Se utilizaron botellas de cultivo de 80 cm<sup>2</sup> de área (Nunc), en un volumen de 10mL, hasta obtener una monocapa a confluencia.

En la cosecha de las células se utilizó tripsina/EDTA (0.05% / 0.5 mM, Gibco). Una vez que las células se tienen en suspensión, se toma una alícuota que se diluye 9/10 con azul tripan (0.4 %). La mezcla resultante se cuenta en hematocitómetro y se evalúa su viabilidad por la exclusión de azul tripan. Este colorante permite distinguir entre las células vivas y las muertas por que estas últimas pierden la permeabilidad selectiva de la membrana y el colorante ingresa al interior de la célula tiñéndola de azul. Para los experimentos se utilizaron cultivos con viabilidad mayor o igual al 95%.

### CARACTERÍSTICAS DE LA EXPOSICIÓN.

Las células se sembraron en placas estériles para cultivo de tejidos (Delta Nunc), utilizando medio RPMI-10% SFB. Tras dejar que las células se adhirieran durante toda la noche, se cambió el medio adicionando medio condicionado (sin suero). El rango de concentraciones de los tratamientos con 4-hidroxicumarina varió en progresión geométrica base 2 entre 62.5 y 1000 µM. Las células control fueron expuestas a etanol (2% v/v), usado como disolvente para la 4-hidroxicumarina. El volumen de los tratamientos con 4-hidroxicumarina se mantuvo constante, por lo que el control es el mismo para todos los tratamientos. El tiempo de exposición fue de 24 horas a temperatura constante de 37 °C. Cada ensayo se repitió de manera independiente de dos a cuatro veces.

### ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA.

Utilizando placas de 96 pozos (2.0x10<sup>4</sup> células por pozo) se realizaron tratamientos por sextuplicado. Después del tiempo de exposición, todos los tratamientos se inspeccionaron visualmente con ayuda del microscopio invertido de campo claro con el objetivo 40X (TMSF Nikon). La morfología observada se documentó mediante microfotografía.

## PRUEBA DE VIABILIDAD POR REDUCCIÓN DE METILTETRAZOLIO (MTT).

Utilizando placas de 96 pozos ( $2.0 \times 10^4$  células por pozo) se realizaron tratamientos por sextuplicado. Después de 24 horas, se evaluó el efecto la viabilidad de las células tratadas, mediante el ensayo colorimétrico de reducción de MTT. Este ensayo se basa en la capacidad de las células vivas de reducir el MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio), soluble en agua y de color amarillo, a formazán de MTT (1-[4,5-dimetil tiazol-2-il]3-3,5-difenilformazan), insoluble en agua y de color púrpura. Para realizar esta prueba, se adicionan  $20 \mu\text{L}$  de solución de MTT al 0.5% a  $100 \mu\text{L}$  de medio existentes en cada pozo.

Las células se incubaron 2 horas a  $37^\circ\text{C}$  y posteriormente se retiró el medio en el cual está el MTT no reducido. Enseguida se adicionaron  $100 \mu\text{L}$  de Dimetil sulfóxido (DMSO) para disolver los cristales que se hayan precipitado de formazán de MTT. En un lector de microplacas (Biotek EL311) a una longitud de  $570 \text{ nm}$  se leyó la absorbancia de las soluciones formadas. La absorbancia es directamente proporcional al número de células vivas en el pozo (Mosmann T. 1983).

Los datos se compararon estadísticamente mediante análisis de varianza de una vía. Cuando existieron diferencias entre los tratamientos se utilizó la prueba de Dunnet con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05.

## TINCIÓN CON FALOTOXINA FLUORESCENTE.

Para analizar el contenido de microfilamentos de actina se trataron por separado, células de melanoma murino B16 y fibroblastos en portaobjetos con 8 pozos desmontables (Nunc) a una densidad de  $30 \times 10^3$  células por pozo. Transcurrido el tiempo de exposición se retiró el medio haciendo dos lavados a cada pozo con amortiguador salino de fosfatos  $15 \text{ mM}$ ,  $\text{pH } 7.2$  (PBS). Se fijaron las células con formaldehído 3.8% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego de lavar las células, se permeabilizaron adicionando Tritón X-100 al 0.1%. Transcurridos 5 minutos se lavaron todos los pozos y se expusieron a  $5 \text{ U/mL}$  de la solución con falodina-Alexa488. Se dejaron incubar durante 1 hora a temperatura ambiente protegidos de la luz. Posteriormente se lavó abundantemente con PBS, enseguida se adicionó una solución de glicerina (DABCO 2 g, Glicerol  $90 \text{ mL}$ , PBS  $10 \text{ mL}$ ) y se montó un cubreobjetos sellándolo por los extremos con barniz.

La morfología de ambos tipos celulares con los diferentes tratamientos se documentó mediante microfotografías utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon modelo Eclipse 600).

## ENSAYOS DE ADHESIÓN.

En una placa de 96 pozos (Nunc) se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  por pozo de una solución de fibronectina una concentración de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en buffer PBS y se dejó incubar toda la noche. Después se retiró la solución de fibronectina y se adicionaron 150  $\mu\text{L}$  por pozo de solución de albúmina desnaturalizada por calor, a una concentración de 10  $\text{mg}/\text{mL}$  durante 1 h. La albúmina bloquea los sitios inespecíficos de adhesión. Pozos sin fibronectina fueron bloqueados para utilizarlos como controles de la adhesión inespecífica.

Las células de melanoma murino B16 que se utilizaron para los ensayos de adhesión fueron tratadas como se describió previamente. Utilizamos dos tratamientos: etanol (solvente) y 4-hidroxicumarina a una concentración de 500  $\mu\text{M}$ . Transcurrido el tiempo de exposición, las células se cosecharon por separado, se les aplicó un lavado, se contaron y se ajustó la concentración a  $5.0 \times 10^5$  células/ $\text{mL}$  (en medio concidionado). De dichas suspensiones se agregaron 100  $\mu\text{L}$  a los pozos tratados con fibronectina y a los pozos que solo se bloquearon con albúmina. Los ensayos se realizaron por quintuplicado.

