



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

"ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN SECUENCIAL DE
DAFNETINA (7,8 DIHIDROXICUMARINA) CON PACLITAXEL
Y CISPLATINO EN LAS LÍNEAS CELULARES MCF-7 y A-427"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

ROBERTO RAZO PAREDES



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA

MÉXICO, D. F.

2005



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Prof. JUAN JOSE MANDOKI WEITZNER.
Vocal	Prof. ALICIA CERVANTES PEREDO.
Secretario	Prof. FAUSTO ALEJANDRO JIMENEZ OROZCO.
1er. Suplente	Prof. MARIA EVA GONZALEZ TRUJANO.
2º. Suplente	Prof. MARCO VELASCO VELAZQUEZ.

Sitio en donde se desarrolló el tema:
LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR
FACULTAD DE MEDICINA UNAM.
Este trabajo fue realizado con el financiamiento del programa UNAM
(DGAPA), proyecto IN246202.



Asesor del tema:
Dr. FAUSTO ALEJANDRO JIMENEZ OROZCO.



Sustentante:
ROBERTO RAZO PAREDES.

A MIS PADRES

**ROBERTO RAZO VASQUEZ
MA. CRUZ PAREDES GARCÍA**

Quienes me han apoyado a lo largo de mi vida.

A MIS HERMANA

NELLY GABRIELA RAZO PAREDES

A quien admiro por su gran determinación.

A MI HERMANO

DIEGO RAZO PAREDES

Quien me ha recordado la inocencia de la niñez.

A los integrantes del Jazmin Club, quienes me han brindado su amistad: a Jazmín, a Claudia, a Belinda, a Alma, a Adriana, a Anahí, a Norma, a Cinthya, a Carlos Catana, a Carlos Lugo y a Angel.

Al Dr. Nicandro Mendoza Patiño y al Dr. Juan José Mandoki Weitzner, por haber permitidola realización de este trabajo.

Al Dr. Alejandro Jimenez Orozco, quien además de guiarme académicamente me ha brindado su amistad.

Al Dr. Francisco Martínez, por su ayuda tan desinteresada

A los integrantes del Laboratorio de Farmacología Celular, por compartir momentos amenos durante mi estancia con ellos: a Juanola García Mondragón, a Estela Estrada Gutierrez, a Violeta Larios Serrato, a la señora Amelia, a Diana Barrera, a Marco Velasco, a Adriana Mejía, a Charmina Aguirre, a Beatriz, a Ana y a Mario.

A todos los profesores que han contribuido con mi formación académica a lo largo de mi vida.

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 CÁNCER	1
1.1.1 CÁNCER DE PULMÓN	2
1.1.2 CÁNCER DE MAMA	4
1.2 CICLO CELULAR	5
1.2.1 REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR	6
1.2.2 FASE G ₁ Y PUNTO DE RESTRICCIÓN (VÍA RB)	6
1.2.3 PUNTOS DE CONTROL	7
1.3 QUIMIOTERAPIA ANTINEOPLÁSICA	8
1.4 FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS EMPLEADOS EN EL PRESENTE TRABAJO	10
1.4.1 CISPLATINO	10
1.4.2 PACLITAXEL	11
1.5 RESISTENCIA A LA QUIMIOTERAPIA ANTINEOPLÁSICA	13
1.5.1 GLICOPROTEÍNA P	13
1.5.2 RESISTENCIA MEDIADA POR EL CICLO CELULAR	13
1.6 LAS CUMARINAS COMO AGENTES CON POTENCIAL USO ANTINEOPLÁSICO	14
1.6.1 BIOTRANSFORMACIÓN DE LA CUMARINA	14
1.7 INHIBICIÓN DE LA CICLINA D1 COMO BLANCO FARMACOLÓGICO DE LAS CUMARINAS	17
2 JUSTIFICACIÓN	19
2.1 HIPÓTESIS	20
2.2 OBJETIVOS GENERALES	20
2.3 OBJETIVOS PARTICULARES	20
3 MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1 REACTIVOS	21
3.2 LÍNEAS CELULARES	21
3.3 MEDIO Y CONDICIONES DE CULTIVO	21

3.4 ENSAYOS DE SENSIBILIDAD A FÁRMACOS	22
3.4.1 ENSAYOS DE REDUCCIÓN DE MTT	23
3.5 CONDICIONES EXPERIMENTALES	24
3.6 DISEÑO EXPERIMENTAL	25
3.6.1 EXPOSICIÓN INDIVIDUAL	26
3.6.2 EXPOSICIÓN SIMULTÁNEA Y SECUENCIAL	26
3.7 ANÁLISIS DEL EFECTO COMBINADO DE LOS FÁRMACOS	26
4 RESULTADOS	28
4.1 EXPOSICIÓN INDIVIDUAL A FÁRMACOS	28
4.1.1 EFECTOS EN LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA MAMARIO MCF-7	28
4.1.2 EFECTOS EN LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA PULMONAR A-427	29
4.2 EXPOSICIÓN SIMULTÁNEA	30
4.2.1 EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN SIMULTÁNEA A CISPLATINO Y DAFNETINA EN LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA MAMARIO MCF-7	30
4.2.2 EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN SIMULTÁNEA A CISPLATINO Y DAFNETINA EN LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA PULMONAR A-427	30
4.2.3 EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN SIMULTÁNEA A PACLITAXEL Y DAFNETINA EN LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA MAMARIO MCF-7	31
4.2.4 EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN SIMULTÁNEA A PACLITAXEL Y DAFNETINA EN LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA PULMONAR A-427	31
4.3 EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN SECUENCIAL A FÁRMACOS	32
4.3.1 ASOCIACIONES CISPLATINO Y DAFNETINA	32
4.3.1.1 EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A CISPLATINO SEGUIDA DE DAFNETINA EN LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA MAMARIO MCF-7	32

4.3.1.2 EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A DAFNETINA SEGUIDA DE CISPLATINO EN LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA MAMARIO MCF-7	32
4.3.1.3 EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A CISPLATINO SEGUIDA DE DAFNETINA EN LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA PULMONAR A-427	34
4.3.1.4 EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A DAFNETINA SEGUIDA DE CISPLATINO EN LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA PULMONAR A-427	34
4.3.2 ASOCIACIONES PACLITAXEL Y DAFNETINA	35
4.3.2.1 EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A PACLITAXEL SEGUIDA DE DAFNETINA EN LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA MAMARIO MCF-7	36
4.3.2.2 EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A DAFNETINA SEGUIDA DE PACLITAXEL EN LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA MAMARIO MCF-7	36
4.3.2.3 EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A PACLITAXEL SEGUIDA DE DAFNETINA EN LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA PULMONAR A-427	37
4.3.2.4 EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A DAFNETINA SEGUIDA DE PACLITAXEL EN LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA PULMONAR A-427	38
5 DISCUSIÓN	39
6 CONCLUSIONES	41
7 REFERENCIAS	42

1 INTRODUCCIÓN

1.1 CÁNCER.

Durante la embriogénesis las células deben proliferar, migrar, diferenciarse e incluso morir en la secuencia correcta para dar origen a tejidos y órganos. En los organismos desarrollados las células también mantienen un equilibrio a través de distintos mecanismos de regulación. Sin embargo, estos sistemas pueden sufrir cambios que originen la formación de células malignas y posteriormente de tumores.

El desarrollo del cáncer en humanos es consecuencia de una compleja sucesión de eventos que se realizan a lo largo de años y que involucran cambios en el genoma. La acumulación progresiva de mutaciones en alelos de genes reguladores del ciclo celular y de la reparación del ADN, dan origen a la inestabilidad genómica que caracteriza a las células tumorales (Hahn *et al*, 2002).

Las mutaciones en su mayoría son ocasionadas por agentes que dañan el ADN, que interfieren en su replicación o en su reparación. Estos agentes pueden ser compuestos químicos, así como radiaciones con suficiente energía para romper o formar enlaces químicos. Aunado a lo anterior algunos virus pueden inducir la formación de tumores malignos en el hospedero (Darnellet *al*, 1999).

A continuación se describen las principales anormalidades que resultan de las mutaciones:

- 1) Proteínas alteradas. Un oncogén puede dar origen a un producto proteico con actividad anómala, relativa a la del proto-oncogén.
- 2) Secuencias reguladoras alteradas. Las transformaciones malignas pueden resultar de la expresión inapropiada de una proteína celular normal.
- 3) Pérdida de señales de degradación. Una proteína codificada por un oncogén que se degrada más lentamente que la proteína celular normal correspondiente, puede alterar las funciones celulares al encontrarse en concentraciones inapropiadas.
- 4) Rearreglos cromosómicos. Un oncogén puede ser transcrito inapropiadamente cuando se encuentra bajo control de una secuencia reguladora extraña a través de rearrreglos cromosómicos (Hanahan *et al*, 2000).

- 5) Amplificación genética. La sobre expresión de un oncogén también puede ocurrir cuando se replica varias veces, ya sea como copias cromosómicas secuencialmente repetidas o como partículas extra cromosómicas.
- 6) Inserciones virales en un cromosoma. La expresión inapropiada de un oncogén puede resultar de la inserción de un genoma viral en un cromosoma celular, de tal forma que el proto-oncogén se encuentra bajo el control transcripcional de una secuencia reguladora viral.
- 7) Pérdida o inactivación de genes supresores de tumores.

En el mundo, cada año seis millones de personas mueren a causa del cáncer y 10 millones son diagnosticadas con este mal. En el hombre, el cáncer de pulmón ocupa el primer lugar con una mortalidad del 27.1 %, mientras que en la mujer, ocupa el segundo lugar con una mortalidad del 10.7 %. Por otra parte, el cáncer de mama en la mujer ocupa el primer lugar con una mortalidad del 13.3 % (WHO Organización Mundial de la Salud).

En México los tumores malignos fueron la segunda causa de muerte en el periodo 1990-2002 (INEGI). En la población masculina de nuestro país, el cáncer de pulmón ocupó el primer lugar con una mortalidad 10.9 % y en la población femenina ocupó el cuarto lugar con una mortalidad del 5 %. En las mujeres mexicanas, el cáncer de mama ocupa el segundo lugar con una mortalidad del 8.4 %, superado solo por el cáncer cérvico-uterino que tiene una mortalidad del 11.3 %.

1.1.1 CÁNCER DE PULMÓN.

Como su nombre indica, el cáncer de pulmón es una enfermedad que se origina en el tejido de los pulmones. El cáncer de pulmón se clasifica de acuerdo a los criterios de la Organización Mundial de la Salud. Cuatro tipos histológicos están establecidos: i) carcinoma epidermoide o escamoso, ii) adenocarcinoma, iii) carcinoma de células grandes y iv) carcinoma de células pequeñas (*American Lung Association*, página web).

A la fecha, se han identificado diversos genes que presentan anormalidades y cuyos productos proteicos participan en forma importante en la patología del cáncer de pulmón. En

la tabla 1 se indican los genes que presentan alteraciones con mayor frecuencia en el cáncer de pulmón y la función de algunos de sus productos (ver sección 1.2).

Algunos de estos genes codifican para proteínas reguladoras del ciclo celular. Los oncogenes que presentan mutaciones con mayor frecuencia son *CCND1*, *KRAS2* y *MYC*. Por otra parte, los genes supresores de tumores como *RB1*, *TP53* *CDKN2A*, también presentan anomalías en este tipo de tumores.

GEN	FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA.	ANORMALIDAD	REFERENCIA
<i>KRAS2</i>	Inicia una cascada de señales, resultado de la cual se activan factores de transcripción	Mutación puntual en el codón 12	Keohavong 2000 Jiménez-Orozco 1999
<i>TP53</i>	Arresto celular cuando el ADN está dañado.	Mutación puntual Delección	Harris 2001 Jiménez-Orozco 1999 Carbone D 1996
<i>MDM2</i>	El producto del gen se une al dominio de transactivación de p53, con la consecuente degradación mediada por ubiquitinación	Amplificación del gen	Rom 2000
<i>MYC</i>	Estimula el crecimiento celular y la proliferación.	Amplificación del gen	Rom 2000 Jiménez-Orozco 1999 Prins J 1993
<i>FHIT</i>	Gen supresor de tumores	Mutación Delección	Rom 2000
<i>TERT</i>	Transcriptasa reversa de telomerasa y RNA telomerasa.. Mantiene el tamaño de los telómeros.	Expresión en células transformadas	Rom 2000
<i>RB1</i>	Secuestra a las proteínas E2F e impide la expresión de genes dependientes de estos factores.	Delección Expresión alterada de la proteína	Jiménez-Orozco 1999 Carbone D 1996
<i>CDKN2A</i>	Inhibidor selectivo de cinasas Cdk4 y Cdk6	Alteración en la expresión de la proteína	Jiménez-Orozco 1999 Shapiro 1995
<i>CCND1</i>	Complejo ciclina D1 – Cdk4 estimula la progresión del ciclo celular.	Amplificación del gen	Rom 2000

Tabla 1. Genes alterados en el cáncer de pulmón

1.1.2 CÁNCER DE MAMA.

El cáncer de mama se origina en el tejido de las glándulas mamarias. El carcinoma ductal es el cáncer de mama más común (80 % de los casos), seguido por el carcinoma lobular (10 a 15 % de casos). El cáncer que se origina en estas áreas puede diseminarse e invadir otras áreas del tejido mamario. Si las células malignas llegan a los nódulos linfáticos, pueden llegar a otras áreas del cuerpo por medio del sistema linfático (*Medline Plus*, página web).

Con el avance de la ciencia, se han identificado diversos genes que presentan anomalías y cuyos productos proteicos participan en forma importante en la patología del cáncer de mama. En la tabla 2 se enlistan algunos genes que se ha reportado participan en el desarrollo del cáncer de mama.

GEN	FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA.	ANORMALIDAD	REFERENCIA
<i>BRCA1</i>	Reparación de ADN.	Deleciones Mutaciones puntuales	Rahman y Stratton 1998
<i>BRCA2</i>	Reparación de ADN.	Deleciones Mutaciones puntuales	Rahman y Stratton 1998
<i>TP53</i>	Supresor de tumores, causa Arresto celular o apoptosis.	Mutación.	Hortobagyi 1998
<i>BCL2</i>	Bloquea liberación de citocromo c de la mitocondria. Promueve la activación de procaspasa.	Mutación.	Hortobagyi 1998
<i>MYC</i>	Estimula el crecimiento celular y la proliferación.	Mutación Amplificación del gen	Hortobagyi 1998, Alberts 2002
<i>PTEN</i>	Fosfatasa del fosfatidil inositol Inhibición de crecimiento.	Mutación	Gutmacher y Collins 2003 Alberts 2002
<i>CHEK2</i>	Reconoce y repara ADN dañado.	Delección (1100 delC)	Gutmacher y Collins 2003
<i>ATM</i>	Reparación de ADN.	Mutación	Gutmacher y Collins 2003
<i>ERBB2</i>	Receptor tirosin cinasa relacionado con el receptor EGF.	Amplificación Sobre-expresión	Hortobagyi 1998
<i>CCND1</i>	Complejo ciclina D1 – Cdk4 estimula la progresión del ciclo celular.	Amplificación del gen	Hortobagyi 1998

Tabla 2. Genes alterados en el cáncer de mama

Las proteínas BRCA1 y BRCA2 participan en los mecanismos de reparación del ADN. Se ha observado que mutaciones constitutivas en los genes de estas proteínas correlacionan con una alta probabilidad de desarrollar cáncer de mama, por lo que se han propuesto como marcadores moleculares de diagnóstico (Guttmacher y Collins, 2003).

