



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Efecto de 4-hidroxycumarina sobre la localización, expresión y
activación de paxilina en células B16 de melanoma murino

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

NOHEMÍ SALINAS JAZMÍN



MÉXICO, D. F.



2005

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

M340800



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Profa. Ma. Del Carmen Parra González
Vocal	Prof. Atonatiu Edmundo Gómez Martínez
Secretario	Prof. Marco Antonio Velasco Velázquez
1er. Suplente	Profa. Herminia De Jesús Loza Tavera
2º. Suplente	Profa. Ruth Bustamante García

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

Apoiada por el proyecto PAPIIT-UNAM IN230202

Asesor de tema:

Q.F.B. Marco Antonio Velasco Velázquez

Sustentante:

Nohemí Salinas Jazmín

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcionali.

NOMBRE: NOHEMI SALINAS JAZMIN

FECHA: 07-FEB-05

FIRMA: [Firma]

Dedicada al ser más importante que ha guiado mi camino

y siempre me ha apoyado: Dios

Agradezco a:

Marco por haberme apoyado y haber confiado en mí para realizar este trabajo, por sus conocimientos y su infinita paciencia.

Diana por su apoyo y por ser un ejemplo a seguir.

Susan, Adriana y Victor, por su colaboración y compañerismo; gracias *Susan* por tu carisma que hace todo más ameno.

Los integrantes del laboratorio de farmacología de la Facultad de Medicina:
Juanola, Dr. Mandoki y Dr. Molina por sus consejos y ayuda incondicional.

Mis Padres por haberme dado la vida. A papá por estar en los momentos más importantes, por su amor y comprensión. Por aceptarme como soy. A mi mamá por su apoyo y cariño.

Mi familia: Abuelitos y tías que se preocuparon por mí, moral y económicamente en los momentos que más lo necesite.

Mi Abue y a mi tía *Mary* por haberme cuidado como ha una hija.

Mis tías *Manue* y *Laura* por haber sembrado en mí la espinita de la confianza, seguridad y superación.

Rodri por todo su apoyo, amor y comprensión, y sobretodo por perseverancia, ya que sin ella no estaríamos juntos.

La familia *Intor Pérez* por haberme ofrecido el cariño de una familia y su apoyo incondicional.

Índice

Contenido.

	Página.
Resumen.....	6
Abreviaturas.....	7
I. Antecedentes.....	8
1. Cáncer.....	8
1.1. Definición y Origen.....	8
1.2. Epidemiología.....	8
2. Melanoma.....	9
3. Carcinogénesis.....	12
3.1. Metástasis.....	15
4. Adhesión celular.....	17
4.1. Moléculas de adhesión.....	17
4.1.1. Moléculas de adhesión celular (CAMs).....	17
4.1.2. Moléculas de adhesión al sustrato (SAMs).....	18
4.1.3. Proteínas del citoesqueleto.....	20
5. Migración celular.....	21
6. Paxilina.....	23
6.1. Estructura y localización.....	24
6.2. Función.....	26

	Página.
7. Cumarinas	29
7.1 Generalidades de cumarinas.....	29
7.2 Metabolismo.....	30
7.3 Actividad de cumarinas	32
7.4 Actividad de 4-hidroxycumarina	34
II. Hipótesis	36
III. Objetivos	36
Objetivo general	
Objetivos particulares	
IV. Material y Métodos	37
V. Resultados	42
VI. Discusión	49
VII. Conclusiones	54
VIII. Bibliografía	55
Apéndice.....	69

RESUMEN:

La adhesión celular desempeña un papel muy importante en diversos procesos biológicos, regulando la comunicación entre las células, la migración celular y el contacto con la matriz extracelular. En la regulación de la adhesión intervienen moléculas de adhesión y proteínas estructurales. Éstas son parte de complejos sistemas transductores de señales capaces de activar funciones específicas. Alteraciones en la actividad, expresión y/o localización de estas moléculas puede provocar cambios en la adhesión y morfología celular.

Los actuales tratamientos contra el cáncer no son efectivos para tratar los tumores secundarios que se forman en el proceso de metástasis, por lo que se requiere desarrollar nuevos tratamientos que inhiban la formación de metástasis. El proceso de metástasis comprende varias etapas; en todas estas está implicada la adhesión de las células tumorales a la matriz extracelular (MEC). Durante el proceso de metástasis, las células neoplásicas incrementan su motilidad. A través de diversos modelos experimentales se ha observado que los cambios en la expresión y/o funcionalidad de receptores de adhesión intervienen en la progresión del cáncer.

Paxilina es una proteína que puede interactuar en los sitios de adhesión focal con integrinas, con receptores a factores de crecimiento y con el citoesqueleto de actina.

La cumarina tiene actividad antineoplásica *in vivo* e *in vitro*. En el humano, la cumarina se metaboliza generando derivados monohidroxilados que presentan vidas medias más largas y poseen actividades biológicas. Se ha descrito que la 4-hidroxicumarina disminuye la adhesión de células B16 a moléculas de matriz extracelular y desorganiza el citoesqueleto de actina.

El presente proyecto analizó el efecto del tratamiento *in vitro* de la 4-hidroxicumarina, sobre la migración y función paxilina en células de melanoma murino B16. Para lo cual se realizó un ensayo de migración aleatoria, en donde se observó inhibición de la migración de forma dependiente a la concentración de 4-hidroxicumarina (50, 160 o 500 μM). A través de inmunofluorescencias de las células tratadas con 4-hidroxicumarina, se observó una modificación en la distribución de paxilina. Por otro lado se encontró una disminución en la expresión y activación de paxilina con 4-hidroxicumarina (500 μM). El hecho de que la 4-hidroxicumarina no altere la localización ni la expresión de paxilina en fibroblastos L929 (células no malignas), sugiere que los efectos de este compuesto pudieran ser selectivos sobre células cancerosas. Esto favorecería el eventual uso de la 4-hidroxicumarina como terapia adyuvante para el cáncer.

Abreviaturas.

ATP. Adenosina trifosfato

CRK. Proteína homóloga del oncogen v-crk del virus CT10 de sarcoma

CRKL. Proteína como CRK

CSK. Proteína tirosina cinasa dependiente de Src

DDT. p,p-diclorodifeniltricloroetano

EGF. Factor de crecimiento epidermal

ERO. Especies Reactivas de Oxígeno

FAK. Cinasa de adhesión focal

HCH. Hexaclorociclohexano

ICAM-1. Molécula de adhesión intercelular 1

LD. Dominio conservado iniciado L= leucina D= ácido aspártico

LIM. Dominio como el de las proteínas: Lin-11, Isl-1 y Mec-3 de *Caenorhabditis elegans*

MEC. Moléculas de matriz extracelular

OMS. Organización Mundial de la Salud

PBS. Buffer Salino de fosfatos

PI3K. Cinasa Fosfatidilinosito-3

PKC. Proteína cinasa C

PKA. Proteína cinasa A

P130CAS. Sustrato asociado a CRK

MLCK. Cinasa de cadenas ligeras de miosina

Src. Proteína cinasa homóloga al oncogen viral v-src de sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2)

SFB. Suero Fetal Bovino

UV. Radiación ultravioleta

I. Antecedentes.

1. Cáncer.

1.1 Definición.

El término cáncer se utiliza para describir a un grupo de enfermedades que se originan a partir de la proliferación descontrolada y anormal de células transformadas. Estas células presentan la capacidad de invadir tejidos diferentes al de origen y de metastatizar a sitios distantes (Ruddon, W., 1995). La presencia de células con capacidad invasiva, es diagnóstico suficiente para indicar malignidad (Lodish, H., *et al* 2000).

1.2. Epidemiología.

El cáncer constituye uno de los principales problemas de salud pública en todo el mundo, por tanto es una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad tanto en la infancia como en la edad adulta. Según el informe anual de la OMS del 2002, en el mundo más de 10 millones de personas son diagnosticadas con cáncer cada año, de las cuales 6 millones mueren y se estima que estas cifras se incrementarán en un 50% en los próximos 20 años. A pesar de que en países desarrollados la mortalidad por neoplasias malignas muestra una reducción en el número de casos durante los últimos años, el perfil de mortalidad por cáncer en las naciones subdesarrolladas presenta todavía un claro patrón ascendente. En

México, la mortalidad global por cáncer en los hombres se incrementó de 76.2 en 1991, a 94.8 por 100 000 casos en 1995; entre las mujeres, ésta se incrementó de 85.6 a 105.8 por 100 000 casos (Salmerón, C., *et al* 1997).

Durante el año 2002, los tumores malignos fueron causa de 24,798 muertes en nuestro país, que corresponden al 5 % del total de defunciones (Fuente: INEGI / SS, 2002). Los tumores malignos se determinaron como la cuarta causa de mortalidad en personas en edad productiva (entre 15 y 64 años). A pesar de los avances en el manejo de la enfermedad, la sobrevivida a 5 años para todos los tipos de cáncer de pulmón es de 13% y la de melanoma metastático es de 16%.

2. Melanoma.

El melanoma es un tumor maligno que se origina de la transformación de los melanocitos. El melanoma representa el 2.5% de todas las neoplasias y es el responsable del 1-2% de las muertes por cáncer (Fuente: INEGI). La mayoría de los melanomas se localizan en la piel, pero también pueden localizarse en otros lugares como mucosas y retina. Puede ser de crecimiento rápido y originar metástasis tempranas, por lo que si no se trata oportunamente produce la muerte. Los melanocitos son células encargadas de dar la coloración a la piel, se encuentran en la epidermis, que es la capa exterior que constituye la piel. Existen varios factores de riesgo que aumentan la posibilidad de desarrollar un melanoma

maligno, pero la radiación solar -ultravioleta- es el factor etiopatogénico más importante (Lodish, H., *et al* 2000).

El melanoma tiene un comportamiento biológico constituido por dos fases de crecimiento, una radial (intraepidérmica) y otra vertical (intradérmica). En la fase de crecimiento radial, que puede durar meses o años, el tumor está limitado a la epidermis sin presentar capacidad de producir metástasis, en esta situación la extirpación quirúrgica es curativa. En la fase de crecimiento vertical, las células tumorales invaden la dermis con la capacidad de producir metástasis linfáticas o sanguíneas (Ruddon, W., 1995). El crecimiento del melanoma hace necesario que una vez determinado el diagnóstico, tenga que establecerse la fase de crecimiento en que se encuentra, con la finalidad de establecer el pronóstico y el tratamiento.

El diagnóstico clínico de melanoma se basa en el reconocimiento de las características clínicas de las formas de melanoma, es decir la observación de una lesión pigmentada, asimétrica, de bordes imprecisos y coloración abigarrada con áreas negras y áreas menos pigmentadas. La presencia o no de metástasis linfáticas regionales en los pacientes con melanoma, tiene un valor pronóstico en relación a la supervivencia. Si existen metástasis linfáticas, la supervivencia a los 5 años se reduce a un 30-50%. El riesgo de desarrollar metástasis linfáticas está en relación con el espesor del tumor primario.

Los principales agentes antineoplásicos empleados en la quimioterapia producen daño al DNA y como resultado, inhiben la progresión del ciclo celular en diferentes fases (tabla 1). Para incrementar la eficacia de los tratamientos, en la práctica clínica se ha optado por administrar en forma combinada agentes

antineoplásicos que actúen en distintas fases del ciclo celular. Sin embargo, la eficacia de los tratamientos es limitada, debido a que la toxicidad de los agentes antineoplásicos es poco selectiva y daña a gran parte de las células normales (Jiménez, O., 2003).

Agente antineoplásico	Blanco farmacológico	Efecto en el ciclo celular	Mecanismo de acción
Cisplatino y análogos (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.
Taxol	Microtúbulos	Arresto en G ₂ /M Arresto en G ₁ Apoptosis	Promueve el ensamble de microtúbulos y estabilización de formación de polímeros de tubulina.
Camptotectina	Topoisomerasa	Arresto en G ₁ Arresto en G ₂	Mediado por incremento de p16. Estabiliza las uniones entre Topoisomerasa I y ADN

Tabla 1. Efectos y mecanismos de acción de agentes antineoplásicos en el ciclo celular (Jiménez, O., 2003).

3. Carcinogénesis.

La carcinogénesis es un proceso de múltiples etapas que culminan en la transformación de una célula normal en una célula cancerosa. Esta conversión requiere de múltiples mutaciones, principalmente en genes que codifican proteínas que participan en el control de la proliferación (Franks, L., 1998; Cohen, S., and Ellwein, L., 1991). Los factores que promueven la carcinogénesis pueden ser: i) externos, que incluyen a carcinógenos químicos (agentes alquilantes como el benceno, aminas aromáticas como la 2-naftilamina presente en el caucho, nitrosaminas como la betanaftilamina presente en el humo del tabaco, grasas poliinsaturadas omega-3 y omega-6 presentes en salmón, nueces, semillas de girasol y margarinas, compuestos policlorados contenidos en insecticidas como el DDT y plaguicidas como el HCH, etc.); carcinógenos biológicos (como la aflatoxina B1, producto del metabolismo de hongos que crecen en los cereales tales como el *Aspergillus flavus*); carcinógenos físicos (radiaciones electromagnéticas ionizantes como los rayos X, γ o UV); e infecciones virales (virus del papiloma humano, el de Epstein Bar y los de hepatitis B y C), o ii) internos, como defectos en el sistema inmune o predisposición genética (Khan, S., *et al* 1994; Iwasawa, A., *et al* 1996; Teramoto, B., *et al* 1996; Wolf, C., 1990).

