



11281
19
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

ESTUDIO DE LAS ACCIONES DE CUMARINA Y 7-HIDROXICUMARINA
EN EL CICLO CELULAR Y EN LA EXPRESION DE LA CICLINA
"D1", "E" Y "A" DE CELULAS DE CANCER HUMANO.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
P R E S E N T A :

M. EN C. FAUSTO ALEJANDRO JIMENEZ OROZCO

Facultad de Medicina



MEXICO, D. F.

2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

EL ASCENSO

Cuentan que hubo hace mucho tiempo un joven guerrero que venció con su ejército a un reino y se erigió como el nuevo gobernante. Aunque el joven gobernante era obedecido y su voluntad era ley, en el fondo él sabía que era temido, pero no respetado por sus súbditos. Al correr del tiempo, el joven comenzó a anhelar con todo el corazón ser admirado y respetado por su pueblo. Fueron muchos los intentos de congraciarse con la gente pero por más esfuerzos que hacía, no conseguía el respeto esperada.

En una montaña cercana vivía un ermitaño que era respetado en toda la comarca debido a su profunda sabiduría. Entonces el joven gobernante tomó la decisión de ascender la montaña para tomar del ermitaño el ansiado secreto: *el respeto que otorga la autoridad.*

Uno de sus consejeros le advirtió que debía ascender a la montaña sólo y sin armas; el joven así lo hizo.

No había avanzado mucho, cuando en las faldas, se topó con unos hombres que corrieron a su encuentro. El joven rápidamente cortó una gruesa rama, peleó contra sus rivales y los venció con facilidad. Más adelante se topó con otros pobladores, a quienes emboscó en una cañada y venció como a los primeros. A mitad del camino enfrentó a tres contrincantes a golpes, e hizo muestra de su fuerza y destreza para pelear.

Y así, el joven continuó avanzando y sometiendo a cuanto rival topa en su camino, hasta que llegó a la ermita donde habitaba el sabio. El anciano permaneció en su lugar sin inmutarse, el joven avanzó se postró frente a él y le dijo:

-He venido para que me digas donde encontrar la verdadera autoridad y el respeto de mi pueblo -

A lo que el sabio le contestó: *-la verdadera autoridad y el respeto se encuentra en los actos cotidianos, porque a todos los que te encontraste de subida, te los vas a encontrar a la bajada -.*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

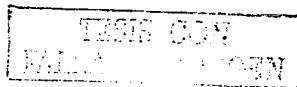
CUENTO ANÓNIMO

General de Bibliotecas de la
Unidad de Trabajo de mi trabajo recepcional.

PRE: FAUSTO ALEJANDRO
JIMÉNEZ OROZCO
7 de ABRIL DEL 2003
[Firma]

A MIS PADRES ELISA OROZCO y FAUSTO
JIMÉNEZ: por darme la vida, por su amor, su
apoyo y respeto a mis decisiones.

A MI HIJO RODRIGO: con todo mi amor y el
más profundo agradecimiento por permitirme
vivir la aventura más hermosa de toda mi vida
ser padre.



A mis hermanas Aida y Elisa por todo su cariño, su comprensión y su apoyo.

A todos los Narradores Orales de Santa Catarina, dirigidos por Beatriz Falero, por su enorme afecto, su cariño y la sabiduría de los cuentos, que me han mostrado que **en tiempos de oscuridad hay que aprender a mirar las estrellas.**

A mis maravillosos amigos de "Compañía Se Cuenta, Contadores Públicos... de Cuentos" **Rosamaría Durand y Marconio**, por su amistad, su generosidad, su creatividad y por mostrarme que hay tantas cosas buenas en la vida, que no vale la pena ocuparse de las malas. Pero ante todo, por acompañarme cariñosamente en los momentos difíciles, tolerar mi terrible carácter, aceptarme como soy y alejarme del camino del enojo y el resentimiento.

A Mario López, por su amistad, su buen humor y sobre todo, por toda su asistencia en la edición de imágenes para este trabajo.

Al recuerdo de mi gran amigo Jairo Botero, por la breve pero nutrida amistad que me brindó, que me hizo volver a creer en mí, en mis sueños y que me hacen ser hoy quien soy. A su viuda Luzmarina y a su hija Esther (si quisimos tanto al árbol, como dejar de querer a las ramas).

A todo el equipo del Laboratorio de Farmacología Celular por su amistad, ayuda y compañía a lo largo de todos estos años de trabajo: a Juanola García Mondragón, a Estela Estrada Gutiérrez, a Marco Velasco Velásquez, a Martha Elinos, a Diana Barrera, a Alejandro García, a Roberto Razo, a Charmina Aguirre y a Adriana Megía.

Al Dr. Wilhelm Seemann, al Dr. José A. Vargas, al Dr. José Miguel Dibildox y a la señorita Monika Herkert, de ALTANA Pharma, por su generosidad para presentar mis resultados en varios foros internacionales y por su desinteresado apoyo para obtener la beca DAAD.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A Dolores Aguilar Cázares, por su desinteresado apoyo y amistad durante mi estancia en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER)

Al Dr. Fermín Valenzuela Gómez-Gallardo, por su apoyo para asistir a eventos científicos, su amistad y su aliento para continuar el camino de la investigación y la docencia.

A Beatriz Falero, Consuelo Izazola, Alfonso Saucedo y Marconio por la corrección de estilo de esta tesis.

A mis estimadísimos compañeros de la Maestría y el Doctorado por su amistad y por compartir los momentos buenos y malos, (NO HAY MAL QUE DURE 100 AÑOS): Toni Guerrero, Francisco Martínez, Alberto Quiñónez, Cecilia Martínez, Flor Porras, Karina Chávez y Cuautemoc Gómez.

A Evita por todos los trámites, inscripciones de enredos que me ayudó a solucionar.

Al Maestro Juan Molina, por sus asesorías en la Defensoría de los Derechos Universitarios y su información oportuna.

A los compañeros del grupo Xochimilco de 4° y 5° paso, por su invaluable y desinteresada ayuda en los momentos que más lo necesité.

A Gabriela Alemán, por haber compartido un tramo en el camino de la vida, que sin duda me hizo crecer y ser mejor persona.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Con profundo cariño y agradecimiento a las personas que han marcado mi vida, dejando en mí sus enseñanzas y que habré de aplicar en mi futura vida académica

Dr. Juan José Mandoki Weitzner, por haber brindado su amistad, su generosidad y su confianza, que me permiten alcanzar hoy una importante meta en mi vida, pero ante todo ser mejor persona.

Dr. José Sullivan López González, por sus comentarios siempre certeros y su gran generosidad durante mi estancia en su laboratorio.

Dr. Nicandro Mendoza Patiño, por su amistad y paciencia que me han mostrado que hay más caminos en la vida que los que vemos a simple vista.

Dr. Abraham Landa Piedra, por su rigor académico y sus observaciones durante el desarrollo experimental de este proyecto.

Dr. Luis Felipe Jiménez García, por todo el apoyo que lo caracterizó durante el desarrollo experimental de proyecto.

A la Dra. Ingrid Grunt y a la Dra. Rente Voit, por su enorme generosidad, apoyo, amistad y rigor académico que me brindaron durante mi estancia en Heidelberg, Alemania.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Agradezco a las siguientes instituciones y empresas por las becas y los apoyos financieros concedidos, sin los cuales no me hubiera sido posible realizar mis estudios de doctorado:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por distinguirme como becario (92229) durante mis estudios de Doctorado.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) por distinguirme como becario durante mis estudios de Doctorado.

A la Fundación TELMEX por distinguirme como becario (3090011617) durante mis estudios de Doctorado.

Al gobierno alemán por distinguirme como becario (A/01/05883) a través de Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD) para realizar una estancia de investigación en Heidelberg, Alemania.

A Altana Pharma por su apoyo financiero para presentar mis resultados en varios Congresos Internacionales.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

JURADO ASIGNADO

Presidente:	Dr. Guillermo Alfaro Martínez
Secretario:	Dr. Juan José Mandoki Weitzner
Vocal	Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Vocal	Dr. Rolando E. Hernández Muñoz
Vocal	Dra. Regina D. Montero Montoya
Suplente	Dr. Luis Felipe Jiménez García
Suplente	Dr. Abraham Landa Piedra

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Farmacología Celular bajo la dirección del Dr. Juan José Mandoki Weitzner, del Departamento de Farmacología, de la Facultad de Medicina de la UNAM; en el laboratorio de Cáncer Pulmonar, del Departamento de Enfermedades Crónicas Degenerativas del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), bajo la dirección del Dr. José Sullivan López Gonzalez.

Con los financiamientos las siguientes instancias universitarias: (i) la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (DGAPA) a través de los proyectos IN211396, IN206599, y IN246202; (ii) la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) a través de los proyectos PAEP 012302 y 201413; y (iii) al Programa Universitario para la Investigación en Salud (PUIS) por su apoyo financiero al proyecto 8687-297-5-99.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTUDIO DE LAS ACCIONES DE
CUMARINA Y 7-HIDROXICUMARINA
EN EL CICLO CELULAR Y EN LA
EXPRESIÓN DE LA CICLINA "D1",
"E" Y "A" DE CÉLULAS DE CÁNCER
HUMANO.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

ii

ÍNDICE

ABREVIATURAS	v
RESUMEN	1
1 INTRODUCCIÓN	2
1.1 CICLO CELULAR	2
1.2 CINASAS DEPENDIENTES DE CICLINAS (CDKs)	3
1.3 PROTEÍNAS SUPRESORAS DE TUMORES	12
1.4 PUNTO DE RESTRICCIÓN	13
1.5 TRANSICIÓN G1/S	15
1.6 PUNTOS DE CONTROL (CHECKPOINTS) Y QUIMIOTERAPIA	15
1.7 NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS	18
1.8 CUMARINA	19
2 JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	26
2.1 HIPÓTESIS	27
2.2 OBJETIVOS	27
3 MATERIAL Y MÉTODO	28
3.1 REACTIVOS	28
3.2 ANTICUERPOS	28
3.3 LÍNEA CELULAR	29
3.4 ANÁLISIS DE ADN POR CITOMETRÍA DE FLUJO	29
3.5 INCORPORACIÓN DE BrdU	30
3.6 DETECCIÓN DE CICLINAS	30
3.7 RT-PCR	32
3.8 MTT	33
4 RESULTADOS	35
4.1 EFECTO CITOSTÁTICO	35
4.2 EFECTO EN EL CICLO CELULAR	33
4.3 PATRÓN DE EXPRESIÓN DE CLICLINAS	38
4.4 EFECTO DE CUMARINAS EN LA EXPRESIÓN DE CICLINAS	39
5 ESTUDIOS POSTERIORES	42
6 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	44
7 REFERENCIAS	46

ABREVIATURAS

- aM Anticuerpos monoclonales.
- BSA Albúmina sérica bovina.
- BrdU Bromo deoxiuridina
- Cdk Subunidad catalítica de las cinasas dependientes de ciclinas.
- CDKs Complejo formado por una determinada Cdk y su ciclina.
- CI_{50} Concentración inhibitoria 50
- Ciclinas Subunidad activadora de las Cdk.
- FITC Isiotiocianato de fluoresceína.
- MTT bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio
- PBS Solución amortiguadora de fosfatos.
- pb Pares de bases .
- PI Yoduro de propidio
- pRb Proteína del retinoblastoma.
- RT-PCR Reacción de la transcriptasa reversa y reacción en cadena de la polimerasa.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

La cumarina tiene actividad antitumoral *in vivo* en varios tipos de cáncer. *In vitro*, la cumarina y la 7-hidroxycumarina, su principal producto de biotransformación en humanos, inhibe la proliferación de varias líneas de células tumorales. Los mecanismos moleculares de estos efectos se desconocen y para obtener información sobre los mismos realizamos el presente estudio. En la línea de adenocarcinoma pulmonar humano A-427, se evaluó el efecto de la cumarina y de la 7-hidroxycumarina en la inhibición de: (i) proliferación celular; (ii) progresión del ciclo celular; y (iii) expresión de la ciclina D1, la ciclina E, y la ciclina A. Las concentraciones inhibitorias 50 (CI₅₀) de ambos compuestos fueron estimadas mediante ensayos de reducción de tetrazolio (MMT). El efecto en la progresión del ciclo celular se realizó con yoduro de propidio y Bromodeoxiuridina (BrdU), usando histogramas y análisis bivariante de citometría de flujo. El porcentaje de las células que expresaban las ciclinas D1, E y A se estimó mediante análisis multiparamétrico por citometría de flujo, usando yoduro de propidio y anticuerpos monoclonales conjugados a isotiocianato de fluoresceína (αM-FITC) para cada ciclina. La CI₅₀ (± e.e.m., n=3) de la cumarina y de la 7-hidroxycumarina a exposiciones de 72 horas, fue 257 ± 8.8 y 100 ± 4.8 µg/ml respectivamente. La 7-hidroxycumarina a concentración de 160 µg/ml (1 mM), inhibió la fase G₁ del ciclo celular, lo que es consistente con su efecto citostático. No se observaron decrementos significativos de la ciclina E y la ciclina A. En contraste, la ciclina D1 disminuyó considerablemente, lo que sugiere que la acción de la 7-hidroxycumarina ocurre en eventos tempranos de la fase G₁. Sin embargo, el ARN mensajero de la ciclina D1, ensayado mediante RT-PCR, no presentó cambios, lo que indica que es un efecto postranscripcional. La cumarina no tuvo efectos significativos. La mayoría de las neoplasias malignas presentan anomalías en los elementos del punto de restricción (vía pRb), que regulan la progresión en la fase G₁ del ciclo celular. La ciclina D1, que forma parte de la vía pRb, está frecuentemente alterada en varios tipos de cáncer y proponemos su inhibición como blanco farmacológico para el desarrollo de nuevos agentes antineoplásicos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CICLO CELULAR

El ciclo celular es el proceso que permite la proliferación celular. En el ciclo celular se duplica con fidelidad el ADN y se asegura la distribución de una copia fiel del genoma a cada una de las dos células hijas. El ciclo se divide en cuatro fases (G_1 , S, G_2 y M) y cada fase involucra varios eventos que ocurren en forma ordenada. En la fase G_1 , las señales extracelulares de proliferación se transducen al interior del núcleo, a través de diversas vías de señalización. Como resultado, se activa la expresión de genes cuyos productos son necesarios para la progresión del ciclo celular y para la síntesis de ADN. En la fase S se sintetiza un juego del genoma. En la fase G_2 , se preparan otros eventos necesarios para la mitosis. Finalmente en la fase M o mitótica las dos copias del ADN y los organelos de la célula preexistente se segregan en dos células hijas (Arellano M. *et al.* 1997; Johnson DG. *et al.* 1999). Las células que no proliferan se encuentran en un estado llamado G_0 , en el que la maquinaria del ciclo celular está inactiva y el metabolismo basal es bajo (Bartek J. *et al.* 1996).

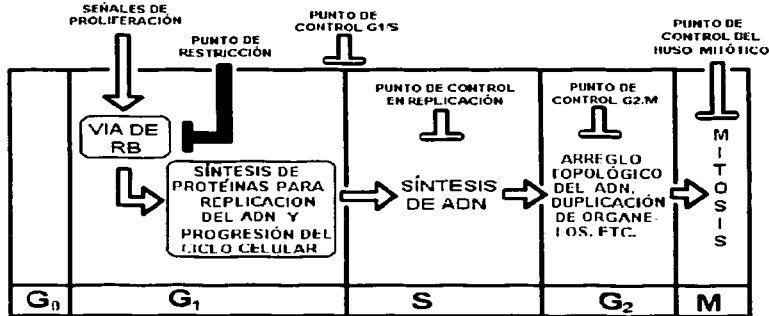


Figura 1. Principales eventos del ciclo celular, punto de restricción y los puntos de control en cada fase.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

3

Las células normales pasan de una fase a la siguiente, sólo después de la culminación exitosa de los eventos de la fase previa. Esto es posible gracias a una compleja red de sistemas de control que verifican los eventos de cada fase y coordinan la actividad de los elementos regulatorios del ciclo (CDK's, CKI's, proteínas supresoras de tumores, etc). Se han descrito dos grandes tipos de sistemas de control: (a) **el punto de restricción**, que controla la entrada al ciclo celular y la progresión en la fase G₁ (Bartek J. *et al.* 1996) y b) **los puntos de control** (del inglés checkpoints) que regulan la progresión entre las distintas fases del ciclo (O'Connor PM. *et al.* 1996; Kornbluth S. 2000).

En el presente trabajo nos centramos en la fase G₁ y la transición a la fase S del ciclo celular, así como en los elementos reguladores del punto de restricción; sus implicaciones en el cáncer y su intervención terapéutica con cumarinas.

1.2 CINASAS DEPENDIENTES DE CICLINAS (CDK's)

La progresión del ciclo celular, a través de las diferentes fases, está dirigida por la activación secuencial de cinasas serinas/treoninas. Estas cinasas son conocidas como cinasas dependientes de ciclinas (Cdk's) y fosforilan sustratos claves de la maquinaria celular que permiten la transición de una fase a la siguiente (Pines J. 1995). Las Cdk's (Cdk1 - Cdk10) son subunidades catalíticas que se unen a sus subunidades activadoras llamadas ciclinas (ciclina A - K, ciclinas T1 y T2) y formar así los complejos activos CDK's (Martínez F. *et al.* 2001).

Los complejos de CDK's mejor conocidos en la progresión del ciclo celular son ciclina D1/Cdk4 (D1-CDK4), ciclina E/Cdk2 (E-CDK2), ciclina A/Cdk2 (A-CDK2) y ciclina B/Cdk1 (B-CDK1). La actividad de los complejos CDK's está regulada en diferentes formas, incluyendo: (a) síntesis y degradación secuencial de las ciclinas; (b) fosforilación y desfosforilación de las subunidades catalíticas Cdk's; (c) unión a proteínas inhibitoras de CDK (Arellano M *et al.* 1997; Morgan DO. 1995).

1.2.1. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE CDK's MEDIANTE LA SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN SECUENCIAL DE CICLINAS

Las ciclinas reciben su nombre, debido a que se sintetizan y degradan cíclicamente en huevos de erizo de mar (Evans T. *et al.* 1983). Es decir, se sintetizan después de la fecundación y se degradan rápidamente en cada mitosis. Actualmente las ciclinas se definen como una familia de proteínas que presentan una secuencia consenso de 100 aminoácidos llamada "caja de ciclinas" (Reed SI. 1991).

Durante el ciclo celular, la cantidad de Cdk's es relativamente constante, lo que varía es la cantidad de las ciclinas D, E, A y B a lo largo del ciclo celular. Esto es posible gracias a que la síntesis y degradación de las ciclinas dependen de los eventos propios de cada fase. El patrón temporal de cada ciclina sigue un orden específico que permite la activación de complejos CDK's en una secuencia específica (Darzynkiewicz Z. *et al.* 1996).