Las células se incubaron durante 60 minutos, por ser este el tiempo óptimo para la adhesión a fibronectina. Después de la incubación se realizaron dos lavados y a continuación se evaluó la cantidad de células adheridas mediante el ensayo de reducción de MTT como se describió previamente. Las absorbancias de las soluciones son directamente proporcional al número de células adheridas. Se graficaron las absorbancias obtenidas para cada tratamiento y los resultados se compararon con la prueba t-student ( $\alpha = 0.05$ ) para determinar si existieron diferencias estadísticamente significativas.

## INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (WESTERN BLOT).

Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la cantidad de  $\beta$ -actina, se sembraron las células de melanoma murino B16 en placas estériles de 6 pozos (Nunc) a una densidad de  $4.0 \times 10^5$  células/pozo. Después de la exposición a las diferentes concentraciones de 4-hidroxicumarina, se procedió a la extracción de proteínas utilizando 500  $\mu\text{L}$  de buffer de lisis (100  $\text{mM}$   $\text{NaCl}$ , 50  $\text{mM}$  Tris  $\text{pH}$  7.4, 5  $\text{mM}$   $\text{EDTA}$ , 5  $\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ , y Tritón X-100 al 1%) (Kislauskis E.H. 1997). Las muestras se incubaron en hielo durante 2 horas y con agitaciones periódicas.

Al terminar la incubación, las muestras se centrifugaron 2 minutos a 5000 rpm y se tomó el sobrenadante para cuantificar la concentración de proteínas por el método de Bradford. Para realizar la cuantificación, las muestras se diluyeron 1:10 para evitar interferencia por el Tritón. Se realizó una curva patrón con albúmina. La técnica utilizada se siguió de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Bio Rad). La concentración de proteína total en las muestras se obtuvo por interpolación en la curva patrón.

Se realizó una electroforesis vertical en gel de acrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes. En un gel de 1.5 mm de grosor se cargaron 40 µg de proteína total de cada muestra y se corrió a una corriente constante de 25mA durante 2.5 h. Posteriormente se realizó una transferencia en cámara húmeda a una membrana de nylon durante 1.5 horas a corriente constante de 330 mA. Como control de la cantidad de proteína por carril, un gel equivalente se puso a teñir en azul brillante de coomassie 0.025% durante 2 horas y posteriormente se destiñó con una solución ácido acético-metanol-agua destilada (40:20:40).

La membrana fue bloqueada con leche durante toda la noche y con agitación constante, posteriormente se lavó 2 veces con PBS-Tween 20 al 0.1%. Después se incubó con un anticuerpo policlonal anti-actina hecho en cabra (C-11/ Santa Cruz Biotechnology, 200µg/mL) diluido 1:2000 en PBS-Tween 20 al 0.1% durante 1 hora a temperatura ambiente y con ligera agitación constante. Al terminar la incubación se realizaron 2 lavados con PBS-Tween 20 al 0.1% y se adicionó el anticuerpo secundario, el cual fue un anticuerpo anti-cabra hecho en conejo, conjugado con peroxidasa (Sigma). Se utilizó una dilución 1:10,000 y se dejó incubar a temperatura ambiente durante una hora en agitación constante. Tras lavar el anticuerpo no unido, se adicionó peracido/luminol como sistema de revelado y se documentaron los resultados mediante exposición de la membrana a placas de autoradiografía (Kodak).

#### TRANSCRIPCIÓN INVERSA-REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR).

Este análisis se realizó para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la cantidad del ARN mensajero de β-actina. Se usaron placas de estériles de 6 pozos, células B16 ( $4.0 \times 10^5$  células/pozo) se trataron en un volumen de 2.5 ml de medio condicionado durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de exposición, se extrajo RNA total utilizando reactivo de TRIZOL (Gibco), conforme a las instrucciones del fabricante. La concentración de ARN extraído se determinó espectrofotométricamente a 260 nm. Se sintetizó el cDNA a partir de 5µg de ARN total, utilizando oligo dT (Gibco) como cebador.

El PCR para  $\beta$ -actina se realizó en 25  $\mu$ L de mezcla de reacción que contenía  $MgCl_2$  4 mM, dNTPs 2 mM, 1 unidad de enzima Taq ADN polimerasa, y el correspondiente juego de iniciadores (sentido y antisentido) a una concentración de 0.2  $\mu$ M. Además, se realizó para todas las muestras un PCR para el gen de G-3-PDH como control positivo. Las condiciones que variaron en esta prueba fue la concentración de  $MgCl_2$  que fue de 2 mM, y el juego de iniciadores para el gen de G-3-PDH. La secuencia de los iniciadores usados se indica a continuación:

	Sentido	Antisentido	Tamaño del producto
$\beta$ -actina (Pérez T.M. 1999)	5'-ctcaatgctggctcaaggaga-3'	5'-gacgcagcgtctgtgaggtc-3'	661 pb
G-3-PDH	5'-accacagtccatgccatcac-3'	5'-tcaccaccctgttgctgt-3'	452 pb

En los protocolos de amplificación empleados, se realizaron 25 ciclos. Cada ciclo consistió en una temperatura de desnaturalización de 94°C durante 15 segundos, una temperatura de alineación de 58°C durante 30 segundos y una temperatura de elongación de 72°C por 30 segundos. Este procedimiento se realizó en termociclador (Ependorf). Terminados los ciclos la muestra se enfrió a 4°C.