El 80% de los cánceres no heredables se deben a exposición ambiental o carcinógenos químicos. Por ejemplo, el cigarrillo predispone al cáncer de pulmón y de vejiga; las aminas aromáticas al cáncer de vejiga; la aflatoxina al cáncer de hígado; el benceno a las leucemias (Franks, L., 1998). Dado que existen diferentes mecanismos que promueven la carcinogénesis, las neoplasias generadas son diferentes; varían en tiempo de crecimiento, grado de diferenciación celular, detectabilidad, invasividad, potencial metastático, respuesta a tratamientos y pronóstico (Franks, L., 1998; Ruddon, W., 1995; Narod, S., *et al* 1994).

Para que se lleve a cabo la formación de tumores se requiere de tres etapas conocidas como:

1. *Iniciación*. La iniciación es debida a alguna causa procarcinógena y resulta en la alteración específica de genes susceptibles. La célula mutada incrementa su capacidad de proliferación; se ha sugerido que los agentes promotores de la proliferación pueden interferir con el proceso de diferenciación que se lleva a cabo normalmente cuando una célula pasa de un estadio no divisorio a otro en el cual está lista para dividirse. Estos estímulos promotores del crecimiento actúan sobre células que aún pueden ser sensibles a factores inhibidores de crecimiento normal. Esto explica por qué algunas neoplasias presentan un carácter reversible (Franks, L., 1998), aún cuando los cambios moleculares sean irreversibles y permanezcan latentes hasta que otro estímulo induzca la proliferación (Ruddon, W., 1995).

2. *Promoción*. Se caracteriza por un estado de hiperproliferación o hiperplasia. Esta proliferación es selectiva sobre células iniciadas por un estímulo promotor y da origen a lesiones premalignas o tumores benignos. Los promotores generalmente son sustancias químicas exógenas, aunque también pueden ser agentes endógenos como las hormonas. Cabe mencionar que además de la proliferación excesiva, la descendencia de células transformadas presentan una morfología y orientación anormal, dando lugar a una displasia. Los tumores denominados *in situ*, son tumores benignos que la mayoría de las veces son de tamaño pequeño, se encuentran encapsulados y no invaden el tejido que los rodea. Causan daño al ejercer presión local u obstrucción en órganos vitales, por lo que el tratamiento quirúrgico constituye una solución efectiva (Colville, P., 1997; Khan, S., *et al* 1994).

3. *Progresión*. Durante esta etapa las lesiones premalignas se convierten en tumores malignos con la capacidad de invadir tejidos vecinos o distantes. En la progresión, las células neoplásicas adquieren gradualmente un fenotipo invasivo y metastásico, generado como consecuencia de alteraciones en genes que regulan la proliferación, la adhesión y la migración celular (Robbins, S., 1995; Ruddon, W., 1995).

3.1 Metástasis.

Una vez que las células tumorales han adquirido un fenotipo invasivo, son capaces de salir del sitio de origen y formar tumores secundarios en otras áreas del cuerpo; este proceso se conoce como metástasis. Solo los tumores malignos tienen la capacidad de producir metástasis. El sitio anatómico donde se localiza el tumor primario proporciona datos sobre su curso clínico, ya que indica los efectos del tumor sobre las funciones del cuerpo, el tipo de tratamiento que se puede aplicar y los sitios más probables de formación de metástasis. Los sitios secundarios más comunes para la metástasis de cualquier tipo de cáncer son los pulmones, el hígado, los nódulos linfáticos, la medula ósea y el cerebro. En general, el sitio inicial de formación de tumores secundarios tiende a ser el órgano que tenga la primera red capilar encontrada por las células después de haber sido liberadas del tumor primario (Liotta, L., *et al* 1974).

Cuando las células tumorales entran al sistema linfático, pasan por los nodos linfáticos regionales donde pueden ser retenidas y provocar un crecimiento metastásico. Una vez que las células cancerosas alcanzan los vasos sanguíneos, pueden llegar a tejidos distantes mediante el torrente circulatorio; sin embargo solo el 0.1 % de las células tienen la capacidad de formar un tumor metastásico secundario. Dada la ineficiencia de este paso, encontrar células cancerosas en el torrente sanguíneo no es indicativo de la formación de metástasis. Sin embargo las explicaciones hemodinámicas no aclaran totalmente la predilección de las células tumorales por un órgano específico, por lo tanto, se ha postulado la teoría de la

existencia de interacciones selectivas entre la célula tumoral y el órgano hospedero (Weiss, L., 1990; Chambers, F., *et al* 2000).

El proceso de metástasis requiere transformaciones de la célula tumoral, que alteren la adhesión y la capacidad migratoria. Las células metastásicas, para entrar a la circulación y eventualmente formar tumores secundarios deben invadir el tejido adyacente, rompiendo el contacto con otras células del tejido de origen y atravesando la barrera de la lámina basal. Dentro de los cambios fenotípicos que afectan la adhesión de las células neoplásicas, se ha reportado una disminución en la expresión de cadherinas (responsables de las interacciones célula-célula), y cambios en la expresión de integrinas (receptores que median las interacciones de la célula con la matriz extracelular y con los vasos sanguíneos) (Yamada, K., and Miyamoto, S., 1995). En algunos casos como en el melanoma maligno, la expresión de integrinas determina el fenotipo de la malignidad (Armitage, P., and Doll, R., 1954; Garibay, M., 1998; Liotta, L., 1986).

Por su importancia en el proceso de metástasis, las integrinas y las moléculas que participan en la regulación de la adhesión han sido señaladas como blancos farmacológicos para disminuir el proceso de metástasis (Velasco, V., *et al* 1999).

4. Adhesión celular.

En todos los organismos multicelulares las células interactúan entre sí o pueden unirse a componentes de la matriz extracelular; estos procesos de adhesión celular sirven para mantener la arquitectura tisular y transmitir señales de comunicación. La adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular son fenómenos regulados por moléculas de adhesión localizadas en la membrana de las células. Dichas moléculas forman parte de complejos sistemas transductores de señales que activan funciones específicas.

4.1. Moléculas de adhesión

4.1.1. Moléculas de adhesión celular (CAMs)

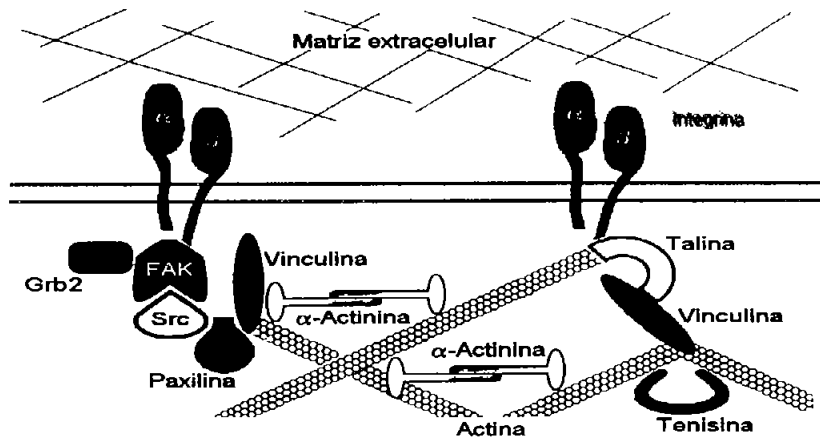
Las CAMs incluyen receptores de la superfamilia de las inmunoglobulinas, cadherinas y selectinas. La superfamilia de las inmunoglobulinas comprende a más de 30 glicoproteínas, que se caracterizan por contener en su porción extracelular múltiples dominios parecidos a los de las inmunoglobulinas. Fisiológicamente estas moléculas participan en las interacciones célula-célula, ya sea manteniéndolas juntas o facilitando la adhesión entre células de diferentes estirpes. Las cadherinas son glicoproteínas de membrana capaces de mediar la adhesión célula-célula de manera dependiente de calcio, con el fin de mantener las células juntas y conservar la arquitectura tisular. La región citoplasmática de las cadherinas está conectada al citoesqueleto de actina mediante proteínas de la familia de las cateninas. La interacción cadherina-catenina favorece la adhesión célula-célula, regula la

proliferación y la migración celular. Las selectinas son lectinas dependientes de calcio, implicadas en el reconocimiento entre los leucocitos y las células endoteliales. Además también intervienen en uniones transitorias de alta especificidad entre las células, por lo que no se expresan constitutivamente en la superficie celular (Alberts, B., *et al* 1994).

4.1.2. Moléculas de adhesión a sustrato (SAMs)

Dentro de las SAMs se encuentran las integrinas y moléculas como proteoglicanos y glicoproteínas (fibronectina, laminina, etc.). Las integrinas son moléculas de superficie glicoprotéicas y multifuncionales, que sirven como receptores a moléculas de matriz extracelular (MEC) e intervienen en la adhesión y migración celular. Estos receptores están formados por dos subunidades transmembranales (α y β); se han identificado 16 subunidades α , 8 β y 22 heterodímeros (Hynes, R., 1992). La mayoría de las integrinas reconocen moléculas de matriz extracelular (laminina, vitronectina o fibronectina), pero algunas (principalmente la que contienen la subunidad $\beta 2$) participan en la adhesión célula-célula, reconociendo moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Como consecuencia del reconocimiento de su ligando, las integrinas se agregan en complejos multimoleculares (complejos de adhesión focal) que participan en la transducción de señales y pueden alterar la reorganización del citoesqueleto de actina y la migración celular (Esquema 1) (Alberts, B., *et al* 1994; Velasco, V., *et al* 1999). La unión del ligando y la agregación de las integrinas en

los complejos de adhesión focal, inducen un cambio conformacional en el dominio citoplasmático de la subunidad β de la integrina, provocando la activación de la cinasa de adhesión focal (FAK) (LaFlamme, S., and Auer, K., 1996). FAK es una tirosina-cinasa intracelular que puede unirse a otras proteínas del citoesqueleto para formar los complejos de adhesión focal (Turner, C., 1994). La activación de FAK induce su autofosforilación (Schaller, M., *et al* 1995), generando nuevos sitios de interacción con proteínas del citoesqueleto y/o proteínas adaptadoras que participan en la señalización intracelular que desembocan en el rearrreglo del citoesqueleto de actina (Schlaepfer, D., *et al* 1999).



Esquema 1. Complejo de adhesión focal. Como consecuencia del reconocimiento del ligando, las integrinas interactúan con proteínas de citoesqueleto (vinculina, talina, tensina, α -actinina y paxilina) y con proteínas cinasas (FAK y Src), para formar los complejos de adhesión focal, con el fin de transmitir señales que controlan la migración celular y la reorganización del citoesqueleto de actina (Velasco, V., *et al* 1999).

La interacción de las MEC con receptores de membrana no es suficiente para soportar la adhesión celular. Esta unión necesita la presencia de proteínas de unión agregadas a los complejos multimoleculares. La función del citoesqueleto en los procesos adhesivos es promover y estabilizar la agregación de receptores de adhesión para facilitar el reconocimiento de múltiples ligandos.

4.1.3. Proteínas del citoesqueleto.

Para regular la morfología, migración y adhesión celular se requiere de la interacción del citoesqueleto de actina con receptores de adhesión, a través de diversas proteínas como paxilina, vinculina y talina. En células normales los microfilamentos de actina son muy estables, por lo que las células tienen poco movimiento; pero en células cancerosas los cambios dinámicos del citoesqueleto de actina impiden la formación de contactos célula-célula y facilitan la migración, permitiendo la progresión tumoral (Bernal S., *et al* 1983). Se ha observado que la adhesión regulada por integrinas es importante durante varias etapas del proceso de metástasis (Velasco, V., *et al* 1999).

Dada la importancia de los procesos adhesivos en la generación de metástasis, la identificación de las alteraciones en la expresión de moléculas de adhesión en las neoplasias puede ser importante para el pronóstico y para la generación de nuevas terapias antineoplásicas.

5. Migración celular.

Para poder migrar sobre un sustrato la célula necesita la presencia y activación de moléculas de adhesión. Como ya se mencionó, la adhesión mediada por integrinas, requiere la unión del receptor al citoesqueleto en el interior de la célula para ser eficiente. En el caso de la migración, las señales generadas en los procesos de adhesión provocan cambios en el citoesqueleto que permiten a la célula tener suficiente tracción para desplazarse. Existen tres principales tipos de estructuras con funciones especializadas formadas por cambios en la polimerización del citoesqueleto de actina, a partir de que la célula se une a su sustrato. A estas estructuras se les han denominado filipodios, lamelipodios y fibras de estrés. Los lamelipodios y filipodios son estructuras altamente móviles que frecuentemente se unen y desprenden del sustrato para producir movimiento, retracción o pliegues en la membrana. Los filipodios y sus precursores se presentan como estructuras alargadas y puntiagudas en la membrana, y se forman por la presión de cadenas de microfilamentos de actina sobre la superficie celular. Los lamelipodios se forman debido a la presencia de una gran cantidad de filamentos de actina en forma de redes que forman la maquinaria contráctil en el extremo líder de la célula para producir movimiento. Las fibras de estrés consisten en largas redes de filamentos que atraviesan la célula, se encuentran unidas indirectamente a la matriz extracelular por medio de integrinas y los complejos de adhesión focal (Condeelis, J., 2001; Lodish, H., *et al* 2000).