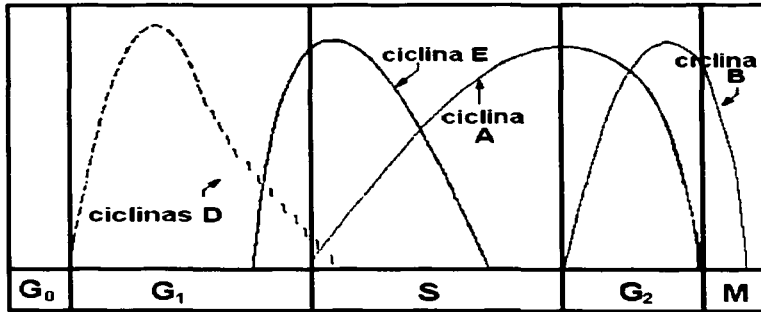


Figura 2. Síntesis y degradación de ciclinas en cada fase del ciclo celular.

Como se observa en la figura 2, la síntesis de ciclinas D (D1, D2 y D3) se inicia en la fase G₁, donde alcanza su máxima expresión; luego disminuye el nivel al final de la fase G₁. La ciclina E se sintetiza al final de la fase G₁, alcanza su máxima expresión durante la transición de la fase G₁ a la fase S y se degrada durante la fase S. La ciclina A se sintetiza al inicio de la fase S, alcanza su máxima expresión durante la transición de la fase S a G₂ y se degrada abruptamente al final de la fase G₂. La ciclina B se sintetiza al inicio de la fase G₂, alcanza su máximo en la fase M y disminuye abruptamente en la transición a la anafase.

La expresión de ciclinas D es inducida por señales mitogénicas extracelulares, como son los factores de crecimiento, hormonas, etc. (Sherr ChJ 1995). Algunos autores consideran que la expresión de las ciclinas del tipo D son los marcadores del inicio del ciclo celular en la fase G₁ (Darzynkiewicz Z. *et al.* 1996). Las ciclinas D2 y D3 se expresan en células del sistema hematopoyético, mientras que la ciclina D1 se expresa en células que dependen de adhesión (Ajchenbaum F. *et al.* 1993).

Una célula inicia su ciclo cuando factores de crecimiento, hormonas y otras señales extracelulares, se unen a sus receptores y activan a proteínas transductoras como Ras (Guille H 1999). La proteína Ras transduce la señal al núcleo y activa la transcripción de varios genes necesarios para la proliferación, entre los que se encuentran los de las ciclinas D (Ewen ME. *et al.* 2000). Las vías activadas por Ras mejor descritas son: Raf/MEK/MAPK (Guille H. *et al.* 1999), Rho/Rac (Sahai E *et al.* 2002) y PI3K/Akt/PKB (Guille H. *et al.* 1999; Ewen ME. *et al.* 2000).

La transcripción del gen de la ciclina D1 (CCND1) es la más estudiada (Amanatullah DF. *et al.* 2001). En el promotor de este gen se han documentado sitios de unión para diferentes factores de transcripción, como AP1, Ets, ATF-2, NF κB, CREBP y otros (ver figura 3).

La activación de integrinas por fibronectina también induce la expresión de la ciclina D1 activando a las proteínas Rho/Rhac, o bien mantienen comunicaciones cruzadas con las cascadas activadas por Ras (Sahai E. *et al.* 2002; Schwartz MA *et al.* 2001). Además, otras proteínas intracelulares, como los receptores de estrógenos (Foster JS. *et al.* 2001) y la β catenina (Tetsu O. *et al.* 1999) también regulan la transcripción de la ciclina D1.

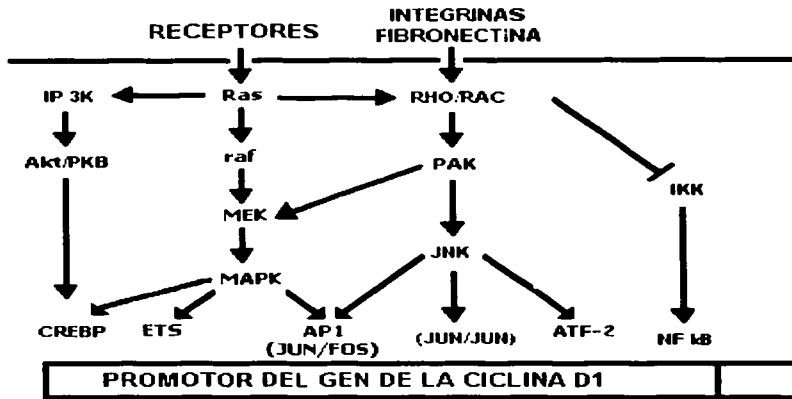


Figura 3. Principales vías de señalización que regulan al promotor del gen de la ciclina D1 a través de receptores y de moléculas de adhesión. Fosfatidil inositol 3 cinasa (IP 3K); cinasa de N-terminal de c-Jun (JNK); cinasa de proteínas de activación mitogénica (MAPK); cinasa de cinasa de integrinas (IKK); proteína de unión a elemento de respuesta a AMP cíclico (CREBP); proteína de activación 1 (AP1); factor de activación transcripcional 2 (ATF-2); factor nuclear kB (NF kB).

Las ciclinas D se unen a las Cdk4 y Cdk6, y regulan la progresión de la fase G1 a través de la fosforilación e inactivación de la proteína pRb, lo que produce la activación de factores que transcriben los genes de las ciclinas E y A (ver pRb y punto de restricción) (Ohtani K. *et al.* 1995; Yamb CH. *et al.* 2002). La ciclina A se expresa después de la ciclina E, porque la transcripción del gen de la ciclina A también requiere de la actividad del complejo E-CDK2 (figura 4). Del mismo modo, la ciclina B sólo se incrementa hasta la fase G2, porque su expresión depende del complejo A-CDK2.

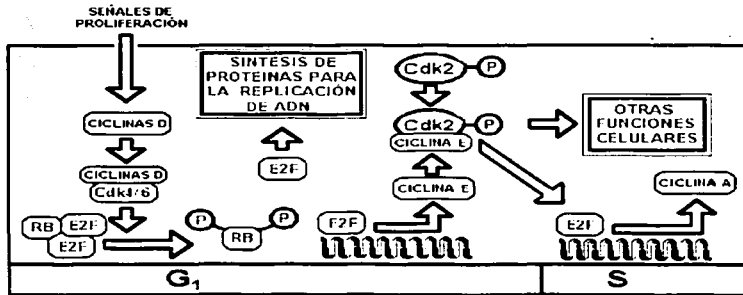


Figura 4. Transcripción secuencial de los genes de las ciclinas D, la ciclina E y la ciclina A.

Por su participación en la fase G1, las ciclinas D y E también se conocen como ciclinas G1, mientras que las ciclinas A y B son llamadas ciclinas mitóticas. La degradación de todas las ciclinas sigue la vía de la ubiquitina, pero existen

importantes diferencias entre la proteólisis de las ciclinas G1 y la de las ciclinas mitóticas (para revisión consultar King RW. *et al.* 1996).

Las ciclinas G1 requieren ser fosforiladas para ser degradadas. En el caso de la ciclina D1, la glucógeno sintasa cinasa 3β (GSK- 3β) fosforila a esta ciclina en la treonina 286 (Thr286), lo que induce su degradación (Diehl JA. *et al.* 1998). En el caso de la ciclina E, cuando alcanza su máximo de expresión en la transición G1/S, el complejo E-CDK2 autofosforila a la ciclina E en Thr380, lo que induce su degradación (Won KA. *et al.* 1996). En consecuencia, la cantidad de ciclina E disminuye a lo largo de la fase S (ver figuras 2 y 5).

La proteólisis de las ciclinas mitóticas, en cambio, es activada por el complejo de promoción a anafase (APC). En la figura 2 se observa que la ciclina A se degrada abruptamente cuando la célula entra a la fase M, mientras que la ciclina B se degrada posteriormente, durante fase M. Aún se debate sobre el mecanismo que produce la degradación de las ciclinas mitóticas en diferentes fases (Klotzbucher A. *et al.* 1996; Keopp DM. *et al.* 1999).

1.2.2. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE SUBUNIDADES CATALÍTICAS Cdk's MEDIANTE GRUPOS FOSFATO

Desfosforilaciones que activan a las Cdk's: la proteína CDC25A es una fosfatasa que elimina los grupos fosfato inhibitorios de Cdk2 en las Thr14, Tyr15 y de Cdk1 en Tyr15. En la figura 5 se observa que la expresión de CDC25 es inducida por la proteína Myc. Esto ocurre al final de la fase G1, en respuesta a factores mitogénicos (Bouchard C. *et al.* 1998).

Fosforilaciones que activan a las Cdk's: La cinasa activadora de Cdk's (CAK), que está formada por la ciclina H y Cdk7, fosforila a la Cdk2 en la posición de la

Tyr160 (Kaldis P. 1999). Esta fosforilación estabiliza los complejos formados por la subunidad catalítica y las ciclinas E y A, e incrementa su actividad.

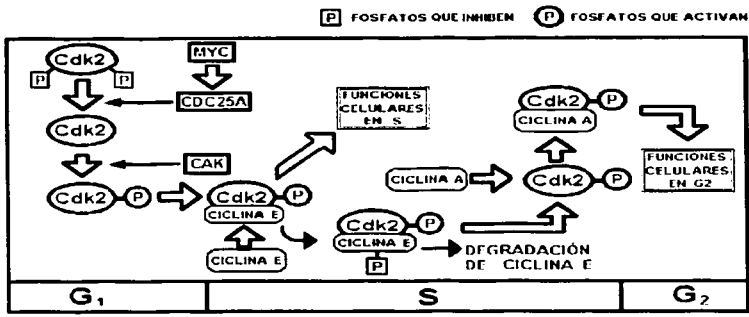


Figura 5. Regulación de la actividad de Cdk2 mediante fosforilaciones y por unión a la ciclina E y a la ciclina A.

Fosforilaciones que inhiben a las Cdk's: en respuesta al daño al ADN se activan las cinasas Mik1 y Wee1, lo que fosforila a la Cdk1 en la Tyr15 (O'Connell MJ. *et al* 1997). Esta fosforilación inhibe a la Cdk1 y en consecuencia se detiene la progresión del ciclo celular en la fase G₂.

Localización subcelular de ciclinas, Cdk's y complejos CDK's

Las fosforilaciones de Cdk's además de activar o desactivar su función, así como las fosforilaciones que promueven la degradación de ciclinas, contribuyen también a regular el tráfico de estas proteínas en los compartimentos de la célula (para revisión, consultar a Yang J. *et al.* 1999).

1.2.3. REGULACIÓN DE COMPLEJOS CDK's MEDIANTE PROTEÍNAS INHIBIDORAS DE CDK (CKI's)

Los inhibidores de CDK's (CKI's) son proteínas que originalmente fueron descritas como reguladores negativos del ciclo celular (Ellenge SJ. *et al.* 1994). Actualmente se sabe que algunas de estas proteínas, en ciertos contextos, además regulan positivamente el ciclo celular (Harper JW. *et al.* 1996; Sherr ChJ. *et al.* 1999). Existen dos familias de CKI's denominadas INK4 y Cip/Kip, que difieren entre sí en su estructura, función y especificidad de sustratos (Peter M. 1997).

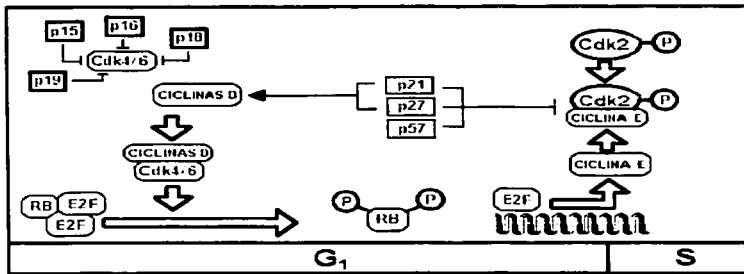


Figura 6. Regulación negativa de CDK's a través de CKI's. Activación (↓); inhibición (⊥).

La familia **INK4** (Inhibidores de cdk 4) está formada por las proteínas p15, p16, p18 y p19, que se unen selectivamente a cdk4 ó cdk6 (ver figura 6). Esta unión selectiva se debe que las proteínas INK4 tienen secuencias repetidas de 33 residuos que forman una estructura terciaria conocida como ankyrina. Dicha estructura se caracteriza por tener consecutivamente plegamientos β y horquilla hélice α hélice ($\beta_2\alpha_2$) (Zhang B. *et al.* 2000). Las uniones de la proteínas INK4 con

las subunidades Cdk4 y Cdk6 previenen la unión con las ciclinas D, y con ello la formación de complejos activos (Sherr ChJ. *et al.* 1999; Peter M. 1997). Los niveles de p16 se encuentran incrementados en células envejecidas (Zyndy F. *et al.* 1997); las proteínas p18 y p19 participan en la diferenciación terminal y se expresan durante el desarrollo embrionario (Phelps DE. *et al.* 1998; Ellenge SJ. *et al.* 1996). Ratones que carecen del gen que codifica para p16 (ratones p16 knock-out) desarrollan tumores espontáneos a edades tempranas, y son muy sensibles a agentes carcinogénicos (Ellenge SJ. *et al.* 1996; Serrano M. 1997).

La familia Cip/Kip está formada por las proteínas p21^{Cip1}, p27^{Kip1} y p57^{Kip2}, caracterizadas por tener dominios en la región amino terminal que se unen a las cinasas cdk2, cdk4 y cdk6, así como a las ciclinas D, E y A (Peter M. 1997). Se ha documentado que las proteínas Cip/Kip tienen diferentes funciones dependiendo del sustrato al que se unen: (i) regulan negativamente las actividades de los complejos E-CDK2 (Harper JW. *et al.* 1996) y (ii) regulan positivamente a la ciclina D1 y su ensamble con Cdk4 (para revisión consultar Sherr ChJ. *et al.* 1999). El incremento de las proteínas Cip/Kip se observa durante el desarrollo embrionario (Peter M. 1997). En ratones deficientes en p21^{Cip1} y p27^{Kip1}, la frecuencia con la que desarrollan tumores espontáneos no difiere de la de ratones normales (Ellenge SJ. *et al.* 1996). Sin embargo, dichos ratones presentan algunas malformaciones (Ellenge SJ. *et al.* 1996; Nakayama K. *et al.* 1998). Estos resultados son consistentes con la baja frecuencia con la que se presentan mutaciones de p21^{Cip1} y p27^{Kip1} en cánceres humanos; sin embargo, se ha observado una baja expresión de p27^{Kip1} en varios tipos de cáncer (Moller MB. 2000).

La cantidad de cada CKI es regulada mediante mecanismos de transcripción, traducción y degradación por vía de la ubiquitina (Peter M. 1997). Señales antiproliferativas como el TGF- β inducen la transcripción de p15, p16 y p21^{Cip1} (Nakayama K. *et al.* 1998; Hannon GJ. *et al.* 1994; Datto MB. *et al.* 1995). La expresión del gen de p21^{Cip1} puede inducirse en caso de daño celular mediante la

proteína p53, o durante la diferenciación del músculo a través de mecanismos independientes de p53 (Nakayama K. *et al.* 1998). En cambio, el incremento de la proteína p27^{Kip1} en citoplasma se debe a mecanismos postranscripcionales, como el incremento en la traducción y/o a la inhibición de su degradación (Moller MB. 2000; Sahai E. *et al.* 2002).

1.3 PROTEÍNAS SUPRESORAS DE TUMORES

1.3.1 PROTEÍNA p53

La proteína supresora de tumores p53 es un factor de transcripción que contribuye a la estabilidad genómica, participando en las siguientes funciones: arresto celular (ver puntos de control), reparación del ADN, apoptosis, envejecimiento celular y diferenciación celular (Vogelstain B. *et al.* 2000). En condiciones normales, esta proteína tiene una baja capacidad de unión al ADN y es poco estable, ya que se degrada rápidamente a través de proteosomas. Daños al ADN producen modificaciones postranscripcionales en p53, lo que la estabiliza y activa su unión al ADN. Esto induce la transcripción de genes cuyos productos proteicos participan en arresto celular, reparación del ADN, apoptosis, etc. Como se señala más adelante, los arrestos celulares son el resultado de la activación de vías específicas conocidas como puntos de control. La proteína p53 es el elemento clave en la transmisión del mensaje de daño genómico (O'Connor PM. *et al.* 1998; Taylor WR. *et al.* 2001). La inactivación de p53 por mutaciones en su gen contribuye a la inestabilidad genómica y a la carcinogénesis (Vogelstain B. *et al.* 2000).

1.3.2. PROTEÍNA RB (pRB)

El gen Rb codifica para una proteína nuclear que inicialmente fue descrita como anormal en pacientes con retinoblastoma (Yunis J. *et al.* 1978). La proteína Rb reprime la actividad de los factores E2F y con ello la expresión de proteínas necesarias para la transición G₁/S (Bartek J. *et al.* 1996; Keelin WG 1999).

Las proteínas de la familia E2F (E2F 1-5) son factores de transcripción que forman heterodímeros con las proteínas DP (DP 1-3). Los dímeros E2F/DP activan la transcripción de dos grandes tipos de genes (ver figura 4). Por una parte, los genes que codifican para enzimas que participan en la síntesis del DNA, como son la DNA polimerasa α , la cinasa de timidina (TK), histonas H2A, etc. Por otra parte, se encuentran los genes que codifican para proteínas reguladoras del ciclo celular, como ciclina E, la ciclina A, Cdc2, B-myb, etc (Lavia P. *et al.* 1999).

La proteína Rb es el componente central del punto de restricción (ver a continuación) y su inhibición por fosforilación constituye el paso crucial que permite el inicio de la proliferación celular. Las fosforilaciones de pRb en la fase G₁ por Cdk4 y Cdk6 son las mejor documentadas. Sin embargo, también se ha reportado que pRb tiene funciones distintas en otras fases, como reprimir la transcripción de ciertos genes y activar la transcripción de otros (Keelin WG. 1999). Los complejos CDK1 y CDK2 también fosforilan a pRb en posiciones diferentes a las fosforiladas por CDK4 y CDK6. Esto coincide con las funciones de pRb en otras fases del ciclo (Mitnacht S. 1998). En el presente trabajo nos centramos en el papel de Rb en la fase G₁ como principal regulador del punto de restricción.

En varios tipos de tumores pRb no se expresa o bien no es funcional. Como resultado, los genes dependientes de los factores E2F permanecen activados y la célula prolifera sin control.