La deficiencia en los mecanismos de reparación produce amplificación de genes que conlleva a la sobre-expresión de sus productos proteicos, tal es el caso de *ERBB2* y de *CCND1* (Hortobagyi *et al*, 1998, Kuo *et al*, 1998, Haber, 1995). Otros genes que presentan anomalías en el cáncer de mama son *TP53*, *BCL2* y *MYC* (Salgai *et al*, 1998).

1.2 CICLO CELULAR.

Todo organismo multicelular depende de la proliferación celular para un adecuado desarrollo. Este proceso celular sigue una serie de eventos ordenados, cuyos principales objetivos son duplicar fielmente el ADN genómico, dividir el contenido celular y asegurar la distribución de una copia fiel del genoma a cada una de las células hijas. El ciclo celular se divide en cuatro fases: G₁, S, G₂ y M.

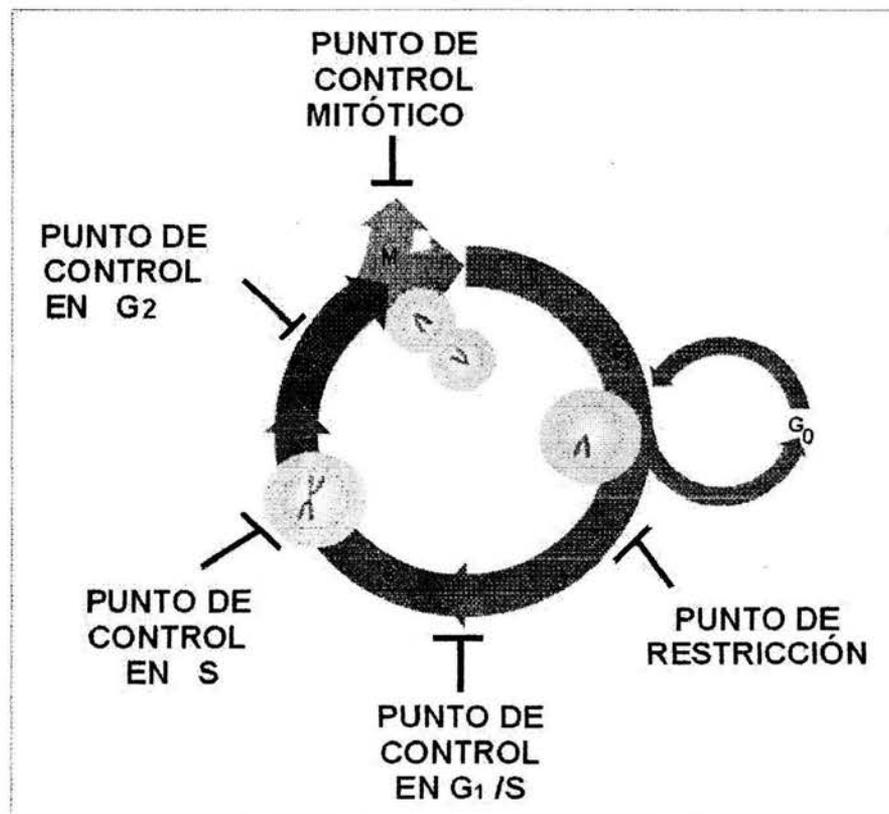


Figura 1. Ciclo celular.

En fase G_1 se sintetizan proteínas necesarias para la división; en la fase S se lleva a cabo la replicación del ADN; la fase G_2 es el periodo de transición entre la fase S y la M y en ella se prepara la célula para la mitosis; en la fase M o mitosis se lleva a cabo la división celular, la cual da origen a dos células hijas.

1.2.1 REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR.

La progresión a través de cada fase está regulada por la activación secuencial de las cinasas dependientes de ciclinas (cdk). Las cdk (cdk1-cdk10) son proteínas de la familia de cinasas de serina/treonina que actúan como subunidades catalíticas y en su estado monomérico son inactivas. Estas cinasas requieren unirse a sus subunidades activadoras llamadas ciclinas (ciclina A-K y T1-T3) para formar así complejos activos ciclina/CDK; y son inhibidas por proteínas inhibidoras de CDK (CKI) (Martínez *et al*, 2001, Kornbluth, 2000).

Los complejos ciclina-cdk activos (CDK) fosforilan substratos claves de la maquinaria del ciclo celular. 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 reguladores del ciclo (ciclinas, CKI, 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 G_1 (Bartek *et al*, 1996) y b) los puntos de control (del inglés *checkpoints*) que regulan la progresión entre las distintas fases del ciclo (O'Connor *et al*, 1996; Kornbluth, 2000).

1.2.2 FASE G_1 Y PUNTO DE RESTRICCIÓN (VÍA pRB).

Las células que no proliferan se encuentran en la fase G_0 , en la que la maquinaria del ciclo celular se encuentra inactiva. La entrada al ciclo celular y la progresión en la fase G_1 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) (Johnson *et al*, 1999; Lavia *et al*, 1999). Las ciclinas del tipo D son las primeras proteínas reguladoras del ciclo celular que se sintetizan en respuesta a señales mitogénicas. Estas ciclinas se unen a cdk4 y cdk6 y forman los complejos activos D-CDK4 y D-CDK6. La fosforilación de pRb en G_1 por D-CDK4 y D-CDK6

constituye el paso crucial que permite la proliferación celular. La proteína pRb regula negativamente la progresión del ciclo en la fase G_1 , a través de secuestro de los factores E2F.

Las proteínas de la familia E2F (E2F 1-5) son factores de transcripción que forman heterodímeros con las proteínas DP (DP 1-3) y activan la transcripción de un banco de genes cuyos productos proteicos regulan el ciclo celular y participan en la síntesis de ADN (Lavia *et al* 1999). Algunas de las proteínas que se sintetizan en respuesta a los factores E2F son ciclina E, ciclina A, cdk1, dihidrofolato-reductasa, timidina cinasa, ADN polimerasa, entre otros. En su forma hipofosforilada, RB se une a los factores de la familia E2F y suprime su función transcripcional, produciendo un arresto en G_1 . La fosforilación de RB en G_1 por D-CDK4 y D-CDK6 libera a los factores E2F, permitiendo la síntesis de las proteínas dependientes de estos factores, y así, la consecuente progresión del ciclo celular en la fase S (Kaelin, 1999).

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 *et al*, 1997; Bartek *et al*, 2001). La expresión de la ciclina D1 está frecuentemente alterada en varios tipos de cáncer y líneas tumorales, y se ha propuesto como un marcador pronóstico (Caputi *et al*, 1999). Su inhibición se ha propuesto como un blanco farmacológico y terapéutico para el desarrollo de nuevos agentes antitumorales (McDonald *et al*, 2002, Hardcastle *et al*, 2002, Yu *et al*, 2001).

1.2.3 PUNTOS DE CONTROL

Existen sistemas de control posteriores al punto de restricción que pueden inhibir la progresión del ciclo celular en respuesta al estrés genotóxico (O'Connor *et al*, 1996, Kornbluth, 2000). Se han descrito cuatro puntos de control, uno en cada fase que pueden ser activados por diversos estímulos o por agentes antineoplásicos.

La fidelidad en la replicación del ADN y su correcta distribución durante la mitosis es una tarea central en el ciclo celular. Esto requiere de sistemas que verifiquen la correcta culminación de eventos como son la síntesis de ADN, la condensación de los cromosomas o

la formación del huso mitótico. Los puntos de control son vías bioquímicas de señalización sensibles a varios tipos de defectos estructurales y funcionales del ADN; pueden activar múltiples respuestas celulares cuando detectan daños en los eventos arriba mencionados. En otras palabras, los puntos de control son alarmas de daño genotóxico que detectan errores y activan la maquinaria de reparación del ADN. También se produce inhibición de la progresión del ciclo celular (arresto celular), dando tiempo a la célula a reparar el daño. Si el daño es irreparable, se induce la muerte celular programada (Bartek *et al*, 2001). 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 cromosómicas que incrementan la probabilidad de desarrollo de neoplasias malignas (Barkova *et al*, 1997; Bartek *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 (Martínez *et al*, 2001).

1.3 QUIMIOTERAPIA ANTINEOPLÁSICA.

La quimioterapia es actualmente la opción más indicada en el tratamiento de varios tipos avanzados de cáncer. Los principales agentes antineoplásicos empleados en la quimioterapia buscan inducir el arresto irreversible en la célula, activando los puntos de control a través de distintas vías; en último término se busca activar las vías de apoptosis. Cada agente produce arrestos en determinadas fases del ciclo dependiendo de sus mecanismos de acción (Kornbluth, 2000).

Dentro de los agentes antineoplásicos los inhibidores de topoisomerasas, los agentes alquilantes, y los antimetabolitos producen daño al ADN (Jonson *et al*, 1999; O'Connor *et al*, 1996). En neoplasias como la leucemia linfoblástica aguda en niños y en subgrupos de enfermedad de Hodgkin y linfoma no Hodgkin, la quimioterapia frecuentemente tiene buenos resultados. En la tabla 3 se mencionan algunos de los principales agentes quimioterapéuticos prototipo y su efecto en el ciclo celular.

El éxito de la administración individual de un agente es limitado y 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 (Jonson *et al*, 1999; DeVita *et al*, 1997).

En cáncer de mama, de colon o de pulmón la quimioterapia como tratamiento coadyuvante incrementa la sobrevivencia. Desafortunadamente, en estos pacientes el índice terapéutico es muy estrecho, las respuestas son parciales, frecuentemente breves e impredecibles.

Después de la quimioterapia inicial las células tumorales desarrollan distintos tipos de resistencia, lo cual restringe la eficacia de los tratamientos. Además la acción de los agentes antineoplásicos es poco selectiva y dañan también a las células sanas que se encuentran en proliferación (Shah *et al*, 2001).

CLASE	TIPOS DE AGENTES	MECANISMO DE ACCIÓN	EFFECTO EN EL CICLO CELULAR.
Agentes alquilantes	Nitrosoureas, Triazenos.	Forman enlaces covalentes con el ADN	Arresto en G1/S Arresto en S Apoptosis
Antimetabolitos	Análogos de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina.	Inhibición de síntesis de pirimidinas y de purinas	Arresto en S
Productos naturales	Alcaloides de Vinca, Taxanos,	Inhibición de la función de microtúbulos.	Arresto en G2/M Arresto en M Apoptosis
	Epipodofilotoxinas	Interacción con la topoisomerasa II y ADN.	Arresto en S
Agentes diversos	Platinos	Formación de enlaces covalentes con el ADN.	Arresto en G1/S Arresto en S Apoptosis
	Hidroxiurea	Inhibe la ribonucleótido reductasa.	

Tabla 3. Agentes quimioterapéuticos y su impacto en el ciclo celular.
(Goodman *et al*, 1996)

1.4 FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS EMPLEADOS EN EL PRESENTE TRABAJO.

1.4.1 CISPLATINO.

El cisplatino o cis-diamino dicloroplatino II ($\text{Cl}_2 \text{H}_6 \text{N}_2 \text{Pt}$), es un compuesto inorgánico con peso molecular de 300.1g/mol. Fue sintetizado por M. Pyrone en 1844.

El cisplatino por su mecanismo de acción pertenece al grupo de agentes antineoplásicos conocidos como agentes alquilantes. En el citoplasma celular, los cloruros substituyentes del cisplatino son reemplazados por moléculas de agua generando especies cargadas positivamente, las cuales pueden reaccionar con los grupos amino de los nucleótidos y proteínas (sitios nucleofílicos) para formar enlaces covalentes (también llamados aductos). Trabajos recientes demuestran que ciertas proteínas nucleares se unen a los aductos **ADN – cisplatino**, lo que inhibe la reparación del ADN. La presencia de enlaces covalentes de cisplatino en el ADN desencadena arrestos en el ciclo celular y posteriormente induce la apoptosis. La especificidad del cisplatino en relación con la fase del ciclo celular parece diferir en diversos tipos de células, aunque durante la fase S son más intensos los efectos de los enlaces cruzados (Goodman *et al*, 1996; Jamieson y Lippard, 1999).

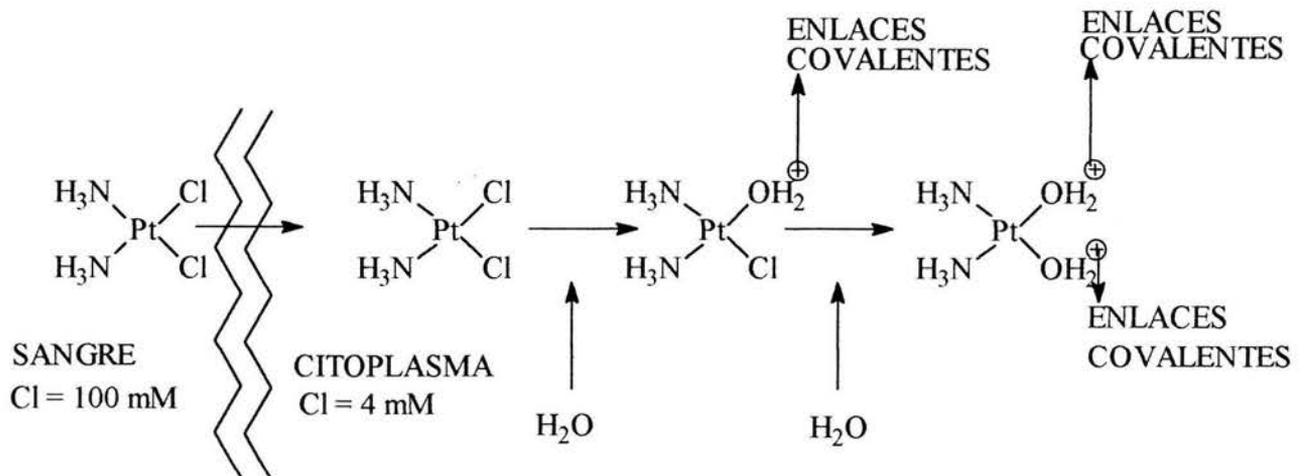


Figura 2. Mecanismo de acción del cisplatino.