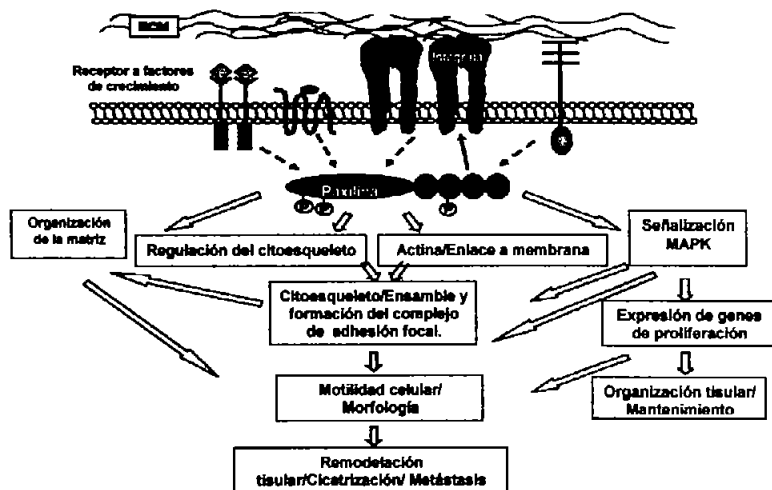
Un movimiento celular implica diferentes mecanismos: desde la extensión inicial de la membrana, la adhesión al sustrato, adelantar el contenido citoplasmático y retraer la parte superior de la célula, que tienen como consecuencia cambios en la morfología celular. El paso inicial para la formación del lamelipodio es la polimerización controlada de filamentos de actina en el extremo líder y la subsecuente unión de estos filamentos en redes y cadenas. Una vez que la membrana se ha extendido y el citoesqueleto se ha ensamblado, la membrana queda firmemente unida al sustrato.

Se ha demostrado que las redes de actina del extremo líder, propician la rápida formación de complejos de adhesión focal en los sitios de unión (Lodish, H., *et al* 2000; Pawlak, G., and Helfman, M., 2001). Esta unión tiene dos funciones principales, mantener adherida la célula al sustrato y preparar el extremo líder para la retracción del resto de la célula; por lo tanto, después de que se ha realizado el proceso de adhesión, el contenido celular es desplazado hacia delante. El siguiente paso del movimiento es la separación de la parte de adhesión focal en el extremo posterior y el traslado del resto de la célula. Para mantener una dirección de movimiento, la célula requiere de señales externas que le permitan diferenciar el extremo líder y adicionalmente señales que coordinen los eventos de ambos extremos. El citoesqueleto y la migración celular son coordinados por la activación de GTPasas complejos multimoleculares y segundos mensajeros, mediante diferentes vías de transducción de señales.

6. Paxilina.

Como ya se ha descrito anteriormente la adhesión y migración celular son fenómenos esenciales en procesos fisiológicos y patológicos. Durante estos procesos las integrinas reclutan una serie de proteínas citoplasmáticas, para formar complejos de adhesión focal (Clark, E., and Brugge, J., 1995; Burridge, K., and Chrzanowska, W., 1996). Paxilina es una de las proteínas reclutadas y ensambladas por activación de la integrina, que actúa como proteína adaptadora y reguladora de la motilidad junto con FAK (Burridge, K., and Chrzanowska, W., 1996; Schaller, M., 2004). Por lo tanto, paxilina es considerada como un punto de correlación entre los estímulos extracelulares que provocan cambios en la organización del citoesqueleto y/o en el estado de la proliferación celular (Rozengurt, E., 1995; Schaller, M., 2001) (Esquema 2).

Vía de señalización de paxilina inducida por adhesión y factores de crecimiento



Esquema 2. Interacción de paxilina con integrinas y receptores a factores de crecimiento para transmitir señales extracelulares que regulan funciones celulares (Brown, M., and Turner, C., 2004).

6.1. Estructura y localización.

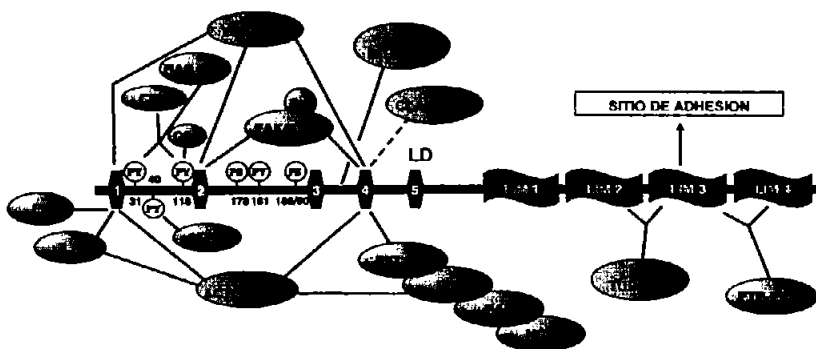
Paxilina es una proteína de la cual existen varias isoformas. En ratón existen dos isoformas de paxilina: α y β , de 60 y 64 kDa respectivamente, mientras que en humanos se han encontrado tres isoformas α , β y γ , de entre 63 y 68 kDa aproximadamente .

Las isoformas de paxilina α y β se pueden localizar dentro de las placas de adhesión focal, en el citoplasma o en el área perinuclear co-localizadas con el aparato de golgi (Mazaki, Y., *et al* 1998).

En ratón, la isoforma α está expresada en la mayoría de los tejidos adultos normales. La expresión de la isoforma β de paxilina es importante durante el proceso de morfogénesis, y una vez terminado éste disminuye su expresión, por lo que en tejidos adultos se expresa en niveles casi imperceptibles (Mazaki, Y., *et al* 1998). Por lo tanto, la expresión de la isoforma β parece no ser esencial para el mantenimiento de la mayoría de los tejidos adultos normales, sin embargo su expresión esta asociada a la de la isoforma α (Mazaki, Y., *et al* 1998). En varios tejidos tales como el del bazo, testículo, timo, y pulmón hay niveles más perceptibles de la isoforma β . Esto se debe a que la isoforma β participa principalmente en el proceso de migración y las células de estos tejidos son móviles (Mazaki, Y., *et al* 1998). En varios tipos de cáncer se ha observado la expresión simultánea de las isoformas α y β de paxilina (Mazaki, Y., *et al* 1997).

Estructuralmente, paxilina se puede dividir en dos regiones; la primera región comprende al amino terminal, que contiene cinco dominios LD conservados y homólogos. Los dominios LD son secuencias repetidas de ocho aminoácidos (Dawid, I., *et al* 1998), que interaccionan proteínas como vinculina, FAK, clatrina, actopaxina, etc. (Turner, C., and Miller, J., 1994) (Esquema 3). A la mitad del amino terminal paxilina contiene subdominios ricos en prolina, tirosina y glicina que interaccionan con los dominios SH3 y SH2 de CRK y CSK (miembros de la familia Src) (Tumbarello, D., *et al* 2002; Lamorte, L., *et al* 2003; Weng, Z., *et al* 1993). La segunda región, localizada en el carboxilo terminal de paxilina esta compuesta por cuatro dominios denominados LIM. Los sitios LIM2 y LIM3 de paxilina contienen residuos de treonina y serina, los cuales pueden ser fosforilados para permitir la interacción proteína- proteína. En conjunto las interacciones de paxilina con otras proteínas modulan la formación de los complejos de adhesión focal y la organización del citoesqueleto de actina permitiendo la adhesión a la matriz extracelular y la migración celular (Schmeichel, K., and Beckerle, M., 1994; Arber, S., and Caroni, P., 1996) (Esquema 3).

Proteínas que se unen a los diferentes dominios de paxilina

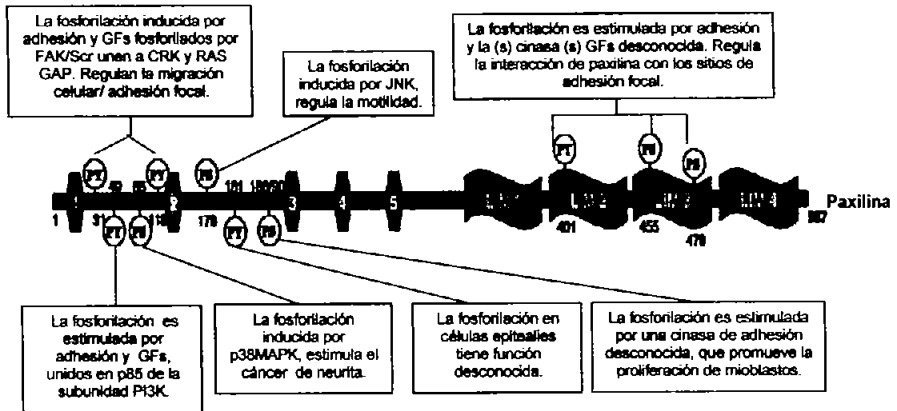


Esquema 3. Estructura de paxilina con sus dominios de unión y su interacción con proteínas que modulan su función (Brown, M., and Turner, C., 2004).

6.2. Función.

La función principal de paxilina es la integración y difusión de señales provenientes de integrinas o receptores a factores de crecimiento para contribuir en la regulación de la polimerización de citoesqueleto de actina, en la proliferación, la adhesión y la migración celular (Esquema 4) (Salvia, R., *et al* 1995; Brown, M., *et al* 1996; Mazaki, Y., *et al* 1997).

Fosforilación de paxilina y función



Esquema 4. La activación de paxilina dependiente de su estado de fosforilación regula fenómenos de adhesión, migración y proliferación celular (Brown, M., and Turner, C., 2004).

La funcionalidad de paxilina esta relacionada a su estado de fosforilación. La unión de integrinas a su ligando induce la distribución y fosforilación de paxilina en residuos de tirosina. FAK y Src fosforilan a paxilina sobre residuos los de tirosina 31 y 118, con el propósito de generar dominios SH2 funcionales que permitan la interacción con proteínas como CRK/CRKL (Birge, R., *et al* 1993; Salvia, R., *et al* 1995), p85/ PI3K, p120RASGAP (Tsubouchi, A., *et al* 2002) y con proteínas ensambladas a las integrinas como vinculina, talina, FAK, Src y CSK. En linfocitos Baf3 de ratón (Romanova, Y., *et al* 2004), en células MMI de hepatoma de rata (Iwasaki, T., *et al* 2002), y en células epiteliales NmuMG de ratón (Nakamura, K., *et al* 2000) se ha observado que la fosforilación de paxilina sobre residuos de tirosina 31 y 118, regula la polarización y motilidad de la célula. Adicionalmente, paxilina es fosforilada sobre residuos de serina en la posición 188/190, lo cual promueve el reclutamiento de paxilina a los complejos de adhesión focal (Woodrow, A., *et al* 2003; Bellis, S., *et al* 1997; De Nichilo, M., and Yamada, K., 1996).

La participación de paxilina en el proceso de metástasis se ha descrito en varios modelos. En un estudio con células de tumor de la vejiga NBTII se observó una disminución en la motilidad y en la interacción paxilina-CRK al sustituir en la paxilina residuos de tirosina por residuos de fenilalanina. Por lo que se concluyó que la fosforilación de paxilina sobre residuos de tirosina y la interacción de paxilina con las proteínas de los complejos de adhesión focal, es esencial para que se lleve a cabo la adhesión y migración celular (Petit, V., *et al* 2000).

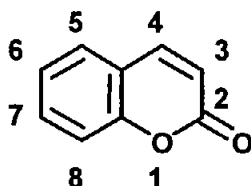
En células pequeñas de carcinoma pulmonar humano SCLC se ha correlacionado la agresividad de este tipo de cáncer y la generación metástasis con la disminución de la expresión de paxilina y del estado de fosforilación de residuos de tirosina (Jackson, J., and Young, M., 2003; Salgia, R., *et al* 1999). Sin embargo en cáncer renal (Jenq, W., *et al* 1996) y en cáncer de próstata (Tremblay, L., *et al* 1996) se ha observado que la regulación y el aumento en la fosforilación de paxilina sobre residuos de tirosina estimula el proceso de metástasis. Por otro lado se ha descrito que una disminución en los niveles de paxilina y un aumento en los niveles de p130CAS se asocian al proceso de metástasis en cáncer de mama (Scibelli, A., *et al* 2003).

Las evidencias aunque son contradictorias conservan una relación entre la expresión y la activación de paxilina. Es decir la agresividad del cáncer puede estar en función de esta correlación, lo cual probablemente se puede relacionar con la función de la célula en el tejido de específico (Liotta, L., and Petricoin, E., 2000).

7. Cumarinas.

7.1. Generalidades de cumarinas.

Las cumarinas son un grupo de compuestos pertenecientes a las benzopironas, que se encuentran como metabolitos de plantas como el haba de tonka, el clavo, el trébol dulce y en algunos aceites esenciales tal como el de lavanda (Nair, R., *et al* 1991). Las cumarinas presentan un benceno unido a un anillo heterocíclico de seis miembros, el cual contiene un átomo de oxígeno y cinco carbonos con hibridación sp^2 (α -pirona). La estructura de la cumarina, cuyo nombre químico es 1,2-benzopirona del ácido orto-hidroxifenil-propenoico se muestra en el esquema 5. Tiene un peso molecular de 146.15 g/mol, un punto de fusión de 68-70°C y un punto de ebullición de 303°C. Es soluble en etanol, cloroformo y aceites (O'Kennedy, R, and Thomes, D., 1997).