En una cámara para electroforesis horizontal (Gibco), 10  $\mu$ L de los productos de PCR se corrieron en gel de agarosa al 2% durante 35 minutos con una corriente constante de 80 Volts. Simultáneamente se corrió un marcador de pesos moleculares (Gibco) para estimar el tamaño de los productos de amplificación. Al terminar la electroforesis, se reveló mediante tinción con bromuro de etidio y exposición a luz ultravioleta; los resultados se documentaron mediante fotografía.

## V. RESULTADOS.

### MORFOLOGÍA.

La apariencia de las células de melanoma murino B16 en los cultivos tratados se presentan en la figura 1.

Conforme aumenta la concentración de 4-hidroxycumarina, se observan cambios más pronunciados en la morfología respecto a las controles tratadas con etanol. Las células tratadas con 4-hidroxycumarina pierden la capacidad de extenderse, adoptando una forma redondeada, semejante a las células tratadas con citocalasina D (usado como control positivo por ser despolimerizante del citoesqueleto de actina). El efecto en la morfología es dependiente de la concentración de 4-hidroxycumarina, por lo que la concentración de 1000 $\mu$ M presenta el mayor efecto.

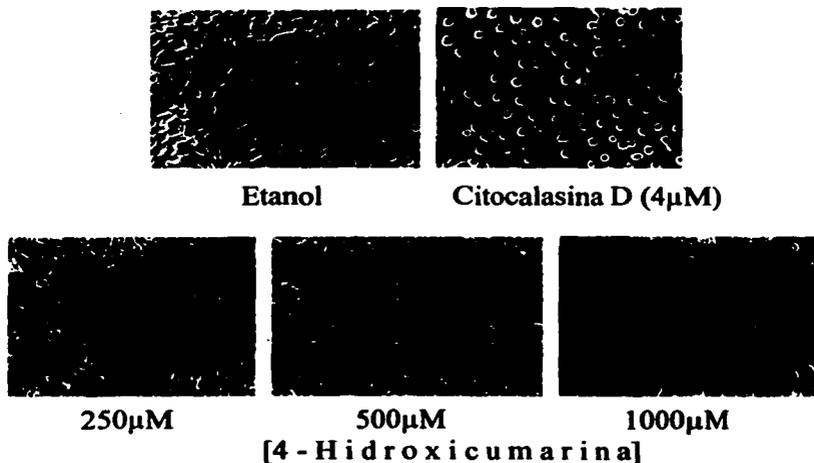


FIGURA 1. Fotografías de las células B16 de melanoma murino, expuestas a diferentes concentraciones de 4-hidroxycumarina, tomadas en microscopio invertido de campo claro (40X).

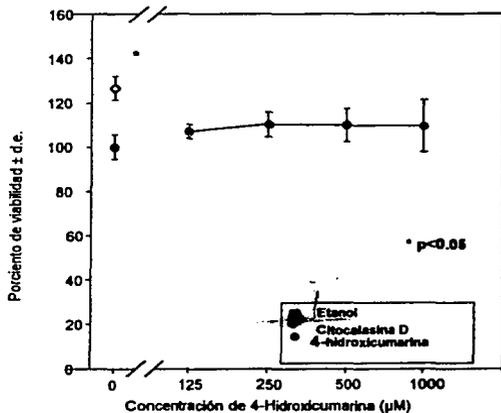
## VIABILIDAD.

La viabilidad se evaluó conforme se describe en la técnica de reducción de MTT. La figura 2A, muestran que la viabilidad de los fibroblastos B82 no se ve afectada con ninguna de las concentraciones de 4-hidroxicumarina evaluadas. Las células tratadas con citocalasina D (4 $\mu$ M) muestran diferencias estadísticamente significativas con respecto a la viabilidad de las células tratadas con etanol.

En el caso de las células B16 de melanoma murino, se observa que la viabilidad disminuye conforme aumenta la concentración de 4-hidroxicumarina. Sin embargo sólo la concentración de 1000 $\mu$ M produce diferencias significativas con respecto al control de disolvente (figura 2B).

### GRAFICAS DE VIABILIDAD

#### A) Fibroblastos



#### B) Células B16 de Melanoma Murino.

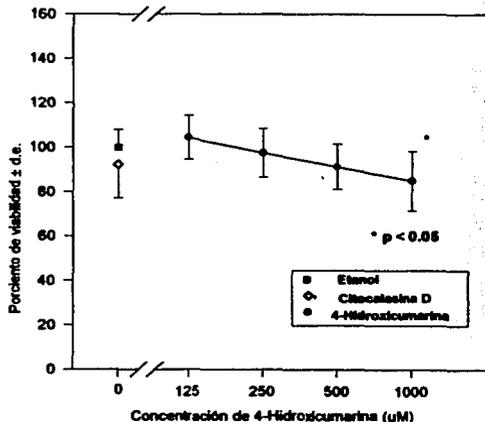


FIGURA 2. Efecto de la 4-hidroxicumarina en la viabilidad celular. Las células de ambas líneas celulares utilizadas en este estudio, se trataron bajo las condiciones mencionadas en material y métodos, posteriormente se evaluó la viabilidad mediante el ensayo de reducción del MTT.

En ambas gráficas se muestra la viabilidad de células tratadas con 4-hidroxicumarina (●). Como controles se utilizaron células tratadas con etanol 2%v/v(solvente) (■) y con Citocalasina D 4  $\mu$ M (◊).

## CONTENIDO DE MICROFILAMENTOS DE ACTINA.

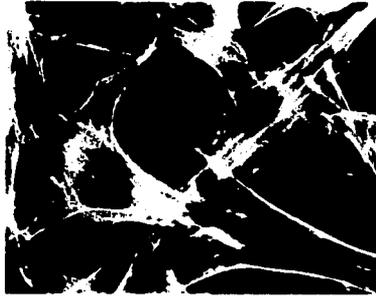
Para evaluar si los cambios morfológicos observados correlacionan con cambios en la cantidad y distribución de los filamentos de actina, se tiñeron células tratadas con falodina conjugada con un fluorocromo.