1.4 PUNTO DE RESTRICCIÓN

Las células que no proliferan se encuentran en la fase G₀ y cuando pasan a la fase G₁ se inicia la proliferación. La entrada al ciclo celular y la progresión en la fase G₁ se regula por un sistema de control que se conoce como punto de restricción o "vía de la proteína Rb" (p16-ciclinas D-Cdk4/6-Rb-E2F) (Jonson M *et*

al. 1999; Lavia P. *et al.* 1999). Para que la célula inicie el ciclo, requiere de un contexto celular favorable y de señales mitogénicas que induzcan la expresión de ciclinas del tipo D. Estas ciclinas se unen a cdk4 y cdk6 y forman los complejos activos D-CDK4 y D-CDK6. La fosforilación de pRb en G1 por D-CDK4 y D-CDK6 constituye el paso crucial que permite la proliferación celular. Como se observa en la figura 4, al inicio del ciclo, la forma hipofosforilada de pRb se une a los factores de la familia E2F y limita su función transcripcional, produciendo un arresto en G₁ (Kaelin P. *et al.* 1999). La inactivación por fosforilación de pRb libera a los factores E2F y permite la progresión del ciclo celular.

1.4.1 REVERSIBILIDAD DEL PUNTO DE RESTRICCIÓN

Se ha reportado que en células *in vitro* se produce un estado conocido como "arresto celular", que consiste en que el ciclo celular se detiene en alguna fase particular. Existe un arresto celular en la fase G₁ que puede ser reversible, dependiendo del contexto celular y del balance entre las señales extracelulares (Parde AB 1989). Dicho estado depende de la vía pRb, la cual inhibe la progresión del ciclo en ausencia de señales mitogénicas (Sherr ChJ 1995), por la presencia de señales antiproliferativas (Peter M *et al.* 1997) y de señales de diferenciación (Spinella M. *et al.* 1999). Los eventos previos a la fosforilación de pRb por D-CDK4 y D-CDK6, así como la síntesis de ciclinas D, dependen de la presencia de señales mitogénicas y pueden ser inhibidas por señales antiproliferativas que incrementan los niveles de CKI's. Sin embargo, después de la síntesis de productos de genes dependientes de factores E2F, la transición a la fase S se hace irreversible e independiente de señales extracelulares.

La mayor parte de los tipos de cáncer presentan anomalías en alguno de los componentes del punto de restricción, por lo que las células continúan su progresión a la fase S en forma descontrolada (Barkova J. *et al.* 1997; Bartek J. *et al.* 2001).

1.5 TRANSICIÓN G₁/S

Como se muestra en la figura 5, al final de la fase G₁ se incrementa la cantidad de ciclina E, y se forma el complejo "ciclina E/Cdk2" (E-CDK2) el cual regula la transición G₁/S de varias formas: a) contribuye a mantener fosforilado pRb, b) inicia la replicación de ADN, c) fosforila a las histonas, d) participa en la replicación de centrosomas, e) activa la degradación de p27^{KIP1}, f) autofosforila a ciclina E en Thr380, lo que la degrada (Keyomarsi K. *et al.* 1997; Sheaff R.J. *et al.* 1997). Como ya se señaló, a la mitad de la fase S, comienza a disminuir la cantidad de ciclina E, la Cdk2 queda libre y forma un complejo activo con la ciclina A (A-CDK2). Este complejo regula negativamente la transcripción dependiente de factores E2F. Como resultado disminuye la síntesis de ADN y la célula entra a la fase G₂ (Krek W. *et al.* 1995). La progresión del ciclo puede ser inhibida en cada fase a través de vías de señalización que se conocen como puntos de control, como se describe a continuación.

1.6 PUNTOS DE CONTROL (CHECKPOINTS) Y QUIMIOTERAPIA

Existen sistemas de control posteriores al punto de restricción que pueden inhibir la progresión del ciclo celular en respuesta al estrés genotóxico (O'Connor PM. *et al.* 1998; Kornbluth S. 2000). Como ya se mencionó, la fidelidad en la replicación del ADN y su correcta distribución durante la mitosis es una función primordial en el ciclo celular. Esto requiere de sistemas que verifiquen la correcta culminación de eventos como son las síntesis de ADN, la condensación de los cromosomas o la formación del huso mitótico. Los **puntos de control** (del inglés Checkpoints) son vías bioquímicas de señalización sensibles a varios tipos de defectos estructurales y funcionales del ADN y que activan múltiples respuestas celulares (para revisión ver Kornbluth S. 2000). En otras palabras, los puntos de control son alarmas de daño genotóxico que producen: inhibición de la progresión del celular (arresto celular), activan la maquinaria de reparación del ADN y si el daño es irreparable, inducen la muerte celular programada. Se ha descrito un punto de control en cada fase del ciclo. La mayor parte de las respuestas inducidas por los

sistemas de control son reguladas a través de la proteína p53 (Vogelstain B. *et al.* 2000; Ryan KM. *et al.* 2001).

Los principales agentes antineoplásicos empleados en la quimioterapia producen daño al ADN y como resultado, inhiben la progresión del ciclo celular en diferentes fases (ver tabla 1). Las mostazas nitrogenadas fueron los primeros compuestos que se emplearon como agentes antineoplásicos en el tratamiento de linfosarcoma, debido a sus efecto citotóxico en el tejido linfoide. Después se desarrollaron antimetabolitos, como los antagonistas del ácido fólico (metotrexato), análogos de pirimidina (fluorouracilo) y análogos de citosina (citarabidina). Más tarde se aislaron los alcaloides de la Vinca (*Vinca rosea Linn*) como los agentes antimitóticos (vincristina y vinblastina) y el paclitaxel. Posteriormente se desarrollaron otros agentes como los inhibidores de topoisomerasas, antiestrógenos, entre otros (Chabner BA. *et al.* 1996).

Originalmente se buscaban compuestos citotóxicos que inhibieran la proliferación celular en forma inespecífica. Posteriormente se buscaron agentes que actuaran selectivamente sobre blancos celulares más específicos. En los últimos 50 años, el estudio de las acciones de los agentes antineoplásicos en el ciclo celular, han permitido avanzar considerablemente en el conocimiento del funcionamiento celular. En el presente se busca activar a los puntos de control para detener la proliferación e inducir apoptosis (O'Connor PM. *et al.* 1998; Kornbluth S. 2000; DeVita VT. 1997).

Para incrementar la eficacia de los tratamientos, en la práctica clínica se administran en forma combinada agentes que actúen en distintas fases del ciclo celular (Johnson DG. *et al.* 1999; DeVita VT. 1997). Sin embargo, la eficacia de los tratamientos es limitada; la toxicidad de los agentes antineoplásicos es poco selectiva y daña a gran parte de células normales que se encuentran en proliferación (Shan MA. *et al.* 2001). Por otra parte, la combinación de agentes favorece la **resistencia múltiple a drogas mediada por la glicoproteína P**, en la

cual la concentración de los agentes disminuye en células tumorales (Sauna ZE. *et al.* 2001).

Tabla 1. Efectos y mecanismos de acción de agentes quimioterapéuticos en el ciclo celular.

AGENTE ANTINEOPLÁSICO	BLANCO FARMACOLÓGICO	EFEECTO EN EL CICLO CELULAR	MECANISMO DE ACCIÓN
Cisplatino y analogos (agentes alquilantes)	DNA	Arresto en G ₁ /S Arresto en S Arresto en G ₂ Apoptosis	Mediado por p53 a través de p21. Inhibe la replicación de ADN Se une a bases púricas de ADN a través de enlaces covalentes. Mediado por wee1/mik1 Producido por daño irreparable al ADN y mediados por Bcl2
Fluorouracilo (Antimetabólicos)	Enzimas involucradas en la síntesis de ADN	Arresto en S	Inhibe síntesis de ADN. Compite por las enzimas que sintetizan timidina 5'-monofosfato, limitando su síntesis.
Taxol Taxanos (inhibidores de microtúbulos)	Microtúbulos	Arresto G ₂ /M Arresto G ₁ Apoptosis	Promueve el ensamble de microtúbulos y estabilización de formación de polímeros de tubulina. ↓ Degradación de ciclina B1 ↓ Expresión de CDK4 Hiperfosforilación de Bcl-2. Fosforilación de c-Raf-1.
Camptotecina	Topoisomerasa I.	Arresto en G ₁ Arresto en fase G ₂	Mediado por incremento de p16. Estabiliza las uniones entre Topoisomerasa I y ADN.

Como se muestra en la tabla 1, cada agente puede producir efectos diferentes en distintas fases del ciclo celular. Esto puede deberse a uno o varios de los siguientes factores: (i) acción del fármaco mediante distintos mecanismos, (ii) el

punto de control activado depende de la magnitud del daño producido y/o (iii) características particulares de las estirpes celulares.

Las células tumorales presentan con frecuencia anomalías en las proteínas que regulan las vías de señalización de los puntos de control. Como resultado, no se producen arrestos celulares por daño genómico, lo que favorece la selección de las clonas mutantes resistentes a los tratamientos. El funcionamiento ineficaz de los puntos de control conduce a la acumulación de mutaciones y aberraciones cromosomales que incrementan la probabilidad de desarrollo de neoplasias malignas (Barkova J. *et al.* 1997; Bartek J. *et al.* 2001). La inestabilidad genética es una característica de células neoplásicas y está asociada a anomalías en el funcionamiento de los puntos de control (Weinert T. *et al.* 1993).

1.7 NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS

Las nuevas estrategias terapéuticas buscan desarrollar agentes que actúen selectivamente en los efectores clave del ciclo celular, como las CDK's y las ciclinas (McDonald RB. *et al.* 2002). También buscan activar con mayor selectividad a p53 e inducir su efecto pro-apoptótico en células de tumores radiados o expuestos a agentes citotóxicos (Blagosklonny MV. 2002).

Como ya se mencionó, una característica común de las células malignas es la pérdida del control del ciclo celular, principalmente en los elementos que conforman el punto de restricción y el punto de control G1.

La inhibición química de E-CDK2 es un blanco farmacológico que se ha explorado en los últimos años. Diversos agentes, como son la olomuncina, la roscovitina y el flavopiridol inhiben la actividad cinasa uniéndose a los sitios de ATP de cdk2 (Hardcastle IR. *et al.* 2002). De estos agentes, el flavopiridol se encuentra en fases clínicas de experimentación en humanos (Sausville EA. 2002) y se combina con otros agentes antineoplásicos como el cisplatino (Shan MA. *et al.* 2001). Se ha

observado que dicha asociación, bajo ciertas condiciones, puede incrementar la toxicidad en células tumorales en cultivo y en pacientes con varios tipos de cáncer.

En reportes recientes se han descrito inhibidores químicos de cdk4, cuya eficacia en los tratamientos antineoplásicos en humanos aún no se ha evaluado (Toogood PL. 2001).

1.8 CUMARINA

La cumarina es un producto natural que se encuentra en gran variedad de plantas, frutas y algunos microorganismos (Gary J. *et al.* 1997; Murray RDH: *et al.* 1982). Está presente en el té verde, la soya y la canela. Se encuentra particularmente en altas concentraciones en aceites esenciales como el de lavanda y el de acacia (Lake BG. 1999).

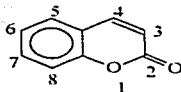


Figura 7. Estructura química de la cumarina

La cumarina (1,2 benzopirona) está formada por un anillo bencénico y un anillo heterocíclico tipo lactona. En 1820 Vogel la aisló por primera vez del haba de Tonka (*coumarona odorata*) de la Guayana. En 1868 W.H. Perkin la obtuvo por síntesis química (Murria RDB. 1982). Debido a su aroma agradable, este compuesto se utiliza en la industria de cosméticos y de perfumería (Cohen AJ. 1974; Egan D. *et al.* 1990). Se ha calculado que el consumo promedio humano de cumarina, por dieta y por uso de cosméticos y fragancias, es aproximadamente de 0.06 mg/Kg/día (Lake BG. 1999).

1.8.1 ACCIONES FARMACOLÓGICAS DE CUMARINAS

Existen diferentes compuestos cumarínicos con diferentes actividades farmacológicas, como son inhibidores de la topoisomerasa IV (novobiocina y cumericina), inhibidores de ciclooxigenasa (5,7-dihidroxi 4-metilcumarina), inhibidores de lipooxigenasa (7,8-dihidroxi 4-metilcumarina), antioxidantes (6,7 dihidroximetil 4-metilcumarina) y anticoagulantes (warfarina) (Fournier B. *et al.* 1998; Hoult JRS. *et al.* 1996; Mayerus PW. *et al.* 2000).

La warfarina es el derivado cumarínico más usado con fines anticoagulantes en la clínica (Majerus PW. *et al.* 2000). Su efecto anticoagulante se debe a la inhibición del ciclo de la vitamina K (figura 8).

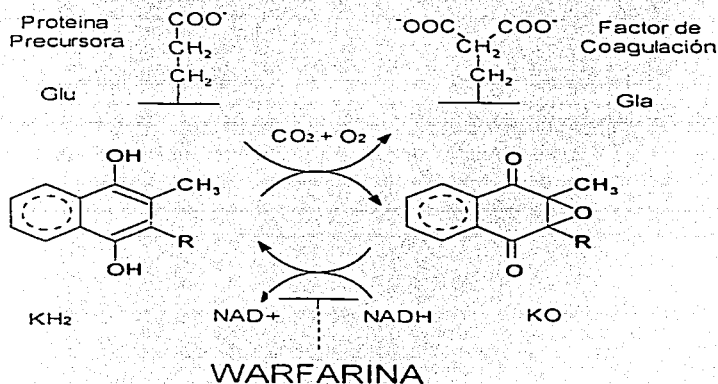


Figura 8. Ciclo de la vitamina K: la carboxilación del glutamato (Glu) de proteínas precursoras de los factores de coagulación a γ -carboxilglutamato (Gla).

La actividad biológica de los factores de la coagulación II, VII, IX y X depende de sus capacidad de unir Ca^{2+} , a través de 12 residuos de γ -carboxilglutamato. La vitamina K se requiere para la formación de dichos residuos γ -carboxilglutamato. Como se observa en la figura 8, estos residuos se forman a través de la carboxilación de ácido glutámico, en una reacción que está acoplada con la oxidación de la vitamina K (KH_2) a su forma de epóxido (KO). La reducción del epóxido KO a la forma activa KH_2 requiere de un sistema de reductasas que puede ser inhibido por la warfarina.

Se ha observado que la warfarina, en combinación con otros tratamientos, disminuye el número de metástasis y alarga al doble el tiempo de sobrevida de pacientes con varios tipos de cáncer (Thornes RD. 1975; Zacharski LR. 1981). La actividad antineoplásica de la warfarina es independiente de su efecto anticoagulante. En modelos animales se ha demostrado que la administración de vitamina K o de factores de la coagulación antagonizan el efecto anticoagulante de la warfarina, pero no afectan la actividad antineoplásica (Maat B. *et al.* 1981). Por otra parte, la cumarina, por no tener actividad anticoagulante puede ser utilizada en dosis mayores en humanos. En estudios multicéntricos se ha observado que disminuye el desarrollo de carcinoma de próstata (Moler JL. *et al.* 1992; Marshall ME. *et al.* 1990; Moler JL. *et al.* 1994), carcinoma renal (Marshall ME. *et al.* 1987; Deux FH. *et al.* 1990) y previene la recurrencia de melanoma maligno (Thornes RD. *et al.* 1982; Marshall ME. *et al.* 1989; Thornes RD. *et al.* 1994). Se han descrito acciones citostáticas, inmunomoduladoras y antimetastásicas de la cumarina, pero se desconocen los mecanismos de acción de estos efectos (Gary J. *et al.* 1997).

1.8.2 BIOTRANSFORMACIÓN Y TOXICIDAD DE LA CUMARINA

En estudios, tanto *in vivo* como *in vitro*, se ha observado que la cumarina es hidroxilada a 3-, 4-, 5-, 6-, 7- y 8-monohidroxicumarinas (Shilling WH. *et al.* 1969; Irsel MPLS. *et al.* 1994). Además, la lactona puede ser hidrolizada y sufrir otras

transformaciones que originan o-hidroxifenilacetaldehído, o-hidroxifeniletanol y ácido o-hidroxifenilpropiónico. Estos productos de biotransformación pueden ser acetilados, metilados, conjugados (glucurónidos, sulfatos) o sufrir otras biotransformaciones. Se ha descrito que algunos de estos productos tienen vidas medias considerablemente mayores a la de la cumarina (Shilling WH. *et al.* 1969), y podrían ser responsables de las acciones biológicas que se observan *in vivo*.

Diferentes especies animales biotransforman la cumarina por distintas vías metabólicas, originando importantes diferencias en la proporción de sus metabolitos (Endell W. *et al.* 1978; Pearce R. *et al.* 1992; Pelkonen O. *et al.* 1993; Pelkonen O. *et al.* 1997; Fentman JH. *et al.* 1993).

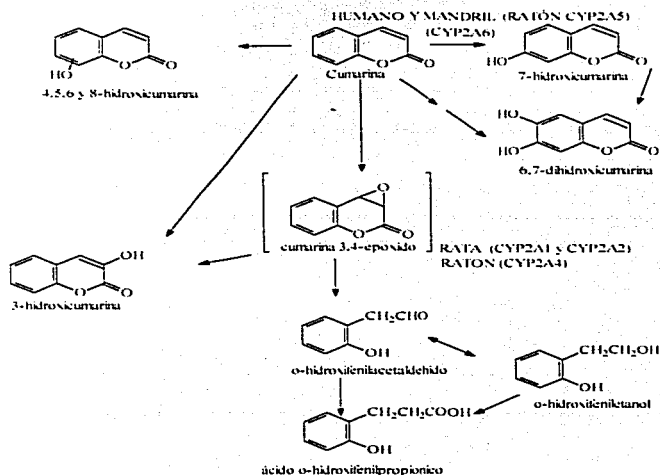


Figura 9. Vías metabólicas de la cumarina en el humano, en el ratón y en la rata.

En primates como el mandrill y el humano, la vida media de la cumarina es breve (1-1.5 horas), y 68 a 92 % de la cumarina es biotransformada a 7-hidroxycumarina (Shilling WH. *et al.* 1969). Esta hidroxilación es catalizada por la isoforma CYP2A6 del citocromo P450 (Pelkonen O. *et al.* 2000). En el ratón y el hamster, esta reacción es catalizada por la isoforma CYP2A5 del citocromo P450 (Lake BG 1999; Zhuo X. *et al.* 1999).

En la rata, el 19% de la cumarina es transformada principalmente a 3-hidroxycumarina y o-hidroxifenilacetaldehído (Pearce R. *et al.* 1992; Pelkonen O. *et al.* 1993).

La toxicidad de la cumarina varía importantemente en las diferentes especies animales (Pelkonen O. *et al.* 1992 y 1997) (figura 9). En el humano la cumarina es poco tóxica (Cox D. *et al.* 1989; Lake BG. 1999) y en estudios multicéntricos se ha observado que hasta 7 g diarios sólo producen efectos adversos de poca importancia, que son reversibles al suspender el tratamiento (Marshall ME. *et al.* 1991). En cambio, en la rata y el ratón se ha observado que la cumarina tiene importantes efectos hepatotóxicos (Pearce R. *et al.* 1992; Fentem JH. *et al.* 1993). Las diferencias de toxicidad también se atribuyen a los metabolitos que resultan de las diferentes vías de biotransformación.