Las quimioterapias de combinación que emplean cisplatino, muestran actividad antitumoral significativa contra cáncer de testículo, de ovario, de cabeza, de cuello y de pulmón. Los efectos colaterales más comunes son ototoxicidad, neuropatía periférica. A veces se presenta mielosupresión leve o moderada, con leucopenia, trombocitopenia y anemia transitorias. Los pacientes tratados con cisplatino pueden sufrir nefrotoxicosis cuando no son hidratados adecuadamente (Essigman *et al*, 2001).

El empleo del cisplatino en la quimioterapia contra el cáncer está limitado por la resistencia intrínseca o adquirida de las células tumorales hacia el fármaco. Se han propuesto varios mecanismos de resistencia: 1) Decremento en la concentración intracelular, debido a una disminución en el paso del fármaco al interior de la célula. 2) Inactivación aumentada del fármaco por moléculas como el glutatión. 3) Escisión incrementada de los enlaces covalentes con el ADN por vías de reparación. 4) Incremento en el nivel de tolerancia a los aductos; en estos casos hay una habilidad incrementada para replicar el ADN a pesar de la existencia de los aductos. 5) Expresión alterada de proteínas reguladoras implicadas en vías de señalización que controlan la apoptosis (Essigmann *et al*, 2001).

1.4.2 PACLITAXEL.

El paclitaxel (5 beta,20-epoxy-1,2 alpha,4,7 beta,10 beta,13 alpha-hexahidroxitax-11-en-9-one 4,10-diacetato benzoate de (2R,3S)-N-benzoil-3-fenilisoserine), con peso molecular de 853.9 g/mol, es un agente antineoplásico que actúa en la fase M del ciclo celular, inhibiendo la actividad de los microtúbulos. Este compuesto se aisló de la corteza del tejo *Taxus brevifolia* y es activo contra un amplio rango de tumores malignos que generalmente se consideran refractarios a la quimioterapia convencional. Los microtúbulos están compuestos de polímeros de tubulina en equilibrio dinámico con heterodímeros de tubulina, compuestos de sub unidades proteicas alfa y beta. Aunque una de sus funciones principales es la formación del huso mitótico, los microtúbulos también están involucrados en muchas funciones vitales durante la interfase, incluyendo el mantener la forma, la motilidad, la transmisión de señales y el transporte intracelular. El paclitaxel promueve la polimerización de la tubulina y los microtúbulos formados en presencia del paclitaxel son muy estables y disfuncionales. El paclitaxel se une al extremo N terminal del aminoácido 31 de la subunidad beta tubulina en el microtúbulo (Rowinski *et al*, 1995). Hay evidencia experimental de que el paclitaxel a bajas concentraciones induce muerte celular al causar una mitosis aberrante por una vía independiente de Raf-1, mientras que a altas concentraciones la muerte celular puede ser el resultado de arresto mitótico causado por una vía dependiente de Raf-1 (Horwitz *et al*, 1998).

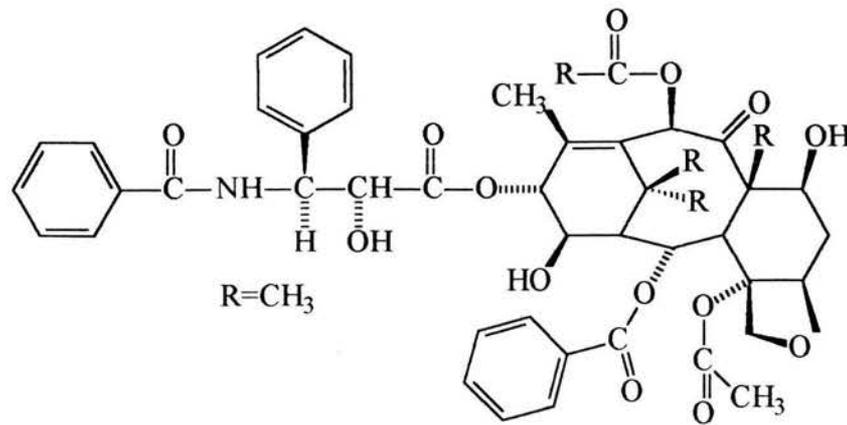


Figura 3. Estructura del paclitaxel.

Actualmente los taxanos representan la segunda línea de tratamiento de elección en el cáncer de mama, y se ha observado que los regímenes de tratamiento basados en taxanos mejoran la sobrevivencia. (Hortobagyi, 1998).

Los efectos adversos que sufren los pacientes tratados con paclitaxel son reacciones de hipersensibilidad tipo 1, incluyendo disnea con broncoespasmos, urticaria e hipotensión. A nivel hematológico puede ocasionar neutropenia, y raramente causa trombocitopenia y anemia severa. También pueden causar neuropatías periféricas, mialgias y artralgias (Rowinski *et al*, 1995).

La resistencia al paclitaxel, se ha caracterizado por dos mecanismos: 1) En algunas células tumorales, la velocidad de ensamblaje de microtúbulos es muy lenta, debido a que las tubulinas alfa y beta tienen deficiencias en su polimerización. Los taxanos, además de que no tienen efectos citotóxicos en este tipo de células, normalizan y favorecen la polimerización.

2) Un segundo mecanismo involucra la amplificación y sobreexpresión del gen que codifica para glicoproteínas de membrana que funcionan como bombas de eflujo. (Rowinsky *et al*, 1995).

1.5 RESISTENCIA A LA QUIMIOTERAPIA ANTINEOPLÁSICA.

El concepto de resistencia a la quimioterapia, se basa en parte en el trabajo de Luria y Delbruck, quienes encontraron que las bacterias desarrollan mutaciones que las hacen resistentes a los bacteriofagos (Luria *et al*, 1943). Al aplicar este concepto al cáncer, Goldie y Coldman proponen que la probabilidad de que un tumor contenga clones resistentes a la quimioterapia, al momento del diagnóstico es una función de la velocidad de mutación del cáncer y del tamaño del tumor (Shah *et al*, 2001).

Las células malignas resistentes a agentes antitumorales expresan en su membrana proteínas transportadoras de resistencia múltiple a drogas MDR (Multidrug-resistance) que expulsan del citoplasma distintos tipos de fármacos. En consecuencia durante la quimioterapia antineoplásica, las concentraciones intracelulares bajas de estos agentes no son suficientes para inhibir a las células tumorales. Estas proteínas son ATPasas de la superfamilia ABC (*ATP-binding cassette*) y sus genes se encuentran frecuentemente amplificados en varios tipos de tumores (Darnell *et al*, 1999).

1.5.1 GLICOPROTEINA P.

La glicoproteína P es una proteína de membrana de 170 kDa que pertenece a la familia de proteínas MDR que es codificada por el gen *MDR1* (Boumendjel *et al*, 2002), este gen se localiza en el cromosoma 7, banda q21.1 (Callen *et al*, 1987). Se ha propuesto que la inhibición de la glicoproteína P podría mejorar los tratamientos antineoplásicos combinados. El verapamil, que es un bloqueador de canales de calcio tipo L empleado en la terapia antihipertensiva, inhibe la actividad de la glicoproteína P *in vitro* (Tsuruo *et al*, 1982). Sin embargo, en la práctica clínica se ha observado que este tipo de interacciones farmacológicas no produce mejoras sustanciales en la eficacia de la quimioterapia (Thomas *et al*, 2003).

1.5.2 RESISTENCIA MEDIADA POR EL CICLO CELULAR.

En un esquema terapéutico combinado, los agentes que producen arrestos en la fase G₁/S disminuyen el número de células en fases posteriores y en consecuencia antagonizan el efecto de los agentes que actúan en la fase G₂/M. La disminución de la eficacia de un

agente, debido a la posición de las células en el ciclo celular ha sido definida por algunos autores como **resistencia múltiple a drogas mediada por el ciclo celular** (Shah *et al*, 2001). Este fenómeno puede ser prevenido con la administración secuencial adecuada de los agentes antineoplásicos.

1.6 LAS CUMARINAS COMO AGENTES CON POTENCIAL USO ANTINEOPLÁSICO.

Hay un creciente interés por los agentes de origen vegetal que previenen el cáncer (Lawrence, 1999). Dentro de estos agentes se encuentran las cumarinas; éstas pertenecen al grupo de compuestos conocidos como α -benzopironas, que consisten en un anillo de benceno unido a una pirona (un anillo heterocíclico de seis miembros que contiene un átomo de oxígeno y cinco carbonos con orbitales sp^2). La cumarina es un producto natural ampliamente distribuido en la naturaleza (Gary *et al*, 1997), con poca toxicidad en el humano (Cox *et al*, 1989). Debido a su aroma agradable, este compuesto se utiliza en la industria de cosméticos y de perfumería (Cohen, 1974; Egan *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 por día (Lake, 1999).

En estudios multicéntricos se ha mostrado que la cumarina disminuye el desarrollo tanto del carcinoma renal (Marshall *et al*, 1987; Deux *et al*, 1990) como de próstata (Marshall *et al*, 1990; Mohler *et al*, 1992; Mohler *et al*, 1994), y previene la recurrencia de melanoma (Thornes *et al*, 1982, Thornes *et al*, 1994).

1.6.1 BIOTRANSFORMACIÓN DE LA CUMARINA.

La cumarina, tanto *in vivo* como *in vitro*, se hidroxila a 3, 4, 5, 6, 7 y 8 monohidroxicumarinas. Además, el anillo lactónico puede ser metabolizado y formar o-hidroxifenilacetaldehído, que a su vez genera o-hidroxifeniletanol y ácido o-hidroxifenilpropiónico. Los porcentajes de cada uno de estos productos varían dependiendo de la especie.

En primates como el mandril 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-hidroxicumarina (Shilling *et al*, 1969). Esta hidroxilación es catalizada por la isoforma CYP2A6 del citocromo P450

(Pelkonen *et al*, 2000). En el ratón y el hamster, esta reacción es catalizada por la isoforma del citocromo P450 CYP2A5 (Lake, 1999; Zhuo *et al*, 1999).

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

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

En estudios recientes sobre la estructura – actividad de compuestos cumarínicos se describió que algunas substituciones en las posiciones 7 y 8 del anillo bencénico de la cumarina incrementan en más de 20 veces la actividad citostática de la molécula (Finn *et al*, 2002; García – Solís AF, 2003). La 7,8-dihidroxicumarina (dafnetina) inhibe la proliferación en varias líneas tumorales, que no son inhibidas por otras cumarinas (Finn *et al*, 2002).

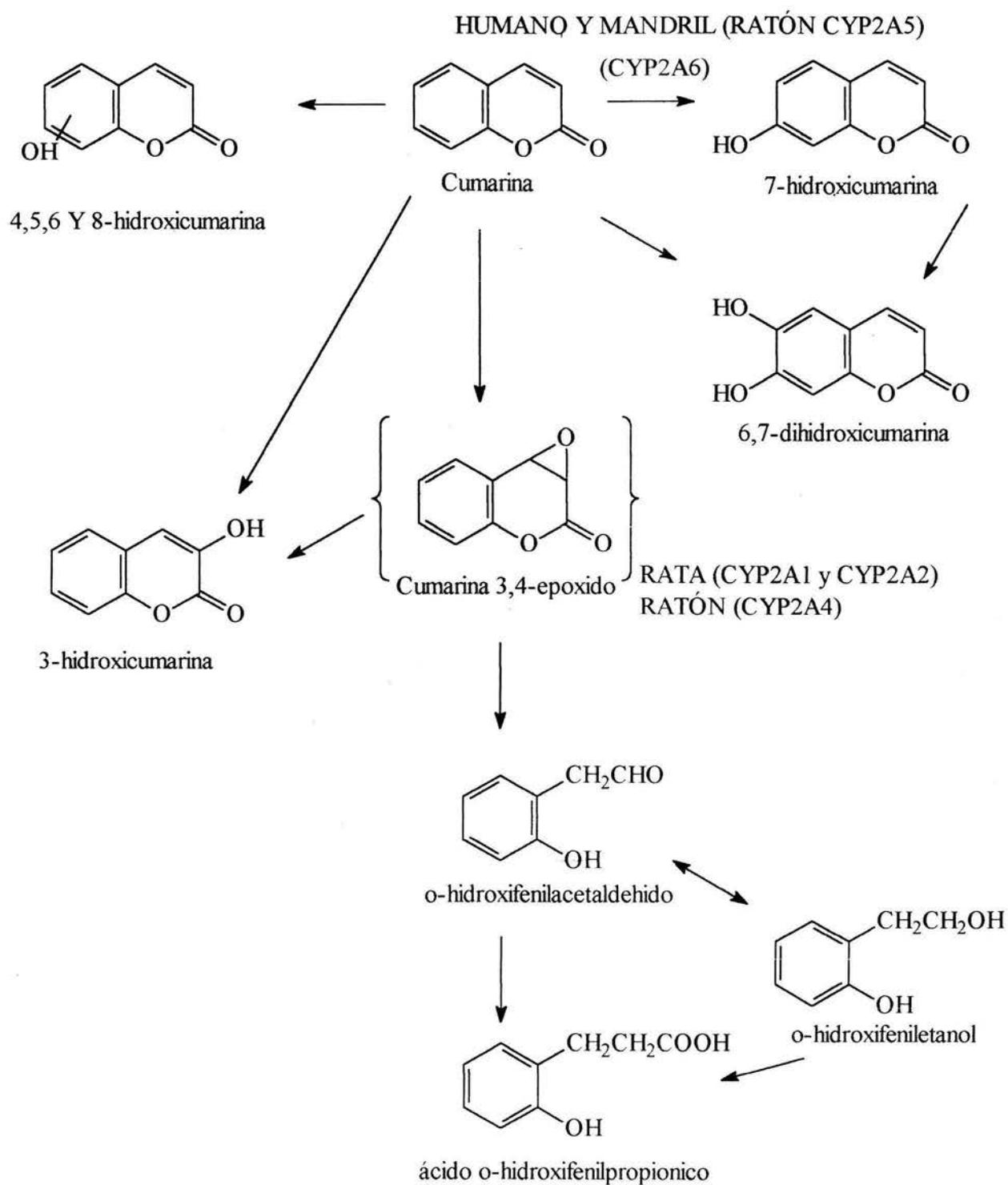


Figura 4. Vías metabólicas de la cumarina en primates y roedores.

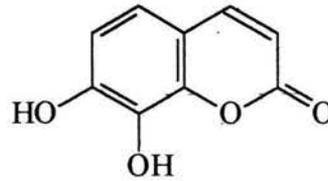


Figura 5. Estructura de la dafnetina.