En la figura 3 se observa que, en células B16, el contenido de microfilamentos disminuye conforme aumenta la concentración de 4-hidroxicumarina. En el control se observan microfilamentos en lamelipodios, filipodios y formando fibras de estrés. En el caso de células tratadas con 4-hidroxicumarina las fibras de estrés se pierden, incluso con 250 $\mu$ M de 4-hidroxicumarina.

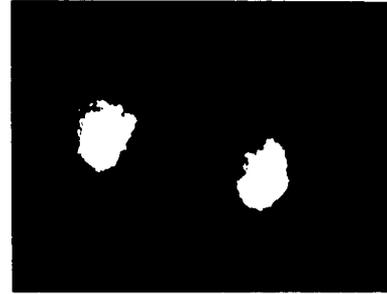
La longitud y extensión de lamelipodios y filipodios también presenta una disminución progresiva dependiente de la concentración, aunque los filipodios no se pierden en su totalidad. Conforme aumenta la concentración de 4-hidroxicumarina, el área total de las células también disminuye, observándose una tendencia a adoptar una morfología similar a la que se observa en el tratamiento con citocalasina D.

En la figura 4 se observa que en los fibroblastos B82 el contenido de microfilamentos no presenta grandes variaciones con los diferentes tratamientos. Las células tratadas con disolvente forman eficientemente lamelipodios, filipodios y fibras de estrés. En células tratadas con 4-hidroxicumarina existe una ligera disminución del contenido de fibras de estrés; esto sólo es evidente con la mayor concentración de 4-hidroxicumarina (1000 $\mu$ M). La extensión y cantidad de filipodios y lamelipodios se conserva al aumentar la concentración de 4-hidroxicumarina. Tampoco se observan cambios en la morfología celular y ni en el área total de las células tratadas con 4-hidroxicumarina. El tratamiento con citocalasina D produce cambios morfológicos y en el contenido de microfilamentos similares a los observados con las células B16.

## Contenido de microfilamentos de actina en células B16 de melanoma murino



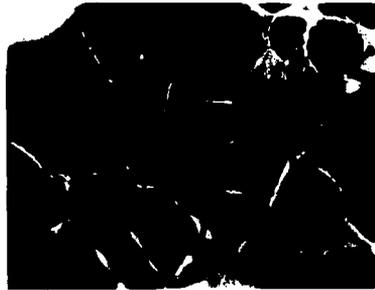
Etanol



Citocalasina D (4 $\mu$ M)



250 $\mu$ M



500 $\mu$ M



1000 $\mu$ M

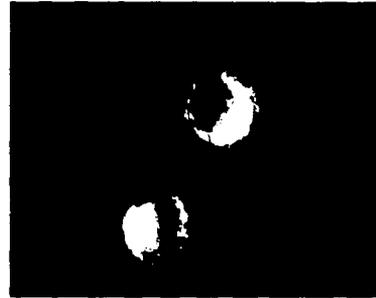
[4 - Hidroxicumarina]

FIGURA 3: Células B16 de melanoma murino tratadas con 4-hidroxicumarina durante 24 horas. Tras el tratamiento las células se marcaron con faloidina alexa488 siguiendo el procedimiento mencionado en material y métodos.

**Contenido de microfilamentos de actina en  
fibroblastos murinos**



**Etanol**



**Citocalasina D (4 $\mu$ M)**



**250 $\mu$ M**



**500 $\mu$ M**



**1000 $\mu$ M**

**[4 - Hidroxicumarina]**

**FIGURA 4:** Fibroblastos murinos B82 tratados con 4-hidroxicumarina durante 24 horas. Tras el tratamiento las células se marcaron con faloidina-alexa488 siguiendo el procedimiento mencionado en material y métodos.

## ENSAYOS DE ADHESIÓN.

Con el objetivo de analizar si el tratamiento con 4-hidroxycumarina modifica la capacidad adhesiva de las células B16, se realizó un ensayo de adhesión a fibronectina. Para este ensayo se tomaron en cuenta los resultados de los experimentos previos; sólo se utilizó la concentración de 500  $\mu\text{M}$  de 4-hidroxycumarina, considerando que los cambios morfológicos y la diferencia en el contenido de microfilamentos de actina son claros y no afecta la viabilidad.

Los resultados obtenidos en el ensayo de adhesión a fibronectina se muestran en la figura 5. En la gráfica se observa que el tratamiento con 4-hidroxycumarina disminuye el número de células que se adhieren a fibronectina. El número de células tratadas adheridas es 28 % menor que el número de células control que se adhieren. Los resultados se compararon con una prueba t-student ( $\alpha=0.05$ ), y se encontró que la diferencia observada es estadísticamente significativa.

### Adhesión de células B16 a Fibronectina.

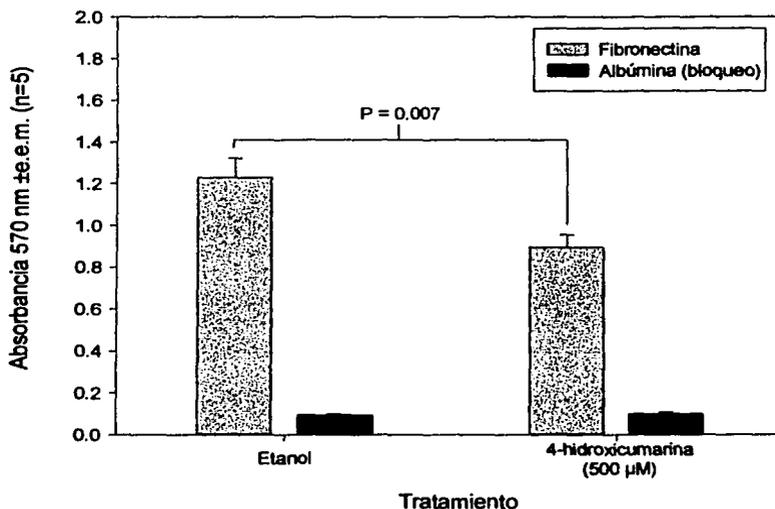


FIGURA 5. Efecto de la 4-hidroxycumarina sobre la capacidad de adhesión a fibronectina. Células de melanoma murino B16 se trataron etanol o con y 4-hidroxycumarina (500  $\mu\text{M}$ ) y se incubaron durante 60 minutos en placas cubiertas con fibronectina. La cantidad de células adheridas se evaluó indirectamente mediante el ensayo de reducción de MTT.

## INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

La cantidad de actina se evaluó mediante inmunodetección. La figura 6 A muestra la placa de autoradiografía obtenida en este ensayo; en ella se aprecian tres bandas con buena resolución. El peso molecular de cada una de las bandas fue calculado basado en la migración relativa de proteínas con pesos moleculares conocidos. La intensidad de las bandas es proporcional a la cantidad de actina presente en la muestra. Observamos que no hay cambios importantes entre los diferentes tratamientos.

Con el fin de demostrar que la cantidad de proteína cargada en cada carril es igual, se presenta, en la figura 6 B, un gel teñido con azul de coomassie; dicho gel fue sometido a las mismas condiciones que el utilizado para la transferencia / inmunodetección. La cantidad de proteína se conserva en todos los tratamientos

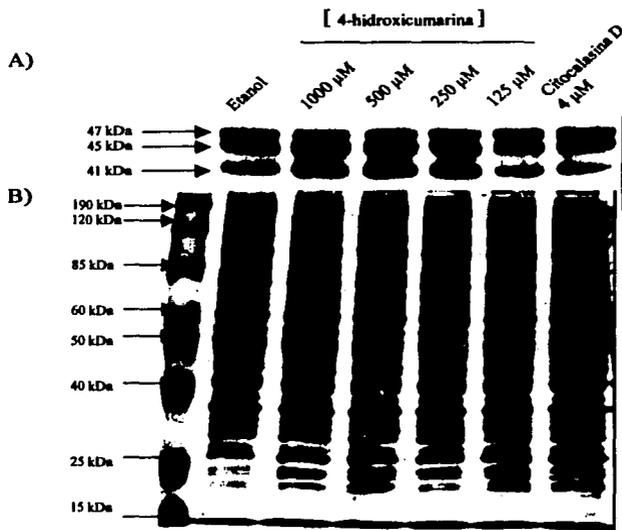


FIGURA 6. A) Análisis del contenido celular de actina mediante inmunoelectrotransferencia. La membrana se incubó con anticuerpo primario anti-actina y se utilizó un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa. Se adicionó peracido/luminol como sistema de revelado y la membrana se expuso a una placa de autoradiografía

6. B) Tinción de proteínas con azul brillante de coomassie 0.025%. Se realizó la electroforesis de proteínas en gel de acrilamida (10%), como control de la cantidad de proteína por carril de acuerdo al procedimiento descrito en material y métodos.

### RT-PCR.

Para evaluar el efecto de la 4-hidroxycumarina sobre la expresión del gen de  $\beta$ -actina, se realizaron ensayos de RT-PCR, mediante la técnica descrita en material y métodos. El producto de los amplificadores para los genes de  $\beta$ -actina y G-3-PDH, se corrieron en electroforesis en gel de agarosa como se describió anteriormente. El resultado obtenido se presenta a continuación en la figura 7.

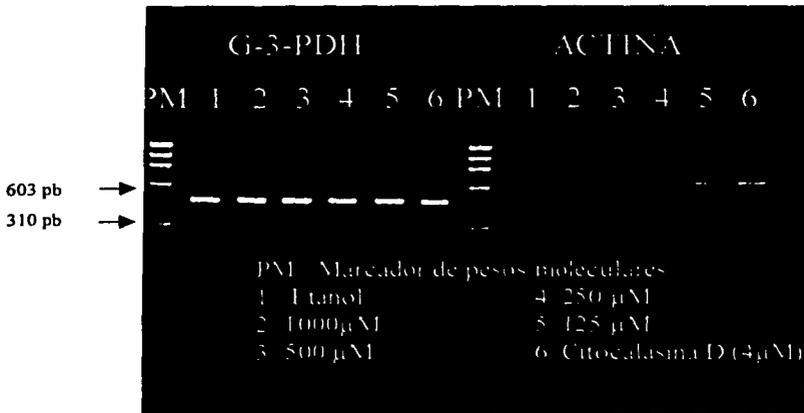


FIGURA 7. Semicuantificación del ARNm para el gen de  $\beta$ -actina. Después de correr la electroforesis con los productos de PCR para cada uno de los tratamientos, el gel de agarosa al 2% se reveló bajo lámpara de luz ultravioleta y se fotodocumentaron los resultados.

En la fotografía del gel se encuentran señalados los carriles donde se corrieron los amplificadores de ambos genes con cada tratamiento. El marcador de pesos moleculares se abrevió como PM, los números 1 y 6 corresponden a los controles de etanol y Citocalasina D respectivamente. Los números del 2 al 5, corresponden a las diferentes concentraciones de 4-hidroxycumarina utilizadas en los tratamientos.

Puede observarse que cada tratamiento exhibe una sola banda bien definida. Las bandas que se observan para los amplificadores del gen de G-3-PDH se aprecian con la misma intensidad. Este ensayo se realizó como control de la cantidad de ARN inicial. El tamaño del producto del amplificado se encuentra entre las bandas de 603 y 310 pb, siendo el tamaño esperado de 452 pares de bases.

Para el caso del gen de  $\beta$ -actina, no se observan cambios, excepto en el caso del tratamiento con citocalasina D, en el que se observa una banda con una intensidad y grosor ligeramente mayor a las de los demás tratamientos.