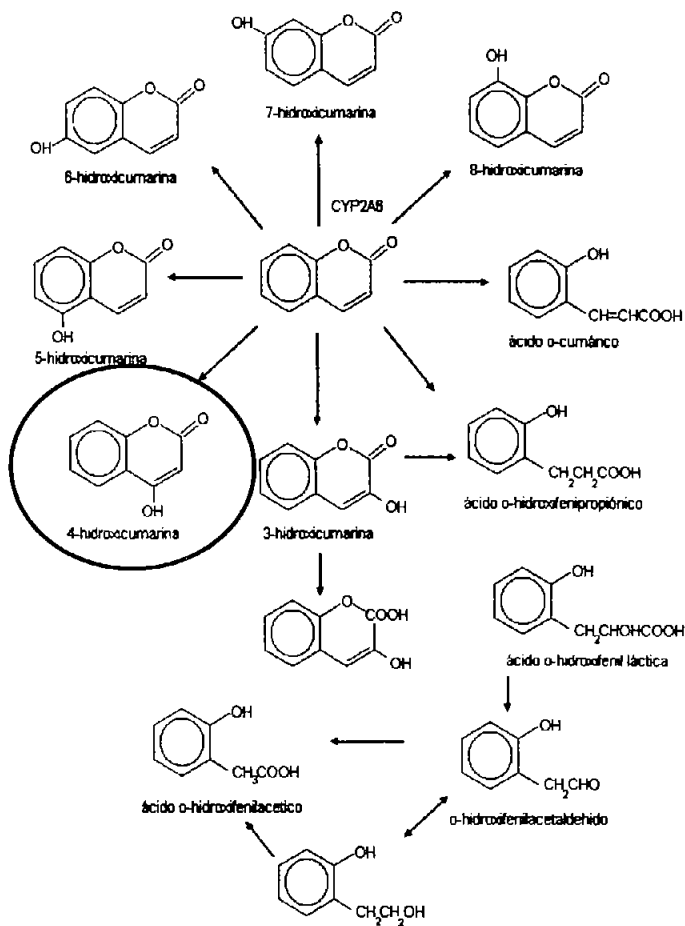


Esquema 5. Estructura química de la cumarina (1,2-benzopirona). Los números indican las posiciones en donde puede presentar sustituyentes.

7.2. Metabolismo.

La vida media biológica de la cumarina es de 1.2 horas si se administra por vía oral y de 0.8 horas cuando es administrada por vía intravenosa. Se oxida tanto *in vitro* como *in vivo* en todas las posiciones de la molécula generando monohidroxycumarinas (Ritschel, W., *et al* 1979; Ritschel, W., 1984). El anillo lactónico puede hidrolizarse para formar ácido o-hidroxifenilacético o ácido o-hidroxifeniláctico, los cuales se han descrito como productos de excreción (Lake, B., 1999). Estos productos pueden estar acetilados, metoxilados, conjugados o sufrir otro tipo de transformación.

Las principales vías metabólicas de la cumarina se ejemplifican en el esquema 6. La cumarina es metabolizada por el sistema del citocromo P450 (isoforma CYP2A6 en humano), produciendo derivados monohidroxilados. Los productos de biotransformación varían cuantitativamente dependiendo de la especie (Cohen, A., 1979; Hadidi, H., *et al* 1997). El principal producto de biotransformación en el humano es la 7-hidroxycumarina mientras que en rata es la 3-hidroxycumarina (Rautio, A., *et al* 1992; O'Kennedy, R., and Thomes, D., 1997). El metabolismo de la rata es semejante al del humano, ya que posee hidroxilasas hepáticas que forman derivados metabólicos hidroxilados. Estos metabolitos tienen una vida media consideradamente más larga, lo que hace pensar que la cumarina actúa como un profármaco. En rata se producen derivados mucho más tóxicos, de ácidos hidroxifenilcarbónicos. Se ha propuesto que algunos de los productos de biotransformación de la cumarina pueden tener actividad inmunoestimulante, antineoplásica y antimetastásica mayor que la cumarina (Moran, E., *et al* 1987; Jiménez, O., *et al* 1999).



Esquema 6. Vías metabólicas de la cumarina. Se muestran los metabolitos de la cumarina, en el círculo se muestra la estructura de la 4-hidroxicumarina (Fuente: Thomas, R., and O'Kennedy, R., 1997).

7.3 Actividad de cumarinas

Derivados cumarínicos con actividad anticoagulante, como la warfarina y el dicumarol comenzaron a utilizarse en el tratamiento de neoplasias para prevenir la formación de estroma de fibrina al rededor del tumor, lo cual esta relacionado con la producción de metástasis. Al respecto, se sabe que la warfarina en combinación con otros tratamientos, alarga al doble la sobreviviva de pacientes con carcinoma pulmonar (Zacharski, L., *et al* 1981). Sin embargo, el efecto antineoplásico de los derivados cumarínicos no se deben a sus propiedades anticoagulantes, ya que se ha observado que la administración de la vitamina K antagoniza la acción anticoagulante de la warfarina, pero no antagoniza el efecto antineoplásico.

Se ha encontrado que la cumarina posee activad antipirética y anti-inflamatoria por lo que se ha utilizado en el tratamiento de enfermedades reumáticas. Estimula la actividad fagocitaria de los macrófagos y de otras células del sistema inmune, por lo cual ha sido administrada en enfermedades crónicas como brucelosis, micoplasmosis y toxoplasmosis (Ozaki, Y., *et al* 1986). En algunos estudios la cumarina y sus derivados tienen acción antitumoral tanto *in vivo* como *in vitro*. La cumarina tiene actividad antineoplásica *in vivo* sobre melanomas malignos (Zänker, K., *et al* 1984), carcinoma renal metastático (Dexeus, F., *et al* 1990) y carcinoma prostático (Mohler, J., *et al* 1994). Estudios *in vitro* han observado que la cumarina y la 7-hidroxycumarina inhiben el crecimiento de varias líneas tumorales humanas (Marshall, M., *et al* 1994a; Myers, R., *et al* 1994; Kawajii, S., *et al* 2001).

La cumarina es considerablemente menos tóxica que la warfarina por lo cual puede ser administrada a dosis mayores sin presentar efectos teratogénicos (Cox, D., *et al* 1989). Estudios en humanos han demostrado la tolerancia de hasta 7g diarios de cumarina con efectos adversos de poca importancia que son reversibles al suspender el tratamiento (Marshall, M., *et al* 1994b; Marshall, M., *et al* 1991a).

Los mecanismos involucrados en los efectos antineoplásicos y antimetastásicos de la cumarina no se conocen. Para explicar sus acciones se han propuesto dos mecanismos principales que involucran:

- 1) La inhibición del crecimiento de algunas células tumorales;
- 2) La estimulación de ciertos componentes del sistema inmune que participen en la reacción contra el tumor.

Respecto a la reacción inmunoestimulante, se ha reportado que la cumarina tiene un efecto sinérgico *in vitro* con una endotoxina bacteriana estimulando la secreción de factores solubles (IL-1 β , IL-6). En la cepa de ratón C57BL/6 la cumarina, a dosis de 80mg/kg, incrementa la actividad fagocitaria de macrófagos peritoneales hasta en un 160% con respecto a los controles (Orozco, A., 2000).

En la inhibición del crecimiento de líneas celulares se involucran dos efectos que son: el arresto en la fase G1 del ciclo celular y la inducción de la apoptosis. El efecto citostático se ha observado que es provocado principalmente por la 7-hidroxycumarina, más que por la cumarina (López, G., *et al* 2004).

Se ha demostrado que la 7-hidroxicumarina (2mM) inhibe el crecimiento *in vitro* de células de la línea A549 de adenocarcinoma pulmonar humano. Se ha propuesto que la cumarina y la 7-hidroxicumarina pueden controlar el crecimiento de ciertos tumores a través de la regulación de la expresión de oncogenes, ya que estudios moleculares en fibroblastos murinos transfectados con los oncogenes *ras* y *myc* han mostrado que la 7-hidroxicumarina disminuye los niveles de RNA mensajero de dichos oncogenes relacionados con la proliferación celular (Seliger, B., and Pettersson, H., 1994; Khan, J., *et al* 1994).

7.4 Actividad de 4-hidroxicumarina.

Estudios con 4-hidroxicumarina han reportado que *in vitro*, la 4-hidroxicumarina induce alteraciones morfológicas en células B16 de melanoma murino, sin producir alteraciones en la línea celular no maligna de fibroblastos B82. Estos cambios morfológicos correlacionan con una desorganización del citoesqueleto de actina, debido a que el tratamiento con 4-hidroxicumarina disminuye el contenido de fibras de estrés, lamelipodios y filipodios. La 4-hidroxicumarina produce también una inhibición de la adhesión a moléculas de matriz extracelular (Velasco, V., *et al* 2003; Espinoza, O., 2002). Además se ha observado que disminuye la tasa de proliferación (Jiménez, O., 1998) y la fosforilación de proteínas de células B16 (Velasco, V., *et al* 2003). Actualmente el mecanismo por el cual la 4-hidroxicumarina produce los efectos reportados se desconoce. Los antecedentes sugieren que algunos de los productos de biotransformación de la cumarina pueden complementar terapias antineoplásicas.

Dado que la organización del citoesqueleto de actina y la adhesión controlan la migración celular, es posible que la 4-hidroxycumarina pueda alterar la capacidad de movimiento de células tumorales y resultar en la disminución o pérdida de la capacidad metastásica. Por lo tanto es importante analizar el efecto de la 4-hidroxycumarina sobre proteínas involucradas en la adhesión y migración celular, como paxilina.

II. Hipótesis.

Si la 4-hidroxicumarina disminuye la adhesión de células de melanoma murino B16 a moléculas de matriz extracelular y modifica la organización del citoesqueleto de actina, se espera que altere la migración de celular. Debido a que el acoplamiento de paxilina en las placas de adhesión focal es requerido para la adhesión y migración celular, se espera encontrar alteraciones en la función de paxilina.

III. Objetivos.

◆ Objetivo general

- El presente estudio analizará la participación de paxilina en la migración celular, en la reorganización del citoesqueleto de actina y en la adhesión celular de células B16 tratadas con 4-hidroxicumarina.

◆ Objetivos particulares

- Analizar el efecto de 4-hidroxicumarina sobre la migración de células de melanoma murino B16.
- Evaluar el efecto de 4-hidroxicumarina en la localización de paxilina.
- Evaluar el efecto de 4-hidroxicumarina en la expresión de paxilina.
- Evaluar el efecto de 4-hidroxicumarina sobre la fosforilación de paxilina sobre residuos de tirosinas.

IV. Material y Métodos

■ *Material biológico.*

Células de melanoma murino B16 y fibroblastos no malignos L929 (ATCC) se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco) y una mezcla de antibióticos (penicilina 5 mg/mL, estreptomycin 10 mg/mL y neomicina 10 mg/mL, Gibco) en cajas de cultivo de 80 cm² de área (Nunc). Se incubaron en una atmósfera de 5% de CO₂ y temperatura constante de 37 °C (Incubadora Nuair). Las células se cosecharon con Tripsina/EDTA (0.05%/0.5 mM, Gibco) y se contaron en un hematocitómetro (cámara de Neubauer) donde se evaluó paralelamente la viabilidad por exclusión de azul tripán. Para los ensayos se utilizaron cultivos con viabilidad mayor o igual al 95%.

■ *Tratamiento.*

Las células se expusieron a 4-hidroxicumarina (50, 160 o 500µM), cumarina (500µM), citocalasina D (5µM) o al vehículo de los tratamientos (etanol 0.75%), durante 24 horas. Como diluyente se utilizó medio RPMI condicionado (sin suero).

■ *Ensayo de migración aleatoria.*

Para observar el efecto de 4-hidroxicumarina sobre la migración celular. Se sembraron células B16 en placas de 6 pozos (Nunc) a una densidad de 300×10^3 células por pozo en medio RPMI-10% SFB. Se incubaron y dejaron adherir toda la noche para formar una monocapa. Antes de tratar las células, con ayuda de un gendarme se realizaron heridas (cortes) sobre la monocapa de células. Posteriormente se retiró el medio para quitar las células despegadas y se agregó el tratamiento. La placa se analizó y documentó fotográficamente a $t=0$ y después de 24 horas con microscópio invertido (TMSF, Nikon).

■ *Inmunofluorescencia.*

Para evaluar el efecto de 4-hidroxicumarina sobre la redistribución de paxilina en células B16 y L929. Se sembraron células a una densidad de 30×10^3 células por pozo en portaobjetos con pozos desmontables (Nunc) y se incubaron toda la noche. Posteriormente las células fueron sometidas al tratamiento; ya concluido, las células se fijaron durante 30 minutos a 37°C con formaldehído al 4% en (PBS) pH 7.4, permeabilizaron 5 minutos con Tritón X-100 (0.1 %) y bloquearon durante 1 hora a 37°C con una solución de albúmina al 3% en PBS. Finalizado el bloqueo, las células se incubaron durante 1 hora a 37°C con un anticuerpo policlonal anti-paxilina hecho en conejo (Santa Cruz Biotechnology, 1:200). Terminada la incubación con anti-paxilina, las células se lavaron con PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-conejo hecho en cabra conjugado con un fluorocromo (IgG, Alexa

546, Santa Cruz Biotechnology, 1:500) durante 1 hora a 37 °C. Al finalizar con la incubación las células se lavaron y prepararon con glicerol para ser observadas y documentadas fotográficamente con microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 600).