A diferencia de otros agentes antineoplásicos que activan los puntos de control del ciclo celular y que son tóxicos, se ha descrito que la dafnetina no causa daño al ADN y actúa en una fase temprana (transición G₁/S) del ciclo celular inhibiendo la vía de RB. La dafnetina inhibe la actividad cinasa de las proteínas PKA y PKC (Yang *et al*, 1999), y puede producir arrestos en la fase G₁ o en la fase S dependiendo de la concentración (Finn *et al*, 2004). Además, recientemente se ha descrito que la dafnetina induce diferenciación en células de carcinoma renal, inhibe a la ciclina D1 y se ha demostrado que no es sustrato para la glicoproteína P (Finn *et al*, 2004).

1.7 INHIBICIÓN DE LA CICLINA D1 COMO BLANCO FARMACOLÓGICO DE LAS CUMARINAS

La transcripción del gen de la ciclina D1 (*CCND1*) ha sido estudiada ampliamente en los últimos años (Amanatullah *et al*, 2002). En el promotor de este gen se han documentado sitios de unión para diferentes factores de transcripción, como AP1, ETS, ATF-2, NFκB, CREBP y otros. 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 *et al*, 2002; Schwartz *et al*, 2001). Además, otras proteínas intracelulares, como los receptores de estrógenos (Foster *et al*, 2001) y la β catenina (Tetsu *et al*, 1999) también regulan la transcripción de la ciclina D1. Por otra parte, existen diversos mecanismos postranscripcionales que también regulan los niveles de ciclina D1, principalmente a través de la estabilidad del ARN mensajero y de la degradación de la proteína (Jiménez Orozco *et al*, 2001).

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 *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 amplificaciones o se sobre-expresa (Barkova *et al*, 1997). Tanto las vías de señalización que regulan la transcripción, como la estabilidad de la ciclina D1 están comúnmente alteradas. Los elementos anteriores nos llevan a proponer que: I) la inhibición de la ciclina D1 es un blanco farmacológico potencial para el desarrollo de nuevos agentes antineoplásicos y II) la asociación de dafnetina con otros agentes antineoplásicos que actúen en otras fases del ciclo celular podría incrementar la eficacia de los tratamientos antineoplásicos actuales.

2 JUSTIFICACIÓN.

Los agentes antineoplásicos son asociados para incrementar la eficacia de la quimioterapia, pero también promueven la resistencia de las células tumorales. Así mismo la secuencia de administración de los fármacos tiene un efecto determinante en la efectividad de un esquema terapéutico antineoplásico.

La dafnetina tiene actividad antiproliferativa en varias líneas celulares malignas y se ha observado que tiene distintos efectos celulares en fases tempranas del ciclo celular. Además por no ser un substrato de la glicoproteína P, la actividad de la dafnetina no es disminuida por el fenotipo de resistencia múltiple a fármacos.

Basados en las premisas anteriores; suponemos que la asociación de la dafnetina con otros agentes antineoplásicos con un mecanismo de acción en fases tardías del ciclo celular, pueden potencialmente incrementar la eficacia de los actuales tratamientos antineoplásicos. Para ello se ha diseñado el presente estudio de interacción secuencial en base a los protocolos de Talalay y Berenbaum. De manera interesante, se ha observado que los resultados obtenidos *in vitro* con estos protocolos son consistentes con los resultados obtenidos en protocolos clínicos de fase I y fase II.

Los resultados de este estudio permitirán valorar: i) la eficacia de la asociación de dafnetina con cisplatino y paclitaxel, ii) identificar los posibles mecanismos de resistencia y iii) diseñar la secuencia de administración que sea más eficaz.

2.1 HIPÓTESIS:

Ya que la dafnetina actúa inhibiendo la vía de RB y a que no es sustrato de la glicoproteína P; su asociación con cisplatino un agente alquilante, y con paclitaxel un inhibidor de la actividad de microtúbulos podría incrementar la eficacia de los tratamientos.

2.2 OBJETIVOS GENERALES

- 1) Evaluar los efectos de la administración secuencial de dafnetina con dos agentes antineoplásico que actúen mediante un mecanismo diferente y en una fase tardía en el ciclo celular.
- 2) Determinar la posible existencia de resistencia múltiple a fármacos mediada por el ciclo celular entre compuestos cumarínicos y agentes citotóxicos actualmente utilizados en la quimioterapia.
- 3) Diseñar esquemas de tratamiento antineoplásico más eficaces y menos tóxicos a partir de los resultados de este estudio.

2.3 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Determinar las concentraciones inhibitorias 50 (CI₅₀) de dafnetina, paclitaxel y cisplatino, en la línea de adenocarcinoma mamario humano MCF-7 y en la línea de adenocarcinoma pulmonar humano A-427.
- 2) Estudiar los efectos de la asociación secuencial de la exposición a dafnetina (previa, posterior y simultánea) con paclitaxel y cisplatino.
- 3) Determinar, mediante isoblogramas, si las distintas interacciones producen un efecto antagónico, de sumación o sinérgico.

3 MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 REACTIVOS

La 7,8-dihidroxicumarina fue sintetizada por el grupo del maestro Fernando León Cedeño del Departamento de Química Orgánica, de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química; la pureza (99.9 %) se caracterizó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Los siguientes reactivos fueron obtenidos comercialmente de Sigma (St Louis Missouri, USA): paclitaxel, cisplatino, medio DMEM, suero fetal bovino, MTT (bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) y DMSO. El medio RPMI-1640 se obtuvo comercialmente de Gibco.

3.2 LÍNEAS CELULARES.

La línea de adenocarcinoma mamario humano MCF-7 fue obtenida del American Type Culture Collection (ATCC Number HTB-22). Esta línea celular es deficiente en caspasa 3 (Makin *et al*, 2001), es heterocigota para una mutación en P53 (Shah *et al*, 2001) y positiva para el oncogén *WNT7H*, cuya proteína WNT inicia la vía de señalizaciones que transcriben a genes como *MYC* (ATCC).

La línea de adenocarcinoma pulmonar humano A-427, fue generosamente proporcionada por el Dr. José Sullivan Lopez Gonzalez a este laboratorio. Esta línea celular es RB positiva y tiene delecciones homocigotas para P16 en *INK4A* (Shapiro *et al* 1995). También tiene activación constitutiva de la vía WNT. Además se ha observado inducción de apoptosis cuando se expone a la 7-hidroxicumarina (Lopez-Gonzalez *et al*, 2004).

3.3 MEDIO Y CONDICIONES DE CULTIVO.

Las células se crecieron en botellas de 25 cm² de área de cultivo (Nunc), a una temperatura de 37°C, en atmósfera humidificada y con inyección de CO₂ al 5%.

La línea celular MCF-7 fue cultivada en medio DMEM alto en glucosa, y la línea celular A-427 fue cultivada en medio RPMI-1640. Ambos medios fueron suplementados con antibióticos

(penicilina G sódica 100 unidades/ml, sulfato de estreptomicina 100 µg/ml y anfotericina B 0.25 µg/ml) y con 10 % de suero fetal bovino con complemento inactivado por calor.

3.4 ENSAYOS DE SENSIBILIDAD A FÁRMACOS.

La actividad antiproliferativa de compuestos antineoplásicos puede ser evaluada *in vitro* mediante distintos tipos de ensayos:

- A) **Ensayos clonogénicos o de formación de colonias:** Este tipo de ensayos se han usado extensivamente en el estudio de quimiosensibilidad en líneas celulares malignizadas y tejido tumoral recién obtenido por biopsia. Los ensayos clonogénicos son sensibles, aunque su aplicación es limitada por los siguientes problemas técnicos: la prolongada duración del ensayo, la baja eficacia al sembrar las células y además el conteo de las colonias al microscopio conlleva errores del experimentador.
- B) **Ensayos de exclusión de colorante:** Estos ensayos se fundamentan en la capacidad de las células vivas de excluir un colorante de su citoplasma. Son relativamente rápidos, pero la confiabilidad de sus resultados es limitada, debido a que el conteo de células que se realiza en la cámara de Neubauer conlleva a errores inherentes al experimentador (falsos negativos).
- C) **Ensayos colorimétricos:** Este método se fundamenta en la capacidad enzimática de células vivas, para reducir un sustrato a un producto colorido, cuya concentración se puede cuantificar por un método espectrofotométrico (Mosmann 1983, McKeehan 1977, Plumb *et al* 1989, Boyd 1989, Skehan *et al* 1989). Los ensayos colorimétricos tienen una adecuada sensibilidad, su medición es automatizada y presenta un bajo riesgo para la salud del experimentador.

La alta sensibilidad de los ensayos clonogénicos se atribuye a los tiempos de exposición prolongados, en donde las células son expuestas por más tiempo a los agentes antineoplásicos. Se han realizado estudios comparativos entre los distintos métodos y se ha descrito que existe una buena correlación entre los resultados obtenidos por ensayos clonogénicos y ensayos colorimétricos como el de reducción de MTT (Carmichael *et al* 1987).

Además, el método de MTT, también ha sido modificado para evaluar la sensibilidad de biopsias de tumores malignos humanos a agentes antineoplásicos (Sagent, 2003). Por estas razones se eligieron los ensayos colorimétricos de reducción de MTT para realizar el presente estudio.

3.4.1 ENSAYOS DE REDUCCIÓN DE MTT (BROMURO DE 3-(4,5-DIMETILTIAZOL-2-IL)-2,5-DIFENIL TETRAZOLIO)

Estos ensayos se basan en la capacidad enzimática de proteínas mitocondriales de las células vivas de reducir la sal de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio), que es hidrosoluble y de color amarillo, a formazán de MTT (1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)3-3,5-difenilformazan), la cual es hidrofóbica y de color púrpura. La absorbancia del formazán de MTT es proporcional al número de células vivas.

Después del periodo de exposición a los fármacos, las células son incubadas con MTT (0.05%) por dos horas a 37°C; al finalizar este periodo, el sobrenadante es retirado. Los cristales de formazán formados, son disueltos con dimetil sulfóxido (DMSO) y su absorbancia es leída en un lector de microplacas Biotek EK11a a una longitud de onda de 570 nm.

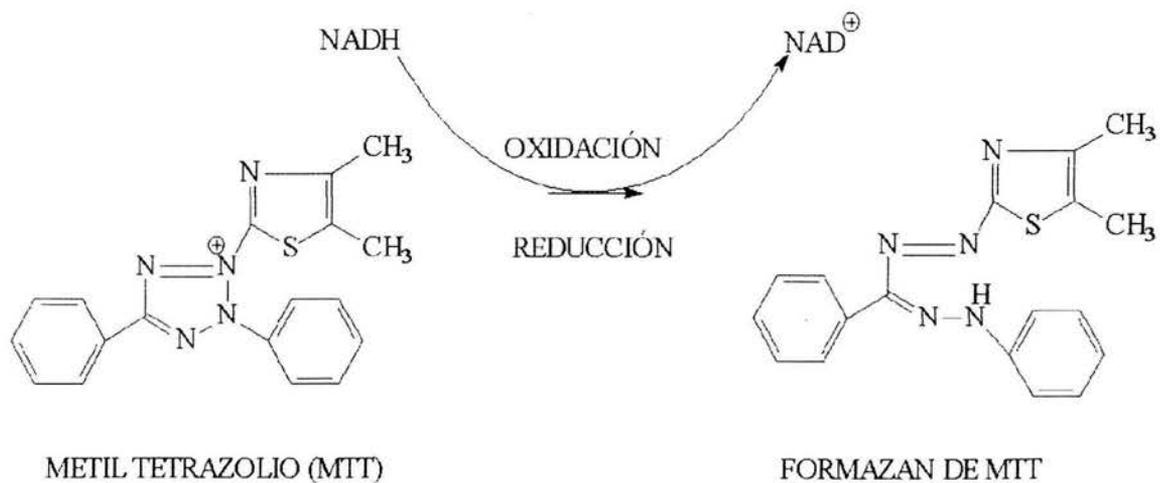


Figura 6. Reacción del MTT.

3.5 CONDICIONES EXPERIMENTALES.

La densidad celular y el tiempo de exposición al fármaco se determinó mediante cinéticas de crecimiento realizadas durante 7 días. Diferente número de células fueron sembradas en pozos (n=6) de microplacas de 96 pozos, en 200 μ l de medio y cada 24 horas se evaluó el crecimiento celular mediante ensayos de MTT.

CÉLULAS MCF-7.

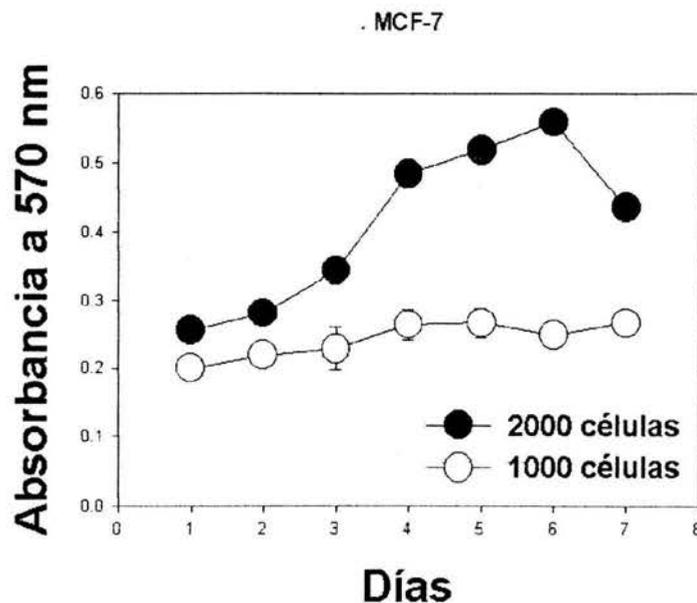


Figura 7. Cinética de crecimiento para la línea MCF-7. El número de células vivas se estimó cada 24 horas mediante ensayos de MTT.

Se determinó que 1000 células por pozo (5 células/ μ L) no crecían adecuadamente. Posiblemente debido a que se requiera un número mínimo de células que permita la formación de un microambiente que propicie la proliferación. El número mínimo para obtener un crecimiento progresivo fue de 2000 células por pozo (10 células/ μ L). En dicha condición se observa un crecimiento adecuado hasta el sexto día, donde alcanzan su máxima absorbancia. Al séptimo día se observa que disminuye el número de células viables, debido probablemente al agotamiento de los nutrientes en el medio. Cinéticas realizadas con un mayor número de células, muestran absorbancias máximas y las células a confluencia total en los pozos al cuarto día (datos no mostrados). A partir de las cinéticas de crecimiento, se decidió que la densidad celular inicial fuera de 2000 células por pozo, y que el tiempo de exposición a los fármacos fuera de 6 días.

CÉLULAS A-427.