1.8.4. EFECTOS CITOSTÁTICOS DE LA CUMARINA Y LA 7-HIDROXICUMARINA.

La cumarina y la 7-hidroxycumarina inhiben el crecimiento de varias líneas celulares (Marshall ME. *et al.* 1994; López-González JS. *et al.* 1998; Jiménez-Orozco FA. *et al.* 1999; ver tabla 2), incluyendo los adenocarcinomas humanos de pulmón A-549, SK-LU, A-427, 1.3.15 y 3A5A. La actividad citostática de la 7-hidroxycumarina es mayor que la de la cumarina y al ser conjugada con glucuronato pierde dicha actividad (Weber US. *et al.* 1998).

Tabla 2. Líneas celulares dónde se ha evaluado el efecto citostático de compuestos cumarínicos.

NOMBRE DE LA LINEA CELULAR	TIPO	REFERENCIA
ACHN	Carcinoma renal humano	Marshall ME. <i>et al.</i> 1994.
Caki-2	Carcinoma renal humano	Marshall ME. <i>et al.</i> 1994
A-498	Carcinoma renal humano	Finn GJ. <i>et al.</i> 2002
HK-2	Células del túbulo proximal humano	Finn GJ. <i>et al.</i> 2002
LNCaP	Carcinoma de próstata humano	Marshall ME. <i>et al.</i> 1994
PC-3	Carcinoma de próstata humano	Marshall ME. <i>et al.</i> 1994
A-549	Adenocarcinoma pulmonar humano	Marshall ME. <i>et al.</i> 1994
SK-LU-1	Adenocarcinoma pulmonar humano	Lopez JS. <i>et al.</i> 2000
13.15	Adenocarcinoma pulmonar humano	Lopez JS. <i>et al.</i> 2000
3A5A	Adenocarcinoma pulmonar humano	Lopez JS. <i>et al.</i> 2000
HCT-15	Carcinoma de colon humano	Marshall ME. <i>et al.</i> 1994
COLO-232	Carcinoma de colon humano	Marshall ME. <i>et al.</i> 1994
Caco-2	Carcinoma de colon humano	Weber US. <i>et al.</i> 1998
TGBC11TKB	Linfoma metastatizado de cáncer gástrico	Kawai S. <i>et al.</i> 2001
Hep G2	Hepatoma humano	Weber US. <i>et al.</i> 1998
CCRF-CÉM	Linfoblastoma humano	Weber US. <i>et al.</i> 1998
Dakiki	Mieloma (Ig A) humano	Marshall ME. <i>et al.</i> 1994
HS-Sultan	Mieloma (IgG) humano	Marshall ME. <i>et al.</i> 1994
RP-1788	Mieloma humano	Marshall ME. <i>et al.</i> 1994
K562	Eritroleucemia humana	Marshall ME. <i>et al.</i> 1994
HL-60	Linfoma humano	Marshall ME. <i>et al.</i> 1994
CCRF-HSB-2	Leucemia humana de células T	Kawai S. <i>et al.</i> 2001
SK-MEL-31	Melanoma maligno humano	Finn GJ. <i>et al.</i> 2001
HS613 SK	Células normales de piel	Finn GJ. <i>et al.</i> 2001
B16	Melanoma murino	Jiménez FA. <i>et al.</i> 1999

Los efectos celulares de estas cumarinas han sido estudiados en algunos modelos experimentales; pero los resultados obtenidos no permiten inferir el mecanismo de su acción citostática. Fibroblastos de rata de la línea 14C transfectados con vectores que contienen las secuencias del oncogen ras (MTV-Ejras) al ser inducidas con dexametasona, expresan la oncoproteína p21^{ras} (Tseng A. *et al.* 1987). Dicha expresión, produce *in vitro* cambios morfológicos e *in vivo* forma tumores en ratas singénicas. En este modelo se ha observado que, en células inducidas por dexametasona, la cumarina disminuye la expresión de la oncoproteína p21^{ras} y el número de células en la fase S del ciclo celular (Kahn J. *et al.* 1994). No se observan efectos de la cumarina en células no tratadas con dexametasona.

En fibroblastos murinos NIH 3T3 transfectados con vectores virales que contienen los oncogenes v-Ha-ras y c-myc, la 7-hidroxicumarina inhibe la síntesis del RNA mensajero de dichos oncogenes (Seliger B. *et al.* 1994). En otros estudios, en células de carcinoma de rata RBA se ha observado que la 7-hidroxicumarina afecta poco los niveles de la proteína p21^{ras}. En estas células, al ser estimuladas con fitohemaglutinina (PHA), se ha observado un incremento en la motilidad celular y en la actividad GTPasa de la proteína p21^{ras}. Bajo este estímulo, la 7-hidroxicumarina disminuye tanto la motilidad celular, como la actividad GTPasa de p21^{ras}. En células no estimuladas con PHA, la 7-hidroxicumarina no produce efectos (Lu H.Q. *et al.* 1996).

2 JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Se desconocen los mecanismos de acción de la cumarina y de la 7-hidroxicumarina. La actividad citostática de estos compuestos en una gran variedad de líneas celulares, sugiere que actúan sobre procesos generales de proliferación de células neoplásicas. Por ello, se estudió el efecto en la progresión del ciclo celular.

El patrón temporal de la expresión de ciclinas ha sido usado, junto con los marcadores tradicionales de replicación de ADN y de mitosis, para localizar con mayor precisión eventos en el ciclo celular. Esto es útil en el estudio de mecanismos de acción de agentes antitumorales (Gong J. *et al.* 1994; Darzynkiewicz Z. *et al.* 1994 y 1996). Con esta metodología y con ensayos de incorporación de BrdU, estudiamos el efecto de cumarina y 7-hidroxicumarina en la progresión del ciclo celular de la línea celular A427, de adenocarcinoma pulmonar humano.

Con base en los resultados previos, para esta investigación se eligieron las ciclinas D1, E y A por estar involucradas respectivamente en la progresión de la fase G1, en la transición G1/S, y en la fase S. De las ciclinas D se eligió la D1 por presentar importantes anormalidades en muchos tipos de cáncer (Bartkova J. *et al.* 1997; Bartek J. *et al.* 2001). Por otra parte, la ciclina D1 se expresa principalmente en células epiteliales y conjuntivas, mientras que las ciclinas D2 y D3 se expresan preferentemente en las células del sistema inmune (Ajchenbaum F. *et al.* 1993).

En México, de acuerdo con la Dirección General de Estadística del INEGI, S.S.A., los tumores malignos fueron la segunda causa de muerte en el año 1997. Entre estos, los principales son los tumores broncogénicos, con una tasa de 6.7 por 100 000 habitantes. Por esta razón se eligió la línea celular A-427 de adenocarcinoma pulmonar humano, que representa el tipo histológico más frecuente (30 a 40 %) en México y Estados Unidos (Medina Morales F. *et al.* 1996; Lazcano Ponce EC. *et al.* 1997).

2.1 HIPÓTESIS:

Los efectos citostáticos de la cumarina y la 7-hidroxycumarina en la línea celular A427, se deben a la inhibición de la progresión del ciclo celular. Esto es el resultado de (i) la inhibición de alguna fase del ciclo celular y de (ii) la disminución de alguna ciclina.

2.2 OBJETIVO GENERAL.

Determinar el mecanismo de los efectos citostáticos de la cumarina y la 7-hidroxycumarina en la línea celular de adenocarcinoma pulmonar humano A427.

2.2.1 OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar qué fase del ciclo celular es inhibida por la cumarina y la 7-hidroxycumarina, mediante histogramas de ADN y análisis bivariante con PI y BrdU.

Determinar si alguna(s) ciclina(s) disminuye(n) por la exposición a la cumarina y la 7-hidroxycumarina.

3 MATERIAL Y MÉTODO

3.1 REACTIVOS

La cumarina y la 7-hidroxycumarina (Aldrich Chemical Co. Milwaukee, WI, USA) se disolvieron en etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Germany). El medio RPMI 1640, suero fetal bovino, MTT (bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio), yoduro de propidio, RNasa A, glicina y bórax se obtuvieron de Sigma Chemical (St Louis, MO). *In Situ* Cell Proliferation kit de Roche (Mannheim, Germany). Los oligos dT y el inhibidor de RNasa, también se obtuvieron de Roche (Mannheim, Germany).

El reactivo de TRIZOL, la DNasa I, la transcriptasa reversa, la DNA *Taq* polimerasa y los dNTP fueron obtenidos de Gibco (BRL, USA-life technologies Inc. Gaithersburg, MD).

3.2 ANTICUERPOS.

Los siguientes anticuerpos monoclonales (aM) están conjugados a isotiocianato de fluoresceína (FITC) y se obtuvieron de PharMingen (San Diego, CA, USA): aM que reconoce a las ciclinas D1 (ratón IgG1, clona G124-326), aM que reconoce ciclina A (ratón IgE, clona BF683), al igual que los controles de isotipo correspondientes para cada aM, que fueron proporcionados por el proveedor.

La detección de ciclina E se realizó a través de una tinción indirecta. Como anticuerpo primario se utilizó un aM de ratón anti ciclina E (IgG_{2b}, clona HE67, PharMingen). Como control de isotipo, se empleó un aM de ratón que no reconoce ciclina E (IgG_{2b}, clona 3F3), (Serotec, Oxford, UK). Como anticuerpo secundario, se empleó el aM de rata IgG_{2b} (clona R12-3, PharMingen), conjugado a FITC.

3.3 LÍNEA CELULAR

La línea celular del adenocarcinoma pulmonar humano A-427 fue generosamente obsequiada por el Dr. José Sullivan López Gonzalez, quien la obtuvo directamente de la American Type Culture Collection (ATCC Rockville, MD USA). Esta línea se generó de un individuo caucásico masculino de 52 años de edad (Girad DJ. *et al.* 1973). Estas células expresan proteína pRB funcional y tienen deleciones homocigotas en el gen de p16INK4A (Shapiro GI. *et al.* 1995).

La línea celular se creció en medio RPMI 1640 con complemento inactivado por calor y suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Las células se incubaron en atmósfera húmeda, a 37 °C y con 5% de inyección de CO₂. La viabilidad celular, que se determinó por exclusión del azul de tripan, siempre excedió el 95 %.

Para ensayos de citometría de flujo y RT-PCR, se sembraron células (10⁶) en 20 ml de medio, en botellas de cultivo de 175 cm² (Nunc, Denmark) y se crecieron asincrónica y exponencialmente. Las células se incubaron con los compuestos por 24, 48 y 72 horas. La concentración de etanol en el medio fue de 0.5 % (v/v), y no afectó el crecimiento de las células control. Para las exposiciones de 48 y 72 horas, a la botella respectiva cada día se agregó 10 ml de medio que contenían los compuestos probados. Cada ensayo se realizó tres veces.

3.4 ANÁLISIS DE ADN POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Las células se cosecharon usando 0.25 % de tripsina y se lavaron como se describe a continuación: el botón celular fue resuspendido en 5 ml de PBS, se centrifugó a 400 X g por 5 minutos y el sobrenadante se eliminó. Para estabilizar el ADN, las células se fijaron en etanol al 80 % (v/v) y se incubaron a -20 °C por 24 horas. Al término de la fijación, las células fueron centrifugadas a 1000 X g, el botón de células se lavó con PBS y fue resuspendido en una solución que contenía 0.5 % de RNAsa A y 1 µg/ml de yoduro de propidio en PBS. Después de

30 minutos de incubación en obscuridad a 4 °C, las muestras se analizaron por citometría de flujo con el FACScalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA). El análisis del ciclo celular se realizó con el programa Modfit (Version 2.0).

3.5 INCORPORACIÓN DE BrdU

Después de los tiempos de exposición a los compuestos, las células se incubaron con 10 µM de BrdU por 30 minutos y se cosecharon usando tripsina al 0.25 %. El botón de células se lavó dos veces con PBS y se resuspendió en 1 ml de PBS. La suspensión de células se diluyó en 5 ml de solución 3:7 (v/v) de 50 mM de glicina y etanol al 70 %, y se incubó a -20 °C por 24 horas. Al término de la fijación, las células se lavaron con PBS, y se resuspendieron en 500 µl de HCl al 4N y se incubaron a temperatura ambiente por 20 minutos. La suspensión se neutralizó con 5 ml de solución 2 M de bórax y se lavó dos veces con PBS. Las células se resuspendieron en 100 µl de solución PBS que contenía 0.5 % de (v/v) de Tween 20, 0.5 % (p/v) BSA y el aM que reconoce a la BrdU y que está conjugado a FITC (1:10 v/v). La suspensión se incubó en oscuridad, a temperatura ambiente y después de una hora se lavaron dos veces. Las células se incubaron, en la oscuridad a 4 °C por 20 minutos, en 500 µl de solución FACScflow con 1 mg/ml de yoduro propidio y 50 mg/ml de RNAasa A. Las muestras se analizaron usando el citómetro de flujo FACScalibur.

3.6 DETECCIÓN DE CLINAS

Después de la incubación con el compuesto respectivo, las células se cosecharon con tripsina al 0.25 % y se lavaron dos veces con PBS. Para estabilizar las ciclinas, las células se fijaron en 5 ml de solución PBS al 1% de formaldehído libre de metanol, por 15 minutos a 4 °C y se lavaron dos veces con PBS. Después de este tratamiento, para estabilizar el ADN, las células se fijaron en 80 % de etanol y se incubaron a -20 °C por 24 horas. Las células se lavaron dos veces con PBS centrifugadas a 400 X g por 5 minutos. Para permeabilizar las membranas, el

botón celular se incubó en solución de Tritón X-100 al 0.25 % (v/v) en PBS, a temperatura ambiente por 10 minutos.

Para detectar las ciclinas D1 y A, las células se lavaron nuevamente y se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente en presencia del aM-FITC correspondiente. Como control de fluorescencia, otras células de cada tratamiento se incubaron con los aM de control de isotipo correspondiente. Los anticuerpos se diluyeron (1:10) en PBS con albúmina de suero bovino (BSA) al 1% (w/v).

Para la detección de ciclina E, las células se incubaron 2 horas en presencia del aM de ratón que reconoce a la ciclina E, la cual se diluyó 1:100 en solución PBS con BSA al 1 % (w/v). Las células fueron lavadas e incubadas con el aM-FITC secundario (1:4000) por 1 hora, a temperatura ambiente. El aM de control de isotipo fue diluido 1:100 en PBS con BSA al 1% (w/v).

Para medir el DNA, las células fueron resuspendidas en 0.5 ml de solución FACSflow al 0.1% de RNAasa A y 1 µg/ml de yoduro de propidio. Después de 30 minutos de incubación, a temperatura ambiente y en oscuridad, las células fueron analizadas en el citómetro de flujo (FACSscalibur) de acuerdo con los protocolos de Darzynkiewicz y Gong (Darzynkiewicz Z. *et al.* 1994 y 1996; Gong J. *et al.* 1994). El porcentaje de células que expresan cada ciclina se estimó de la siguiente manera: las células de cada tratamiento se dividieron en dos alícuotas; una de ellas se incubó con el anticuerpo que reconoce a la ciclina y la otra con el anticuerpo de control de isotipo. A la fluorescencia de las células incubadas con el anticuerpo de la ciclina, se le restó la fluorescencia de las células incubadas con el anticuerpo de isotipo. Es decir, la señal de las células que expresan una determinada ciclina se desplazan hacia arriba de la gráfica; dichas células aparecen por encima del recuadro que encierra a las células incubadas con el anticuerpo de isotipo (ver figuras 10, 15 y 16A). Cada experimento se realizó por triplicado y los valores promedio (\pm e. e. m) se muestran en las figuras 16B, 18 y 19.

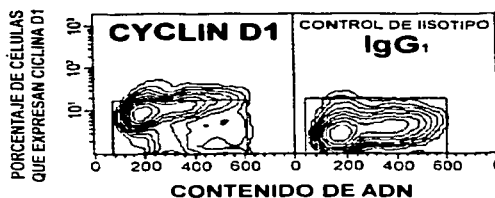


Figura 10. Estimación del porcentaje de células que expresan ciclina D1.

3.7 REACCIÓN DE LA TRANSCRIPTASA REVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR).

Después de la exposición a los compuestos, el RNA total de las células se extrajo con el TRIZOL de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El cDNA se obtuvo mediante la transcripción reversa del RNA total. La muestra total de RNA (1.0 µg) se transfirió a tubos para PCR, de 0.2 ml de volumen y se agregó buffer para PCR (20 mM de Tris-HCl, pH 8.4; 50 mM de KCl), 6.6 mM de MgCl₂, 5.4 mM de dNTP's, 9.6 U de inhibidor de RNAsa, 0.08 µg de oligos dT, 6.6 mM DTT y 48 U M-MLV de enzima transcriptasa reversa. Los tubos se incubaron a 42°C durante 60 min.

La reacción de amplificación se realizó en el equipo de "Touchdown, Hybaid Termical Cycler" empleando el siguiente protocolo. La reacción de amplificación se realizó en una mezcla de PCR que contenía 1.7 mM de MgCl₂, 1.5 U de Taq DNA polimerasa y 10 pMoles de cada iniciador en un volumen total de 50 µl. Después del paso de desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, se corrieron por un total de 30 ciclos en las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C por 50 seg, templación a 60°C por 50 seg y elongación a 72°C por 50 seg, y un ciclo final de elongación de 7 min a 72°C. Los iniciadores para la ciclina D1 y para la beta actina se describen a continuación.

TAMAÑO DEL FRAGMENTO	SENTIDO	ANTISENTIDO	REFEREN.
Cyclina D1 323 pb	5'-GGCAACGG- AGGTCTGCG-3'	5'-GTCGGTGTAGAT- GCACAGCTT-3'	Xiong 1991
Beta actina 218 pb	5'-GGGTCAGAA- GGATTCCTATG-3'	5'-GGTCTCAAAC- ATGATCTGGG-3'	Ponte 1984

Se corrieron 10 µl de producto de PCR en gel de agarosa al 2%, en una cámara horizontal para electroforesis (Gibco), por 40 minutos a corriente constante de 80 V. Simultáneamente se corrió un marcador de pesos moleculares (Gibco) para estimar el tamaño de los productos de amplificación. Al terminar la electroforesis, la muestra se reveló mediante tinción con bromuro de etidio y se expuso a luz ultravioleta.

3.8 ENSAYO DE VIABILIDAD POR REDUCCIÓN DE METILTETRAZOLIO (MTT)

El efecto citostático de los compuestos se estimó con base en el ensayo colorimétrico de reducción de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio) (Mossmann T 1983). Este ensayo se basa en la capacidad de células vivas de reducir la sal de MTT, que es hidrosoluble y de color amarillo, a formazán de MTT (1-[4,5-dimetiltiazol-2-il]3-3,5-difenilformazán), que es hidrofóbica y de color púrpura (figura 11). La absorbancia del formazán de MTT es proporcional al número de células vivas.