■ *ELISA en célula*

Se sembraron células con medio RPMI 10% SFB en placas estériles de 96 pozos (Nunc) a una densidad de 20×10^3 células por pozo y se incubaron toda la noche. Se realizó cada tratamiento por triplicado. Después del tratamiento, las células fueron fijadas con glutaraldehído al 1.1 % durante 30 minutos, permeabilizadas con Tritón X-100 (0.1 %), y bloqueadas con albúmina sérica bovina al 1% en buffer de carbonatos pH 9.6 durante toda la noche a 4 °C. Mediante la técnica inmunoenzimática ELISA en célula, se cuantificó la expresión de paxilina empleando un anticuerpo policlonal anti-paxilina hecho en conejo (Santa Cruz Biotechnology, 1:400). Este anticuerpo se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de la incubación, la placa se lavó con PBS/tween 20 (0.1%) e incubó con un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a una peroxidasa (PO) hecho en cabra (SIGMA, 1:10,000) durante 2 horas a temperatura ambiente. Como sustrato de la PO acoplada al anticuerpo, se agregó H_2O_2 , ortofenilendiamina (OPD), en amortiguador de citratos y fosfatos. La reacción enzimática se detuvo con H_2SO_4 , 2M y se leyó en un lector de microplacas (Biotek EL311) a una longitud de 490nm con un filtro de referencia de 630nm.

Como control del número de células conservadas durante el ELISA en célula, se realizó una cuantificación mediante una tinción con cristal violeta, que se basa en la afinidad del colorante a las proteínas celulares. Las células se fijaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con una solución 1.1 % de glutaraldehído en amortiguador salino de fosfatos (PBS). Después se añade una solución de cristal violeta 0.2% durante 30 minutos y al término del tiempo se realizan lavados extensivos con agua para eliminar el exceso de colorante. Finalmente el colorante se solubiliza en 10% de ácido acético y se cuantifica mediante un lector de microplacas (Biotek EL311) a una longitud de onda de 595 nm; siendo la absorbancia una medida proporcional de las células en el pozo. El análisis estadístico se realizó comparando las células tratadas contra su respectivo control utilizando la prueba de Dunnett, con un límite de significancia de $P < 0.05$.

■ *Inmunoprecipitación y Western Blot*

Células B16 se sembraron con medio RPMI 10 % SFB a una densidad de 2×10^6 células por caja petri estéril (Nunc) y se incubaron toda la noche. Las células fueron sometidas al tratamiento con 4-hidroxycumarina o etanol al 0.75%. Posteriormente se lisaron con 800 μ L de amortiguador de lisis frío (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 1%, NP-40, 1 mM DTT, 5 % glicerol, 5 mM de EDTA, 1 mM de fluoruro de fenil-metil-sulfonilo (PMSF), 1 mM o-vanadato, 1 μ g/ mL de pepstatina A, leupeptina y aprotinina y 10 mM NaF). El lisado se incubó en hielo 5 minutos y centrifugó durante 12 minutos a 13 000 rpm. Del volumen total del lisado,

se tomarón 50µL para ser separados en un gel de acrilamida al 12 % en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Para la inmunoprecipitación, los lisados anteriores se incubaron durante 3 horas a 4 °C en agitación constante con un anticuerpo policlonal anti-paxilina hecho en conejo (Santa Cruz Biotechnology), que previamente hablan sido unidos a las perlas de proteína A - agarosa. Al término de la incubación, las perlas se lavaron 3 veces con amortiguador salino de lavado (amortiguador de lisis 1:10, inhibidores de proteasas y fosfatasas 1X) y se prepararon para ser separados por electroforesis vertical en gel de acrilamida al 12 % en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Después de la separación se realizó la transferencia a una membrana de PVF en cámara húmeda.

La membrana se bloqueó 1 hora con albúmina (1%), en agitación constante. Después se incubó 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante con los anticuerpos primarios (1/1000): anti-paxilina hecho en conejo (policlonal, Santa Cruz Biotechnology), anti-β tubulina hecho en ratón (SIGMA) o anti-fosfotirosina hecho en ratón (clona PY20, Santa Cruz Biotechnology) diluidos en TBS-Tween 20 (0.05%). Posteriormente se lavó la membrana, y se incubó con los correspondientes anticuerpos secundarios (1:10,000) conjugados con peroxidasa por una hora a temperatura ambiente. Para la detección de la señal por quimioluminiscencia, las membranas se revelaron con el kit Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se documentaron los resultados por exposición de la membrana a placas de autoradiografía (Kodak).

V. Resultados.

ENSAYO DE MIGRACIÓN ALEATORIA.

La figura 1 muestra el efecto de 4-hidroxicumarina sobre la migración de células de melanoma murino B16. En la microfotografía se puede ver que a tiempo cero las células están separadas entre sí por una herida. En el control se observó como las células migraron para cerrar la herida después de 24 horas. Mientras que en el control positivo células tratadas con citocalasina D no migraron debido a la polimerización del citoesqueleto de actina. Por otro lado se puede observar que la inhibición de la migración fué dependiente de la concentración de 4-hidroxicumarina. Conforme aumentó la concentración, la migración de las células disminuyó comparándola con el control (etanol 0.75%).

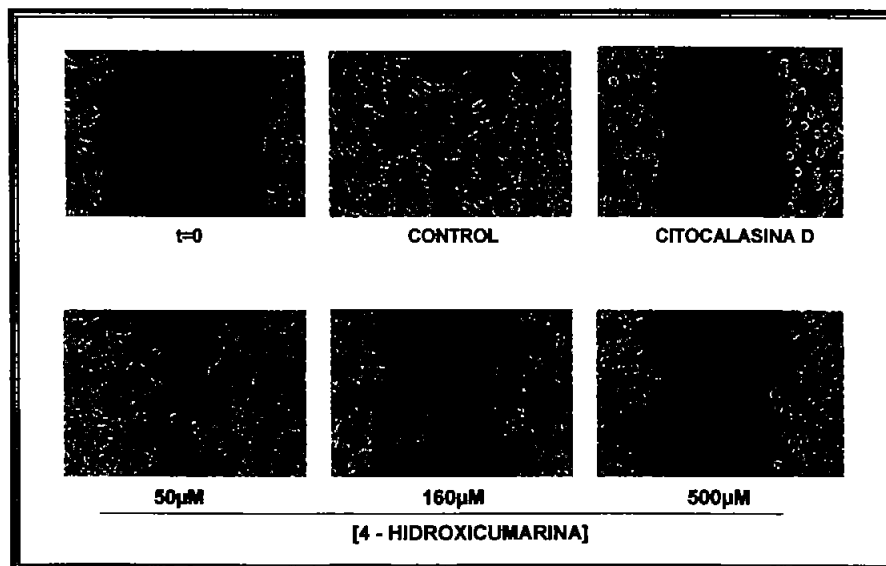


Figura 1. La 4-hidroxicumarina inhibió la migración de células de melanoma murino B16.

INMUNOLocalIZACIÓN DE PAXILINA

Para observar la distribución de paxilina en células de melanoma murino B16 se utilizó la técnica de inmunofluorescencia. Las microfotografías de la figura 2 muestran que células B16 tratadas con 4-hidroxicumarina (50, 160 o 500 μ M) presentaron una distribución de paxilina diferente a la de células control (etanol 0.75%) y a las de células tratadas cumarina (500 μ M). Se observó que de forma dependiente a la concentración de 4-hidroxicumarina, paxilina no se distribuyó hacia las placas de adhesión focal si no que se relocalizó en la periferie del núcleo, mientras que con cumarina 500 μ M no se presentó efecto alguno.

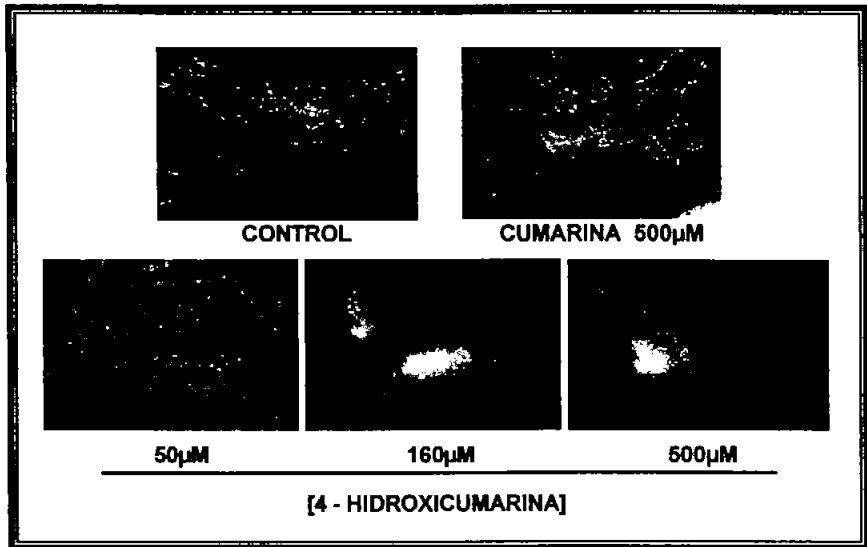


Figura 2. La 4-hidroxicumarina impidió la distribución de paxilina hacia las placas de adhesión focal. El tratamiento con cumarina (500 μ M) no tuvo efecto.

Para analizar si el efecto de 4-hidroxicumarina sobre la distribución de paxilina era exclusivo de células de melanoma murino B16, se realizó inmunofluorescencia sobre fibroblastos L929 (células no malignas) tratados con 4-hidroxicumarina 500 μ M o etanol al 0.75%. En las microfotografías de la figura 3 se puede ver que la 4-hidroxicumarina 500 μ M no tuvo efecto sobre la distribución de paxilina con respecto al control.

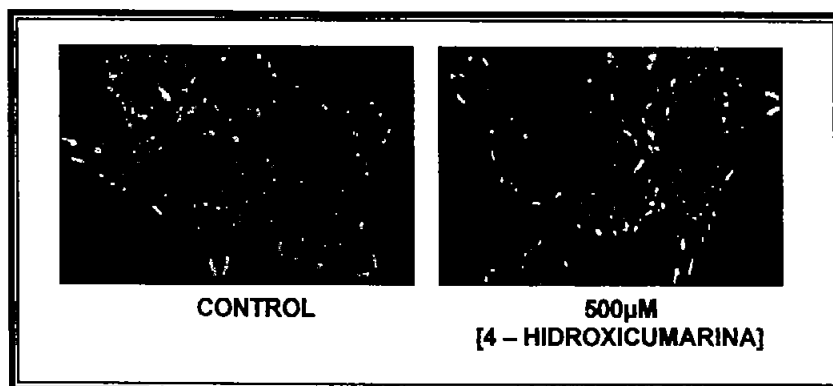


Figura 3. Efecto de la 4-hidroxicumarina sobre la distribución de paxilina en fibroblastos L929. Las microfotografías muestran que el tratamiento la 4-hidroxicumarina (500 μ M) por 24h, no modificó la distribución de paxilina con respecto al control (etanol 0.75%).

EXPRESIÓN DE PAXILINA

Para determinar si el tratamiento con 4-hidroxicumarina disminuye la expresión de paxilina se realizó un ELISA en célula. La gráfica de la figura 4-A muestra que la expresión de paxilina disminuyó de forma dependiente a la concentración de 4-hidroxicumarina. En la concentración 500 μ M se observa que la expresión de paxilina disminuyó significativamente hasta un 50%. Para descartar la posibilidad de que el efecto observado de 4-hidroxicumarina sobre la expresión de paxilina, se debiera a la disminución del número de células tratadas, se realizó una tinción con cristal violeta. En la figura 4-B se puede observar que el número de células conservadas durante el ELISA en célula no varía de forma significativa.

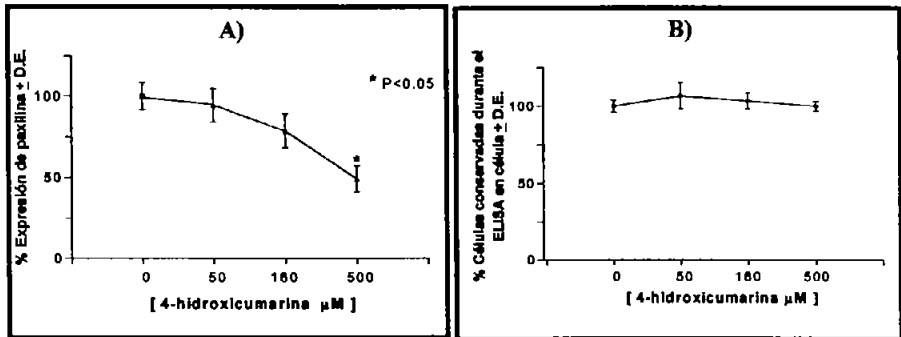


Figura 4. Efecto de la 4-hidroxicumarina sobre la expresión de paxilina en células de melanoma murino B16. A) El tratamiento con 4-hidroxicumarina (50, 160 o 500 μ M) por 24h, disminuyó la expresión de paxilina con respecto al control (etanol 0.75%). Solo la concentración de 500 μ M disminuyó la expresión de forma significativa (n=8) (P<0.05, Dunnett). B) La disminución de la expresión de paxilina no se debió a cambio en el número de células.

El western blot de la figura 5 muestra que la disminución de la expresión de paxilina inducida por el tratamiento con 4-hidroxicumarina, principalmente se lleva a cabo sobre la isoforma β . En el western blot se utilizó como control de carga β tubulina., por lo tanto la figura 5 muestra que en los cuatro carriles se tiene la misma cantidad de proteína total.