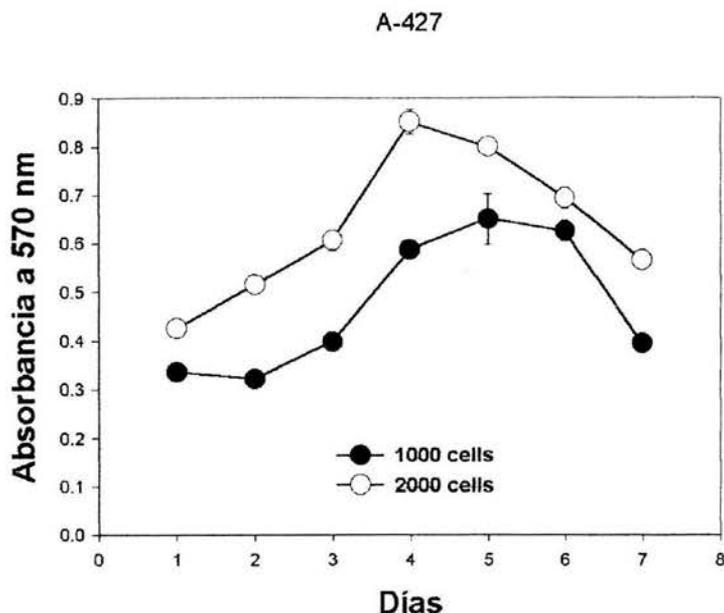


Figura 8. Cinética de crecimiento para la línea A-427. El número de células vivas se estimó cada 24 horas mediante ensayos de MTT.

En el caso de las células A-427 el número adecuado para realizar los ensayos fue de 1000 células por pozo (5 células/ μl). En esta condición la absorbancia máxima se alcanza al quinto día, a diferencia de cuando se siembran 2000 células por pozo (10 células/ μl), en cuyo caso las células alcanzan la absorbancia máxima al cuarto día. Esta última condición es inconveniente para los ensayos de exposición, ya que las células están en contacto con el fármaco por muy poco tiempo. En las condiciones empleadas al tiempo de realizar los ensayos de MTT, las células control están aconfluentes y su crecimiento no se ve afectado por limitaciones en los nutrientes o el área de crecimiento.

3.6 DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental que se empleó en el presente estudio se basó en los protocolos de Talay y Berenbaum (Talalay *et al* 1984, Berenbaum 1989). Brevemente, se determinó la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) de cada fármaco en cada línea celular empleando concentraciones en escala geométrica. Para estudiar la interacción entre dos fármacos se emplearon concentraciones en proporciones fijas que corresponden a 1/8, 1/4, 1/2, 1 y 2 veces la CI_{50} individual de cada fármaco. En ensayos preliminares se siguió este protocolo,

pero en vista de los resultados bifásicos que se observaron (ver resultados) el protocolo se modificó de la siguiente manera: para la dafnetina se emplearon 1/8, 1/4, 1/2, 1 y 2 veces su CI_{50} , mientras que para paclitaxel y cisplatino se emplearon 1/4, 1/2, 1, 2 y 4 veces sus CI_{50} .

3.6.1 EXPOSICIÓN INDIVIDUAL

En las dos líneas celulares, las CI_{50} de cada fármaco se determinaron empleando rangos geométricos de concentraciones como se especifica a continuación

Línea celular MCF-7

- a) Para dafnetina: 12.5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M y 200 μ M.
- b) Para Cisplatino: 12.5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M y 200 μ M.
- c) Para Paclitaxel: 1.25 nM, 2.5 nM, 5 nM, 10 nM y 20 nM.

Línea celular A-427

- a) Para dafnetina: 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 80 μ M y 160 μ M.
- b) Para Cisplatino: 1.25 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M, 10 μ M y 20 μ M
- c) Para Paclitaxel: 0.5 nM, 1 nM, 2 nM, 4 nM y 8 nM

3.6.2 EXPOSICIÓN SIMULTÁNEA Y SECUENCIAL

En los ensayos de exposición secuencial, las células una vez adheridas fueron expuestas al primer fármaco en las concentraciones descritas (ver punto 3.6). A los dos días se adicionó el segundo fármaco. Al tercer día, después de esta segunda exposición se midió el efecto.

3.7 ANÁLISIS DEL EFECTO COMBINADO DE LOS FÁRMACOS.

Para evaluar las interacciones farmacológicas (antagonismo, sumación o sinergismo), se realizaron isoblogramas (Tallarida *et al* 1989, Berenbaum 1989) empleando las CI_{50} de los fármacos individuales y de las combinaciones como se describe a continuación:

Se grafica en el eje X la CI_{50} del fármaco A y en el eje Y la CI_{50} del fármaco B. La línea que une la CI_{50} del fármaco A con la CI_{50} del fármaco B representa las combinaciones teóricas de ambos fármacos a las cuales se observa un efecto de sumación.

En la misma gráfica se indican las CI_{50} obtenidas al combinar los fármacos A y B, de cada secuencia, si la CI_{50} obtenida experimentalmente se localiza por encima de esta línea, esto indica que hay antagonismo, si ésta se localiza sobre la línea se indica que hay sumación, y se indica sinergismo cuando la CI_{50} se localiza por debajo de la línea.

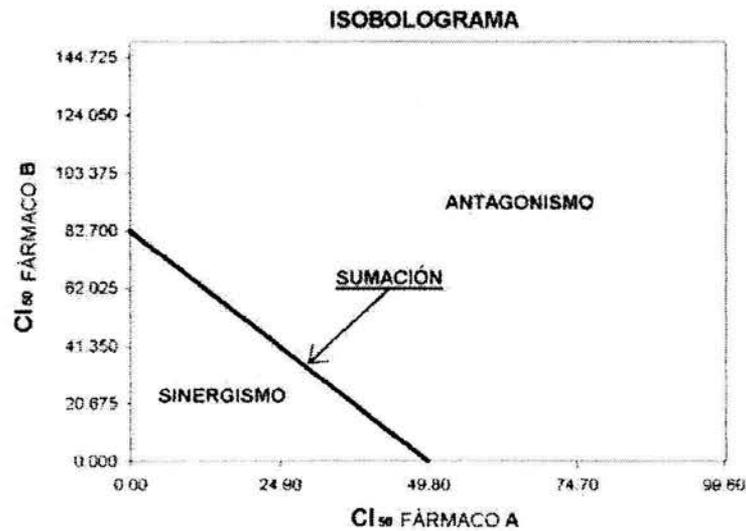


Figura 9. Isobolograma y regiones.

4. RESULTADOS.

4.1 EXPOSICIÓN INDIVIDUAL A FÁRMACOS.

En la figura 10 se presentan las gráficas que muestran el efecto antiproliferativo de paclitaxel, dafnetina y cisplatino en forma individual en las líneas celulares MCF-7 y A-427. Los efectos del paclitaxel se observaron a concentraciones nanomolares, mientras que la dafnetina y el cisplatino tuvieron efectos a concentraciones micromolares.

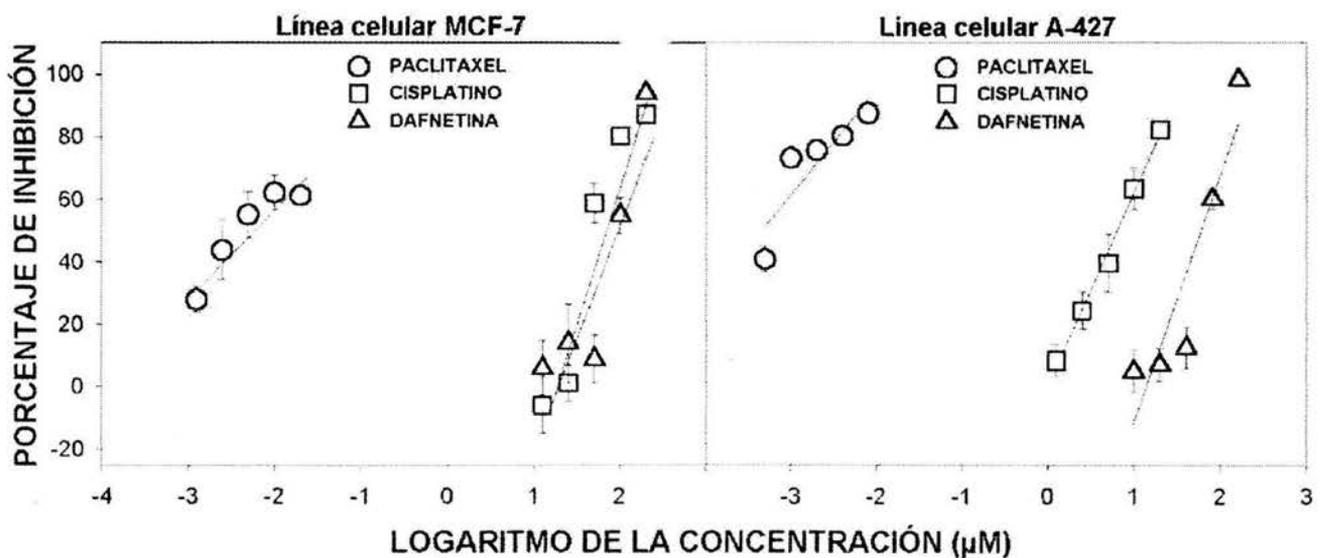


Figura 10. Gráficas que esquematizan el efecto antiproliferativo de fármacos individuales en las líneas celulares MCF-7 y A-427. Ensayos realizados por sextuplicado.

4.1.1 EFECTOS EN LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA MAMARIO MCF-7

El **paclitaxel** tuvo un efecto antiproliferativo gradual en estas células a bajas concentraciones. A concentraciones de 5 y 10 nM, la inhibición fue alrededor de 62 % y no se incrementó a concentraciones mayores, incluso de 200 nM (datos no mostrados). La CI_{50} promedio fue de 4.3 ± 0.4 nM ($n=3$).

El **cisplatino** inhibió la proliferación en forma gradual a todas las concentraciones probadas. La CI_{50} promedio fue de $49.8 \pm 4.9 \mu\text{M}$ (n=3).

La **dafnetina** inhibió la proliferación de las células en forma gradual sólo a partir de la tercera concentración probada, que corresponde a $50 \mu\text{M}$. Su CI_{50} promedio fue de $98 \pm 1.3 \mu\text{M}$ (n=5).

4.1.2 EFECTOS EN LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA PULMONAR A-427

El **paclitaxel** inhibió la proliferación celular en forma gradual hasta valores próximos al 100 %. La CI_{50} promedio fue de $0.59 \pm 0.18 \text{ nM}$ (n=3).

El **cisplatino** inhibió la proliferación celular de forma gradual a todas las concentraciones probadas. La CI_{50} promedio fue de $5.8 \pm 0.39 \mu\text{M}$ (n=3).

La **dafnetina** inhibió la proliferación en forma gradual sólo a partir de $40 \mu\text{M}$ a semejanza de su acción en las células MCF-7. La CI_{50} promedio fue de $74 \pm 2.3 \mu\text{M}$ (n=5).

4.2 EXPOSICIÓN SIMULTÁNEA.

4.2.1 EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN SIMULTÁNEA A CISPLATINO Y DAFNETINA EN LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA MAMARIO MCF-7

En estas células la exposición simultánea de cisplatino y dafnetina, a todas las concentraciones, incrementó el efecto antiproliferativo ($p < 0.05$) con respecto al efecto de la exposición individual a cisplatino.

4.2.2 EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN SIMULTÁNEA A CISPLATINO Y DAFNETINA EN LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA PULMONAR A-427

A bajas concentraciones (1.25 y 2.5 μM de cisplatino) el efecto antiproliferativo de la exposición simultánea a cisplatino y dafnetina no presentó diferencias significativas con respecto al efecto producido por el cisplatino solo (figura 11). En la misma figura se observa que a concentraciones mayores, la exposición simultánea de cisplatino y dafnetina presentó un efecto antiproliferativo mayor ($p < 0.05$) que el obtenido con la exposición al cisplatino solo.

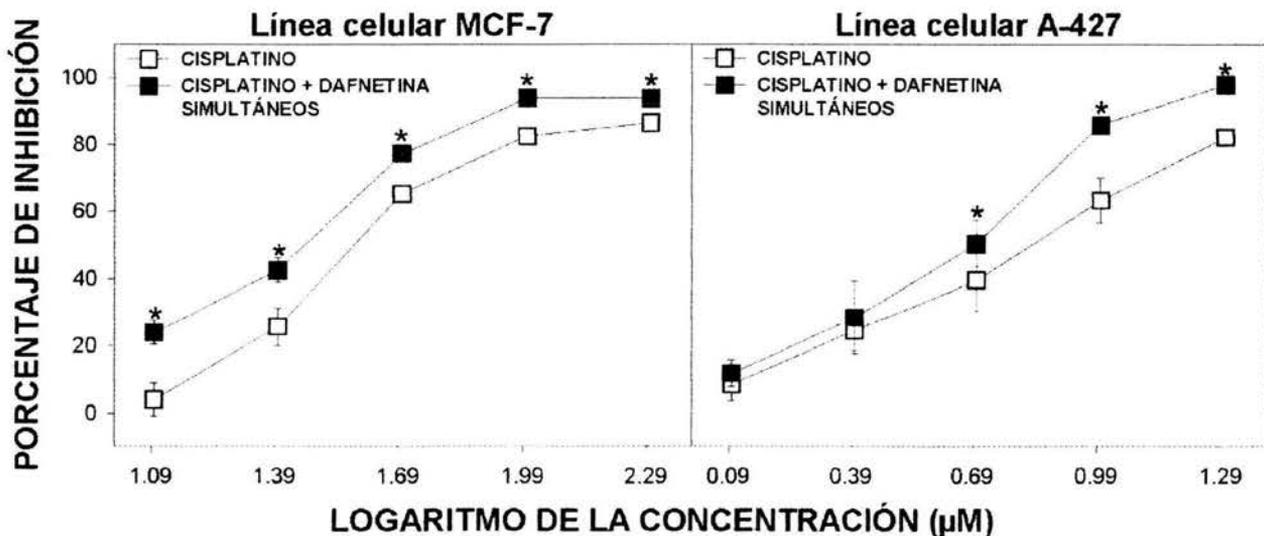


Figura 11. Gráficas que muestran el efecto antiproliferativo de la exposición a cisplatino solo y la exposición simultánea a cisplatino más dafnetina en las líneas celulares MCF-7 y A-427. Cada concentración se evaluó por sextuplicado.