Después de la exposición a los fármacos, las células son incubadas con MTT (0.05 %) por 2 horas; al término de la incubación se retira el sobrenadante. Los cristales de formazán de MTT, que permanece en las mitocondrias de las células,

se solubilizan en dimetilsulfóxido (DMSO). La absorbancia de esta solución se mide espectrofotométricamente en el lector de microplacas (Biotek EK11) a una longitud de onda de 570 nm.

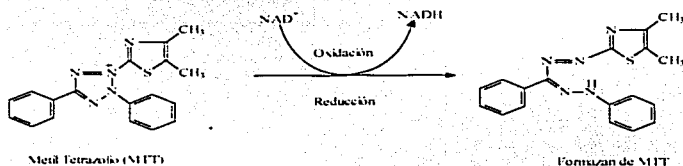


Figura 11. Reducción del Metil Tetrazolio a Formazán.

De cada compuesto se evaluaron 6 concentraciones en rangos de 10 a 320 $\mu\text{g/ml}$ ($n=6$ para cada concentración). Las células se sembraron (5×10^3 /pozo) en placas de 96 pozos (Nunc, Denmark), fueron expuestas por 72 horas a los fármacos y al término de la exposición se estimó el número de células viables para cada concentración. El porcentaje de proliferación de las células tratadas se estimó con respecto a las células control que fueron expuestas sólo al disolvente (etanol 2%). La concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) de cada compuesto se calculó mediante curvas concentración-respuesta.

4. RESULTADOS

4.1 EFECTO CITOSTÁTICO

La actividad citostática de la 7-hidroxicumarina fue mayor a la de cumarina. La concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) a 72 horas de exposición fue de $100 \pm 4.8 \mu\text{g/ml}$ ($n = 3$) para la 7-hidroxicumarina y de $257 \pm 8.8 \mu\text{g/ml}$ ($n = 3$) para la cumarina (ver figura 12).

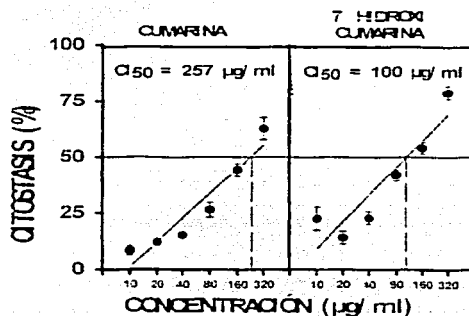


Figura 12. Concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de cumarina y 7-hidroxicumarina (7-HC) a 72 horas de exposición.

4.2. EFECTO EN EL CICLO CELULAR ESTIMADO POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Con base en los resultados del efecto citostático de cumarina y 7-hidroxicumarina, se estudiaron las acciones de ambos compuestos en el ciclo celular a tres tiempos de exposición (24, 48 y 72 horas) y a concentraciones de 160 y 80 µg/ml (aproximadamente 1 mM y 0.5 mM).

4.2.1 HISTOGRAMAS DE ADN

En la figura 13 se presentan histogramas correspondientes al número de células contadas (eventos) con diferentes contenidos de ADN y que corresponden a diferentes fases del ciclo celular. También se señalan los porcentajes de células en las diferentes fases. El primer pico corresponde a las células en la fase G₁, el segundo pico corresponde a las células en la fase G₂/M y la meseta entre ambos picos corresponde a las células en la fase S. A la concentración de 160 µg/ml, la 7-hidroxycumarina produjo pequeños incrementos en el porcentaje de células en la fase G₁, y una disminución en el porcentaje de células en la fase S. El efecto fue más evidente a las 72 horas de exposición. La cumarina no tuvo efectos apreciables. Estas diferencias se confirmaron por análisis bivariante como se describe en el siguiente párrafo.

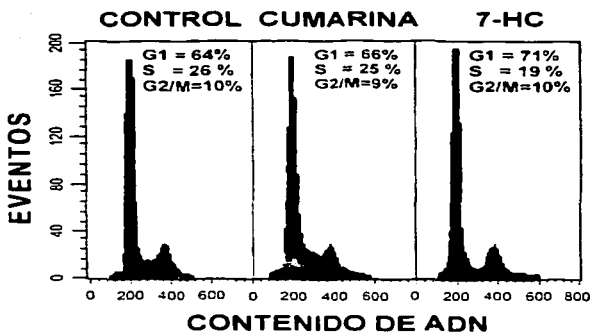


Figura 13. Histogramas de ADN de células expuestas por 72 horas a cumarina o 7-hidroxycumarina, a concentración de 160 µg/ml

4.2.2 ANÁLISIS BIVARIANTE

La disminución del porcentaje de células en la fase S se estimó evaluando simultáneamente el contenido de ADN (por tinción de yoduro de propidio) y por la incorporación de bromo-desoxiuridina (BrdU). La BrdU es un análogo de la timidina y es incorporada al ADN en las células que se encuentran en la fase S del ciclo celular. En las gráficas de la figura 14, se observa que la señal correspondiente al porcentaje de células en fase S está en la parte superior de la gráfica.

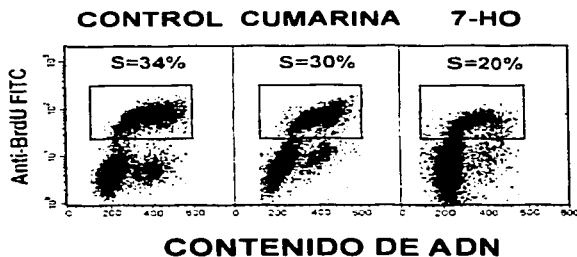


Figura 14 Análisis Bivariante de la fase S. Porcentaje de células en la fase S después de exposición a cumarina o 7-hidroxycumarina por 72 horas, a concentración de 160 $\mu\text{g/ml}$

La exposición a la 7-hidroxycumarina (por 72 horas a 160 $\mu\text{g/ml}$) disminuyó el porcentaje de células en la fase S; en las células control fue de 34 % y en las células tratadas con 7-hidroxycumarina fue de 20 %. A exposiciones más cortas y a la concentración de 80 $\mu\text{g/ml}$ no se observaron cambios. La cumarina sólo produjo a las 72 horas de exposición, decrementos no significativos en el porcentaje de células en fase S.

4. 3 PATRONES DE EXPRESIÓN DE CICLINAS

En varias líneas tumorales malignas el patrón de expresión de ciclinas es anormal (ectópico), es decir, dichas ciclinas se expresan durante todo el ciclo celular y no sólo en fases específicas, lo que da por resultado la pérdida del control del ciclo celular (Darzynkiewicz Z. *et al.* 1994 y 1996; Gong J. *et al.* 1994). En las gráficas superiores de la figura 15, se observa la expresión de las ciclinas a lo largo del ciclo celular. En las gráficas inferiores se observa que la señal de las células incubadas con el anticuerpo de isotipo (fluorescencia basal) se encuentra en el recuadro. La fluorescencia de las células que expresan cada ciclina es la señal que se desplaza por arriba del recuadro de la fluorescencia basal (ver página 31). De acuerdo con nuestras observaciones, en la línea celular A-427, la ciclina A se expresó en la fase S y G₂, de acuerdo con el patrón normal. En contraste, la ciclina D1 y la ciclina E se expresaron a lo largo de todo el ciclo, y no sólo en la fase G₁ y en la transición G₁-S, respectivamente.

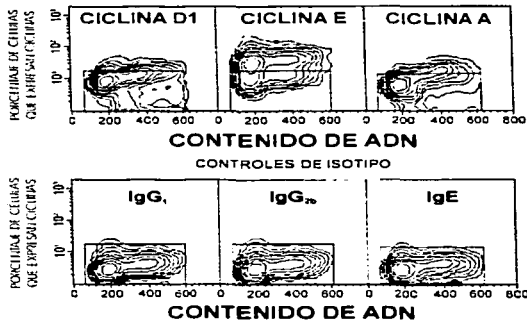


Figura 15. Expresión de ciclina D1, ciclina E y ciclina A en células control del adenocarcinoma humano de pulmón A427.

4.4 EFECTO DE CUMARINAS EN LA EXPRESIÓN DE CICLINAS

A concentración de 80 $\mu\text{g/ml}$ de cumarina y 7-hidroxicumarina no se observó cambio en el porcentaje de expresión de ninguna de las ciclinas. A concentraciones de 160 $\mu\text{g/ml}$, a 24, 48 y 72 horas de exposición, se observaron los siguientes efectos:

CICLINA D1

La exposición por 72 horas a la 7-hidroxicumarina disminuyó a sólo 3% el porcentaje de células que expresaban ciclina D1 ($p < 0.05$); mientras que en el grupo control se expresó en 35 % (figura 15B). La cantidad del RNA mensajero de la ciclina D1 se estimó por RT-PCR y como se observa en la figura 17, la intensidad de la banda no cambia en ninguna condición. La exposición por 24 horas no afectó el porcentaje de células que expresaban ciclina D1 (figura 16 A). La exposición a 48 horas disminuyó dicho porcentaje a la mitad del valor control, aunque la diferencia no llegó a ser estadísticamente significativa (figura 16 B).

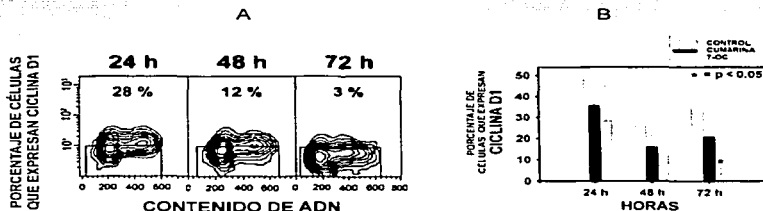


Figura 16. (A) Porcentaje de células que expresan ciclina D1, después de la exposición a 7-hidroxicumarina a 24, 48 y 72 horas y a la concentración de 160 $\mu\text{g/ml}$. (B) Promedio del porcentaje de células que expresan ciclina D1 después de la exposición a cumarina o a 7-hidroxicumarina a concentración de 160 $\mu\text{g/ml}$ ($n = 3$).

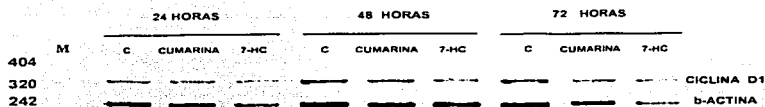


Figura 17. Determinación del ARN mensajero de ciclina D1 después de exposición a cumarina o a 7-hidroxycumarina por 24, 48 y 72 horas, a concentración de 160 µg/ml.

La exposición a la cumarina por 24 horas, no alteró el porcentaje de células que expresaron ciclina D1. Exposiciones a 48 y 72 horas disminuyeron dicho porcentaje con respecto al control. Estas reducciones no llegaron a ser estadísticamente significativas.

CICLINA E:

El porcentaje de células que expresaron ciclina E no fue afectado por la exposición a los compuestos (figura 18).

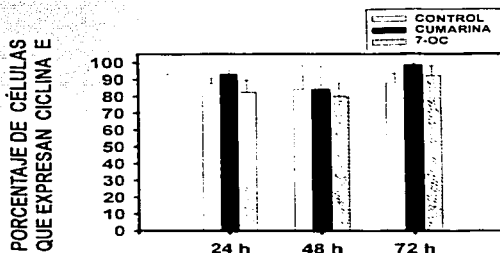


Figura 18. Promedio del porcentaje de células que expresan ciclina E después de la exposición a cumarina o a 7-hidroxycumarina a concentración de 160 µg/ml (n = 3).

CICLINA A:

Las exposiciones a la 7-hidroxicumarina por 48 y 72 horas, disminuyeron el porcentaje de células que expresaron ciclina A. Este efecto no alcanzó significancia estadística (figura 19).

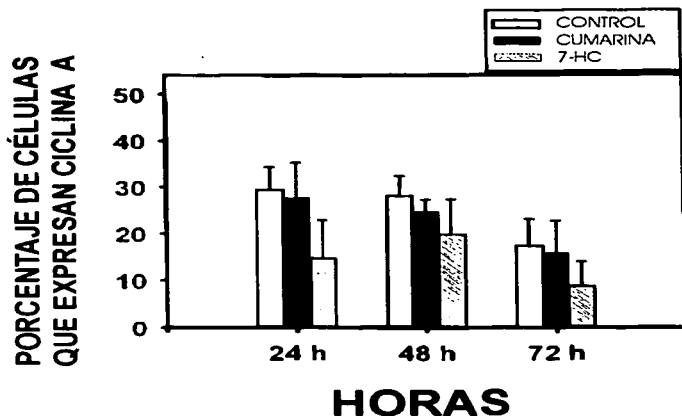


Figura 19. Promedio del porcentaje de células que expresan ciclina A después de la exposición a cumarina o a 7-hidroxicumarina a concentración de 160 $\mu\text{g/ml}$ ($n = 3$).

5 ESTUDIOS POSTERIORES

En un trabajo posterior observamos nuevamente el efecto citostático de la cumarina y la 7-hidroxicumarina en fibroblastos murinos NHI 3T3. Sin embargo, ninguno de los dos compuestos inhibieron la proliferación de las células de la línea de carcinoma mamario MCF-7 (datos no publicados). A través de inmunoelectrotransferencias (Western blots), corroboramos que la citostasis en los fibroblastos NHI 3T3 corresponde a la inhibición de la vía pRb. En las células MCF-7 no se observan cambios en los elementos que componen esta vía. En la figura 20 se observa que, en los fibroblastos NHI 3T3 hay una disminución de la ciclina D1 que es dependiente de la concentración de 7-hidroxicumarina. El control de dichas células presenta una doble banda de la proteína pRb, que corresponde a la forma hipo e hiperfosforilada de la proteína. Los fibroblastos tratados con 7-hidroxicumarina sólo presentaron la banda baja que corresponde a la forma hipofosforilada de pRb.

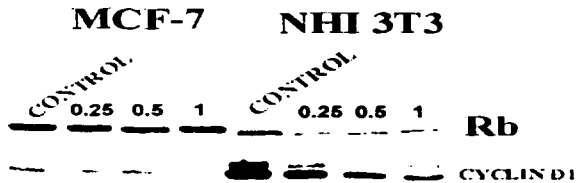


Figura 20. Efecto de 3 concentraciones (mM) de 7-hidroxicumarina a 48 horas de exposición en la expresión de la ciclina D1 y en el estado de fosforilación de pRb. El efecto se evaluó en la línea de carcinoma mamario humano MCF-7 y en fibroblastos murinos NHI 3T3.

Además, en un trabajo reciente, Wang y col., observaron que en las células LH60, la esculetina (6,7-dihidroxicumarina) tiene un efecto citostático y disminuye la

expresión de ciclina D1, así como la forma hiperfosforilada de pRb (Wang CJ. *et al.* 2002). Esta evidencia es consistente con nuestra hipótesis de que la inhibición del ciclo celular producida por la 7-hidroxycumarina en la fase G₁, ocurre a través del punto de restricción y no a través del punto de control de esa fase.

En otro trabajo, medimos el efecto citotóxico y citostático de una serie de 22 compuestos cumarínicos monosustituídos en las posiciones 3, 4, 6, 7 y 8; así como disustituídos en las posiciones 7 y 8 (datos no publicados). En 4 diferentes líneas celulares se evaluó el efecto citostático mediante la reducción de MTT y el efecto citotóxico a través de la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). La toxicidad de cumarina y 7-hidroxycumarina en todos los casos fue baja (menor de 24 % a concentración de 1 mM) (datos no publicados). En el mismo trabajo, identificamos 4 cumarinas disustituídas que tienen poca toxicidad y hasta 20 veces mayor actividad citostática que la 7-hidroxycumarina.

De todos los compuestos evaluados sólo la dafnetina y la 7,8-diacetoxicumarina inhibieron la proliferación de las células MCF-7. Con estos compuestos continuaremos estudiando las acciones celulares en los elementos del punto de restricción.

En un reporte reciente se demuestra que compuestos cumarínicos como la dafnetina (7,8-dihidroxycumarina) no se une a ADN (Finn GJ. *et al.* 2002), lo que concuerda con la baja toxicidad que nosotros observamos.

6 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El efecto citostático de la 7-hidroxicumarina en las células A-427 se manifiesta en el incremento del número de células en la fase G₁ y el consecuente decremento en la fase S. Esta inhibición en la fase G₁ resulta de los decrementos observados en el porcentaje de células que expresaron ciclina D1. El efecto es postranscripcional ya que no se observaron cambios en el nivel de ARN mensajero de la ciclina D1. El decremento de la ciclina D1 podría ser el resultado de: 1) disminución de la eficacia de traducción del ARN mensajero (Muisse-Helmericks RC. *et al.* 1998); 2) disminución de la estabilidad de la proteína (Diehl JA. *et al.* 1998). El decremento en el porcentaje de células que expresan ciclina A a 48 y 72 horas de exposición con la 7-hidroxicumarina puede ser atribuido a un efecto indirecto, resultado de la disminución del número de células en la fase S y G₂, en las cuales la ciclina A es expresada. El mecanismo citostático de la 7-hidroxicumarina involucra eventos tempranos de la fase G₁ del ciclo celular.

Nosotros no observamos efectos de la cumarina en el ciclo celular y este resultado es consistente con los obtenidos por Kahn (Kahn J. *et al.* 1994).

Los efectos citostáticos de la cumarina y la 7-hidroxicumarina en el adenocarcinoma A-427 son consistentes con los reportados previamente por otros autores en varias líneas celulares (Marshall ME. *et al.* 1994; López-González JS. *et al.* 1998) y por nosotros, en la línea de melanoma murino B16-F10 (Jiménez-Orozco FA. *et al.* 1999). La mayor latencia y menor actividad citostática de la cumarina comparada con la de la 7-hidroxicumarina, observada en este estudio, es consistente con la sugerencia de Egan de que la cumarina es una pro-droga (Egan D. *et al.* 1990). En estudios recientes hemos identificado compuestos cumarínicos disubstituidos que tienen poca toxicidad y mayor efecto citostático que las cumarinas monosubstituidas (datos no publicados). Con estas moléculas se estudiará con mayor detalle la inhibición en la fase G₁ del ciclo celular.

La siguiente evidencia sugiere que la cumarina y la 7-hidroxycumarina no activan los puntos de control: 1) *in vitro* no se observan efectos tóxicos; 2) no se unen al ADN y 3) no tienen efectos mutagénicos. Por otra parte, nuestros resultados preliminares y un reporte reciente (Wang CJ. *et al.* 2002) apoyan nuestra hipótesis de que las cumarinas inhiben la vía de pRb.

Los elementos que componen la vía pRb están desregulados en neoplasias malignas, por lo que la inhibición farmacológica de esta vía puede ser una importante estrategia terapéutica. La ciclina D1 está frecuentemente alterada en varios tipos de cáncer y de líneas tumorales, y se ha propuesto como un marcador de pronóstico (Caputi M. *et al.* 1999). El gen de la ciclina D1 (conocido como CCND1, bcl-1 y PRAD1) que se localiza en el cromosoma humano 11q13, frecuentemente sufre ampliificaciones o se sobre-expresa (Bartkova 1997). Las vías de señalización que regulan la transcripción de la ciclina D1 están comúnmente alteradas. Proponemos la inhibición de la ciclina D1 como un blanco farmacológico para el desarrollo de nuevos agentes antineoplásicos.