## VI. DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos muestran que los cambios morfológicos en células B16 de melanoma murino, tratadas con 4-hidroxicumarina son evidentes desde la concentración de 250  $\mu\text{M}$ . Los fibroblastos B82 utilizados en los ensayos como controles normales, no presentaron cambios morfológicos con ninguna de las concentraciones evaluadas (no se muestran los datos). Con estos resultados se demuestra que el efecto producido por el tratamiento con 4-hidroxicumarina sobre la morfología es selectivo para la línea tumoral B16.

Cuando se analizó la viabilidad celular, se obtuvo que la 4-hidroxicumarina no tiene efecto citotóxico sobre las células normales utilizadas (fibroblastos B82), en el rango de concentraciones empleadas (62.5 - 1000  $\mu\text{M}$ ). En el caso de las células B16, sólo la concentración de 1000  $\mu\text{M}$  produce una disminución estadísticamente significativa en la viabilidad. Este análisis demuestra que los cambios morfológicos observados no están relacionados con muerte celular.

La mayoría de las quimioterapias actuales están encaminadas a matar a las células cancerosas y, dado que también pueden ser citotóxicas para las células normales, tienen graves efectos secundarios sobre el paciente. En el desarrollo de nuevas terapias antineoplásicas se busca disminuir los efectos adversos, por lo que es importante que 4-hidroxicumarina no afecte la viabilidad de células normales. En el caso de las células B16, sólo la más alta concentración disminuye la viabilidad en un 15 %; esto significa que este compuesto podría disminuir la progresión tumoral por un mecanismo diferente al de los agentes antineoplásicos que se encuentran en el mercado. Estos datos concuerdan con los reportes de que la cumarina es muy poco tóxica y sólo a concentraciones muy elevadas (7g diarios) presenta efectos adversos de poca importancia y reversibles (Marshall M. E. 1994).

Para que las células tumorales produzcan metástasis, la morfología celular, la capacidad de adhesión y la capacidad migratoria requieren alteraciones. Todas estas características fenotípicas son controladas por la organización del citoesqueleto. Con el objetivo de analizar si los cambios morfológicos observados dependen del citoesqueleto de actina, se realizó el análisis del contenido de microfilamentos de actina en células tratadas con 4-hidroxicumarina. En células B16 los tratamientos con 4-hidroxicumarina producen una disminución contundente en la cantidad y organización de los microfilamentos; es evidente la disminución en las fibras de estrés comparando con las células

tratadas con etanol. Los lamelipodios y filipodios disminuyen notablemente en cantidad y extensión conforme aumenta la concentración de 4-hidroxycumarina. Al comparar con la morfología que presentan las células tratadas con citocalasina D, se observa una tendencia de las células tratadas con 4-hidroxycumarina a adoptar esa morfología, por lo que los mecanismos responsables de estos cambios morfológicos probablemente están relacionados con el control de la polimerización del citoesqueleto de actina.

Las fotografías de fibroblastos tomadas con microscopía de fluorescencia, permiten apreciar que la organización de los microfilamentos de actina prácticamente no presenta variaciones entre los tratamientos, lo que se refleja en el mantenimiento de la forma celular. Sólo en el caso de las fibras de estrés se observa una ligera disminución en su cantidad. El control de citocalasina D muestra que los fibroblastos también son capaces de responder a agentes despolimerizantes del citoesqueleto.

La disminución en el contenido de microfilamentos correlaciona con los cambios morfológicos producidos por la 4-hidroxycumarina. Las células B16 son susceptibles a las alteraciones producidas por la 4-hidroxycumarina, mientras que los fibroblastos no. La importancia de un efecto diferencial entre células normales y células neoplásicas disminuye el riesgo de efectos adversos.

Dado que la adecuada organización del citoesqueleto es necesaria para la adhesión célula-sustrato, evaluamos el efecto que produce la 4-hidroxycumarina sobre la capacidad de adhesión a fibronectina (molécula de matriz extracelular). En el ensayo de adhesión se encontró que existe una disminución en el número de células tratadas con 4 hidroxycumarina que se adhieren a fibronectina, con respecto al control. Esta disminución correlaciona con las modificaciones que la 4-hidroxycumarina induce en el citoesqueleto. Se sabe que los receptores que se agregan en los complejos de adhesión focal dependen de la interacción con el citoesqueleto de actina para soportar eficientemente la adhesión. Como la 4-hidroxycumarina desorganiza el citoesqueleto, es muy probable que este fármaco disminuya la capacidad de adhesión a otras proteínas de matriz extracelular.

Estudios previos muestran que el grado de polimerización de actina correlaciona con la concentración de la proteína; por lo tanto, analizamos la concentración de actina y la del ARN mensajero en que codifica para  $\beta$ -actina. Mediante la técnica de inmunoelectrotransferencia se evaluó la concentración de actina en células B16. Los resultados muestran tres bandas bien definidas debidas a que el anticuerpo utilizado reconoce todas las isoformas de actina; la banda de 41 kDa corresponde a  $\beta$ -actina. En todos los tratamientos que producen cambios morfológicos y alteraciones

en el contenido de microfilamentos, la intensidad de las bandas es similar a la del control de solvente. Dado que se cargaron cantidades iguales de proteína total, la concentración de actina no presenta cambios considerables. Cuando analizamos la cantidad de ARNm, mediante la técnica semicuantitativa de RT-PCR, tampoco se encontraron diferencias entre los tratamientos. Estos resultados indican que los cambios morfológicos producidos por la 4-hidroxicumarina no dependen de la expresión del gen de actina ni de la concentración de la proteína. La disminución en el contenido celular de fibras de estrés puede deberse a la alteración de las vías de señalización implicadas en la formación de estas fibras. Estas vías involucran diversas cinasas de tirosina; algunos compuestos cumarínicos han demostrado ser inhibidores de este tipo de enzimas (Yang A. B. 1999), por lo que existe la posibilidad de que la 4-hidroxicumarina tenga también esa actividad. Otra posibilidad es que la 4-hidroxicumarina se una directamente a los monómeros de actina alterando así su polimerización. Yang y colaboradores demostraron que algunas cumarinas se unen a sitios de reconocimiento a ATP. Dado que los sitios de unión a ATP son altamente conservados y que la actina presenta uno de ellos, existe la posibilidad de que la 4-hidroxicumarina ejerza su efecto bloqueando la unión de ATP a actina. Por último, el mecanismo de la 4-hidroxicumarina podría estar relacionado con cambios en la expresión o actividad de moléculas reguladoras de la polimerización de actina, sin embargo no existe evidencia que apoye esta alternativa.