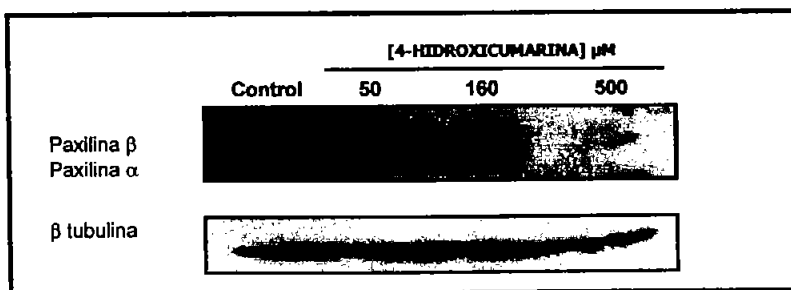


Figura 5. Efecto de la 4-hidroxicumarina sobre la expresión de paxilina en células de melanoma murino B16. El Western blot anti- paxilina de lisados totales de células B16 tratadas con la 4-hidroxicumarina (50, 160 o 500 μ M) por 24h, se encontró que la expresión de las dos isoformas de paxilina se encuentran disminuidas con respecto al control. Como control de carga se utilizó β tubulina.

Para comprobar que el efecto de 4-hidroxicumarina es selectivo a células de melanoma B16, se realizó un ELISA en célula con fibroblastos L929 tratados con etanol 0.75% o 4-hidroxicumarina (50,160 o 500 μ M). La gráfica de la figura 6-A indica que la expresión de paxilina no se modificó de forma significativa en los diferentes tratamientos. A través de la tinción de cristal violeta se determinó que el número de células se conservaron durante el ensayo (datos no mostrados). Por otro lado con el western blot de la figura 6-B se pudo confirmar que la expresión de paxilina en fibroblastos L929 no se modificó con el tratamiento de 4-hidroxicumarina 500 μ M, en donde como control de carga de proteína total se utilizó β tubulina.

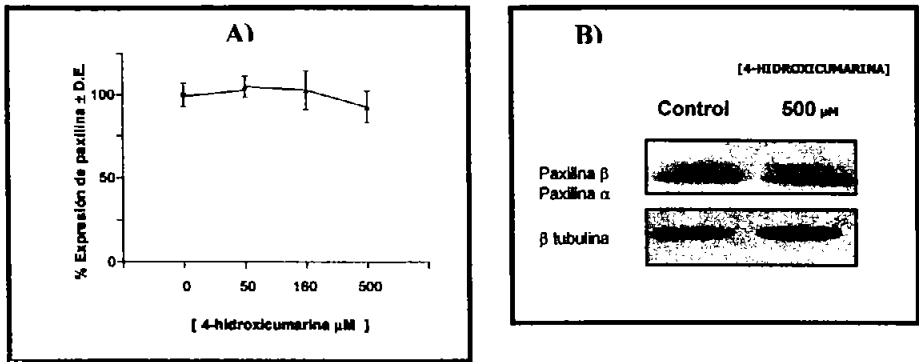


Figura 6. Efecto de 4-hidroxicumarina sobre la expresión de paxilina en fibroblastos L929. A) El tratamiento con 4-hidroxicumarina (50, 160 o 500µM) por 24h, no disminuyó de forma significativa la expresión de paxilina con respecto al control (0.75% etanol). B) El western blot anti-paxilina muestra que no se modificó la expresión de las dos isoformas de paxilina por el tratamiento con 4-hidroxicumarina 500µM.

ACTIVACIÓN DE PAXILINA

Para evaluar el efecto de 4-hidroxicumarina sobre la activación de paxilina en células de melanoma murino B16, se inmunoprecipitó paxilina con anti-paxilina hecho en conejo, a partir de lisados totales de células tratadas con etanol al 0.075% o 4-hidroxicumarina 500µM por 24h.

En la figura 7-A se muestra la inmunodetección del estado de activación de paxilina, a través de la fosforilación de residuos en tirosina con anti-py20. Se analizó si el efecto sobre la activación de paxilina se debió a la disminución de la expresión o al decremento de la activación. En los carriles en donde se colocaron volúmenes

iguales y la mitad del inmunoprecipitado se observó una menor activación de paxilina.

Después de haber detectado el estado de activación de paxilina, se corroboró el efecto observado sobre la expresión en células tratadas con 4-hidroxicumarina 500 μ M (Figura 7-B).

En el Western blot de la figura 7-A se observa que la fosforilación de paxilina de células tratadas con 4-hidroxicumarina 500 μ M es menor en las dos isoformas de paxilina con respecto al control, a pesar de haber colocado la mitad del control.

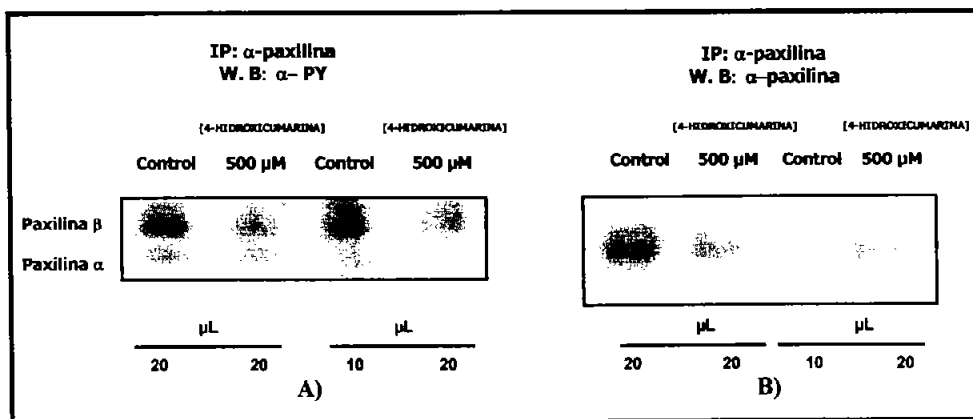


Figura 7. Efecto de la 4-hidroxicumarina sobre la activación de paxilina en células de melanoma murino B16. La 4-hidroxicumarina 500 μ M disminuyó la fosforilación paxilina sobre residuos de tirosina (A) y su expresión (B).

VI. Discusión.

En el proceso de invasión y metástasis las células requieren transformaciones adicionales que alteren la adhesión y migración. Una de las transformaciones que impide la formación de contactos célula-célula y modifica la migración, es la reorganización del citoesqueleto de actina (Bernal, S., *et al* 1983). Dada la importancia de los procesos adhesivos en la generación de metástasis, la identificación de alteraciones en la expresión y/o funcionalidad de moléculas que regulan la adhesión y migración celular en neoplasias puede ser importante para el pronóstico y generación de nuevas terapias (Ruoslahti, E., and Giancotti, F., 1989).

Nuestros resultados muestran que la 4-hidroxicumarina inhibe la migración celular de forma dependiente a la concentración. Este efecto correlaciona con la desorganización del citoesqueleto de actina y con la disminución de la adhesión, reportado previamente (Velasco, V., *et al* 1999), dado que tanto el rearrreglo del citoesqueleto de actina como la adhesión están involucrados en la regulación de la migración celular (Alberts, B., *et al* 1994). La 7-hidroxicumarina, el principal metabolito de la cumarina en el hombre, también afecta la motilidad de células cancerosas; Lü, Q., *et al* reportaron que la 7-hidroxicumarina inhibe la migración de células de adenocarcinoma mamario de rata (RBA) (Lü, Q., 1996), en geles de colágena. Al disminuir la capacidad de migración, la 4-hidroxicumarina podría afectar las siguientes etapas del proceso de metástasis: (i) intravasación, (ii) extravasación, y (iii) migración en el tejido conectivo.

En el proceso de migración celular las integrinas reclutan una serie de proteínas citoplasmáticas, para formar los complejos de adhesión focal y reorganizar el citoesqueleto de actina (Clark, E., and Brugge, J., 1995; Burridge, K., and

Chrzanowska, W., 1996). En la progresión del cáncer se ha observado que existen cambios en la expresión y/o funcionalidad tanto de receptores de adhesión, como de proteínas intracelulares que regulan la señalización mediada por integrinas (Velasco, V., *et al* 1999). Paxilina es una proteína que interacciona, en los sitios de adhesión focal, con receptores de adhesión como las integrinas, con proteínas como vinculina y con el citoesqueleto de actina (Brown, M., and Turner, C., 2004; Turner, C., 2000). En fibroblastos normales, se requiere de la redistribución de paxilina, FAK y talina, y de la reorganización del citoesqueleto de actina para una migración eficiente (Sieg, J., *et al* 1999). De manera similar, la distribución de paxilina hacia los sitios de adhesión focal, como su fosforilación en residuos de tirosina (31 y 118), regulan la polimerización del citoesqueleto de actina y la motilidad en diferentes estirpes celulares (Romanova, Y., *et al* 2004; Iwasaki, T., *et al* 2002; Nakamura, K., *et al* 2001). Por lo tanto, cambios en la activación y expresión de paxilina están relacionados con cambios en la morfología, la adhesión y la migración celular (Mazaki, Y., *et al* 1997, Turner, C., 2000; Brown, M., and Turner, C., 2004).

En el caso de las células cancerosas, se ha descrito que el estado de fosforilación de paxilina es importante para la migración y la formación de metástasis. En células de tumor de la vejiga NBTII se demostró que la fosforilación de paxilina en tirosinas y su distribución a los complejos de adhesión focal, es esencial tanto para la adhesión celular como para la migración (Petit, V., *et al* 2000). El aumento en la fosforilación de paxilina sobre residuos de tirosina incrementa el proceso de metástasis en cáncer renal (Jenq, W., *et al* 1996) y en cáncer de próstata (Tremblay, L., *et al* 1996).

Sin embargo, en células de cáncer de pulmón una disminución de la expresión del paxilina y en su estado de fosforilación en residuos de tirosina se ha

correlacionado con la generación metástasis (Jackson, J., and Young, M., 2003; Salgia, R., *et al* 1999). También se ha descrito que en cáncer de pecho (Scibelli, A., *et al* 2003) la disminución de los niveles de paxilina y el aumento en los niveles de p130CAS se asocia al proceso de metástasis. Estas diferencias pueden deberse a que dependiendo la estirpe y función de cada tipo de célula, las isoformas de paxilina se expresan en distinta proporción (Mazaki, Y., *et al* 1997). Aunque en tejidos normales la expresión de la isoforma β es muy baja, durante el proceso de transformación las células pueden modificar su expresión y activación (Mazaki, Y., *et al* 1998). La isoforma β de paxilina al participar en la regulación del proceso de migración (Mazaki, Y., *et al* 1998) se ve involucrada en el proceso de metástasis.

En células B16, 4-hidroxicumarina disminuye la expresión de las dos isoformas de paxilina, aunque el efecto sobre la isoforma β es de mayor magnitud. La disminución en la expresión y activación de paxilina producida por la 4-hidroxicumarina podría ser responsable de que está no se distribuya eficientemente a los complejos de adhesión focal. Al generarse complejos de adhesión focal que no tienen todos sus componentes activos, estos complejos no son funcionales y se impide una adecuada adhesión y migración.

El mecanismo por el cual la 4-hidroxicumarina disminuye la expresión de paxilina y su fosforilación se desconoce. Sin embargo, se sabe que la exposición de células cancerosas a cumarina o 7-hidroxicumarina provoca disminuciones en la síntesis de RNA y proteínas (Marshall, M., *et al* 1994a). Por otro lado se ha observado que el tratamiento *in vitro* con cumarina modifica la expresión genes, por ejemplo en células de melanoma murino B16 disminuye la expresión de ICAM-1 (Molina, G., *et al* 1997), mientras que en células mononucleadas humanas

incrementa la expresión de los antígenos DQ y DR del complejo principal de histocompatibilidad (Marshall, M., *et al* 1991b). Dado que otros compuestos cumarínicos son inhibidores de cinasas, el mecanismo involucrado en los efectos de la 4-hidroxicumarina podría incluir la inhibición de cinasas. Dafnetina (6,7-dihidroxicumarina) produce una inhibición competitiva con el ATP del receptor a EGF, PKC y PKA (Yang, B., 1999). La 7- hidroxicumarina inhibe la cinasa de cadenas ligeras de miosina (MLCK), mientras el ácido robustico, otro derivado de la cumarina, es un inhibidor selectivo de PKA (Wang, H., 1999). Aún cuando 4-hidroxicumarina no modifica significativamente la actividad de esas enzimas (Yang, B., 1999; Wang, H., 1999), no debe descartarse la posibilidad de que pueda inhibir otras cinasas, como FAK o Src, que son responsables de la fosforilación de paxilina. Otras posibles explicaciones son que la 4-hidroxicumarina altere la expresión de algunas cinasas, o que modifique la actividad de fosfatasa. Actualmente no tenemos evidencia que soporte ninguna de estas posibilidades, por lo que se requieren estudios posteriores.

El mecanismo por el cual la 4-hidroxicumarina genera los efectos descritos también podría involucrar cambios en la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y, por lo tanto, en el estado redox de la célula. Las ERO son moléculas que pueden regular vías de señalización y participar en procesos fisiológicos en el organismo (Chiarugi, P., 2003). En el melanoma los niveles EROS como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), se elevan por diversos mecanismos (Sander, C., *et al* 2003), entre los que se incluye la disminución del potencial antioxidante (Meyskens, L., *et al* 2001). Se ha observado que el aumento de ERO promueve la invasión (Miura, Y., *et al* 2003; Nagao, N., *et al* 2000; Richard, D., *et al* 2002) y la metástasis *in vivo* (Brown, S., AND Bicknell, R.,

2001; Kundu, N., *et al* 1995). En un estudio *in vitro* con células de melanoma se observó que ERO promueve la migración celular y que dicho efecto puede inhibirse con el antioxidantes (Cheng, C., *et al* 2004). La 4-hidroxicumarina disminuye los niveles de H₂O₂ en células B16 (Aguirre, A., 2004); esto puede deberse a que la 4-hidroxicumarina, al igual que otros compuestos relacionados como 3-hidroxicumarina o esculetina, presenta propiedades antioxidantes (Bailly, F., *et al* 2004).

El hecho de que la 4-hidroxicumarina no altere la localización ni la expresión de paxilina en fibroblastos L929, sugiere que los efectos de este compuesto pudieran ser selectivos sobre células cancerosas. Esto favorecería el eventual uso de la 4-hidroxicumarina como terapia adyuvante para el cáncer. Actualmente las terapias antineoplásicas se enfocan en matar células tumorales y muchos de los tratamientos tienen efectos adversos sobre células normales, por lo que es importante encontrar tratamientos con menores efectos no deseados como el Taxol, y el Cisplatino.

VII. Conclusiones.

- El tratamiento con la 4-hidroxicumarina disminuye la migración de células de melanoma murino B16, de forma dependiente a la concentración.

- La 4-hidroxicumarina (500 μ M) impide la redistribución de paxilina hacia las placas de adhesión focal en células B16, pero no en células no malignas como los fibroblastos L929. El tratamiento con cumarina (500 μ M) no presenta efecto.

- La expresión y la activación de paxilina disminuye con el tratamiento de 4-hidroxicumarina 500 μ M.

- El efecto de 4-hidroxicumarina sobre paxilina, explica parcialmente el mecanismo por el que este compuesto desorganiza el citoesqueleto de actina y disminuye la migración celular.

VIII. Bibliografía.

- Aguirre, A., (2004). Efecto de cumarina 4-sustituidas sobre la adhesión de células de melanoma murino B16 a moléculas de matriz extracelular. México, D.F. Facultad de química, UNAM. 60p. Tesis de licenciatura.
- Alberts, B., Dennis, B., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J., (1994). *Molecular Biology of the cell*. Garland Publishing Inc. U. S. A. Cap 23-24
- Arber, S., and Caroni, P., (1996). Specificity of single LIM motifs in targeting and LIM/LIM interactions in situ. *Genes Dev.* 10: 289–300.
- Armitage, P., and Doll, R., (1954). The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. *Br. J. Cancer.* 8: 1-15.
- Bailly, F., Cédric, M., Teissier, E., Vezina, H., and Cotellet, P., (2004). Antioxidant properties of 3-hydroxycoumarin derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 12: 5611–5618.
- Bernal, S., Baylin, S., Shaper, J., Gazdar, A., and Chen, L., (1983). Cytoskeleton-associated proteins of human lung cancer cells. *Cancer Res.* 43: 1798-808.
- Bellis, S., Perrotta, J., Curtis, M., and Turner, C., (1997). Adhesion of fibroblasts to fibronectin stimulates both serine and tyrosine phosphorylation of paxillin. *Biochem J.* 325: 375–381.
- Birge, R., Fajardo, J., Reichman, C., Shoelson, S., Songyang, Z., Cantley, L., and Hanafusa, H., (1993). Identification and characterization of a high-

affinity interaction between v-Crk and tyrosine-phosphorylated paxillin in CT10-transformed fibroblasts. *Mol. Cell Biol.* 13: 4648–4656.

- Brown, M., and Turner, C., (2004). Paxillin: Adapting to Change. *Physiol Rev.* 84: 1315–1339.
- Brown, M., Perrotta, J., and Turner, C., (1996). Identification of LIM3 as the principal determinant of paxillin focal adhesion localization and characterization of a novel motif on paxillin directing vinculin and focal adhesion kinase binding. *J. Cell Biol.* 135: 1109–1123.
- Brown, S., and Bicknell, R., (2001). Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 3: 323–327.
- Burridge, K. and Chrzanowska, W., (1996). Focal adhesion, contractility and signaling. *Ann Rev. Cell Dev. Biol.* 12: 463-519.
- Chambers, F., Naumov, G., Vantyghem, S., and Tuck, A., (2000). Molecular biology of breast cancer metastasis. Clinical implications of experimental studies on metastatic inefficiency. *Breast Cancer Res.* 2: 400-407.
- Cheng, C., Schulze, P., Lee, T., Sylvan, J., Zetter, B., and Huang, H., (2004). Oxidative stress and thioredoxin-interacting protein promote intravasation of melanoma cells. *Experimental Cell Research.* 300: 297–307.
- Chiarugi, P., (2003). Reactive oxygen species as mediators of cell adhesion. *Italian Journal of Biochemistry.* 52(1): 31-35.
- Clark, E., and Brugge, J., (1995). Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science.* 268: 233-9.

- Cohen, A., (1979). Critical review of the toxicology of coumarin with special referente to interspecies differences in metabolism and hepatotoxic response and their significance to man. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 17(3): 277-289.
- Cohen, S., and Ellwein, L., (1991). Errores genéticos, proliferación celular y carcinogénesis. *Cancer Research.* 51: 6493-6505.
- Colville, P., (1997). Grow Factors in Angiogenesis: Current interest and therapeutic potential. *Molecular Medicine Today.* 14: 23-26.
- Condeelis, J., (2001) How is actin polimerización in vivo?. *Trenes in Cell Biology.* 11: 288-293.
- Cox, D., O'Kennedy, R., and Thornes, R., (1989).The rarity of liver toxicity in patients treated with coumarin (1, 2-Benzopyrone). *Human Toxicol.* 8: 501-506.
- Dawid, I., Breen, J., and Toyama, R., (1998). LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *Trenes Genet.* 14: 156-162.
- De Nichilo, M., and Yamada, K., (1996). Integrin alpha v beta 5-dependent serine phosphorylation of paxillin in cultured human macrophages adherent to vitronectin. *J. Biol. Chem.* 271: 11016-11022.
- Dexeus, F., Logothetis, C., Sella, A., Fitz, K., Amato, R., Reuben, J., and Dossier, N., (1990). Phase II study of coumarin and cemetidine in patients with metastasic renal carcinoma. *Journal of clinical Oncol.* 8:325-329.
- Espinoza, O., (2002). Efecto de la 4-hidroxicumarina sobre la organización del citoesqueleto de actina en células de melanoma murino B16. México, D.F. Facultad de química, UNAM. 47p. Tesis de licenciatura.

- Franks, L., (1998). Introduction to the cellular and Molecular Biology of Cancer, 3rd. Edition. London. Oxford University Press.
- Garibay, M., (1998). Importancia de las integrinas en el proceso metastático. México, D.F. Facultad de química, UNAM. 56p. Tesis de Licenciatura.
- Hadidi, H., Salseen, K., Idle, J., and Cholerton, S., (1997). Single amino acid substitution (Leu160His) in cytochrome P450 CYP2A6 causes switching from 7-hydroxylation to 3-hydroxylation of coumarone. Food and chemical Toxicol. 35: 903-907.
- Hynes, R., (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell. 69: 11-25.
- Iwasawa, A., Nieminen, P., Lehtinen, M., and Paavonen, J., (1996). Human Papillomavirus DNA in Uterine Cervix Squamous Cell Carcinoma and Adenocarcinoma Deletec by Polymerase Chain Reaction. Cancer. 77 (11): 2275-2279.
- Iwasaki, T., Nakata, A., Mukai, M., Shinkai, K., Yano, H., Sabe, H., Schaefer, E., Tatsuta, M., Tsujimura, T., Terada, N., Kakishita, E., and Acedo, H., (2002). Involvement of phosphorylation of tyr-31 and tyr-118 of paxillin in MMI cancer cell migration. Int. J. Cancer. 97: 330-335.
- Jackson, J., and Young, M., (2003). Protein phosphatase-2A regulates protein tyrosine phosphatase activity in Lewis lung carcinoma tumor variants. Clin. Exp. Metastasis. 20: 357-364.
- Jenq, W., Cooper, D., and Ramirez, G., (1996). Integrin expression on cell adhesion function and up-regulation of P125FAK and paxillin in metastatic renal carcinoma cells. Connect Tissue Res. 34: 161-174.

- Jiménez, O., Molina, G., Mendoza, P., León, C., Flores, P., and Mandoki, J., (1999). Cytostatic activity of coumarin metabolitos and derivates in the B16-F10 murine melanoma cell line. *Melanoma Research*. 9: 243-247.
- Jiménez, O., (1998). Efecto de compuestos cumarínicos en el crecimiento de la línea celular del melanoma murino B16 F10-5AB1. México, D.F. Facultad de química, UNAM. 33p. Tesis de Maestría.
- Jiménez, O., (2003). 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 de humano. Facultad de Medicina. UNAM. 55p. Tesis de Doctorado.
- Kahn, J., Preis, P., Waldman, F., and Tseng, A., (1994). Coumarin modulates the cell cycle progression of an MTV-EJras cell line. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 120(Suppl): S19-22.
- Kawai, S., Tomono, Y., Ogawa, K., Sugiura, M., Yano, M., Yoshizawa, Y., Ito, C., and Furukawa, H., (2001). Anti-proliferative effect of coumarins on several cancer cell lines. *Anticancer Res.* 21: 917-23.
- Khan, S., Rogers, M., Obando, J., and Tamsen, A., (1994). Estrogen Receptor Expression of Benign Breast Epithelium and Its Association with Breast Cancer. *Cancer Research*. 15 (54): 993-997.
- Kundu, N., Zhang, S., and Fulton, M., (1995). Sublethal oxidative stress inhibits tumor cell adhesion and enhances experimental metastasis of murine mammary carcinoma. *Clin. Exp. Metastasis* 13: 16–22.
- LaFiamme, S., and Auer, K., (1996). Integrin signaling. *Sem. Cancer Biol.* 7: 111-118.

- Lake, B., (1999). Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity relevance for human risk assessment. *Food Chem. Toxicol.* 37:423-453.
- Lamorte, L., Rodrigues, S., Sangwan, V., Turner, C., and Park, M., (2003). CRK Associates with a multimolecular paxillin/GIT2/ β -PIX complex and promotes Rac-dependent relocalization of paxillin to focal contacts. *Molecular Biology of the cell.* 14: 2818-2831.
- Liotta, L., Kleinerman, J., and Saitel, G., (1974). Quantitative relationships of intravascular tumor cell: tumor vessels and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res.* 34: 997-1003.
- Liotta, L., (1986). Tumor invasion and metastases-role of the extracellular matrix. *Cancer Res.* 46: 1-7
- Liotta, L., and Petricoin, E., (2000). Molecular profiling of human cancer. *Nat Rev Genet.* 1: 48-56.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J., (2000). *Molecular Biology*, 4th. Edition. Scientific American Books. USA. 1033-1174.
- López, G., Prado, G., Aguilar, C., Molina, G., Morales, F., and Mandoki, J., (2004). Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxycoumarin on human lung carcinoma cell lines. *Lung Cancer.* 43: 275-283.
- Lü, Q., Niggemann, B., and Zänker, S., (1996). 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.

- Marshall, M., Butler, K., and Fried, A., (1991a). Phase I evaluation of coumarin (1, 2-benzopyrone) and cimetidine in patients with advanced malignancies. *Mol Biother.* 3: 170-178.
- Marshall, M., Rhoades, J., Mattingly, C., and Jennings, C., (1991b) Coumarin (1,2-benzopyrone) enhances DR and DQ antigen expressions by peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Mol Biother.* 3: 204-206.
- Marshall, M., Kervin, K., Umerani, A., Albainy-Jenei, J., Zhao, Q., and Khazaeli, M., (1994a). Growth-inhibitory effects of coumarin (1, 2-benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin on human malignant cell lines in vitro. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 120 (Suppl): S3—S10.
- Marshall, M., Mohler, J., Edmonds, K., Williams, B., Butler, K., Ryles, M., Weiss, L., Urban, D., Bueschen, A., and Markiewicz, M., (1994b). An updated review of the clinical development of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin. *J Cancer Res Clin Oncol.* 120 Suppl: S39-42.
- Mazaki, Y., Hashimoto, S., and Sabe, H., (1997). Monocyte cells and cancer cells express novel paxillin isoforms with different binding properties to focal adhesion proteins. *J. Biol. Chem.* 272: 7437–7444.
- Mazaki, Y., Hiroshi, U., Okio, H., and Shigeru, H., (1998). Paxillin Isoform in Mouse. *J. Biol. Chem.* 273: 22435-22441.
- Meyskens, L., McNulty, E., Buckmeier, A., Tohidian, B., Spillane, T., Kahlon, R., and Gonzalez, R., (2001). Aberrant redox regulation in human metastatic melanoma cells compared to normal melanocytes *Free Radic. Biol. Med.* 31: 799-808.
- Miura, Y., Kozuki, Y., and Yagasaki, K., (2003). Potentiation of invasive activity of hepatoma cells by reactive oxygen species is mediated by

autocrine/paracrine loop of hepatocyte growth factor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305:160-165.

- Mohler, J., Williams, B., Thompson, I., and Marshall, M., (1994) Coumarin (1, 2-benzopyrone) for the treatment of prostatic carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 120 (suppl): S35-S38
- Molina, G., Velasco, V., García, M., Jiménez, F., Mendoza, N., and Lascurain, R., (1997). Expresión de moléculas de adhesión en el melanoma metastásico murino B16-F10 y su modificación farmacológica con el empleo de cumarina. *Rev Inst Natl Enf Resp Mex.* 10: 92-99.
- Moran, E., O'Kennedy, R., and Thorne, R., (1987). Análisis of coumarin and its urinary metabolitos by high-performance liquid chromatography *Journal of Chromatography.* 416: 165-169.
- Myers, R., Parker, M., and Grizzle, W., (1994). The effects of coumarin and suramin on the growth of malignant renal and prostatic cell lines. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 120(Suppl): S11-S13.
- Nair, R., Fisher, P., Safe, H., Cortez, C., Harvey, G., and Di Giovanni, J., (1991). Novel coumarins as potencial anticarcinogenic agents. *Carcinogénesis.* 12: 65-69.
- Nagao, N., Nakayama, T., Etoh, T., Saiki, I., and Miwa, N., (2000). Tumor invasion is inhibited by phosphorylated ascorbate via enrichment of intracellular vitamin C and decreasing of oxidative stress. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 126: 511-518.
- Nakamura, K., Yano, H., Schaefer, E., and Sabe, H., (2001). Different modes and qualities of tyrosine phosphorylation of fak and Pyk2 during epithelial-mesenchymal transdifferentiation and cell migration: analysis of

- specific phosphorylation events using site-direct antibodies. *Oncogene*. 20: 2626-2635.
- Narod, S., Lynch, H., Lynch, J., Conway, T., Watson, P., Feunteun, J., Lenoir, G., and Fitzgibbons, R., (1994). Hereditary breast cancer and family cancer syndromes. *World J Surg*. 18(1):21-31
 - O'Kennedy, R., and Thomes, D., (1997). Coumarins, Biology, Application and Model of action. Ed. John Wiley and Sons. Cap. 2 y 3.
 - Ozaki, Y., Niwa, Y., and Ohashi, T., (1986). A comparative study on the effects of inhibitors of the lipoxygenase pathway on neutrophil function. Inhibitory effects on neutrophil function may not be attributed to inhibition of the lipoxygenase pathway. *Biochem. Pharmacol.* 35: 3481-3488.
 - Orozco, A., (2000). Estudio in vivo del efecto antineoplásico de la cumarina en un modelo de melanoma murino. México, D. F. Facultad de Química. UNAM. 120p. Tesis de Licenciatura.
 - Pawlak, G., and Helfman, M., (2001). Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. *Current opinión in Genetics and development*. 11: 41-47.
 - Petit, V., Boyer, B., Lentz, D., Turner, C., Thiery, J., and Valles, A., (2000). Phosphorylation of tyrosine residues 31 and 118 on paxillin regulates cell migration through an association with CRK in NBT-II cells. *J. Cell Biol.* 148: 957-970.
 - Rautio, A., Kraul, H., Kojo, A., Salmela, E., and Pelkonen, O., (1992). Inerindividual variability of coumarin 7-hydroxylation in healthy volunteer. *Pharmacogenetics* 2. 227-233.

- Richard, D., Hollender, P., and Chenais, B., (2002). Involvement of reactive oxygen species in aclarubicin-induced differentiation and invasiveness of HL-60 leukemia cells. *Int. J. Oncol.* 21: 393-399.
- Ritschel, W., Brady, E., and Tan, I., (1979). First-pass effect of coumarin in man. *Int. J. Clin Pharmacol. Biopharm.* 17: 99-103.
- Ritschel, W., (1984). Therapeutic concentration of coumarin and predicted dosage regimens. *Drug Res.* 34: 907-910.
- Robbins, S., (1995). *Patología estructural y funcional. Capítulo VI (Trastornos de la Inmunidad) y Capítulo VII (Neoplasia). 5ª Edición.*
- Romanova, Y., Hashimoto, S., Chay, O., Blagosklonny, V., Sabe, H., and Mushinski, F., (2004). Phosphorylation of paxillin tyrosines 31 and 118 controls polarization and motility of lymphoid cell and in PMA-sensitive. *Journal of Cell Science.* 117 (17): 3759-3769.
- Rozengurt, E., (1995). Convergent signalling in the action of integrins, neuropeptides, growth factors and oncogenes. *Cancer Surv.* 24: 81-96.
- Ruddon, W., (1995). *Cancer Biology, 3ª Edición.*
- Ruoslahti, E., and Giancotti, F., (1989). Integrins and tumor cell dissemination. *Cancer Cells.* 1(4): 119-126.
- Sander, C., Hamm, F., Elsner, J., and Thiele, J., (2003) Thiele, Oxidative stress in malignant melanoma and non-melanoma skin cancer. *Br. J. Dermatol.* 148: 913-922.
- Salgia, R., Li, L., Ewaniuk, S., Wang, B., Sattler, M., Chen, C., Richards W, Pisick, E., Shapiro, G., Rollins, B., Chen, L., Griffin, J., and Sugarbaker, D., (1999). Expression of the focal adhesion protein paxillin in lung cancer and its relation to cell motility. *Oncogene.* 18: 67-77.

- Salmerón, C., Franco, M., Salazar, M., y Lazcano, P., (1997). Panorama epidemiológico de la mortalidad por cáncer en el Instituto Mexicano del Seguro Social: 1991-1995. *Salud pública de México*. 39: 1-8.
- Salvia, R., Uemura, N., Okuda, K., Pisick, E., Sattler, M., Druker, B., Heisterkamp, N., Chen, L., Groffen, J., and Griffin, J., (1996). CRKL links p210BCR/ABL with paxillin in chronic myelogenous leukemia cells. *J. Biol. Chem.* 270: 29145–29150.
- Schaller, M., (2001). Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene*. 20: 6459–6472.
- Schaller, M., (2004). FAK and Paxillin: regulators of N-cadherin adhesion and inhibitors of cell migration?. *Journal of Cell Biology*. 166: 157-159
- Schaller, M., Otey, C., Hildebrand, J., and Parsons, J., (1995). Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. *Journal of Cell Biol.* 130: 1181-1187.
- Schlaepfer, D., Hauck, C., and Sieg, D., (1999). Signaling through focal adhesion kinase. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 71: 435-478.
- Schmeichel, K., and Beckerle, M., (1994). The LIM domain is a modular protein-binding interface. *Cell*. 79: 211–219.
- Scibelli, A., d'Angelo, D., Pelagalli, A., Tafuri, S., Avallone, L., Della Morte, R., and Staiano, N., (2003). Expression levels of the focal adhesion associated proteins paxillin and p130CAS in canine and feline mammary tumors. *Vet. Res.* 34: 193–202.

- Seliger, B., and Pettersson, H., (1994). 7-hydroxycoumarin inhibits oncogene-induced transformation of murine fibroblasts. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 120(Suppl): S23-S27.
- Sieg, J., Hauck, R., and Schlaepfer, D., (1999). Required role focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *Journal of cell science.* 112: 2677-2691.
- Teramoto, B., Sarker, A., Tonoyama, Y., Yoshino, T., Hayashi, K., Takahashi, K., and Akagi, T., (1996). Epstein-Barr virus infection in the neoplastic and nonneoplastic cells of lymphoid malignancies. *Cancer.* 77 (11): 2339-2347.
- Thomes, R., and O'Kennedy, R., (1997). Coumarins. *Biology, applications and medo of action.* John Wiley and sons. 67-142.
- Tremblay, L., Hauck, W., Aprikian, A., Begin, L., Chapdelaine, A., and Chevalier, S., (1996). Focal adhesion kinase (pp125FAK) expression, activation and association with paxillin and p50CSK in human metastatic prostate carcinoma. *Int. J. Cancer.* 68: 164-171.
- Tsubouchi, A., Sakakura, J., Yagi, R., Mazaki, Y., Schaefer, E., Yano, H., and Sabe, H., (2002). Localized suppression of RhoA activity by Tyr31/ 118-phosphorylated paxillin in cell adhesion and migration. *J. Cell Biol.* 159: 673-683.
- Tumbarello, D., Brown, M., and Turner, C., (2002). The paxillin LD motifs. *FEBS Lett.* 513: 114-118.
- Turner, C., (1994). Paxillin: a cytoeskeletal target for tyrosin kinases. *BioEssays.* 16: 47-52.

- Turner, C., and Miller, J., (1994). Primary sequence of paxillin contains putative SH2 and SH3 domain binding motifs and multiple LIM domains: identification of a vinculin and pp125Fak-binding region. *J. Cell Sci.* 107: 1583-1591.
- Turner, C., (2000). Paxillin and focal adhesion signalling. *Nature Cell Biology.* 2: 231-236.
- Velasco, V., Agramonte, H., Barrera, O., Jiménez, O., Mendoza, P., Mandoki, J., Garcia, M., and Landa, A., (2003). 4-hidroxicoumrin disorganizes the actin cytoskeleton in B160-F10 melanoma cells but not in B82 fibroblasts, decreasing their adhesión to extracellular matriz proteins and motility. *Cancer Letters.* 198: 179-186.
- Velasco, V., Molina, G., Mendoza, P., Lopez, G., y Mandoki, J., (1999). Integrinas y moléculas asociadas a integrinas: blancos para el desarrollo de terapias antimetastásicas. *Rev. Invest. Clin.* 51: 183-193.
- Weiss, L., (1990). Metastatic inefficiency. *Adv. Cancer Res.* 54: 159-211.
- Weng, Z., Taylor, J., Turner, C., Brugge, J., and Seidel-Dugan, C., (1993). Detection of Src homology 3-binding proteins, including paxillin, in normal and v-Src-transformed Balb/c 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 268: 14956-14963.
- Wolf, C., (1990). Metabolic factors in cancer susceptibility. *Cancer Surv.* 9(3): 438-466.
- Woodrow, A., Woods, D., Cherwinski, H., Stokoe, D., and McMahon, M., (2003). Ras-induced serine phosphorylation of the focal adhesion protein paxillin is mediated by the Raf->MEK->ERK pathway. *Experimental Cell Research.* 287: 325-338.

- Yamada, K., and Miyamoto, S., (1995). Integrin transmembrane signal and cytoskeletal control. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:681-689
- Yang, B., Zhao, Y., Zhang, K., and Mack, P., (1999) Daphnetin, one of coumarin derivatives, is a protein kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun.* 260: 682-685.
- Wang, H., Ternai, B., and Polya, G., (1999). Specific inhibition of cyclic AMP-dependent protein kinase by warangalone and robustic acid. *Phytochemistry.* 44: 787-796.
- Zacharski, L., Henderson, W., Rickles, F., Forman, W., Forcier, J., Edwards, R., Headley, E., Kim, S., O'Donnell, J., O'Dell, R., Tornoyos, K., and Kwaan, H., (1981). Effect of warfarin on survival in small cell carcinoma of the lung. Veterans Administration Study No. 75. *JAMA.* 245 (8): 831-835.
- Zänker, K., Blümel, G., Lange, S., and Siewert, J., (1984). Coumarin in melanoma patients: an experimental and clinical study. *Drugs Exptl. Clin. Res.* 11: 767-774.
- <http://www.ssa.gob.mx> (Fuente: INEGI, 2002)

Apéndice.

■ Medio RPMI 1640

En un vaso de precipitado colocar 800mL de agua desionizada, agregar 2.0g de NaHCO_3 y agitar. Posteriormente agregar un sobre de medio RPMI 1640 (Contenido en mg/L: 400 KCl, 48.84 MgSO_4 , 6000 NaCl, 800 Na_2HPO_4 , 2000 Glucosa, 1 Glutacion, 5 Rojo de fenol, 200 L-arginina, 50 L-aspargina, 20 L-acido aspartatico, 65 L-cistina, 20 L-acido glutámico, 300 L-glutamina, 10 L-glicina, 15 L-histidina, 20 L-hidroxiprolina, 50 L-isoleucina, 50 L-leucina, 40 L-lisina, 15 L-metionina, 15 L-fenilalanina, 20 L-prolina, 30 L-serina, 20 L-treonina, 5 L-triptofano, 29 L-tirosina, 20 L-valina, 0.2 Biotina, 1 ácido fólico, 35 Inositol, 1 niacinamida, 1 ácido para-aminobenzoico, 0.005 Vitamina B_{12} , 0.2 Rivoftavina y 1 tiamina), agitar hasta disolver y ajustar pH (7.4). Aforar en un matraz aforado y esterilizar a través de filtración.

■ PBS 10X

En un vaso de precipitado disolver 21.29g de Na_2HPO_4 anhidro y 87.60g de NaCl con 800mL de agua desionizada. Por separado en un vaso de precipitado disolver 2.07g de NaHPO_4 anhidro y 8.76g de NaCl con 100mL de agua desionizada. Finalmente mezclar las dos soluciones, ajustar el pH (7.4) y llevar a un volumen final de 1100mL.

- TBS 1X

En un vaso de precipitado disolver 8g de NaCl, 0.2g KCl y 3g de Tris-base con 800mL de agua desionizada. Ajustar el pH (7.4) y llevar a un volumen final de 1000mL.

- Buffer de Carbonatos.

Para preparar 200mL de buffer de carbonatos mezclar 586mg de NaHCO_3 , 3.18mg de Na_2CO_3 y 4mg de azida de sodio, y ajustar el pH (9.6).