La mayor parte de los agentes antineoplásicos empleados actualmente producen daño al ADN, inducen arrestos celulares y apoptosis mediante la activación de los puntos de control. El arresto celular producido por el punto de restricción, en adición a la activación de los puntos de control podría incrementar la eficacia de los tratamientos quimioterapéuticos.

5 REFERENCIAS

- Ajchenbaum F, Ando K, DeCaprio JA, Griffin JD. Independent regulation of human D-type cyclin gen expression during G1 phase in primary human T lymphocytes. *J Biol Chem* 268, 4113-4119. 1993.
- Amanatullah DF, Zafonte BT, Albanese C, Fu M, Messiers C, Pestell R. Ras regulation of cyclin D1 promoter. *Methods Enzymol* 33, 116-127. 2002.
- Arellano M, Moreno S. Regulation of CDK/cyclin complex during the cell cycle. *Biochem Cell Biol* 29, 559-573. 1997.
- Barkova J, Lukas J, Bartek J. Aberrations of the G1- and G1/S-regulating genes in human cancer. *Prog Cell Cycle Res* 3, 211-220. 1997.
- Bartek J, Bartkova J, Lukas J. The retinoblastoma protein pathway and the restriction point. *Curr Opin Cell Biol* 8, 805-814. 1996.
- Bartek J, Lukas J. Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol* 13, 738-747. 2001.
- Blagosklonny MV. P53: an ubiquitous target of anticancer drugs. *Int J Cancer* 98, 161-166. 2002.
- Bouchard C, Staller P, Eilers M. Control of cell proliferation by Myc. *Trends Cell Biol* 8, 202-206. 1998.
- Chabner BA, Ryan DP, Paz-Ares L, Garcia-Carbonero, Calabresi P. Antineoplastic agents. In: Goodman AG, Hardman JG, Limbird LE (eds) *The pharmacological basis of therapeutics*. New York. Ed 10. McGraw-Hill, 2000, 1389-1445.
- Caputi M, Groeger AM, Esposito V, Muller MR, Wolner E, Giordano A. Prognostic role of cyclin D1 in lung Cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20, 746-750. 1999
- Cohen AJ. Critical review of the toxicology of coumarin with special reference to interspecies differences in metabolism and hepatotoxicity response and their significance to man. *Food and Chem Toxicol* 17, 277-289. 1974.
- Cox D., O'Kennedy R., Thornes D. The rarity of liver toxicity in patients treated with coumarin (1,2- benzopyrone). *Human Toxicol* 8, 501-506. 1989.
- Darzynkiewicz Z, Traganos F, Gong J. Expression of cell cycle specific proteins cyclins as a marker of the cell cycle independent of DNA content. *Methods Cell Biol* 41, 422-435. 1994.
- Darzynkiewicz Z, Gong J, Juan G, Ardelet B, Traganos F. Cytometry of cyclins proteins. *Cytometry* 25, 1-13. 1996.

Datto MB, Li Y, Panus JF, Howen DJ, Xion Y, Wang XF. Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci* 92, 5545-5549. 1995.

DeVita VT 1997 Principles of cancer management: chemotherapy. In: DeVita H, Rosenberg SA (eds), *Cancer: principles and practice of oncology*. Ed 5, Philadelphia, Lippincott Reven Publishers, 1997, 333-3473.

Deux FH, Logothetis ChJ, Sella A, Fitz K, Amato R, Reuben JM, Dozier N. Phase II study of coumarin and cimetidine in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 8, 325-329. 1990.

Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr ChJ. Glycogen synthase kinase 3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes & Dev* 12, 3499-3511. 1998.

Dolbeare F, Gratzner H, Pallavicini MG, Gray JW. Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromo-deoxiuridine. *Proc Natl Acad Sci* 80, 5573-5577. 1983.

Egan D, O'Kennedy, Moran E, Cox D, Prosser E, Thornes D. The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarins and coumarins-related compounds. *Drug Metab Rev* 22, 503-529. 1990.

Ellenge SJ, Harper JW. CDK inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Curr Opin Cell Biol* 6, 874-852. 1994.

Ellenge SJ, Winston J, Harper JW. A question of balance: the role of cyclin-kinase inhibitors in development and tumorigenesis. *Trends Cell Biol* 6, 388-392. 1996.

Endell W., Seidel G. Coumarin toxicity in different strains of mice. *Agents Actions* 8, 299-302. 1978.

Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T. Cyclin: a protein specified by internal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 3, 389-96, 1983.

Ewen ME. Relationship between Ras pathways and cell cycle control. *Prog Cell Cycle Res* 4, 1-17. 2000.

Finn GJ, Creaven B, Egan DA. Study of the in vitro cytotoxic potential of natural and synthetic coumarin derivatives using human normal and neoplastic skin cell lines. *Melanoma Res* 11, 461-467. 2001.

Finn GJ, Kenealy E, Creaven B, Egan DA. In vitro cytotoxic potential and mechanism of action of selected coumarins, using human renal cell lines. *Cancer Lett* 183, 61-68. 2002.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

48

Fentem JH., Fry JR. Species differences in the metabolism and hepatotoxicity of coumarin. *Comp Biochem Physiol C* 104, 1-8. 1993.

Foster JS, Henley DC, Ahamed S, Wimalasena J. Estrogens and cell-cycle regulation in breast cancer. *Trends Endocrinol Metab* 12, 320-327. 2001.

Fournier B, Hooper DC. Mutation in topoisomerase IV and DNA girase of *Staphylococcus aureus*: novel pleiotropic on quinolone and coumarin activity. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 121-128. 1998.

Gary J, O'Kenney R, O'Kenney K. The chemistry and occurrence of coumarins. In: O'Kenney R, Thornes RD (eds) *Coumarins biology, applications and mode of action*. New York. 1997,23-63.

Giard DJ, Aronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a serie of solid tumors. *J. Natl Cancer Inst* 51, 1417-23. 1973.

Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. Use of cyclin E restriction point to map cell arrest in G1 induced by n-butyrate, cycloheximide, staurosporine, lovastatin, mimosine and quercetine. *Int J Oncol* 4, 803-808. 1994.

Guille H, Downward J. Multiple Ras effector pathways contribute to G₁ cell cycle progression. *J Biol Chem* 274, 22033-22040. 1999.

Hardcastle IR, Golding BT, Griffin RJ. Designin inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42, 325-48. 2002.

Harper JW, Ellenge SJ. Cdk inhibitors in development and cancer. *Curr Opin Gen Dev* 6, 56-64. 1996.

Ho A. Regulation of G(1) cell cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes. *Curr Opin Gen Dev* 12, 47-52. 2002.

Hoult JRS, Payá M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *Gen Pharma* 27, 713-722. 1996.

Iersel van MPLS, Henderson CJ, Walter DG, Prince RJ, Wolf CR, Lake BG. Metabolism of (3-¹⁴C) coumarin by human liver microsomes. *Xenobiotica* 24, 795-803. 1994.

Jiménez-Orozco F.A. Cytostatic activity of coumarin metabolites and derivatives in the B16 F10 murine melanoma cell line. *Melanoma Res* 9, 243-247. 1999.

Johnson DG, Walker CL. Cyclin and cell cycle checkpoints. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 39, 295-312. 1999.

TESIS CON
FALLA DE ORDEN

49

Kaelin WG Jr. Functions of the retinoblastoma protein. *Bioessays* 21, 950-958. 1999.

Kahn J, Preis P., Waldman F., Tseng A Jr. Coumarin modulates the cell cycle progression of an MTV-EJ-ras cell line. *Cancer Res Clin Oncol* 120, 19-22. 1994.

Kaldis P. The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals. *Cell Mol Life Sci* 55, 284-296. 1999.

Kawaii S, Tomono Y, Ogawa K, Sugira M, Yano M, Yoshizawa Y. The antiproliferative effect of coumarins on several cell lines. *Anticancer Res* 21, 917-924. 2001

Keyomarsi K, Herliczek TW. The role of cyclin E in cell proliferation, development and cancer. *Prog Cell Cycle Res* 3, 171-191. 1997.

Keopp DM, Harper JW, Ellenge ST. How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell* 97, 431-434. 1999.

Klotzbucher A, Stewart E, Harrison D, Hunt T. The "destruction box" of cyclin A allows B-type cyclins to be ubiquitinated, but not efficiently destroyed. *EMBO J* 12, 3053-3064. 1996.

Krek W, Xu G, Livingston DM. Cyclin A-kinase regulation of E2F-1 DNA binding function underlies suppression of S phase checkpoint. *Cell* 83, 1149-1158. 1995.

Kornbluth S. Cell cycle checkpoints. In: Conn PM, Means AR, O'Malley BW (eds) *Principles of Molecular Regulation*. Human Press, New Jersey, 2000, 407-413.

King RW, Deshaies RJ, Peters JM, Kischner MC. How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 274, 1652-1659. 1996.

Lake BG. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. *Food and Chem Toxicol* 37, 423-453. 1999.

Lam EW, Glassford J, Banerji L, Shaun N, Sicinski P, Klaus GB. Cyclin D3 compensates for loss of cyclin D2 in mouse B-lymphocytes activated via the antigen receptor and CD40. *J Biol Chem* 275, 3479-3484. 2000.

Lavia P, Jansen-Durr P. E2F target genes and cell-cycle checkpoint control. *Bioessays* 21, 221-230. 1999.

Lazcano Ponce EC, Tovar Guzmán V, Meneses Gonzáles F. Trends of lung cancer mortality in Mexico. *Arch Med Res* 28, 565-570. 1997.

López-González J.S. Efecto citostático de la cumarina y la 7-hidroxicumarina en tres líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar humano. *Rev Inst Nac Enf Res* 11, 267. 1998.

ESTA TESIS NO ESTÁ
DE LA BIBLIOTECA

Lü H.Q., Niggemann B., Zänker K.S. Suppression of the proliferation and migration of oncogenic *ras*-dependent cell lines, cultured in a three-dimensional collagen matrix, by flavonoid-structured molecules. *J Cancer Res Clin Oncol* 122, 335-342. 1996.

Maat B, Hilgard P. Anticoagulants and experimental metastasis evaluation of antimetastatic effects in different model system. *Cancer Res Clin Oncol* 101, 272-283. 1981.

Majerus PW, Tollefsen DM Anticoagulant, thrombolytic, and antiplatelet drugs. In: Goodman AG, Hardman JG, Limbird LE (eds) *The pharmacological basis of therapeutics*. New York. Ed 10, McGraw-Hill, 2000, 1519-1538.

Marshall ME, Mendelsohn L, Butler K, Riley L, Cantrell J, Wiseman Ch, Taylor R, Macdonald JS. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with coumarin (1,2-benzopyrone) and cimetidine: a pilot study. *J Clin Oncol* 17, 862-866. 1987.

Marshall ME, Butler K, Cantrell J, Wiseman Ch, Mendelsohn L. Treatment of advanced malignant melanoma with coumarin and cimetidine: a pilot study. *Cancer Chem Pharmacol* 24, 65-66. 1989.

Marshall ME, Butler K, Hermansen D. Treatment of hormone-refractory stage D carcinoma of prostate with coumarin (1,2-benzopyrone) and cimetidine: a pilot study. *Prostate* 17, 95-99. 1990.

Marshall ME, Butler K, Fried A. Phase I evaluation of coumarin (1,2-benzopyrone) and cimetidine in patients with advanced malignancies. *Molec. Biother* 3, 170-178. 1991.

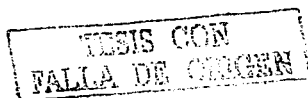
Marshall ME, Kervin K, Benefield C, Umerani A, Albainy-Jenei S, Zhao Q, Kehzaeli. Growth-inhibitory effects of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin in human malignant cell lines *in vitro*. *J Cancer Res Clin Oncol* 120, 3-10. 1994.

Martínez F, Chávez AD, González D, Gutiérrez AA Regulation of cell division in higher eukaryotes. In *Cell physiology sourcebook*. New York, Ed 3th. Nicholas Sperelakis editor, Stockton Press, 2001, 1135-1159.

McDonald RB 3rd, El-Deiry WS. Cell cycle control as a basis for cancer drug development. *Int J Oncol* 16, 871-886. 2002.

Medina-Morales F, Barrera RR. Primary lung cancer in Mexico city: a report of 1019 cases. *Lung Cancer* 14, 185-193. 1996.

Mittnacht S. Control of pRb phosphorylation. *Curr Opin Gen Dev* 8, 21-27. 1998.



Mohler JL, Gomella LG, Crawford ED, Glode LM, Zippe CD, Fair WR, Marshall ME. Phase II evaluation of coumarin (1,2-benzopyrone) in metastatic prostatic carcinoma. *Prostate* 20, 123-131. 1992.

Mohler JL, Williams BT, Thompson IM, Marshall ME. Coumarin (1,2-benzopyrone) for the treatment of prostatic carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 120, S35-S38. 1994.

Moller MB. p27 in Cell cycle control and cancer. *Leuk Lymphoma* 39, 19-27. 2000.

Mossmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferative and cytotoxic assays. *Immunol Methods* 65, 55-63. 1983.

Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature* 375, 131-134. 1995.

Moise-Helmericks RC, Grimes HL, Bellacosa A, Malstrom SE, Tsichlis PN, Rosen N. Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 273, 29864-72. 1998.

Murray RDH, Méndez J, Brown SA Introduction. In: Murray RDH, Méndez J, Brown SA (eds) *The natural coumarins, occurrence, chemistry and biochemistry*. New York. 1982. 1-12.

Nakayama K-i, Nakayama K. Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors: breakers of the cell cycle engine during development. *Bioessays* 20, 1020-1029. 1998.

O'Connell MJ, Raleigh JM, Verkade HM, Nurs P. Chk 1 is a wee1 kinase in the G₂ DNA damage checkpoint inhibiting cdc2 cy T15 phosphorylation. *EMBO J* 16, 545-554. 1997.

O'Connor PM, Fan S. DNA damage checkpoints: implication for cancer therapy. *Prog Cell Cycle Res* 2, 165-173. 1996.

Ohtani K, DeGregori J, Revins JR. Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proc Natl Acad Sci* 92, 12146-50. 1995.

Pardee AB. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 246, 603-246. 1989.

Peter M. The regulation fo cyclin-dependent kinase inhibitors (CKI's). *Prog Cell Cycle Res* 3, 99-108. 1997.

Pearce R, Greenway D, Parkinson A. Species differences and interindividual variation in liver microsomal cytochrome P450 2A enzymes: effects on coumerin dicumarol, and testosterone oxidation. *Arch of Biochem and Biophys* 298, 211-225. 1992.

- Peikonen O., Raunio H., Lang M.A. The metabolism of coumarin. In: Kennedy R.O., Thornes R.D. (eds) In coumarins: Biology, Applications and mode of action. New York. 1997, 67-92.
- Peikonen O., Raunio H., Lang M.A. Coumarin 7-hydroxylase: characteristics and regulation in mouse and man. *J Irish Colleg of Phys Surg* 22, 24-28. 1993.
- Peikonen O., Rautio A., Raunio H., Maenpää J., Hakkola J. Regulation of coumarin 7-hydroxylation in man. *J Cancer Res Clin Oncol* 120 Suppl: S30-1. 1994.
- Peikonen O., Rautio A., Raunio H., Pasanen M. CYP2A6: a human coumarin 7-hydroxylase. *Toxicology* 144, 139-147. 2000.
- Phelps DE, Hsiao KM, Li Y, Hu N, Franklin DS, Westphal E, Lee EY, Xiong Y. Coupled transcriptional and transductional control of cyclin-dependent kinase inhibitors p18^{INK4c} expression during myogenesis. *Mol Cell Biol* 18, 2334-2343. 1998.
- Pines J. Cyclins and cyclin-dependent kinase: theme and variations. *Adv Cancer Res* 66, 181-213. 1995.
- Ponte P, Ng SY, Engel J, Gunning P, Kedes L. Evolutional conservation in the untranslated region of actin mRNAs: DNA sequence of a human beta-actin cDNA. *Nucleic Acids Res* 12, 1687-1696. 1984.
- Reed SI. G1-specific cyclins: in search of an S-phase promoting factor. *Trends Genet* 7, 95-9. 1991.
- Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol* 13, 332-337. 2001.
- Sahai E, Marshall CJ. Rho-GTPases and cancer. *Nature Rev* 2, 133-142. 2002.
- Sauna ZE, Smith MM, Muller M, Kerr KM, Ambudkar SV. The mechanism of action of multidrug-resistance-linked P glycoprotein. *J Bioenerg Biomembr* 33, 481-491. 2001.
- Sausville EA. Inhibition of CDK as a therapeutic modality. *Trends Mol Med* 5, S32-7. 2002.
- Schwartz MA, Assoian EK. Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinase via cytoplasmic signaling pathways. *J Cell Sci* 114, 2553-2560. 2001.
- Seliger B, Pettersson H. 7-Hydroxycoumarin inhibits oncogen-induced transformation of murine fibroblast. *Cancer Res Clin Oncol* 120, 23-27. 1994.

TESIS CON
FALLA DE COPIEN

Shah MA, Schwartz GK. Cell cycle-mediated drug resistance: an emerging concept in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 7, 2168-2181. 2001.

Shapiro GI, Park JE, Edwards ChD. Multiple mechanisms of p16^{INK4A} inactivation on non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res* 55, 6200-6209. 1995.

Sheaff RJ, Groudine M, Gordon M, Roberts JM, Clurman BE. Cyclin E-Cdk2 is a regulator of p27^{Kip1}. *Genes & Dev* 11, 1464-1478. 1997.

Shilling WH, Crampton RF, Longland RC. Metabolism of coumarin in man. *Nature* 221, 64-65. 1969.

Serrano M. The tumor supresor protein p16INKa. *Exp Cell Res* 237, 7-13, 1997.

Sherr ChJ. D-type cyclins. *TIPS* 20, 187-190. 1995.

Sherr ChJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & Dev* 13, 1501-1512. 1999.

Spinella M, Freemantle SJ, Sekula D, Chang JH, Christie AJ, Dminrovsky E. Retinoic acid promotes ubiquitination and proteolysis of cyclin D1 during induced tumor cell differentiation. *J Biol Chem* 274, 22013-18. 1999.

Starey D. Regulation of Ras signaling by the cell cycle. *Curr Opin Gen Dev* 12, 44-46. 2002.

Taylor WR, Stark GR. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20, 1803-1815. 2001.

Tetsu O, McCormick. β -Catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398, 422-426. 1999.

Thornes RD. Adjuvant therapy of cancer via the cellular immune mechanism of fibrin by fibrinolysis and oral anticoagulants. *Cancer* 35, 91. 1975.

Thornes RD, Lynch G, Sheehan MV. Cimetidine and coumarin therapy of melanoma. *Lancet*. 328 1982.