## VII. CONCLUSIONES.

El presente estudio demuestra que la 4-hidroxicumarina altera selectivamente la morfología, la organización del citoesqueleto de actina y la capacidad de adhesión a fibronectina en células B16 de melanoma murino. La organización del citoesqueleto y la capacidad de adhesión controlan la motilidad celular; por lo que la 4-hidroxicumarina pudiera alterar la capacidad de movimiento de células tumorales y resultar en la disminución o pérdida de la capacidad metastásica. Se requieren estudios posteriores para demostrar lo anterior.

La identificación del mecanismo de acción de la 4-hidroxicumarina puede señalar nuevos blancos farmacológicos para el desarrollo de terapias antimetastásicas y dar lugar a la generación nuevos compuestos que disminuyan la invasividad. Dichos compuestos, al afectar una etapa de la progresión de neoplasias diferente a la proliferación, pueden complementar las actuales terapias antineoplásicas.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

- Alberts B, Dennis B, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 1994. Molecular biology of the cell. Garland Publishing Inc. U.S.A. Cap. 23, 24.
- Andrés J. P. 1999. Patología molecular de la progresión tumoral. Fox Chase Cancer Center. 9:138-143.
- Armitage P. 1954. The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. Br. J. Cancer; 8: 1-15.
- Balmer C. Wells A. 1998. Basics principles of cancer treatment and cancer chemotherapy; En: Tannock I, Hill R. The basics science of oncology. 3ª ed. Mc Graw-Hill, USA.
- Barkalow K. and Hartwing J. H. 1995. Actin cytoskeleton. Setting the pace of cell movement. Curr. Biol. 5: 1000-1002.
- Burridge K. and Chrzanowska W. M. 1996. Focal adhesions, contractility, and signaling. Ann. Rev. Cell. Dev. Biol. 12: 463-519.
- Carlier F. M. 1991. Actin: Protein structure and Filament Dynamics. The Journal of Biological Chemistry. 266: 1, 1-4.
- Chambers F. A., Naumov N. G., Vantigham A. S. and Tuck B. A. 2000. Molecular biology of breast cancer metastasis. Clinical implications of experimental studies on metastasis inefficiency. Breast Cancer Res. 2: 400-407.
- Cohen A. J. 1979. Critical review of the toxicology of coumarin with special reference to interspecies differences in metabolism and hepatotoxic reponse and their significance to man. Fd. Cosmet. Toxicol. 17: 277-289.
- Condeelis J. S. 2001. How is actin polymerization nucleated in vivo? Trends in Cell Biology. 11: 288-293.
- Condeelis J. S., Wyckoff B. J., Bailly M., Pestell R., Lawrence D., Backer J. and Segall J. E. 2001. Lamellipodia in invasion. Cancer Biology. 11: 119-128.
- Cox D., O'Kennedy R., Thornes R. D. 1989. The rarity of liver toxicity in patients treated with coumarin (1,2-Benzopyrone). Human Toxicol. 8: 501-506.
- Dexeus F. 1990. Phase II study of coumarin and cimetidine in patients with metastatic renal carcinoma. Journal of Clinical Oncol. 8: 325-329.
- Edward M. and MacKie R. 1993. Cell-cell and cell-extracellular matrix interactions during melanoma cell invasion and metastasis. Melanoma cells: effects of fibronectin, laminin,

- type IV collagen, and an autocrine motility factor-like substance. *Cancer Res.* **53**: 4376-4382.
- Franks L. M. 1998. Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. 3rd. Edition. London. Oxford University Press. 458pp.
  - Garibay M. A. 1998 Importancia de las integrinas en el proceso metastásico. México D.F. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. 56p. Tesis para obtener el grado de Licenciatura.
  - Hadidi H., Zahlsen K., Idle J. R. and Cholerton S. 1997. A single amino acid substitution (Leu160His) in cytochrome P450 CYP2A6 causes switching from 7-hydroxylation to 3-hydroxylation of coumarone. *Food and chemical Toxicology.* **35**: 903-907.
  - Hilgard P. 1984. Anticoagulants and tumor growth: Pharmacological considerations. En: Nicholson G. and Milas L. Cancer invasion and metastasis: biologic and therapeutic aspect. New York Raven press. 353-360.
  - Jiménez. O. A., Molina G. J., Mendoza P. N., León C. F. Flores P. B., Santos S. E., Mandoki J. J. 1999. Cytostatic activity of coumarin metabolites and derivatives in the B16-F10 murine melanoma cell line. *Melanoma Research.* **9**. 243-247.
  - Jordan A. M. And Wilson L. 1998. Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Current Opinion in Cell Biology.* **10**:123-130.
  - Kislauskis E. H., Shu X. C. and Singer H. R. 1997. "β-Actin Messenger RNA Localization and Protein Synthesis Augment Cell Motility" *The journal of Cell Biology.* **136**: 1263-1270.
  - Krishna Rao K. M. and Cohen H. J. 1991. Actin cytoskeletal network in aging and cancer. *Mutation research.* **256**: 139-148.
  - Liotta L. 1986. Tumor invasion and metastases-role of the extracellular matrix. *Cancer Res.* **46**: 1-7.
  - Liotta L., Kleinemar J. and Saidel G. 1974. Quantitative relationships of intravascular tumor cells: tumor vessels and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res.* **34**: 997-1003.
  - Lodish H.; Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P., Baltimore D. and Darnell J. 2000. *Molecular Biology.* 4th edition. Scientific American Books. USA. 1033-1174.