4.2.3 EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN SIMULTÁNEA A PACLITAXEL Y DAFNETINA EN LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA MAMARIO MCF-7

A bajas concentraciones (1.25 a 5 nM de paclitaxel) no se observaron diferencias entre los efectos antiproliferativos de la exposición simultánea y la exposición individual del paclitaxel (figura 12). A concentraciones mayores, la exposición simultánea de paclitaxel y dafnetina presentó un efecto antiproliferativo mayor ($p < 0.05$) que el obtenido con la exposición al paclitaxel solo.

4.2.4 EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN SIMULTÁNEA A PACLITAXEL Y DAFNETINA EN LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA PULMONAR A-427

En estas células el efecto fue semejante al observado en las células MCF-7.

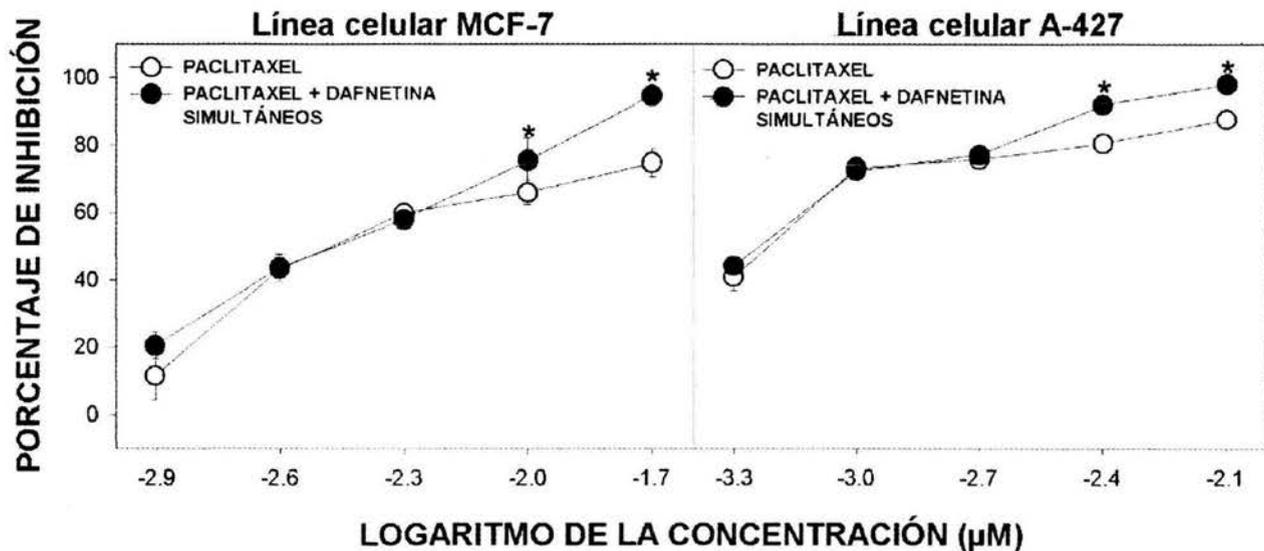


Figura 12. Gráficas que muestran el efecto antiproliferativo de la exposición a paclitaxel solo y la exposición simultánea a paclitaxel más dafnetina en células MCF-7 y A-427. Cada concentración se evaluó por sextuplicado.

A bajas concentraciones, el efecto antiproliferativo de la exposición simultánea de paclitaxel y dafnetina no presentó diferencias con respecto al efecto producido por la exposición al paclitaxel solo (figura 12).

A concentraciones mayores, la exposición simultánea de paclitaxel y dafnetina, presentó un efecto antiproliferativo mayor ($p < 0.05$) que el obtenido con la exposición al paclitaxel solo.

4.3 EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN SECUENCIAL A FÁRMACOS.

4.3.1 ASOCIACIONES CISPLATINO Y DAFNETINA.

En las líneas celulares MCF-7 y A-427 se compararon los efectos antiproliferativos de cisplatino individual y de sus asociaciones con dafnetina en dos secuencias de exposición: cisplatino seguido de dafnetina (**CISPLATINO → DAFNETINA**) y dafnetina seguida de cisplatino (**DAFNETINA → CISPLATINO**).

4.3.1.1 EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A CISPLATINO SEGUIDA DE DAFNETINA EN LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA MAMARIO MCF-7

El efecto antiproliferativo de esta asociación, a concentraciones de 50 μM y menores, no fue diferente del efecto del cisplatino individual; a concentraciones mayores se produjo ligero aumento que fue estadísticamente significativo ($p > 0.05$).

4.3.1.2 EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A DAFNETINA SEGUIDA DE CISPLATINO EN LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA MAMARIO MCF-7

En la figura 13 A se observa que entre las concentraciones de 25 y 100 μM , el efecto antiproliferativo de esta asociación disminuye notablemente con relación al efecto del cisplatino individual. Este antagonismo, que también se observa en la figura 13 B, es estadísticamente significativo y se refleja en el aumento de la CI_{50} de $50 \pm 4.9 \mu\text{M}$ de a $76 \pm 2.8 \mu\text{M}$.

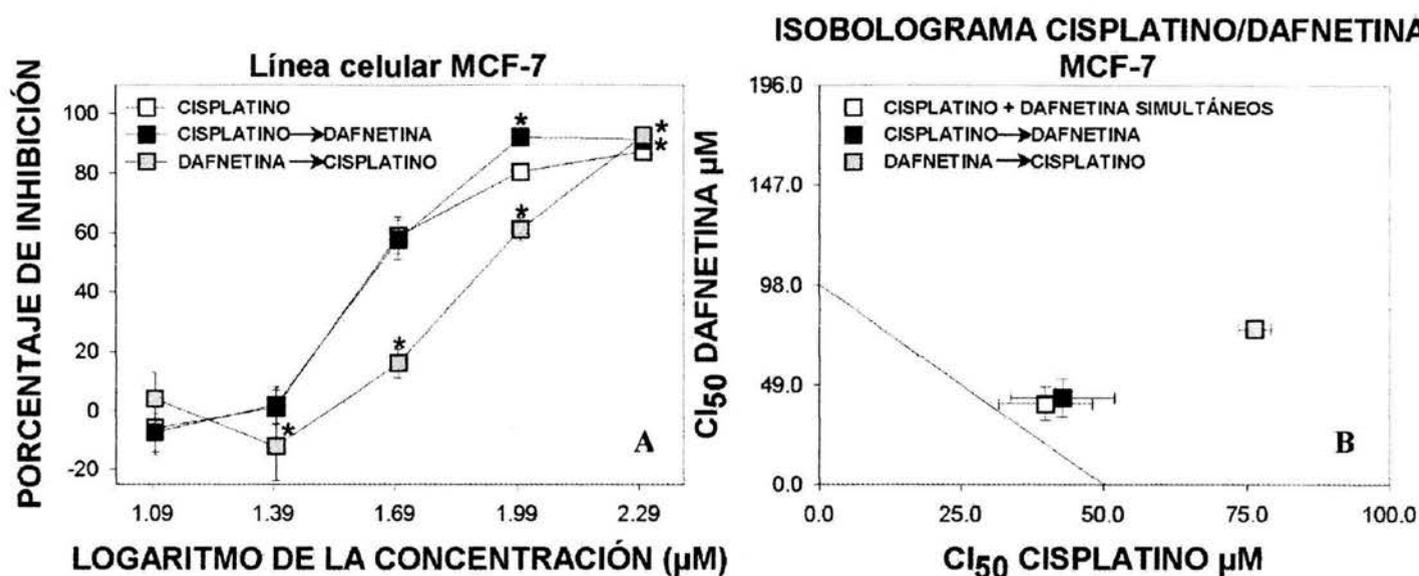


Figura 13 A y 13 B. A) Efectos antiproliferativos de cisplatino y sus asociaciones con dafenetina en las células MCF-7. Cada concentración se evaluó por sextuplicado (* $p < 0.05$). B) Isoblograma de las asociaciones cisplatino-dafenetina en células MCF-7.

	CI_{50} (μM) \pm EEM
DAFNETINA	98 ± 1.3
CISPLATINO	50 ± 4.9
CISPLATINO + DAFNETINA	40 ± 8.2
CISPLATINO (CIS \rightarrow DAF)	43 ± 9.1
CISPLATINO (DAF \rightarrow CIS)	76 ± 2.8

Tabla 4. CI_{50} de dafenetina y cisplatino solos y sus asociaciones en la línea celular MCF-7.

4.3.1.3 EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A CISPLATINO SEGUIDA DE DAFNETINA EN LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA PULMONAR A-427

El efecto antiproliferativo de esta asociación no difirieron significativamente de los producidos por el cisplatino individual. Solamente a la concentración más alta (20 μM de cisplatino y 160 μM de dafnetina), el efecto antiproliferativo obtenido con esta asociación fue mayor que el efecto del cisplatino individual ($p < 0.05$).

4.3.1.4 EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A DAFNETINA SEGUIDA DE CISPLATINO EN LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA PULMONAR A-427

El efecto antiproliferativo de esta asociación fue menor al obtenido con el cisplatino individual. Solamente a concentraciones de 10 y 20 μM el efecto antiproliferativo fue mayor ($p < 0.05$) que el efecto del cisplatino individual. A concentraciones más bajas los efectos de la asociación fueron menores ($p < 0.05$) con respecto al cisplatino individual.

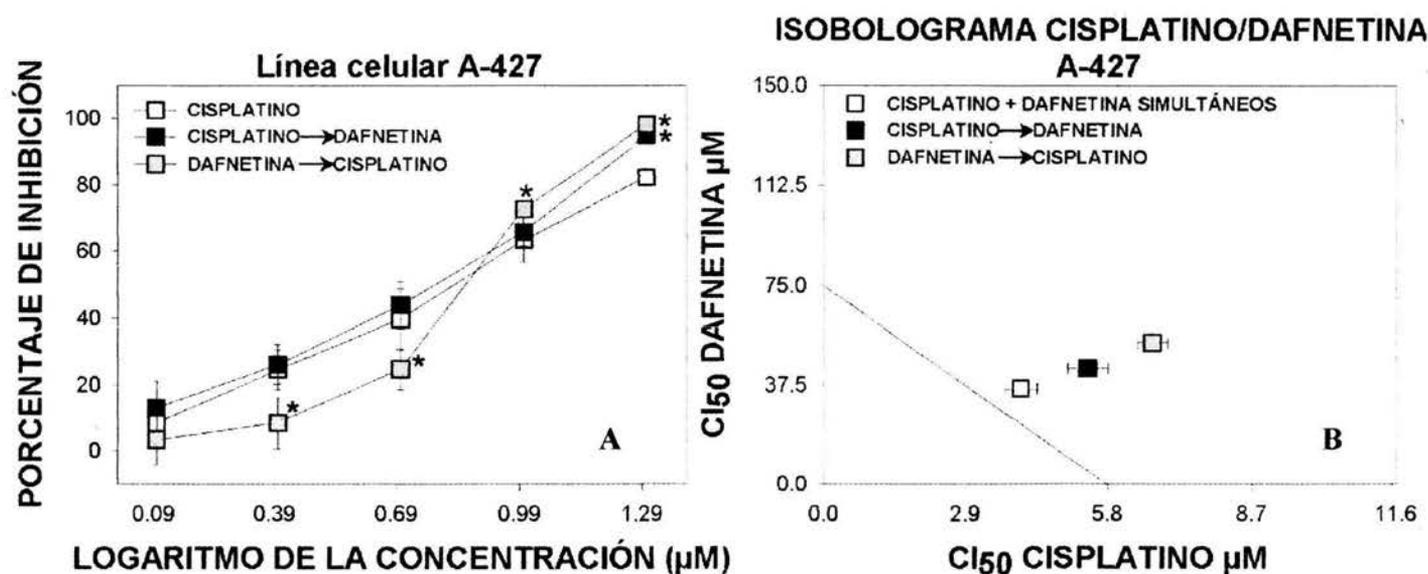


Figura 14 A y 14 B. A) Efectos antiproliferativos de cisplatino y sus asociaciones con dafnetina en las células A-427. Cada concentración se evaluó por sextuplicado (* $p < 0.05$). B) Isoblograma de las asociaciones cisplatino-dafnetina en células A-427.

En el isoblograma de la figura 14 B se observa que en todas las asociaciones hubo antagonismo de diferente magnitud, aunque en la figura 14 A se observa que a concentraciones mayores a la CI50 hay un efecto moderado de sumación. Además se observa en la asociación dafnetina seguida de cisplatino que el antagonismo fue mayor que el producido por la asociación cisplatino seguido de dafnetina. El menor antagonismo se obtuvo en la exposición simultánea de dafnetina y cisplatino.

	CI ₅₀ (μM) ± EEM
DAFNETINA	75 ± 2.3
CISPLATINO	5.8 ± 0.4
CISPLATINO + DAFNETINA	4.1 ± 0.3
CISPLATINO (CIS → DAF)	5.4 ± 0.4
CISPLATINO (DAF → CIS)	6.8 ± 0.3

Tabla 5. CI₅₀ de dafnetina y de cisplatino individuales, así como de sus asociaciones en la línea celular A-427.

4.3.2 ASOCIACIONES PACLITAXEL Y DAFNETINA.

En las líneas celulares MCF-7 y A-427 se compararon los efectos antiproliferativos de paclitaxel individual y de sus asociaciones con dafnetina en dos secuencias de exposición: paclitaxel seguido de dafnetina (**PACLITAXEL → DAFNETINA**) y dafnetina seguida de paclitaxel (**DAFNETINA → PACLITAXEL**).

4.3.2.1 EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A PACLITAXEL SEGUIDA DE DAFNETINA EN LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA MAMARIO MCF-7

El efecto antiproliferativo de esta asociación tuvo un pequeño incremento con respecto al paclitaxel individual. A concentraciones de 10 y 20 nM las diferencias entre la asociación y el paclitaxel individual fueron estadísticamente significativas. Sin embargo a concentraciones de 5 nM y menores no se observaron diferencias.

4.3.2.2 EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A DAFNETINA SEGUIDA DE PACLITAXEL EN LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA MAMARIO MCF-7

El efecto antiproliferativo de esta asociación fue menor que el obtenido con el paclitaxel individual. Sólo a las concentraciones de 10 y 20 nM hubo un incremento del efecto ($p < 0.05$). A concentraciones más bajas los efectos antiproliferativos de la asociación fueron menores ($p < 0.05$) que los obtenidos con el paclitaxel individual.

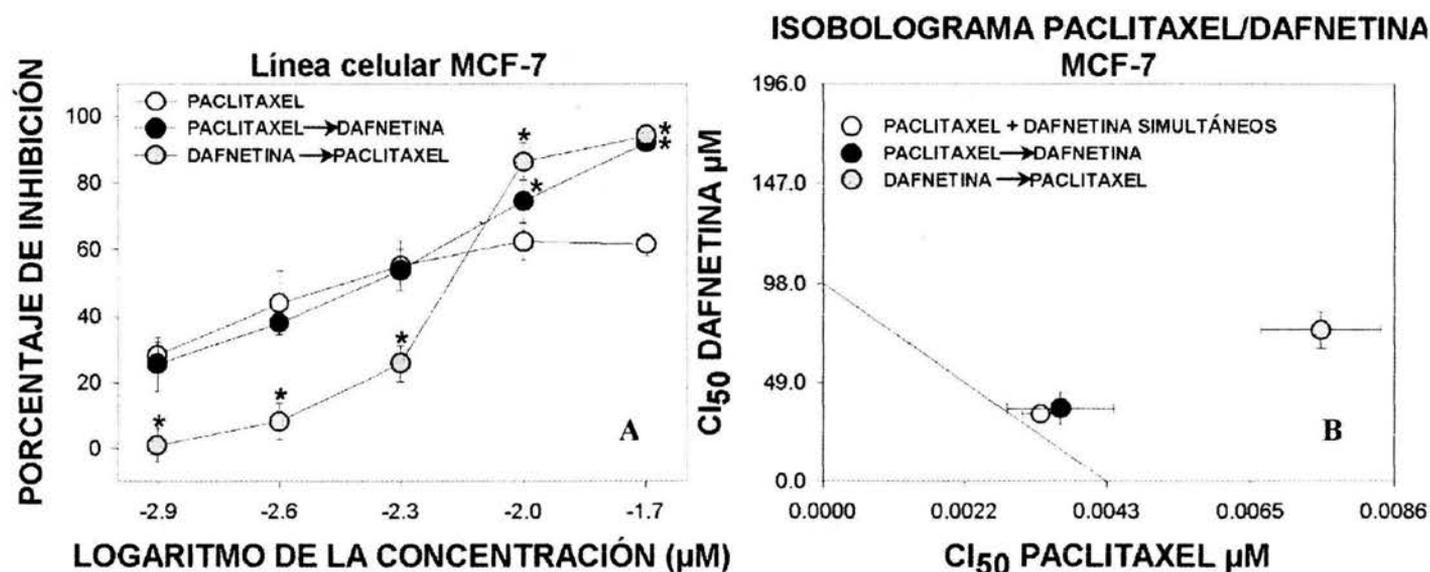


Figura 15 A y 15 B. A) Efectos antiproliferativos de paclitaxel y sus asociaciones con dafnetina en las células MCF-7. Cada concentración se evaluó por sextuplicado (* $p < 0.05$). B) Isobolograma de las asociaciones paclitaxel-dafnetina en células MCF-7.

En la figura 15 B se observa que en la exposición simultánea de paclitaxel y dafnetina así como en la secuencia paclitaxel seguido de dafnetina, la respuesta observada tiende a la sumación. En cambio, cuando la secuencia de exposición de dafnetina seguida de paclitaxel, hubo un marcado antagonismo.

	CI ₅₀ (μM) ± EEM
DAFNETINA	98 ± 1.3
PACLITAXEL	0.0043 ± 0.0004
PACLITAXEL + DAFNETINA	0.0033 ± 0.00029
PACLITAXEL (PAC → DAF)	0.0036 ± 0.0008
PACLITAXEL (DAF → PAC)	0.0075 ± 0.0009

Tabla 6. CI₅₀ de dafnetina y paclitaxel solos y sus asociaciones en la línea celular MCF-7.

4.3.2.3 EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A PACLITAXEL SEGUIDA DE DAFNETINA EN LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA PULMONAR A-427

El efecto antiproliferativo de esta asociación aumentó ligeramente con respecto al paclitaxel individual. Solamente a la concentración más alta (8 nM de paclitaxel y 160 μM de dafnetina) los efectos de esta asociación fueron mayores ($p < 0.05$) que los del paclitaxel individual. A concentraciones menores no se observaron diferencias.

4.3.2.4 EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A DAFNETINA SEGUIDA DE PACLITAXEL EN LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA PULMONAR A-427

El efecto antiproliferativo de esta asociación fue menor con respecto al del paclitaxel individual. Sólo a la concentración más alta (8 nM de paclitaxel y 160 μ M de dafnetina) el efecto antiproliferativo fue mayor ($p < 0.05$). A concentraciones menores los efectos antiproliferativos de la asociación fueron menores ($p < 0.05$) que los del paclitaxel individual.

En la figura 16 B se observa que tanto en la exposición simultánea a paclitaxel y dafnetina como en la secuencia paclitaxel seguido de dafnetina, la respuesta observada fue de sumación. En cambio, cuando la secuencia de exposición fue de dafnetina seguida de paclitaxel hubo un marcado antagonismo.

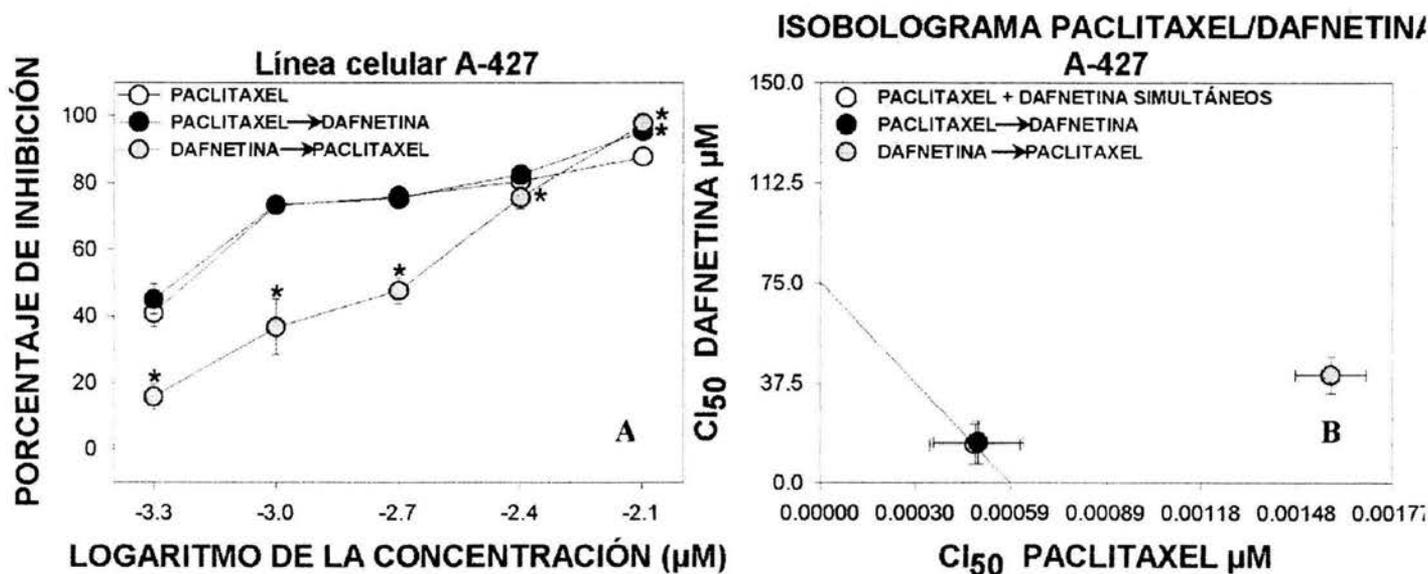


Figura 16 A y 16 B. A) Efectos antiproliferativos de paclitaxel y sus asociaciones con dafnetina en las células A-427. Cada concentración se evaluó por sextuplicado (* $p < 0.05$). B) Isobolograma de las asociaciones paclitaxel-dafnetina en células A-427.

	CI ₅₀ (μM) ± EEM
DAFNETINA	75 ± 2.3
PACLITAXEL	0.00059 ± 0.00018
PACLITAXEL + DAFNETINA	0.00049 ± 0.00014
PACLITAXEL (PAC → DAF)	0.00050 ± 0.00015
PACLITAXEL (DAF → PAC)	0.00158 ± 0.00015

Tabla 7. CI₅₀ de dafnetina y paclitaxel solos y sus asociaciones en la línea celular A-427.

5 DISCUSIÓN.

Se ha descrito que los derivados cumarínicos tienen efectos citostáticos en diversas líneas celulares. En el humano, el principal producto de biotransformación de la cumarina es la 7-hidroxycumarina, la cual posee mayor actividad citostática que la cumarina (Jiménez-Orozco *et al*, 1999). La 7-hidroxycumarina produce decrementos en los niveles de la ciclina D1 mediante mecanismos post transcripcionales, lo que inhibe la transición de las fases G₁/S del ciclo celular (Jiménez-Orozco *et al*, 2001). Además se ha observado que este compuesto induce un mecanismo de apoptosis en la línea celular A-427 (López-González *et al*, 2004). La dafnetina (7,8-dihidroxycumarina) es otro compuesto cumarínico que tiene mayor actividad que la 7-hidroxycumarina, y que inhibe la proliferación en un mayor número de líneas celulares que la 7-hidroxycumarina (García Solís, 2003).

Se ha demostrado que la dafnetina no se intercala en el ADN, no produce mutagénesis (Finn *et al*, 2002) y por no ser un sustrato para la glicoproteína P, sus acciones antiproliferativas no son disminuidas por el fenotipo de resistencia múltiple a fármacos (Finn *et al*, 2004). Esta cumarina inhibe la actividad cinasa de las proteínas PKA y PKC (Yang *et al*, 1999) y presenta poca toxicidad celular *in vitro* (García Solís, 2003). A concentraciones altas: i) causa arrestos en la fase G₁ del ciclo celular (Finn *et al*, 2004) y ii) disminuye la fosforilación de pRb (Jiménez Orozco, datos no publicados). A concentraciones bajas: i) causa arrestos en la fase

S del ciclo celular ii) activa a p38 lo que induce diferenciación celular, y iii) inhibe la fosforilación de ERK1 y ERK2 en exposiciones prolongadas (Finn *et al*, 2004).

Debido a las distintas acciones de la dafnetina, se evaluó en este trabajo su interacción con dos agentes antineoplásicos prototipo, que actúan mediante distintos mecanismos en fases tardías del ciclo celular.

En exposiciones simultáneas observamos que la dafnetina, en todas sus concentraciones, incrementó el efecto citotóxico del cisplatino en ambas líneas celulares. En contraste, cuando se le combinó con paclitaxel sólo produjo pequeños incrementos de la citotoxicidad en concentraciones altas.

En las asociaciones secuenciales entre la dafnetina y los agentes antineoplásicos prototipo se observó que las respuestas varían dependiendo de las concentraciones y de la secuencia de exposición. La dafnetina, en concentraciones altas y sin importar la secuencia de exposición, produce pequeños incrementos en el efecto citotóxico tanto de cisplatino como de paclitaxel. Este incremento es consistente con la inhibición de la vía pRb que se observa en la fase G1 del ciclo celular. En contraste, a concentraciones bajas, la exposición previa a dafnetina antagoniza el efecto citotóxico de cisplatino y paclitaxel. Este antagonismo podría ser resultado de la diferenciación inducida por dafnetina (Finn *et al*, 2004), que podría interferir con los mecanismos de los agentes prototipo. La exposición posterior a dafnetina no modifica la magnitud de los efectos de los agentes prototipo.

En estudios similares, basados en los protocolos de Talalay (1984) y Berenbaum (1989) se ha evaluado la interacción de nuevos compuestos antineoplásicos, como el flavopiridol, con cisplatino y paclitaxel. Las observaciones de este tipo de ensayos *in vitro* son muy importantes porque fueron consistentes con los resultados obtenidos en protocolos clínicos de fase I (Schwartz *et al*, 1999; Kaubisch *et al*, 1999).

El flavopiridol que es una flavona que inhibe a la CDK2, produce arrestos en la transición G₁/S, induce apoptosis y ha mostrado actividad antineoplásica tanto en ensayos *in vitro* como en estudios clínicos (Bible *et al*, 2000). Mediante ensayos clonogénicos, se evaluó la interacción de este agente con paclitaxel y cisplatino (Bible *et al*, 1997). En su asociación con paclitaxel la exposición previa de flavopiridol produjo antagonismo en todas las

concentraciones, mientras que la exposición posterior produjo sinergismo. En contraste, sin importar la secuencia de asociación, el flavopiridol produjo un efecto sinérgico con cisplatino. Dicho sinergismo puede deberse a que el flavopiridol además de inhibir CDK también se une al ADN de doble cadena (Bible *et al*, 2000).

A diferencia de los resultados obtenidos por este grupo, nosotros observamos que la dafnetina tuvo efectos bifásicos que dependen de la concentración y no produce sinergismo en su asociación con otros agentes.

6 CONCLUSIONES.

1. ASOCIACIONES SECUENCIALES.

En las asociaciones secuenciales entre la dafnetina y los agentes antineoplásicos prototipo se observó que, a altas concentraciones se incrementa moderadamente el efecto citotóxico independientemente de la secuencia. A bajas concentraciones se observa un efecto antagónico, el cual puede prevenirse exponiendo las células a los fármacos en la secuencia adecuada.

Este antagonismo podría tener implicaciones importantes en el uso clínico de la dafnetina como agente antineoplásico. Nuestros resultados experimentales sugieren que las cumarinas podrían emplearse en la clínica después de la administración de cócteles quimioterapéuticos.

2. EFECTOS BIFÁSICOS.

Se ha reportado que un fármaco puede tener varios efectos a través de mecanismos diferentes (Horwitz *et al*, 1998). El efecto bifásico de hormonas y fármacos también se ha documentado ampliamente (Calabrese, 2001). Los resultados de este diseño experimental evidencian que los compuestos cumarínicos tienen efectos bifásicos que corresponden a la activación de distintos mecanismos de acción. El efecto de sumación que se observó a concentraciones altas, es consistente con la inhibición de la vía de pRb a través de la disminución de la ciclina D1. En contraste, el antagonismo que se observó a bajas concentraciones parece ser el resultado de un efecto distinto mediado por la activación de P38 (Finn *et al*, 2004).

Una alternativa relativamente novedosa para el tratamiento de leucemias es la terapia de diferenciación. La hipótesis de esta estrategia propone que algunos tipos de neoplasias tienen *anormalidades celulares reversibles en el curso de la diferenciación*. Un tratamiento apropiado puede reprogramar a las células para inducir diferenciación y/o apoptosis, con la consecuente pérdida de la proliferación (Leszczynyecka *et al*, 2004). En este tipo de terapias el uso de dafnetina como inductor de diferenciación puede ser promisorio.

7 REFERENCIAS.

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the Cell. 4th ed. New York: Garland Publishing, pp: 1338-1342. 2002.
2. Amanatullah DF, Zafonte BT, Albanese C, Fu M, Messiers C, Pestell R. Ras regulation of cyclin D1 promoter. *Methods Enzymol.* 33: 116-127. 2002.
3. American Lung Association. (<http://www.lungusa.org>)
4. 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.
5. Bartek J, Bartkova J, Lukas J. The retinoblastoma protein pathway and the restriction point. *Curr Opin Cell Biol.* 8: 805-814. 1996.
6. Bartek J, Lukas J. Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol.* 13: 738-747. 2001.
7. Berenbaum M.C, What is synergy? *Pharmacol Rev.* 41(2):93-141. 1989.
8. Bible KC, Bible RH, Kottke TJ, Svingen PA, Xu K, Pang Y-P, Hajdu E, Kauffman SH. Flavopiridol binds to Duplex DNA. *Cancer Res.* 60: 2419-2428. 2000.
9. Boumendjel A, Di Pietro A, Dumontet C, Barron D. Recent advances in the discovery of flavonoids and analogs with high-affinity binding to P-glycoprotein responsible for cancer cell multidrug resistance. *Med Res Rev.* 22(5):512-529.. 2002.

10. Boyd MR. Status of the NCL preclinical antitumor drug discovery screen. *Prin Parc Oncol.* 10: 1-12. 1989.
11. Calabrese EJ. Estrogen and Related Compounds: Biphasic Dose Responses. *Crit Rev Toxicol.* 31(4 y 5): 503-515. 2001.
12. Callen D.F, Baker E, Simmers R.N, Seshadri R, Roninson IB. Localization of the human multiple drug resistance gene *mdr1*, to 7q21.1. *Hum Genet.* 77: 142-144. 1987.
13. 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.
14. Carbone D, Kratzke R. RB1 and p53 genes. In: Mitchell J, Johnson D, Turrisi, editors. *Lung Cancer: Principles and practice* . Philadelphia PA: Lippincott-Raven: 107-121. 1996.
15. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47: 936-942. 1987.
16. 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.
17. 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.
18. Darnell JE. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D. *Molecular Cell Biology.* 4th ed. New York: W. H. Freeman & Co, pp: 595-597. 1999.
19. 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.
20. DeVita VT. Principles of cancer management: chemotherapy. In: DeVita HSTV, Rosenberg SA (eds), *Cancer: principles and practice of oncology.* Ed 5, Philadelphia, Lippincott Reven Publishers, pp: 333-343. 1997

21. 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.
22. Essigmann J.M, Kartalou M, Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res.* 478(1-2):23-43. 2001.
23. Fentem JH., Fry JR. Species differences in the metabolism and hepatotoxicity of coumarin. *Comp Biochem Physiol. C* 104: 1-8. 1993.
24. Finn GJ, Creaven, 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.
25. 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.
26. Finn GJ, Creaven B, Egan DA. Daphnetin induced differentiation of human renal carcinoma cells and its mediation by p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochemical Pharmacol.* 67: 1779-1788. 2004.
27. Foster JS, Henley DC, Ahamed S, Wimalasena J. Estrogens and cell-cycle regulation in breast cancer. *Trends Endocrinol Metab.* 12: 320-327. 2001.
28. García-Solis AF. Relación estructura actividad citotóxica y citostática de derivados cumarínicos en cuatro líneas tumorales humanas. Facultad de Química UNAM. 2003, 63 páginas (Tesis de licenciatura).
29. 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, pp: 23-63. 1997.
30. Goodman A, Ruddon RW, Molinoff PB, Limbird LE, Hardra JG. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Novena edición Inglés. Octava edición español. McGraw Hill – Interamericana. México, pp: 1303-1305. 1996.

31. Gutmacher A.E, Collins FS. Breast and Ovarian Cancer. *N Engl J Med.* 348, 23: 2339-2347. 2003.
32. Haber D.A, Telomeres, Cancer, and Immortality. *N Engl J Med.* 332: 955-956. 1995.
33. Hahn WC, Weinberg RA. Mechanisms of disease: rules for making human tumor cells. *N Engl J Med.* 347 (20): 1593-1603. 2002.
34. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 100: 57-70. 2000.
35. Hardcastle IR, Golding BT, Griffin RJ. Designin inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 42: 325-48. 2002.
36. Harris C.C, Vähäkangas K.H, Bennett W.P, Castren K, Welsh J.A, Khan M.A, Blömeke B, Alavanja M.C, p53 and K-ras mutations in lung cancers from former and never-smoking women. *Cancer Res.* 61: 4350-4356. 2001.
37. Hofmanova J, Soucek K, Pachernik J, Kovarikova M, Hoferova Z, Minksova K, Netikova J, Kozubik A. Lyxoygenase inhibitors induce arrest of tumor cells in S-phase of the cell cycle. *Neoplasma.* 49: 362-367. 2002.
38. Hortobagyi G.N, Treatment of Breast Cancer. *N Engl J Med.* 339 (14): 974-984. 1998.
39. Horwitz S.B, Torres K, Mechanisms of taxol-induced cell death are concentration dependent. *Cancer Res.* 58: 3620-3626. 1998.
40. INEGI página web (<http://www.inegi.gob.mx>)
41. Iwasa H, Han J and Ishikawa F. Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. *Genes to Cell.* 8: 131-144. 2003.
42. Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chemical Reviews.* 99(9): 2467-2498. 1999.
43. Jiménez-Orozco F.A, Molina-Guarneros JM, Mendoza-Patiño N, León-Cedeño F, Flores-Pérez B, Santos-Santos E, Mandoki JJ. Cytostatic activity of coumarin metabolites and derivatives in the B16 F10 murine melanoma cell line. *Melanoma Res.* 9: 243-247. 1999.

44. Jiménez-Orozco F.A, López JS, Nieto A, Molina J, Velasco MA, Mendoza N, García MJ B, León F, Mandoki JJ. Decrease of cyclin D1 in the human lung adenocarcinoma cell line A-427 by 7-hydroxycoumarin. *Lung Cancer*. 34: 185-194. 2001.
45. Johnson DG, Walker CL. Cyclin and cell cycle checkpoints. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*. 39: 295-312. 1999.
46. Kaelin WG Jr. Functions of the retinoblastoma protein. *Bioessays*. 21: 950-958. 1999.
47. Kaubisch A, Kelsen D.P, Saltz L, Kemeny N, O'Reilly E, Ilson D, Endres S, Barazzuol J, Schwartz G.K. A Phase I trial of weekly sequential bryostatins (Bryo) and paclitaxel in patients with advanced solid tumors. *Proc Am Soc Clin Oncol*. 18: 166a. 1999.
48. Keohavong P, Mady H, Gao W, Melhem M, K-ras mutation in histologically-normal tissue adjacent to lung carcinoma. *Cancer Detection and Prevention* 24. 2000.
49. Kelland LR, Flavopiridol, the first cyclin-dependent kinase inhibitor to enter the clinic: current status. *Exp Opin Invest Drugs*. 9: 2903-2911. 2000.
50. Kornbluth S. Cell cycle checkpoints. In: Conn PM, Means AR, O'Malley BW (eds) *Principles of Molecular Regulation*. Human Press, New Jersey, pp: 407-413. 2000.
51. Kuo M.T, Sen S, Hittelman W. N, Hsu T.C, Chromosomal fragile sites and DNA amplification in drug-resistant cells. *Biochem Pharmacol*. 56(1): 7-13. 1998.
52. Lake BG. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. *Food and Chem Toxicol*. 37: 423-453. 1999.
53. Lavia P, Jansen-Durr P. E2F target genes and cell-cycle checkpoint control. *Bioessays*. 21: 221-230. 1999.
54. Lawrence RN, Rediscovering natural product biodiversity. *Drug Discov Today*. 4: 449-451. 1999.
55. Leszczyniecka M, Roberts T, Dent P, Grant S, Fisher P.B. Differentiation therapy of human cancer: basic science and clinical applications. *Pharmacol Ther*. 90: 105-156. 2001.

56. López-González J.S, Prado-García H, Aguilar-Cázares D, Molina-Guarneros JA, Morales-Fuentes J, Mandoki JJ. Apoptosis and cell cycle disturbance induced by coumarin and 7-hydroxycoumarin on human lung carcinoma cell lines. *Lung Cancer*. 43: 277-283. 2004.
57. Luria, S.E., and Delbruck, M. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics*. 28: 491. 1943.
58. Makin G, y Dive C, Apoptosis and cancer chemotherapy. *Trends Cell Biol*. 11(11): S22-6. 2001.
59. Marshall ME, Mendelsohn L, Butler K, Riley L, Cantrell J, Wiseman Ch, Taylor R, Macdonal JS. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with coumarin (1,2-benzopirone) and cimetidine: A pilot study. *J Clin Oncol*. 17: 862-866. 1987.
60. Marshall ME, Butler K, Hermansen D. Tratment of hormone-refrectory stage D carcinoma of prostate with coumarin (1,2-bensopyrone) and cimetidine: a pilot study. *Prostate*. 17: 95-99. 1990.
61. Marshall ME, Butler K, Fried A. Phase I evaluation of coumarin (1,2-benzopirone) and cimetidine in patients with advanced malignancies. *Molec Biothec*. 3: 170-178. 1991.
62. Martínez F, Chávez AD, González D, Gutiérrez AA Regulation of cell division in higher eukaryotes. In *Cell physiology sourcebook*. New York, 3th Ed. Sperelakis N ed, Stockton Press, pp: 1135-1159. 2001.
63. McDonald RB 3rd, El-Deiry WS. Cell cycle control as a basis for cancer drug development. *Int J Oncol*. 16: 871-886. 2002.
64. McKeehan WL. The effect of temperature during trypsin treatment on viability and multiplication potential of single normal human and chicken fibroblast. *Cell Biol Int Rep*. 1: 335-343. 1977.
65. Medline Plus, (<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/breastcancer.html>).
66. Mohler JL, Gomella LG, Crawford ED, Glode LM, Zippe CD, Fair WR, Marshall ME. Phase II evaluation of coumarin (1,2-benzopirone) in metastatic prostatic carcinoma. *Prostate*. 20: 123-131. 1992.

67. 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.
68. Mossmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferative and cytotoxic assays. *Immunol Methods.* 65: 55-63. 1983.
69. O'Connor PM, Fan S. DNA damage checkpoints: implication for cancer therapy. *Prog Cell Cycle Res.* 2: 165-173. 1996.
70. Organización Mundial de la Salud. www.who.int
71. 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.
72. Pelkonen 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, pp: 67-92. 1997.
73. Pelkonen 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.
74. Pelkonen O., Rautio A, Raunio H., Pasanen M. CYP2A6: a human coumarin 7-hydroxylase. *Toxicology.* 144: 139-147. 2000.
75. Plumb JA, Milroy R, Kake SB, Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetra-zolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer Res.* 49: 4435-440. 1989.
76. Prins J, De-Vries E, Mulder N. The *myc* family oncogenes and their presence and importance in small-cell lung carcinoma and other tumour types. *Anticancer Res.* 13: 1373-1385. 1993.
77. Rahman N, y Stratton M.R, The genetics of breast cancer susceptibility. *Annu Rev Genet.* 32: 95-121. 1998.

78. Rom W.N, Hay J.G, Lee T.C, Jiang Y, Tchou-Wong K, Molecular and genetic aspects of lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med.* 161: 1355-1367. 2000.
79. Rowinski E.K, Donehower R.C, Paclitaxel. *N Engl J Med.* 332: 1004-1014. 1995.
80. Salgai R, Skarin AT. Molecular abnormalities in lung cancer. *J Clin. Oncol.* 16: 1207-1217. 1998.
81. Sargent J, The use of the MTT assay to study drug resistance in fresh tumor samples. *Recent Results Cancer Res.* 161: 13-25. 2003.
82. Sahai E, Marshall CJ. Rho-GTPases and cancer. *Nature Rev.* 2: 133-142. 2002.
83. Schwartz G.K, Kaubisch A, Saltz L, Ilson D, O'Reilly E, Baraszzuol J, Endres S, Stoltz M, Tong W, Spriggs D, Kelsen D.P. Phase I study of sequential paclitaxel and the cyclin dependent kinase inhibitor flavopiridol. *Proc Am Soc Clin Oncol.* 18: 160a. 1999.
84. Shah MA, Schwartz GK. Cell cycle-mediated drug resistance: an emerging concept in cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 7: 2168-2181. 2001.
85. Shapiro GI, Edwards CD, Kobzik L. Reciprocal Rb inactivation and p16^{INK4} expression in primary lung cancer and cell lines. *Cancer Res.* 55: 505-509. 1995.
86. Shapiro GI, Park JE, Edwards ChD. Multiple mechanisms of p16^{INK4} inactivation in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res.* 55: 6200-6209. 1995.
87. Shilling WH, Crampton RF, Longland RC. Metabolism of coumarin in man. *Nature.* 221: 64-65. 1969.
88. Skehan P, Storeng R, Scudiero N. Evaluation of colorimetric protein and biomass stains for assaying *in vitro* drug effects upon human tumor cell lines. *Proc Am Soc Cancer Res.* 30: 612. 1989.
89. Talalay P, Chou T.C, Quantitative Analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul.* 22: 27-55. 1984.
90. Tallarida R.J, Porreca F, Cowan A, Statistical analysis of drug-drug and site-site interactions with isobolograms. *Life Sciences.* 45: 947-961. 1989.

91. Tetsu O, McCormick. β -Catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*. 398: 422-426. 1999.
92. Thomas H, Coley HM. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control*. 10(2): 159-65. 2003.
93. Thornes RD, Lynch G, Sheehan MV. Cimetidine and coumarin therapy of melanoma. *Lancet*. 328. 1982.
94. 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.
95. Tsuruo T, Iida H, Yamashiro M, Tsukagoshi S, Sakurai Y. Enhancement of vincristine- and adriamycin-induced cytotoxicity by verapamil in P388 leukemia and its sublines resistant to vincristine and adriamycin. *Biochem Pharmacol*. 31(19): 3138-40. 1982.
96. Venkitaraman A.R. A growing network of cancer-susceptibility genes. *N Engl J Med*. 348(19): 1917-9. 2003.
97. Weinert T ed, Lydall D. Cell cycle checkpoints, genetic instability and cancer. *Sem Cancer Biol*. 4: 129-140. 1993.
98. Yang J, Kornbluth S. All aboard the cyclin train: subcellular trafficking of cyclin and their CDK partners. *Trends Cell Biol*. 9: 207-210. 1999.
99. Yang E.B, Zhao Y.N., Zhang K., Mack P. Daphnetin, One of Coumarin Derivatives, is a Protein Kinase Inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*. 260: 682-685. 1999.
100. Yunis J, Ramsay N. Retinoblastoma and subband deletion of chromosomae 13. *Am J Dis Child*. 132: 161-163. 1978.
101. Yu Q, Geng Y, Scinski P. Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation. *Nature*. 411: 1017-1021. 2001

- 102.** 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.