Thornes RD, Daly L, Lynch B, Breslin B, Browne H, Browne HY, Corrigan T, Daly P, Edwards G, Gaffney E, Henley J, Henley T, Keane F, Lennon F, McMurray N, O'Loughlin S, Tanner SA. Treatment with coumarin to prevent or delay recurrence of malignant melanoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 120, S32-S34. 1994.

Toogood PL. Cyclin-dependent kinase inhibitors for treating cancer. *Med Res Rev* 21, 487-498. 2001.

TESIS CON
FALLA DE CALGEN

Tseng A, Lee WMF, Kirsten E., Hakam A., Mc Lick J., Buki K., Kun E. Prevention of tumorigenesis of oncogene-transformed rat fibroblasts with DNA site inhibitors of poly(ADP ribose) polymerase. *Proc Natl Acad Sci* 84, 1107-1111. 1987.

Vogelstein B, Lane D, Levine J. Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-310. 2000.

Wang CJ, Hsieh YJ, Chu CY, Lin YL, Tseng TH. Inhibition of cell cycle progression in human leukemia HL-60 cells by esculetin. *Cancer Lett* 183, 163-68. 2002.

Weber US, Steffen B, Siegers CP. Antitumor-activities of coumarin, 7-hydroxy-coumarin and its glucuronide in several human tumor cell lines. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 99, 193-206. 1998.

Weinert Ted, Lydall D. Cell cycle checkpoints, genetic instability and cancer. *Sem Cancer Biol* 4, 129-140. 1993.

Won K-A, Reed SI. Activation of cyclin E/cdk2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin E. *EMBO J* 15, 4182-4193. 1996.

Xion Y, Connolly T, Fletcher B, Beach D. Human D-type cyclin. *Cell* 65, 691-699. 1991.

Yamb CH, Fung TK, Poon RY. Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cell Mol Life Sci* 59, 1317-1326. 2002.

Yang J, Kornbluth S. All aboard the cyclin train: subcellular trafficking of cyclin and their CDK partners. *Trends Cell Biol* 9, 207-210. 1999.

Yang E-B, Zhao Y.N., Zhang K., Mack P. Daphnetin, One of Coumarin Derivatives, is a Protein Kinase Inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 260, 682-685. 1999.

Yunis J, Ramsay N. Retinoblastoma and subband deletion of chromosomae 13. *Am J Dis Child* 132, 161-163. 1978.

Zacharski LR, Henderson WG, Rickles FR, Forman WB, Cornell CJ, Forcier RJ. Effect of warfarin on survival time in small cell carcinoma of the lung. *JAMA* 245, 831-835. 1981.

Zhai S, Senderowicz AM, Sausville EA, Figg WB. Flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor in clinical development. *Ann Pharmacother* 36, 905-911. 2002.

Zhang B, Peng Z-Y. A minimum folding in the ankyrin repeat protein p16^{INK4}. *J. Mol. Biol* 299, 1121-1132. 2000.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Zhuo X, Gu J, Zhang QY, Spink DC, Kaminsky L, Ding X. Biotransformation of coumarin by rodent and human cytochromes P-450: metabolic basis of tissue-selective toxicity in olfactory mucosa of rats and mice. *J Pharm Exp Ther*. 288, 463-471, 1999

Zindy F, Quelle DE, Russel MF, Sherr ChJ. Expression of the p16^{INK4a} a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene* 15, 203-211. 1997.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Decrease of cyclin D1 in the human lung adenocarcinoma cell line A-427 by 7-hydroxycoumarin

Fausto Alejandro Jiménez-Orozco ^{a,*}, José Sullivan López-González ^b,
Alejandro Nieto-Rodríguez ^b, Marco Antonio Velasco-Velázquez ^a,
Juan Arcadio Molina-Guarneros ^a, Nicandro Mendoza-Patiño ^a,
Maria Juana García-Mondragón ^a, Patricia Elizalde-Galvan ^c,
Fernando León-Cedeño ^c, Juan José Mandoki ^a

^a Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-297 Ciudad Universitaria, México D.F. 04510, México

^b Departamento de Enfermedades Crónicas-Degenerativas, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Tlalpan 4502, Col. Sección XVI, México D.F. 14080, México

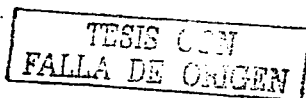
^c Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México D.F. 04510, México

Received 3 January 2001; received in revised form 4 May 2001; accepted 6 June 2001

Abstract

Coumarin *in vivo* has antitumor activity in various types of cancer. *In vitro*, coumarin and 7-hydroxycoumarin, its major biotransformation product in humans, inhibit the proliferation of several human tumor cell lines. The molecular mechanisms of these effects are unknown. To gain information about these mechanisms, we studied the effects of coumarin and 7-hydroxycoumarin in the human lung adenocarcinoma cell line A-427 on the inhibition of: (i) cell proliferation; (ii) cell cycle progression; and (iii) expression of cyclins D1, E and A. The inhibitory concentrations 50 (IC₅₀) of both compounds were estimated by cytostatic assays of tetrazolium (MTT) reduction. The effects on cell cycle progression were assayed with propidium iodide and BrdU using DNA histograms and multiparametric flow cytometry. The percentages of cells expressing cyclins D1, E, and A were estimated by means of bivariate flow cytometry using propidium iodide, and FITC-conjugated monoclonal antibodies for each cyclin. The IC₅₀ (\pm S.E.M, $n = 3$) of 7-hydroxycoumarin and coumarin at 72 h exposure, were 100 ± 4.8 and 257 ± 8.8 μ g/ml, respectively. 7-Hydroxycoumarin at the concentration of 160 μ g/ml (1 mM), inhibited the G₁/S transition of the cell cycle, an action consistent with the cytostatic effect. No significant decreases of cyclins E and A were observed. In contrast, cyclin D1 significantly decreased, which appears to indicate an action of 7-hydroxycoumarin in early events of phase G₁. However, messenger RNA of cyclin D1, assayed by RT-PCR, did not change. This suggests a posttranscriptional effect. The effects of coumarin were not significant. Cyclin D1 is overexpressed in many types of cancer, and its inhibition has been proposed as a pharmacological and therapeutic target for novel antitumor agents.

* Corresponding author. Tel.: +52-56-23-2164; fax: +52-56-16-1489.
E-mail address: alejo@servidor.unam.mx (F.A. Jiménez-Orozco).



Knowledge of the decrease of cyclin D1 by 7-hydroxycoumarin may lead to its use in cancer therapy, as well as to the development of more active compounds. © 2001 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: 7-Hydroxycoumarin; Cell cycle; Cyclin D1; Cytostatic effect; G₁/S transition; Flow cytometry

1. Introduction

Coumarin (1,2 benzopyrone), a widely distributed natural product [1] with low human toxicity [2], has been shown in multicentric studies to slow the development of both renal [3] and prostate carcinoma [4,5], and to prevent the recurrence of melanoma [6]. In humans, coumarin has a short half-life (1–1.5 h) [7] and its major biotransformation product (75%) is 7-hydroxycoumarin. Egan et al. [8] have suggested that coumarin may be a pro-drug, 7-hydroxycoumarin being the active drug. The cytostatic effect of coumarin and 7-hydroxycoumarin has been studied in many human tumor cell lines including the lung adenocarcinoma cell lines A549 [9], SK-LU-1, 1.3.15 and 3A5A [10]. The molecular mechanisms of the cytostatic effects are unknown. To clarify mechanisms of action of these compounds, we studied their effects on the cell cycle progression of the human adenocarcinoma cell line A-427. These cells are Rb-positive and have homozygous deletions at the gene of p16^{INK4A} [11].

Cyclins are key components of the cell cycle progression machinery. They activate their partners, cyclin-dependent kinases (CDKs), which phosphorylate sequentially critical substrates that regulate the progression of the cell cycle [12,13]. Normal, non-tumor cells express cyclin proteins in an orderly, scheduled fashion, at a given phase of the cell cycle [14]. Cyclins D are expressed early in phase G₁, and are degraded prior to entrance into phase S. Synthesis of cyclin E begins in mid-phase G₁; its expression peaks at the G₁/S transition, and is degraded during phase S. Synthesis of cyclin A starts in phase S; its expression peaks at the S/G₂ transition, and decreases stepwise during the latter part of phase G₂. Synthesis of cyclin B starts at the end of phase S, reaches maximal levels as the cell enters into phase M, and breaks down at the transition to anaphase [14].

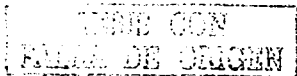
One feature of malignant cells is the lack of control of their cell cycle, mainly at the transition G₁/S [15,16]. Altered structure and function of the CDKs of phase G₁, and their regulatory molecules, such as cyclin D1, have been implicated in cancer pathogenesis [17]. Forced ectopic expression of cyclin D1 contributes to the oncogenic transformation of cells in vitro and in vivo [18,19]. The overexpression of cyclin D1 has been observed in many types of cancer and malignant cell lines [20–22].

Expression of cyclins, together with DNA content, has been used to map the cell cycle with greater accuracy. Such improved cell cycle maps allow more precise studies of the mechanisms of action of antitumor agents [23–25]. With this methodology we characterized the pattern of expression of cyclins D1, E and A of the cell line A-427; the expressions of cyclin D1 and E were unscheduled, whereas that of cyclin A was scheduled. The cytostatic effects of coumarin and 7-hydroxycoumarin were assayed using the tetrazolium (MTT) assay [26]. With propidium iodide and BrdU incorporation assays, we studied their effects on the cell cycle progression [27]. The following effects of 7-hydroxycoumarin were observed: (1) cytostatic effect; (2) inhibitions of G₁/S transition; (3) decrease of cyclin D1. The effects of coumarin were not significant.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Coumarin and 7-hydroxycoumarin from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI) were dissolved in absolute ethanol (Merck, Darmstadt, Germany). RPMI 1640, fetal bovine serum, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), propidium iodide, RNase A, glycine and borax were obtained from Sigma



Chemical (St Louis, MO). The S phase was estimated using an immunofluorescence assay for the detection of 5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) incorporated into cellular DNA (In Situ Cell Proliferation kit) from Roche (Mannheim, Germany). Oligo (dT) and RNase Inhibitor, from Roche (Mannheim, Germany).

The TRIZOL reagents, DNase I, Reverse Transcriptase enzyme, Taq DNA polymerase and dNTPs were obtained from Gibco (BRL, USA-Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD). The culture flasks and 96-well microplates were obtained from Nunc (Denmark).

2.2. Antibodies

FITC-conjugated monoclonal antibody to cyclins and isotype controls were obtained from PharMingen (San Diego, CA). For human cyclin D1 detection, mouse monoclonal antibody (IgG1, G124-326 clone) and the respective matched FITC-conjugated isotype control were used. For human cyclin A, mouse monoclonal antibody (IgE, BF683 clone) and the respective matched FITC-conjugated isotype control were used.

An indirect-stain was used for cyclin E detection. Mouse monoclonal antibody to human cyclin E (IgG_{2b}, clone HE67) was obtained from PharMingen. As isotype control, we used mouse monoclonal antibody without reactivity to human cyclin E (IgG_{2b}, clone 3F3), (Serotec, Oxford, UK). As second antibody we used FITC-conjugated rat monoclonal antibody to mouse IgG_{2b}, (clone R12-3), obtained from PharMingen.

2.3. Cell line

Cells of the human lung carcinoma cell line A-427 (ATCC) were cultured at 37 °C with 5% CO₂ in RPMI 1640 medium, supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. Viability of the cells always exceeded 95%, as determined with trypan blue.

For flow cytometry and RT-PCR assays, 10⁶ cells, in 20 ml medium, were seeded in 175 cm² culture flasks, where they grew asynchronously at

an exponential rate. The cells were incubated with the test compound for 24, 48 and 72 h. Ethanol concentration in the medium was less than 0.5% (v/v), and did not affect the growth of control cells. For 48- and 72-h exposures, each day 10 ml of culture medium containing the test compound, was added to the respective flasks. Each experiment was carried out three times.

2.4. DNA flow cytometric analysis

The cells were harvested using 0.25% trypsin, washed with PBS, fixed in ethanol, and incubated at -20 °C for 24 h. The cells were pelleted at 400 × g, washed in PBS, and resuspended in a solution containing 0.5% RNase A and 1 µg/ml propidium iodide in PBS. After incubation for 30 min in the dark at -4 °C, the samples were analyzed by flow cytometry with a FACScalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Cell cycle analysis was done on list mode data files using Modfit software (version 2.0).

2.5. BrdU incorporation

After 24, 48 and 72 h exposure to the test compounds, the cells were incubated with BrdU (10 µM) for 30 min and harvested using 0.25% trypsin. The pellet was washed once with PBS at 1000 × g for 5 min and resuspended in 1 ml PBS. The suspension was diluted in a solution 3:7 (v/v) of glycine 50 mM in ethanol 70% and incubated at -20 °C for 24 h. Cells were centrifuged at 1000 × g for 5 min, resuspended in 500 µl of 4 N HCl, and incubated at room temperature for 20 min. The suspension of cells was neutralized with 5 ml of 2 M borax solution and washed twice with PBS. Cells were resuspended in PBS containing 0.5% (v/v) Tween-20, 0.5% (w/v) BSA, and FITC-conjugated anti-BrdU antibody (1:10 v/v), and incubated in the dark at room temperature for 1 h. Cell pellets were washed twice with PBS, resuspended in PBS containing 1 µg/ml propidium iodide and 0.5 µg/ml RNase A, and incubated in the dark for 20 min at -4 °C. Samples were analyzed using FACScalibur flow cytometer [27].

TESIS COM
FALLA DE ORIGEN

2.6. Detection of cyclins

Following incubation with the respective compounds, the cells were harvested using 0.25% trypsin and were washed twice with PBS. To stabilize the cyclins, cells were fixed in 5 ml of 1% methanol-free formaldehyde in PBS, for 15 min incubation at 4 °C and were washed twice with PBS. After this treatment, to stabilize the DNA, the cells were fixed in 80% ethanol and incubated at –20 °C for 24 h. The cells were pelleted at 400 × g and were washed twice in PBS. To permeabilize the cells, they were treated with a solution of 0.25% (v/v) Triton X-100 in PBS for 10 min at room temperature [25].

For detection of cyclins D1 and A, the cells were washed again and were incubated for 2 h at room temperature in the presence of FITC-conjugated monoclonal-antibodies, against human cyclin D1 or cyclin A. The stock solution of antibody was diluted (1:10 v/v) in PBS containing 1% BSA. As fluorescence control, other cells from each treatment were incubated with the respective isotype control antibodies.

For cyclin E detection, cells were incubated 2 h in the presence of the mouse monoclonal antibody to human cyclin E, which was diluted 1:100 in PBS containing 1% (w/v) of BSA. Cells were then washed and incubated for 1 h, at room temperature, with an FITC-conjugated rat monoclonal antibody to mouse IgG₂, diluted 1:4000 in PBS containing 1% (w/v) of BSA. Mouse monoclonal isotype control antibody was employed in dilution 1:100.

For DNA measurement, the cells were resuspended in 0.5 ml of a solution of 0.1% RNase A, 1 µg/ml propidium iodide in PBS, and incubated for 30 min, in the dark at –4 °C. Samples were analyzed by flow cytometry using FACScalibur and analyzed according to the protocols of Darzynkiewicz and Gong [23–25].

2.7. Isolation of total RNA

Total RNA was isolated from trypsinized cells with TRIzol according to the method of Chomczynski [28]. After incubation of the homogenized sample for 5 min at room temperature, 0.2 ml of

chloroform was added. Samples were mixed vigorously and then centrifuged at 2000 × g for 15 min. Samples were treated with DNase I. The RNA was precipitated from the aqueous phase by mixing with isopropanol and incubated at 4 °C for 12 h. After centrifuging and washing once with ethanol, the RNA was dissolved in diethyl pyrocarbonate (DEPC)-treated water and was quantified spectrophotometrically at A 260 nm.

2.8. RT-PCR

cDNA was obtained by reverse transcription from total RNA. Samples of total RNA (1.0 µg) were transferred to 0.2 ml thin wall PCR tubes and were mixed with 1 × PCR buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.4; 50 mM KCl), 6.6 mM MgCl₂, 5.4 mM dNTP's, 9.6 U RNase inhibitor, 0.08 µg of oligo (dT), 6.6 mM DTT and 48 U M-MLV Reverse Transcriptase enzyme. Tubes were incubated at 42 °C for 60 min.

PCR was carried out in PCR buffer (1 ×), 1.7 mM MgCl₂, 1.5 U Taq DNA polymerase and 10 pmol of each primer set. After an initial denaturation step at 94 °C for 5 min, cycling conditions were: 30 cycles at 94 °C for 50 s, 60 °C for 50 s and 72 °C for 50 s with final extension cycle of 7 min at 72 °C. The equipment used was a Touch-down, hybrid thermal cycler. PCR products were analyzed by electrophoresis on 2% agarose gel stained with ethidium bromide.

Primer sets for cyclin D1 and beta-actin were the following: Cyclin D1 sense (5'-GGCAACG-GAGGTCTGCG-3') and antisense (5'-GTTCGGT-GTAGATGCACAGCTT-3') according to Xiong [29]. beta-actin sense (5'-GGGTCAAGA-GATTCTCATG-3') and antisense (5'-GGTCT-CAAACATGATCTGGG-3') according to Ponte [30]. The sizes of the expected products were 323 and 218 bp, respectively.

2.9. MTT

(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay

The cytostatic effect of the test compounds on the tumor cells was estimated using the microculture tetrazolium (MTT) assay [26]. The assay is

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

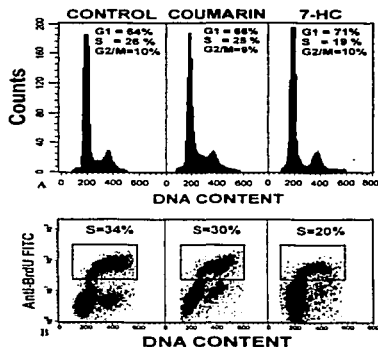


Fig. 1. (A) DNA histograms of cells exposed to coumarin or 7-hydroxycoumarin for 72 h, at a concentration of 160 $\mu\text{g/ml}$. (B) Percentage of cells in S phase after exposure to coumarin or 7-hydroxycoumarin for 72 h, at a concentration of 160 $\mu\text{g/ml}$.

based on the reduction of the soluble tetrazolium salt by mitochondria of viable cells. The reduced product, an insoluble colored formazan, is dissolved in dimethyl sulfoxide and measured spectrophotometrically. Under the experimental conditions of this study, the amount of formazan formed was proportional to the number of viable cells.

To diminish the cytostatic assay variability, the assays were performed as described earlier [31]. Briefly, cells (5×10^4) were seeded in each well of 96-well microplates. At 0, 24 and 48 h, medium (100 μl containing the test compound)

was added to each well. The compounds were tested at six concentrations (ranging from 10 to 320 $\mu\text{g/ml}$). At 72 h exposure, the number of viable cells was estimated. The percentage decrease of proliferation of the treated cells was estimated with respect to the solvent-treated control cells. The IC_{50} was calculated from the least square concentration-response regressions.