- Lu C. Kerbel R. 1994. Cytokines, growth factors and the loss of negative growth controls in the progression of human cutaneous malignant melanoma. *Curr. Opin. Oncol.* **6**: 212-220.
- Marshall M. E. 1994. An updated review of the clinical development of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7- hydroxicoumarin. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **120** (suppl): S14-S16.
- Marshall M. E., Kervin K., Benefield C., Umerani A, Albainy-Jenei S and Zhao Q. 1994. Growth-inhibitory effects of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7-hidroxicoumarin on human malignant cell lines in vitro. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **120** (suppl): S3-S10.
- Maecioni R. B. and Seeds N. W. 1997. Stoichiometry of GTP hydrolysis and tubulin polymerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 462-469.
- Maecioni R. B. and Archeaga J. 1987. The cytoesqueleton in cell differentiation and polymerization. Oxford University Press. U.K. pp. 367.
- Mohler J. L., Williams B. T., Thompson I. M. and Marshall M. E. 1994. Coumarin (1,2-benzopirone) for the treatment of prostatic carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **120** suppl.: S35-S38.
- Moran E. O'Kennedy R. and Thornes R. D. 1987. Analysis of coumarin and its urinary metabolites by high-performance liquid chromatography *Journal of Chromatography.* **416**: 165-169.
- Mosmann T. 1983. Rapid Colorimetric Assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity Assays. *Journal of immunological Methods.* **65**: 55-63.
- Nair R. V., Fischer P. E., Safe H. S., Cortez C. Harvey G. R. and DiGiovanni J. 1991. Novel coumarins as potential anticarcinogenic agents. *Carcinogenesis.* **12**: 65-69.
- Nobes D. C. and Hall A. 1995. Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated whit actin stress fibers, lamellipodia, and filipodia. *Cell.* **81**: 53-62.
- Onuma. E. K. 1988. Electrified-directed cell shape changes displacement and cytoskeletal reorganization are calcium dependent. *J. Cell Biol.* **106**: 2067-2075.
- Orozco A. A. 2000. Estudio in vivo del efecto antineoplásico de la cumarina en un modelo de melanoma murino. México D.F. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. 120p. Tesis para obtener el grado de licenciatura.

- Pérez T. M. 1999. Efecto del factor de transferencia sobre la inhibición de Osteopontina. México D.F. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. 39p. Tesis para obtener el grado de licenciatura.
- Pawlak G. and Helfman M. D. 2001. Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. *Current opinion in Genetics and development*. **11**: 41-47.
- Rice L. R., Tang D. G., Haddad M., Honn V. K. and Taylor D. J. 1998. 12(S)-Hidroxyeicosatetraenoic acid increases the actin microfilaments content in B16 Melanoma cells: a protein Kinase-Dependent process. *Int. J. Cancer*. **77**: 271-278.
- Ritschel W. A., Brady E. M. and Tan I. S. 1979. First-pass effect of coumarin in man. *International Journal of Clinical Pharmacology and Biopharmacy*. **17**: 99-103.
- Ritschel W. A. 1984. Therapeutic concentration of coumarone and predicted dosage regimens. *Drug Res*. **34**: 907-910.
- Ruoslahti E. 1996. How cancer spreads. *Scientific American*. Special issue: What you need to know about cancer? Sep: 42-47.
- Ruddon W. R. 1995. *Cancer Biology*. 3rd. edition. N.Y. Oxford University Press. 520pp.
- Schafer A. D. and Cooper A. J. 1995. Control of actin assembly at filament ends. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**: 497-518.
- Schoenwaelder M. S. and Burridge. K. 1999. Bi-directional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Current Opinion in Cell Biology*. **11**: 274-286.
- Tannock I. and Hill R. 1999. *The basics science of oncology*. 3rd edition. Mc Graw-Hill. USA. Cap 1,2.
- Thomes R. D. and O'Kennedy. 1997. *Coumarins. Biology, applications and mode of action*. John Wiley and sons. Pág. 67-142.
- Thomes R. D., Daly L. and Lynch H. 1989. Prevention of early recurrence of high risk malignant melanoma by coumarin. *European Journal of Surgical Oncology*. **15**: 431-435.
- Varmus H., Weinberg R. 1993. *Genes and biology of cancer*. *Scientific American Library*
- Villee C. 1996. *Biología de Villee*. 3a. Edición. Editorial interamericana Mc Graw Hill. Pág. 683-702.
- Warren R. A. 2000. Cell and tissue movements, invasion and angiogenesis. *Cancer and Metastasis Reviews in Kluwer Academic Publishers*. **19**: 257-279.
- Weidner N. 1993. Tumor angiogenesis: review of current applications in tumor prognostication. *Semin. Diagn. Pathol.* **10**: 302-313.

- Weinberg A. R. 1996. How cancer arises. Scientific American Library. Special issue: What you need to know about cancer?. 275; 3:32-40.
- Weiss L. 1990. Metastatic inefficiency. Adv. Cancer Res. 54: 159-211.
- Yang E. B., Zaho Y. N., Zhang K. and Mack P. 1999. Daphnetin, one coumarin derivatives, is a protein kinase inhibitor. Biochemical and Biophysical Research Communications 260: 682-687.
- Yamada K. M. Miyamoto S. 1995. Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. Curr. Op. Cell Biol. 7: 681-689.
- Zänker K. S., Blümel G., Lange S. and Siewert J.R. 1984. Coumarin in melanoma patients: an experimental and clinical study. Drugs Exptl. Clin. Res. 11:767-774.
- <http://www.ssa.gob.mx> (Fuente: INEGI, SS/ DGEI, 1999).