3. Results

3.1. Inhibitory concentration 50 (IC_{50})

7-Hydroxycoumarin had a greater cytostatic activity than coumarin. The mean IC_{50} from three independent assays was 100 ± 4.8 and 257 ± 8.8 $\mu\text{g/ml}$ for 7-hydroxycoumarin and coumarin, respectively. The effects of both compounds on the cell cycle were studied at the concentrations of 160 and 80 $\mu\text{g/ml}$ approximately (1 and 0.5 mM) and three exposure times (24, 48 and 72 h).

3.2. Effects on the cell cycle

3.2.1. DNA histograms

In histograms of DNA, 7-hydroxycoumarin only at concentrations of 160 ($\mu\text{g/ml}$ and exposures of 72 h, slightly increased the percentage of cells in the G_1 phase, and decreased the percentage of cells in the S phase (Fig. 1A). Coumarin had no appreciable effect.

3.2.2. BRDU incorporation

The changes produced in the S phase were confirmed by bivariate flow cytometric analysis of DNA synthesis (BrdU incorporation) and of DNA content (propidium iodide stain). In cells exposed to 160 ($\mu\text{g/ml}$ of 7-hydroxycoumarin for 72 h, a statistically significant decrease in the percentage of cells in the S phase was observed, from 34% in the control cells, to 20% in the treated cells (Fig. 1B). At the concentration of 80 $\mu\text{g/ml}$ or shorter exposure times no changes were observed. Coumarin only produced a non-significant decrease in the percentage of cells in the S phase at 72 h exposure.

TRINIS COLI
FALLA DE ORIGEN

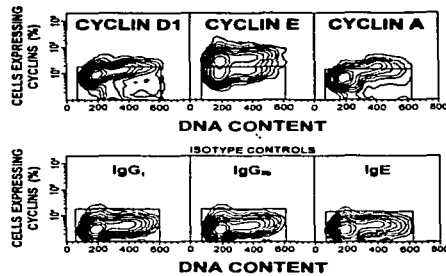


Fig. 2. Expression of cyclin D1, cyclin E and cyclin A in control cells of human lung adenocarcinoma cell line A-427. The percentage of cell expressing each cyclin was estimated by subtracting the fluorescence of the cells incubated with the corresponding isotype control antibody (bottom), from the fluorescence of the cells incubated with antibody to the cyclin (top).

3.3. Patterns of expression of cyclins

Many tumor cell lines express cyclins in an unscheduled (ectopic) fashion, i.e. unrelated to the phase of the cell cycle. Unscheduled expression of cyclins in tumor cells may lead to a loss of the regulatory mechanism of cell cycle progression [23,32]. According to our observations, the A-427 cell line, expressed cyclin A in a scheduled fashion, i.e. only in phases S and G₂ (see Fig. 2). In contrast, cyclin D1 and cyclin E were expressed in an un-

scheduled fashion throughout the whole cycle, and not only in the phase G₁ and in the G₁/S transition, respectively. Similar observations were made by Gong et al. in other malignant cell lines [33,34].

3.4. Effects on the expression of cyclins

For each concentration and exposure time, the percentage of cells expressing each cyclin was estimated by subtracting from the fluorescence of the cells incubated with antibody to the cyclin, the

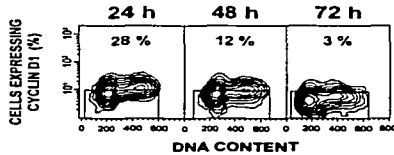


Fig. 3. Percentage of cells expressing cyclin D1, after exposure to 7-hydroxycoumarin for 24, 48 and 72 h, at a concentration of 160 µg/ml.

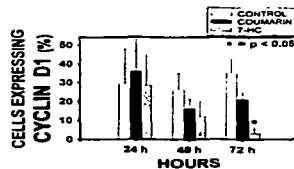


Fig. 4. Mean of the percentages of cells expressing cyclin D1, after exposure to coumarin or 7-hydroxycoumarin at a concentration of 160 µg/ml (n = 3).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

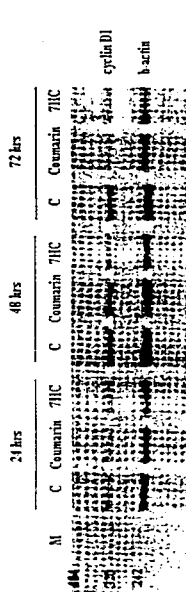


Fig. 5. Cyclin D1 RNA messenger after exposure to coumarin or 7-hydroxycoumarin for 24, 48, and 72 h, at a concentration of 160 µg/ml.

fluorescence of the cells incubated with the corresponding isotype control antibody (see Fig. 3). Each experiment was performed three times, and the mean values (\pm S.E.M.) are shown in Figs. 4, 6 and 7.

At a concentration of 80 µg/ml, no effect was observed with any of the two compounds. At a concentration of 160 µg/ml, the following effects were observed.

Cyclin D1: exposure of the cells to 7-hydroxycoumarin for 24 h did not affect the percentage of cells expressing cyclin D1 (see Fig. 4). Exposure of 48 h decreased the percentage of cells expressing cyclin D1 to one half of the control value. This reduction was not statistically significant. However, as shown in Table 1, exposure of 72 h decreased the percentage of the cells expressing cyclin D1 to 3%, compared to the control value of 35% ($P < 0.05$). No difference was observed in the level of messenger RNA (mRNA) of cyclin D1 measured by RT-PCR, between control cells and 7-hydroxycoumarin-treated cells (see Fig. 5).

Exposure to coumarin for 24 h, did not alter the percentage of cells expressing cyclin D1. The percentage was decreased approximately to one half with respect to the control values with exposures of 48 and 72 h. These reductions were not statistically significant.

Cyclin E: the percentages of cells expressing cyclin E were not affected by exposure to the compounds (see Fig. 6).

Cyclin A: 7-hydroxycoumarin produced after 48 and 72 h a progressive decrease in the percent-

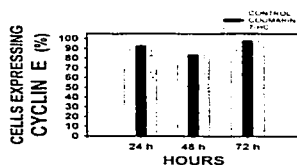


Fig. 6. Mean of the percentages of cells expressing cyclin E, after exposure to coumarin or 7-hydroxycoumarin at a concentration of 160 µg/ml ($n = 3$).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

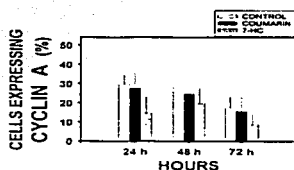


Fig. 7. Mean of the percentages of cells expressing cyclin A, after exposure to coumarin or 7-hydroxycoumarin at a concentration of 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($n = 3$).

age of cells expressing cyclin A. These effects did not reach statistical significance (see Fig. 7). This decrease might be attributed to an indirect effect, resulting from the diminished number of cells in phases S and G_2 , in which cyclin A is expressed.

4. Discussion

The cytostatic effect of 7-hydroxycoumarin in the adenocarcinoma cell line A-427 is consistent with the cytostatic effects reported by various authors in other cell lines [9], and by us in the murine melanoma cell line B16-F10 [31]. Also, the lack of a significant effect of coumarin on the cell cycle is consistent with the observations of Kahn et al. on murine fibroblasts [35].

The inhibition of the cell cycle at transition G_1/S is consistent with the cytostatic effect of

7-hydroxycoumarin. Furthermore, the decrease in the percentage of cells expressing cyclin D1 indicates that the action of 7-hydroxycoumarin involves early events in phase G_1 .

The D-type cyclins (D1, D2 and D3) and their major kinase partners CDK4 and CDK6 regulate G_0 - G_1/S progression by means of phosphorylation and inactivation of the retinoblastoma gene product pRb [12,13,36]. Deregulation of the cyclin D1/CDK4-Rb/E2F pathway is a usual feature of the neoplastic phenotype and has been implicated in cancer pathogenesis [17]. The cyclin D1 is a protein frequently deregulated in many cancer types and tumoral cell lines, and it has been proposed as a prognostic marker [37]. The signal pathways that regulate gene transcription of cyclin D1 are commonly altered. In addition, several abnormalities of cyclin D1 gene have been described [16]. Inhibition of cyclin D1 has been proposed as a pharmacological and therapeutic target for the development of novel antitumor agents [38,39].

Absence of changes in the level of cyclin D1 mRNA suggests a post-transcriptional effect of 7-hydroxycoumarin. Two pathways have been described which regulate post-transcriptionally the levels of cyclin D1: (1) translation of the mRNA by Ras/P13K/Akt, which increases the level of the cyclin [40]; (2) phosphorylation of the cyclin by glycogen synthase kinase-3 β (GS K3 β), which leads to cyclin degradation [41]. Decrease of mRNA translation of cyclin D1 has been observed with chemical inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) [40,42]. Whether 7-hydroxycoumarin inhibits translation of cyclin

Table 1
Effects of coumarin and 7-hydroxycoumarin in the human lung adenocarcinoma cell line A-427 after 72 h exposure to a concentration of 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *

Compound	Cells in S phase (% \pm S.E.M.)	Cells expressing cyclin D1 (% \pm S.E.M.)	Cells expressing cyclin E (% \pm S.E.M.)	Cells expressing cyclin A (% \pm S.E.M.)
Control	33 (\pm 1.1)	35 (\pm 6.6)	88 (\pm 5.3)	17 (\pm 5.7)
Coumarin	34 (\pm 2.3)	21 (\pm 3.8)	78 (\pm 6.9)	16 (\pm 6.9)
7-Hydroxycoumarin	20 (\pm 0.9)*	3 (\pm 1.7)*	92 (\pm 5.5)	9 (\pm 5.4)

* Mean of the percentages of cells in the S phase; and mean of the percentages of cells expressing cyclins D1, E and A.
* $P < 0.05$.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

D1 mRNA, as well as the stability of its protein remain to be investigated.

On the other hand, flavopyridol down-regulates cyclin D1 and inhibits the activities of several CDKs [43]. We shall investigate whether 7-hydroxycoumarin and other more active coumarins also affect the activity of CDKs.

5. Conclusions

The cytostatic effect of 7-hydroxycoumarin is elicited by a selective decrease in the percentage of cells expressing cyclin D1. These results are consistent with the inhibition of the cell cycle at the G₁/S transition. As the level of mRNA of cyclin D1 was not affected by 7-hydroxycoumarin, the protein decrease appears to be posttranscriptional. Further studies will be directed to clarify the nature of the posttranscriptional effects. Having defined the phase of the cycle and the cyclin involved in the cytostatic effect of 7-hydroxycoumarin, development of more active coumarin compounds using this pharmacological target will follow.

Acknowledgements

This work was supported by the following grants: CONACYT 92229 and F643-M9406, PUIS 8687-297-S-V-99, DGAPA IN 206599. We gratefully acknowledge the financial help from BYK-GULDEN México, to attend the 11th NCI-EORTC-ACR Symposium on New Drugs in Cancer Therapy.

References

- [1] Gary J, O'Kenney R, O'Kenney K. The chemistry and occurrence of coumarins. In: O'Kenney R, Thornes RD, editors. Coumarins Biology, Applications and Mode of Action. New York: Wiley, 1997:23-66.
- [2] Cox D, O'Kenney R, Thornes RD. The rarity of liver toxicity in patients treated with coumarin (1,2-benzopyrone). *Hum Toxicol* 1989;6:501-6.
- [3] Marshall ME, Mendelsohn L. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with coumarin (1,2 benzopyrone) and cimetidine: a pilot study. *J Clin Oncol* 1987;5:862-6.
- [4] Marshall ME, Butler K, Hermansen D. Treatment of hormone-refractory stage D carcinoma of prostate with coumarin (1,2-benzopyrone) and cimetidine: a pilot study. *Prostate* 1990;17:93-9.
- [5] Mohler JL, Gomella LG, Crawford ED, et al. Phase II evaluation of coumarin (1,2-benzopyrone) in metastatic prostatic carcinoma. *Prostate* 1992;20:123-31.
- [6] Thornes RD, Daly L, Lynch G, et al. Treatment with coumarin to prevent or delay recurrence of malignant melanoma. *J Cancer Res Clin Oncol (Suppl)* 1994;120:32-4.
- [7] Ritschel WA, Brady ME, Tan HSI, Hoffmann KA, Yiu IM, Grumlich KW. Pharmacokinetics of coumarin and its 7-hydroxy-metabolites upon intravenous and per-oral administration of coumarin in man. *Eur J Clin Pharmacol* 1977;12:457-61.
- [8] Egan D, O'Kenney R, Moran E, Thornes RD. The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarin-related compounds. *Drug Metab Rev* 1990;22:503-29.
- [9] Marshall ME, Kervin K, Benefield C, Umerani A, Albainy-Jenei S, Zhao Q, Khazaeli MB. Growth-inhibitory effects of coumarin (1,2 benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin on human malignant cell lines in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol (Suppl)* 1994;120:3-10.
- [10] López-González S, García V, Aguilar D, et al. Efecto citostático de la cumarina y la 7-hidroxicumarina en tres líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar humano. *Rev Inst Natl Enf Resp Mex* 1998;11(4):261-7.
- [11] Shapiro GI, Park JE, Edwards CHD, et al. Multiple mechanisms of p16^{INK4} inactivation in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1995;55:6200-9.
- [12] Graña X, Premkumar RE. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene* 1995;11:211-9.
- [13] Arellano M, Moreno S. Regulation of CDK/cyclin complex during the cell cycle. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29:559-73.
- [14] Pines J. Cyclin and cyclin-dependent kinases: theme and variations. *Adv Cancer Res* 1995;66:181-212.
- [15] Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996;274:1672-7.
- [16] Bartkova J, Lukas J, Bartek J. Aberrations of the G₁ and G₁/S-regulating genes in human cancer. *Prog Cell Cycle Res* 1997;3:211-20.
- [17] Sherr CJ. The peroveller lecture: cancer cell cycle revisited. *Cancer Res* 2000;60:3689-95.
- [18] Lovec H, Sewing A, Lucibello FC, Muller R, Moroy T. Oncogenic activity of cyclin D1 revealed through cooperation with Ha-ras: link between cell cycle control and malignant transformation. *Oncogene* 1994;9:323-6.
- [19] Nakagawa H, Wang TC, Zukerberg L, et al. The targeting of the cyclin D1 oncogene by an Epstein-Barr virus promoter in transgenic mice causes dysplasia in the tongue, esophagus and forestomach. *Oncogene* 1997;14:1185-90.

TESIS CONT
FALLA DE ORIGEN

- [20] Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. Growth imbalance and altered expression of cyclins B1, A, E and D3 in MOLT-4 cells synchronized in the cell cycle by inhibitors of DNA replication. *Cell Growth Differ* 1995;6:1485–93.
- [21] Tam SW, Theodoras AM, Shay JW, Druetta GF, Pagano M. Differential expression and deregulation of cyclin D1 in normal and tumor cells: association with Cdk4 is required for cyclin D1 function in G1 progression. *Oncogene* 1994;9:2663–74.
- [22] Yamanouchi H, Furuhara M, Fujita J, Murakami H, Yoshinouchi T, Takahara J, Ohtsuki Y. Expression of cyclin E and cyclin D1 in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2001;31:3–8.
- [23] Darzynkiewicz Z, Traganos F, Gong J. Expression of cell cycle specific proteins cyclins as a marker of the cell cycle independent of DNA content. *Methods Cell Biol* 1994;41:422–35.
- [24] Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. Use of cyclin E restriction point to map cell arrest in G1 induced by robitrate, cyclohexamide, staurosporine, lovastatin, mimosine and quercetin. *Int J Oncol* 1994;4:803–8.
- [25] Darzynkiewicz Z, Gong J, Juan G, Ardelt B, Traganos F. Cytometry of cyclin proteins. *Cytometry* 1996;25:1–13.
- [26] Moorman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferative and cytotoxic assays. *Immunol Methods* 1983;65:55–63.
- [27] Dolbear F, Gratzner H, Pullavcin MG, Gray JW. Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromo-deoxyuridine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:5573–7.
- [28] Chomezynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156–9.
- [29] Xion Y, Connolly T, Fletcher B, Beach D. Human D-type cyclin. *Cell* 1991;65:691–9.
- [30] Ponte P, Ng SY, Engel J, Gunning P, Kedes L. Evolutional conservation in the untranslated region of actin mRNA: DNA sequence of a human beta-actin cDNA. *Nucleic Acids Res* 1984;12:1687–96.
- [31] Jiménez-Orozco FA, Molina-Guarneño FA, Mendoza-Palho N, León-Cedeño F, Flores B, Santos E, Mandoki JJ. Cytostatic activity of coumarin metabolites and derivatives in the B16 F10 murine melanoma cell line. *Melanoma Res* 1999;9:243–7.
- [32] Pusch O, Soucek T, Wawru E, Hengatschlager-Ottmad E, Bernaschek G, Hengatschlager M. Specific transformation abolishes cyclin D1 fluctuation throughout the cell cycle. *FEBS Lett* 1996;385:143–8.
- [33] Gong J, Ardelt B, Traganos F, Darzynkiewicz Z. Unscheduled expression of cyclin B1 and cyclin E in several leukemic and solid tumor cell lines. *Cancer Res* 1994;54:4285–8.
- [34] Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. Threshold expression of cyclin E but not D1 type cyclins characterizes normal and tumour cell entering S phase. *Cell Prolif* 1995;28:337–46.
- [35] Kahn J, Preis P, Waldman F, Tseng A Jr. Coumarin modulates the cell-cycle progression of an MTV-EJras cell line. *Cancer Res Clin Oncol (Suppl)* 1994;120:19–22.
- [36] Mittnacht S. Control of Rb phosphorylation. *Curr Opin Genet Dev* 1998;8:21–7.
- [37] Caputi M, Groeger AM, Esposito V, Müller MR, Wolner E, Giordano A. Prognostic role of cyclin D1 in lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:746–50.
- [38] McDonald ER, El-Deiry WS. Cell cycle control as a basis for cancer drug development. *Int J Oncol* 2000;16:871–86.
- [39] Sausville EA. Cyclin-dependent kinases: novel targets for cancer treatment. *Pharmacol Ther* 1999;82:285–92.
- [40] Muise-Helmericks RC, Grimes HL, Bellacosa A, Malstrom SE, Tsichlis PN, Rosen N. Cyclin D expression is controlled posttranscriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *J Biol Chem* 1998;273:29864–72.
- [41] Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ. Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 1998;12:3499–511.
- [42] Hashemolhosseini S, Nagamine Y, Morley SJ, Desrivieres S, Meroep L, Ferrari S, Rapamycin inhibition of the G1 to S transition is mediated by effects on cyclin D1 mRNA and protein stability. *J Biol Chem* 1998;273:14424–9.
- [43] Carlson B, Lahusen T, Singh S, et al. Down-regulation of cyclin D1 by transcriptional repression in MCF-7 human breast carcinoma cells induced by flavopiridol. *Cancer Res* 1999;59:4634–41.

65

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN