



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“EVALUACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO* DE LA EXPRESIÓN DE
ICAM-1 EN CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16-F10
TRATADAS CON DAFNETINA”

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA
ROSA ANGÉLICA FERNÁNDEZ RAMÍREZ



MÉXICO, D. F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente:	Prof. Alicia Beatriz Cervantes Peredo
Vocal:	Prof. Constantino III Roberto López Macías
Secretario:	Prof. Fausto Alejandro Jiménez Orozco
Primer suplente:	Prof. Patricia Elvira Berrón Ruiz
Segundo suplente:	Prof. León Patricio Martínez Castilla

Sitio donde se realizó el tema:
LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA CELULAR
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

Asesor del tema
Dr. FAUSTO ALEJANDRO JIMÉNEZ OROZCO

Supervisora técnica
Biól. GISELA MARTÍNEZ GARCÍA

Sustentante
ROSA ANGÉLICA FERNÁNDEZ RAMÍREZ

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi mamá y papá por todos sus cuidados, consejos pero sobre todo por hacer de mí una mejor persona, gracias por apoyarme en mis proyectos y brindarme la confianza que me permitió lograrlos. A mi malvada hermana gemela por estar siempre apoyándome en todo momento.

Agradezco a mis tíos y abuelos por su apoyo a lo largo de mi carrera y en la elaboración de la tesis. Por las palabras de aliento cuando no veía fin.

Agradezco a mi otra familia, mis amigos que conocí en la universidad y los que llevan toda la vida conmigo, por hacer de la universidad una gran experiencia y por estar siempre conmigo apoyándome.

Te agradezco todo lo que me has enseñado Valladares, por compartir todo este tiempo conmigo, apoyarme en todo y cambiar mi percepción de muchas cosas, sin ti todo este tiempo no hubiera sido igual.

Gracias al Dr. Alejandro, Juanolita, Amelia, Estelita y al departamento de farmacología por darme la oportunidad de pertenecer al proyecto y por hacer más ameno el trabajo. Gracias a todos con los que compartí servicio social y tesis, estuvimos muchas horas trabajando juntos y apoyándonos, y lo mejor fue que nos hicimos amigos.

Muchas gracias a los laboratorios del Dr. Zarain, Dr. Arzate y de la Biól. Gisela Martínez por prestarme material y equipo para poder trabajar en mi proyecto.

Agradezco el financiamiento otorgado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con el número IN209010.

Finalmente agradezco a la UNAM por esta gran oportunidad de formarme como persona y profesionista.

ÍNDICE

Página

1. INTRODUCCIÓN	
1.1 CUMARINAS Y CÁNCER	1
1.2 DAFNETINA E INFLAMACIÓN	3
1.3 PROCESO DE CARCINOGENÉISIS	5
1.3.1 CÉLULAS PLURIPOTENCIALES Y CÁNCER	6
1.3.2 CAMBIOS EPIGENÉTICOS EN EL CÁNCER	7
1.3.2.1 METILACIÓN DEL DNA	8
1.3.2.2. REORDENAMIENTO Y MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE HISTONAS	8
1.3.2.3 miRNA	9
1.3 INFLAMACIÓN Y CÁNCER	10
1.4 PROTEÍNA ICAM-1	16
1.5.1 PAPEL ANTIMETASTÁSICO DE ICAM-1	17
1.5.2 PAPEL DE ICAM-1 COMO FACILITADOR DE METÁSTASIS	18
1.5.3 REGULACIÓN DE ICAM-1	20
2. JUSTIFICACIÓN	22
2.1 HIPÓTESIS	23
2.2 OBJETIVOS GENERALES	23
2.2.1 OBJETIVOS PARTICULARES	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1 REACTIVOS Y MEDIOS	24
3.2 LÍNEA CELULAR	24
3.3 MEDIO Y CONDICIONES DE CULTIVO	25
3.4 ENSAYOS <i>IN VITRO</i>	25
3.5 ENSAYOS <i>IN VIVO</i>	25

3.6 EXTRACCIÓN DE RNA	26
3.7 PRUEBAS ESTADÍSTICAS	27
4. ESTANDARIZACIÓN	28
4.1 DETERMINACIÓN DEL GEN DE REFERENCIA	30
4.2 DETERMINACIÓN DEL RANGO DINÁMICO DE LA REACCIÓN	31
4.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CEBADOR	34
5. RESULTADOS	
5.1 EXPRESIÓN IN VITRO DE ICAM-1 EN CÉLULAS DEL MELANOMA MURINO B16-F10	35
5.2 EXPRESIÓN DE ICAM-1 EN RATONES NO TRATADOS	36
5.3 EXPRESIÓN DE ICAM-1 EN RATONES TRATADOS CON DAFNETINA	37
6. DISCUSIÓN	38
7. CONCLUSIONES	42
REFERENCIAS	43

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura de la dafnetina.	3
Figura 2. Fotografía de tumores de los ratones C57BL/6	5
Figura 3. Participación de la inflamación crónica en el proceso de carcinogénesis	15
Figura 4. ICAM-1	16
Figura 5. Esquema representativo de los activadores de la expresión de <i>ICAM-1</i>	21
Figura 6. Fases que se observan durante la graficación de los valores de fluorescencia obtenidas durante diferentes ciclos de amplificación en la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real	28

ÍNDICE DE GRÁFICAS

	Página
Gráfica 1. Determinación del volumen de reacción	29
Gráfica 2. Gráficas obtenidas de los genes evaluados mediante el programa Corbett Rotor-Gene TM 6000	31
Gráfica 3. Determinación del rango dinámico de la reacción	32
Gráfica 4. Variación de la Δ Ct de <i>ICAM-1</i> con respecto a los genes <i>UBC</i> y <i>GAPDH</i>	33
Gráfica 5. Expresión relativa de <i>ICAM-1</i> y <i>EIF4A2</i> con respecto a <i>GAPDH</i> .	35

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Tipos de cáncer relacionados con la inflamación	11
Tabla 2. Secuencia de los cebadores de ICAM-1 utilizados	24
Tabla 3. Las condiciones de corrida para el PCR en tiempo real	25
Tabla 4. Genes evaluados para determinar el gen de referencia que se utilizará en ensayos subsecuentes.	30
Tabla 5. Determinación de Δ Ct de ICAM-1 con respecto a GAPDH y UBC	32
Tabla 6. Evaluación de la concentración de cebador en la reacción con respecto al Ct obtenido.	34
Tabla 7. Expresión relativa de ICAM-1 en tumores extraídos de ratones de la cepa C57BL/6 inoculados con células de melanoma murino B16-F10.	36
Tabla 8. Expresión relativa de ICAM-1 en tumores extraídos de ratones de la cepa C57BL/6 tratados con dafnetina e inoculados con células de melanoma murino B16-F10.	37

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CUMARINAS Y CÁNCER

Los efectos y toxicidad de la cumarina han sido estudiados por su amplia distribución en la naturaleza y su consumo en humanos. La cumarina es utilizada como agente fijador y potenciador de aroma en los perfumes, se utiliza en la elaboración de jabones, detergentes, pasta de dientes, tabaco, en algunas bebidas alcohólicas (Cohen, 1979; Opdyke, 1974), así como para neutralizar aromas desagradables en plásticos y pinturas (Fentem y Fry, 1993). El consumo de cumarina en humanos, por alimentos y exposición a cosméticos es aproximadamente de 0.06 mg/kg/día (Lake, 1999).

El efecto antitumoral de la cumarina se observó a partir de estudios clínicos en humanos de carcinoma renal (Marshall *et al*, 1987; Dexeus *et al*, 1990; Kokron *et al*, 1991), cáncer prostático (Marshall *et al*, 1991; Mohler *et al*, 1992), así como en la recurrencia del melanoma maligno (Zänker *et al*, 1984; Marshall *et al*, 1989; Mohler *et al*, 1992; Thornes *et al*, 1982, 1983, 1994).

La cumarina tiene una vida media corta (1–1.5 h) y el 75% de ésta es biotransformada a 7-hidroxycumarina (7-OHC) (Shilling *et al*, 1969) por lo que se había sugerido que la cumarina era pro-fármaco y que la 7-OHC es la forma activa de la molécula (Cohen, 1979; Egan *et al*, 1990).

Por su interés en la clínica, los primeros trabajos se enfocaron en el estudio de las acciones directas de cumarina y de 7-OHC en la inhibición de la proliferación de distintas líneas celulares de tumor (Marshall *et al*, 1994).

Posteriormente se reportó que la 7-OHC inhibe, con mayor magnitud que la cumarina, la proliferación de diferentes tipos de líneas tumorales en una relación dependiente de la concentración (Weber *et al*, 1998; Jiménez-Orozco *et al*, 1999 y

2001; López-González *et al*, 2004). Pese a que se emplearon distintos tiempos de exposición, en concentraciones milimolares, las inhibiciones fueron consistentes desde las 24 horas de exposición.

También se realizaron estudios de “estructura-actividad” con otros derivados cumarínicos a concentraciones en rangos micromolares y a tiempos de exposición más prolongados. En estas condiciones la actividad citostática de la cumarina y de los derivados cumarínicos monosustituídos no se observan, pero la actividad de cumarinas bisustituídas es evidente (Kolodziej *et al*, 1997; Finn *et al*, 2001, 2002; Kawaii *et al*, 2001; Kawase *et al*, 2003). La adición de grupos hidroxilo tanto en los átomos 6 y 7, como en los átomos 7 y 8 del anillo bencénico incrementa la actividad antiproliferativa de la molécula. De esta manera la 6,7-dihidroxicumarina (esculetina) y la 7,8-dihidroxicumarina (dafnetina) se han reportado como las cumarinas simples más activas (Kawase *et al*, 2003).

Las líneas de leucemia y de fibrosarcoma son más sensibles a la esculetina que las líneas de origen epitelial y los hepatocitos (Hofmanova *et al*, 2002). Este compuesto no inhibe la proliferación de las células de melanoma humano SK-MEL-31, ni la de las células renales de túbulo proximal HK-2 (Finn *et al*, 2001, 2002). En contraste, la dafnetina inhibe, con mayor magnitud que la esculetina, la proliferación de las células tumorales de distintos tipos, sin causar daño al genoma (Finn *et al*, 2002).

En células del adenocarcinoma humano de riñón A-498, se ha descrito que a concentraciones bajas, la dafnetina activa a la proteína P38 e induce la diferenciación, produciendo arrestos en la fase S del ciclo celular. En contraste, a concentraciones altas y exposición prolongada, este compuesto inhibe la fosforilación de las cinasas 1 y 2 para receptores extracelulares (ERK1 y ERK2) y produce sólo un pequeño arresto en la fase G1 (Finn *et al*, 2004).

A diferencia de los agentes antitumorales convencionales que producen resistencia múltiple a fármacos (MDR por sus siglas en inglés), la dafnetina no es sustrato para la glicoproteína P. Por todas estas características se ha propuesto que puede ser un agente coadyuvante promisorio en la quimioterapia (Finn *et al*, 2004).

A diferencia de otras cumarinas, la dafnetina inhibe la actividad cinasa de varias proteínas (Yang *et al*, 1999), no tiene actividad estrogénica y potencia el efecto de tamoxifeno (Román-Rosales, 2007).

Aunque la warfarina, acenocumarol y dicumarol son anticoagulantes orales ampliamente utilizados en la clínica, la dafnetina carece de dicha actividad. Recientemente se ha reportado que la dafnetina es un quelante de hierro (Mu *et al*, 2002) por lo que se han realizado estudios para evaluar su eficacia en el tratamiento de la malaria (Wang *et al*, 2004).

1.2 DAFNETINA E INFLAMACIÓN

La dafnetina es un metabolito secundario que se encuentra en varias plantas de la familia Thymelaeaceae (*Daphne odora*, *Daphne gnidium* L, *Daphne oleoides*, *Stellera chamaejasme*) empleadas en la medicina popular para el tratamiento de dolor reumático y como antipirético (Yesilada *et al*, 2001; De Rosa *et al*, 2002; Su *et al*, 2003; Liu *et al*, 2004; Zhang *et al*, 2005).

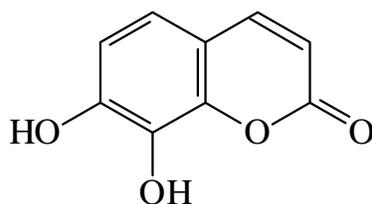


Figura 1. Estructura de la dafnetina.

Además de propiedades antioxidantes (Fylaktakidou *et al*, 2004), la dafnetina produce efectos antiinflamatorios que se explican a través de diferentes mecanismos. Por una parte disminuye la actividad de lipooxigenasas y ciclooxigenasas y en consecuencia inhibe las vías del ácido araquidónico (Kimura *et al*, 1985; Hoult y Payá, 1996). Por otra parte, *in vitro* se ha observado que disminuye la biosíntesis tanto de factor de necrosis tumoral (TNF-) como de interleucina 1 (IL-1) (Yesilada *et al*, 2001). Recientemente estas acciones de la dafnetina, así como su efecto antiinflamatorio, fueron corroborados en un modelo *in vivo* de artritis reumatoide de ratas (Gao *et al*, 2008).

Actualmente, en la medicina tradicional china existen tabletas con el nombre de Zushima-Pian, que contienen extractos de plantas del género *Daphne* estandarizados con 1% de dafnetina (registrados en el Ministerio de Salud Pública de China) utilizadas para el tratamiento de artritis reumatoide. Sin embargo, en la literatura disponible no se especifica el peso de la tableta ni el contenido de extracto por lo que desconocemos las dosis empleada en humanos (Gao *et al*, 2008).

Recientemente se ha evaluado *in vivo* el efecto antitumoral de la dafnetina en un modelo de ratón: los tumores fueron inducidos inoculando 10^5 células del melanoma murino B16-F10 en forma subcutánea en el dorso de ratones de la cepa C57BL/6. Los tumores son visibles a la tercera semana después de la inoculación y los ratones mueren aproximadamente después de la sexta semana. Los ratones tratados con dafnetina tienen un mayor tiempo de supervivencia, y a diferencia de los ratones control, no se observaron procesos inflamatorios en sus tumores (Figura 2) (Villegas, 2007). Se desconocen los genes que participan en estas respuestas.



a) TESTIGO



b) DAFNETINA 20 mg/kg

Figura 2. Fotografía de tumores de los ratones C57BL/6. a) Ratón de un grupo testigo. b) Ratón de un grupo tratado con dafnetina.

Los efectos antiproliferativos y pro-apoptóticos de la dafnetina reportadas *in vitro* están en un rango de 250 y 500 μM . Aunque desconocemos las concentraciones plasmáticas de dafnetina, en el presente trabajo sólo se probaron concentraciones bajas de dafnetina (10, 20 y 40 μM) ya que estas condiciones son semejantes a las que se observarían *in vivo*.

1.3 PROCESO DE CARCINOGENESIS

Las células malignizadas poseen las siguientes características: autosuficiencia en factores de crecimiento, insensibilidad a factores que inhiben el crecimiento, evasión de apoptosis, potencial ilimitado de replicación, angiogénesis sostenida, invasión a tejidos y metástasis (Hanahan y Weinberg, 2000). Al menos tres importantes clases de genes juegan un papel clave en la iniciación tumoral: proto-oncogenes, genes supresores de tumores y genes que participan en la reparación del DNA. Mutaciones, amplificaciones o supresiones en estos genes producen anomalías en los procesos que regulan la proliferación y diferenciación celular, lo que conduce a la malignización (Lodish *et al*, 1999). Tradicionalmente el proceso de carcinogénesis se ha dividido en las siguientes fases:

- 1) **Iniciación.** En esta fase los agentes carcinogénicos o inductores (patógenos, rayos UV, rayos X, productos químicos o sus metabolitos, etc.) dañan al DNA y producen mutaciones (Coussens y Werb, 2002; Anisimov et al, 2007).
- 2) **Promoción.** Durante esta fase señales químicas como hormonas, factores de crecimiento, ésteres de forbol, etc., estimulan la proliferación celular. Estas moléculas, conocidas como promotores, no interactúan directamente con el DNA pero favorecen la supervivencia de células mutadas y dan lugar a una acumulación paulatina de otras mutaciones (Abel y DiGiovanni, 2008).
- 3) **Progresión.** En esta fase, como resultado de la acumulación de mutaciones, las células hiperplásicas adquieren la capacidad de invadir tejidos adyacentes o producir metástasis. Es decir, se transforman de tumores benignos a tumores malignos (Anisimov et al, 2007; Abel y DiGiovanni, 2008).

Sin embargo, esta propuesta por sí sola no explica la gran cantidad de mutaciones y anormalidades cromosómicas que se han observado en tumores incipientes (Loeb *et al*, 2003). La inestabilidad cromosómica resulta de la pérdida o ganancia de segmentos mayores de DNA y además puede dar lugar a la aneuploidía, que es el desbalance en el número de cromosomas (Lengauer *et al*, 1998; Michor *et al*, 2005). Aunque este proceso aún no se ha esclarecido suficientemente para explicar la iniciación tumoral, se ha propuesto que la desregulación en la expresión génica se debe a la combinación tanto de mutaciones como de cambios en la regulación epigenética, así como la participación de las células pluripotenciales o *stem cells*.

1.3.1 CÉLULAS PLURIPOTENCIALES Y CÁNCER

A lo largo de la vida del organismo, las **células pluripotenciales** poseen la capacidad de autorrenovación gracias a las señales producidas por el microambiente del nicho donde se encuentran (Tysnes y Bjerkvig, 2007). A

medida que se duplican, salen del nicho y empiezan a diferenciarse para reconstituir los tejidos correspondientes (Spradling *et al*, 2001).

En los procesos inflamatorios o de reparación de tejido se propicia un microambiente favorable para la migración del tejido epitelial, degradación de matriz extracelular, supervivencia, proliferación e invasión de células neoplásicas (Pollard, 2004). En estos procesos las células pluripotenciales pueden fusionarse con células mutadas, lo que desregula la mitosis y puede favorecer anomalías cromosómicas o aneuploidía durante las divisiones posteriores de las células. De esta forma, la aneuploidía por fusión de células pluripotenciales puede favorecer el proceso de iniciación (Reya *et al*, 2001).

También se puede transferir DNA de una célula mutada a una célula normal mediante la fagocitosis de cuerpos apoptóticos. Este nuevo material genético puede llevar a la reprogramación celular y al origen de una nueva célula tumoral (Tysnes y Bjerkvig, 2007). Se ha reportado que los cuerpos apoptóticos de las células tumorales pueden generar fibroblastos deficientes de *P53*, lo cual sugiere que este mecanismo contribuye a la progresión tumoral (Bergsmedh *et al*, 2001).

1.3.2 CAMBIOS EPIGENÉTICOS EN EL CÁNCER

La epigenética se ha definido como los estudios del cambio heredable en la expresión de los genes y organización de la cromatina, sin implicar cambios en la secuencia del DNA. Los cambios en la expresión génica se pueden llevar a cabo a través de los siguientes mecanismos: metilación del DNA, reordenamiento y modificaciones postraduccionales de histonas e interferencia con micro RNA (miRNA).

1.3.2.1 METILACIÓN DEL DNA

La metilación en las citosinas en dinucleótidos CpG modifica la expresión génica y a lo largo de la carcinogénesis ocurren cambios en los patrones de metilación que desregulan dicha expresión (Sawan *et al*, 2008). Por una parte, en forma general se observa una disminución en la metilación del DNA que favorece traslocaciones y deleciones en el DNA, incrementando la inestabilidad genómica (Eden *et al*, 2003; Esteller, 2008). Por otra parte, se ha observado la inhibición de la expresión de genes supresores de tumores como *RB*, y de genes que participan en la reparación del DNA, como *BRCA1*, debido a la hipermetilación de islas CpG en sus promotores. Además, los dinucleótidos CpG metilados son más afines a los agentes carcinogénicos, lo que los hacen más propensos a mutaciones (You y Pfeifer, 2001).

1.3.2.2. REORDENAMIENTO Y MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE HISTONAS

Las histonas son proteínas básicas (H2A, H2B, H3 y H4) en las que se enrollan aproximadamente 146 pares de bases del DNA para formar el núcleo de los nucleosomas, que constituyen la subunidad estructural repetitiva básica de la cromatina. La metilación, acetilación, fosforilación y ubiquitinación de estas proteínas modifican su conformación y la regulación de la expresión génica. Estas modificaciones se llevan a cabo en la porción N-terminal de las histonas (Sawan *et al*, 2008; Kristensen *et al*, 2009). Las modificaciones en las histonas se conservan durante la división celular. La modificación más estudiada es la acetilación, la cual ocurre en las lisinas y permite la transcripción al relajar la estructura de la cromatina (Bernstein *et al*, 2007). La metilación es un proceso más complejo, ya que en el caso de la histona H3, la metilación de la lisina 4 activa la transcripción, mientras que la metilación de las lisinas 9 y 27 se asocia con la inhibición de la transcripción (Kondo *et al*, 2008).

Se ha observado que la hipermetilación de los genes supresores de tumores, cuya expresión está inhibida, se asocia a la desacetilación de las histonas (Esteller *et al*, 2009). La desregulación de la conformación de las histonas lleva a la inadecuada reparación del DNA (Qin y Parthun, 2002), así como a deficiencias en los puntos de control del ciclo celular (Masumoto *et al*, 2005).

1.3.2.3 miRNA

Los miRNA son cadenas de alrededor de 22 pares de bases, sintetizadas a partir de secuencias no codificantes, que pueden evitar la traducción o degradar al RNA mensajero al unirse a éste en una secuencia complementaria. (Jackson y Standart, 2007). Los miRNA, entre otros mecanismos, también regulan la metilación del DNA, ya que están involucrados en la expresión de DNA metiltransferasas (Fabbri *et al*, 2007). Se ha observado que algunos miRNAs, como *mir-15* y *mir-16*, tienen una menor expresión en leucemia linfocítica crónica (Blenkiron y Miska, 2007). Los genes de estos miRNAs se localizan en la región 13q14, la cual se pierde frecuentemente en este tipo de leucemia o bien existe una translocación. Por otra parte, el grupo *mir-17-92* posee potencial oncogénico, ya que su sobreexpresión, junto con *MYC*, pueden hacer más agresivo al linfoma de células B (He *et al*, 2005). La expresión de miRNA se ve afectada por cambios epigenéticos, deleciones y mutaciones de los genes (Croce, 2009).

1.4 INFLAMACIÓN Y CÁNCER

La inflamación es una respuesta fisiológica a diversos estímulos como daño en los tejidos o infecciones (Kindt *et al*, 2004). El objetivo de la respuesta inflamatoria es aislar y destruir al agente dañino, reconstituir la matriz extracelular, favorecer la proliferación y transporte de células sanas para reparar el tejido (Keibel *et al*, 2009).

La inflamación aguda es una respuesta inespecífica, sistémica, rápida y de corta duración. Se caracteriza por vasodilatación e incremento de la permeabilidad vascular, lo que permite la extravasación de varios tipos de células hacia la zona afectada. Posteriormente, se liberan quimiocinas que modifican la estructura conformacional de las integrinas, lo que incrementa su afinidad hacia las moléculas de adhesión intercelulares (ICAM) que se encuentran en el endotelio (Ramzi *et al*, 1995; Kindt *et al*, 2004; Gonda *et al*, 2009).

En zonas de inflamación aguda, los leucocitos (neutrófilos, monocitos y eosinófilos) migran para iniciar la reparación del tejido afectado (Coussens y Werb, 2002). Se ha propuesto que existe un mecanismo de cuatro pasos para la migración de los neutrófilos hacia la zona afectada:

- Activación de selectinas L, P y E (moléculas de adhesión), las cuales facilitan el rodamiento de las células en el endotelio vascular.
- Las citocinas incrementan en los leucocitos la expresión de integrinas.
- Inmovilización de los neutrófilos en la superficie del endotelio vascular mediante la adhesión a integrinas $\alpha_4\beta_1$ y $\alpha_4\beta_7$ unidas a la molécula de adhesión del endotelio vascular 1 (VCAM-1) y la molécula de adhesión de adresina de mucosa (MADCAM-1) respectivamente.
- Migración a través del endotelio hacia los sitios dañados, probablemente facilitada por proteasas, tales como las metaloproteinasas de matriz extracelular.

Los procesos antiinflamatorios normales son autolimitados, poco después de la producción de citocinas pro-inflamatorias se generan citocinas antiinflamatorias (Coussens y Werb, 2002). Sin embargo, en algunas enfermedades la actividad del sistema inmune persiste, lo que da paso a procesos crónicos que tienen características diferentes.

La **inflamación crónica** se origina cuando los estímulos de citocinas pro-inflamatorias persisten por semanas, meses o años, lo que produce cambios estructurales en las zonas afectados. Dichas citocinas favorecen la infiltración de linfocitos y macrófagos lo que incrementa los procesos de angiogénesis y proliferación de tejido conjuntivo y epitelial (Ramzi *et al*, 1995; Kindt *et al*, 2004).

En la actualidad se ha observado que la inflamación crónica puede llegar a causar diversas enfermedades tales como diabetes, artritis, Alzheimer, trastornos cardiovasculares, pulmonares, autoinmunes y particularmente cáncer (Aggarwal *et al*, 2006). La mayoría de los tejidos precancerosos y cancerosos muestran signos de inflamación crónica.

La inflamación crónica por sí misma, así como la proliferación que promueve no son suficientes para la malignización celular. Además de ello, se requiere un conjunto de condiciones para que se dé este proceso. Un mecanismo mediante el cual participa la inflamación en el proceso de carcinogénesis es la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que dañan al DNA (Coussens y Werb, 2002; Anisimov *et al*, 2007). Lo cual favorece la aparición de más mutaciones.

En la tabla 1 se presentan algunos ejemplos de cáncer relacionados con la inflamación.

Tabla 1. Tipos de cáncer relacionados con la inflamación (Aggarwal *et al*, 2006).

CAUSANTE	INFLAMACIÓN	CÁNCER
Humo de cigarro	Bronquitis	Cáncer de pulmón
<i>Helicobacter pylori</i>	Gastritis	Cáncer de estómago
Virus del Papiloma humano	Cervicitis	Cáncer de cervix
Virus de la Hepatitis B y C	Hepatitis	Carcinoma hepatocelular
Estreptococo del Grupo B	Colecistitis	Cáncer de vesícula biliar
Uropatógenos Gram-	Cistitis	Cáncer de vejiga
Gastritis, alcohol, tabaco	Esofagitis	Cáncer de esófago
Fibras de asbesto	Asbestosis	Mesotelioma pleural
Virus Epstein-Barr	Mononucleosis, enfermedad de Hodgkin	Linfoma de Burkitt
Patógenos intestinales	Enfermedad inflamatoria intestinal	Cáncer colonorrectal
Luz ultravioleta	Dermatitis	Melanoma
Infecciones, enfermedades de transmisión sexual	Atrofia inflamatoria de la próstata	Cáncer de próstata

Dos de las principales citocinas que median los procesos de inflamación crónica son, por una parte el factor de necrosis tumoral (TNF- α), que es secretado por macrófagos activados. Por otra parte, el interferón (γ) producido por células T cooperadoras (T_H), NK y células T citotóxicas (T_C o $CD8^+$). Dicha citocina, a su vez, activa la respuesta humoral de los macrófagos, así como la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHCII) en estas células (Kindt *et al*, 2004).

Sin embargo, la activación crónica de macrófagos, también incrementa la expresión de metaloproteasas y el daño al DNA por especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, además de lesionar al tejido adyacente. La activación de los macrófagos por γ incrementa la transcripción y estabilidad de mRNA de TNF- α . Estas moléculas incrementan la expresión de ICAM-1, favoreciendo así la migración de células del sistema inmune al sitio de inflamación (Kindt *et al*, 2004).

Los monocitos migran hacia el tejido dañado guiados por factores quimiotácticos de las zonas inflamadas y su extravasación induce la diferenciación a macrófagos, que al activarse favorecen un microambiente local. Los macrófagos activados son la principal fuente de factores de crecimiento y citocinas, favoreciendo la modificación del microambiente local (Coussens y Werb, 2002).

Los **macrófagos asociados a tumores** (TAM) son importantes inductores de inflamación crónica, se encuentran infiltrados en los tumores y favorecen la promoción de tumores (Keibel *et al*, 2009). La adecuada activación de macrófagos con IL-12 puede eliminar las células tumorales. Sin embargo en algunos contextos celulares, los macrófagos también pueden estimular la proliferación de células tumorales, así como incrementar la invasión y metástasis (Balkwill y Mantovani, 2001; Coussens y Werb, 2002). Los macrófagos favorecen la supervivencia del tumor en condiciones de hipoxia ya que incrementan el proceso de angiogénesis. (Sica *et al*, 2008). Muchas células malignas producen factores estimulantes de colonias (CSF) que prolongan la vida de los macrófagos. La abundancia de los TAM indica un pronóstico no favorable en los pacientes. Los TAM pueden suprimir la respuesta inmune reclutando células T que carecen de acción citotóxica y produciendo receptores solubles de TNF- lo que inhibe la activación de dichas células (Takanami *et al*, 1999; Keibel *et al*, 2009).

Las células dendríticas asociadas a tumores, también contribuyen a la baja actividad de las células T, ya que tienen un fenotipo inmaduro que impide su activación (Allavena *et al*, 2000).

Por otra parte, las citocinas producidas por células tumorales y/o leucocitos asociados a tumores y plaquetas son proinflamatorias, pero no son de respuesta inmune específica o sostenida (Burke *et al*, 1996). El TNF- α es una citocina que participa en la inflamación, controla la población de células inflamatorias (Coussens y Werb, 2002) induce la muerte de células enfermas y estimula la proliferación de fibroblastos (Balkwill y Mantovani, 2001). Una alta dosis local de

TNF- α destruye los vasos sanguíneos del tumor e induce su necrosis. En contraste, bajas concentraciones de TNF- α como las que resultan de una inflamación crónica, contribuyen a la remodelación de tejido y al desarrollo del estroma necesario para el crecimiento del tumor y su migración (Balkwill y Mantovani, 2001; Brigati *et al*, 2002; Aggarwal *et al*, 2006). La activación de NF-

B por TNF- α es muy importante en el proceso de promoción, ya que está implicado en la supervivencia de las células, proliferación y arresto celular, siendo el vínculo entre la inflamación y el cáncer (de Visser y Coussens, 2005). Este factor de transcripción crea un microambiente sostenido de inflamación crónica en el tumor al favorecer la expresión de genes proinflamatorios. En diversos estudios *in vivo* se ha observado una disminución en la incidencia de cáncer de colon asociado a colitis con la inhibición de NF- κ B (Kundu y Surh, 2008).

Debido a la relación entre el cáncer y la inflamación, se ha estudiado el efecto de antiinflamatorios no esteroideos (AINES) en células cancerígenas, determinando que los efectos de los antiinflamatorios son diversos, ya que mientras algunos inducen apoptosis, otros producen arresto del ciclo celular, disminuyendo así, la proliferación. En otros casos se inhibe la producción de factores angiogénicos y la migración de células endoteliales, reduciendo el tamaño del tumor (Iñiguez *et al*, 2003).

Particularmente se ha estudiado el efecto que los AINES tienen en la ciclooxigenasa 2 (COX-2), ya que esta enzima induce angiogénesis, disminuye la función citotóxica de las células T, inhibe la apoptosis y la inmunovigilancia (Denkert *et al*, 2001; Subbaramaiah *et al*, 2003; Blanke, 2004; Chun *et al*, 2004). Las COX son enzimas que participan en la síntesis *de novo* de prostaglandinas (PG) a partir de ácido araquidónico, el cual se encuentra en las membranas celulares esterificado con fosfolípidos (Subbaramaiah *et al*, 2003).

Las prostaglandinas, en especial la prostaglandina E₂ (PGE₂), juegan un papel importante en la inflamación, ya que incrementan la permeabilidad vascular favoreciendo la extravasación de fluidos y la aparición del edema. La PGE₂ es vasodilatadora por lo que incrementa el flujo sanguíneo hacia el tejido, apareciendo así el enrojecimiento. PGE₂ hace más sensibles los nervios periféricos en el sitio de inflamación, participando así en el incremento de la sensibilidad al dolor y además, como mediador pirético (Clària y Romano, 2005).

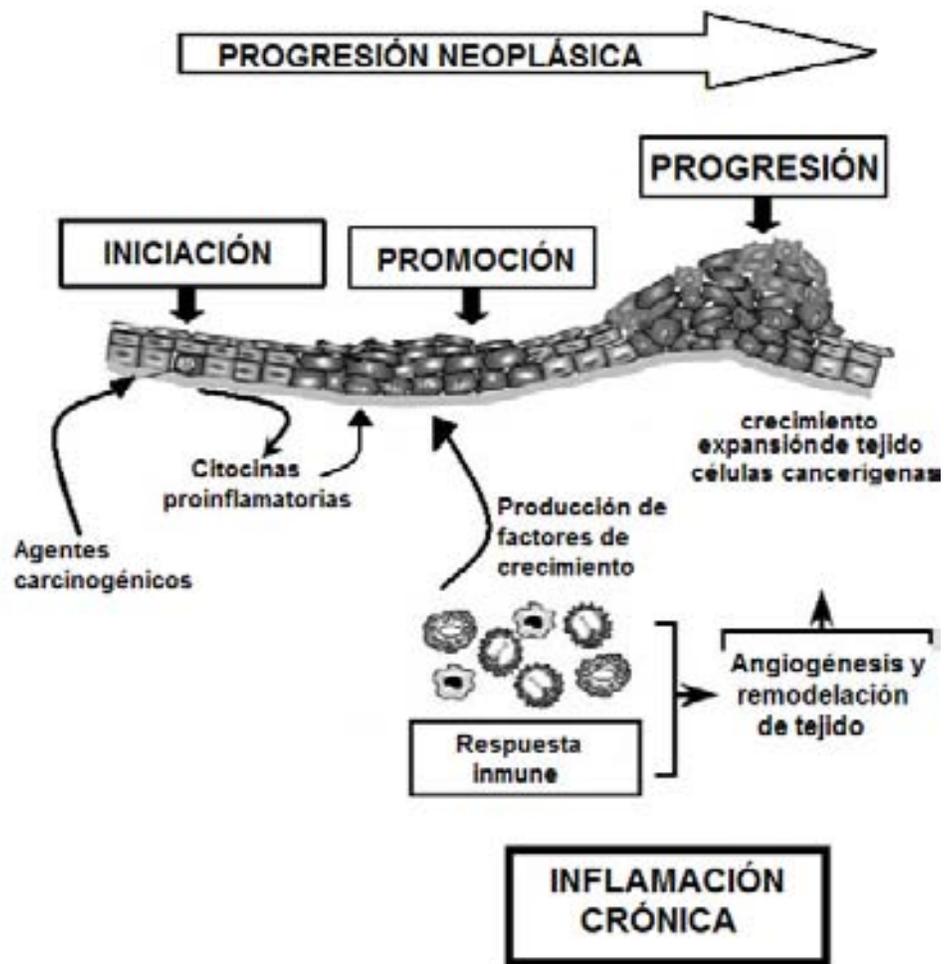


Figura 3. Participación de la inflamación crónica en el proceso de carcinogénesis (modificado de Balkwill y Mantovani, 2001).

1.5 PROTEÍNA ICAM-1

La molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1, también llamada CD54) es una glicoproteína que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas con cinco dominios extracelulares. Fisiológicamente, las moléculas de adhesión participan en las interacciones célula-célula de dos maneras: ya sea manteniendo juntas a células de la misma estirpe o facilitando la adhesión entre células del sistema inmune con otras estirpes celulares. Esta molécula se expresa en macrófagos, linfocitos B, linfocitos T, fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales y epiteliales (Roebuck y Finnegan, 1999; Velasco-Velázquez *et al*, 2000).

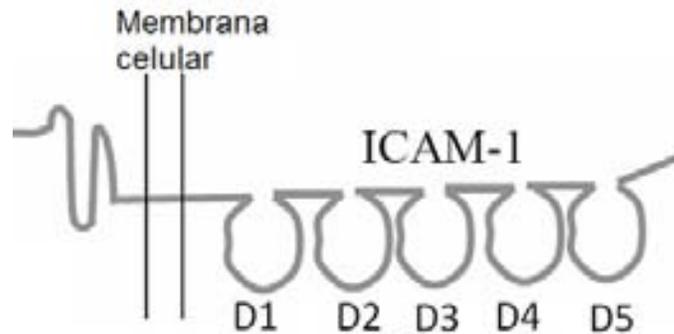


Figura 4. ICAM-1 posee 5 dominios extracelulares tipo inmunoglobulina (D) (Sinha *et al*, 2008).

La proteína ICAM-1 participa en la extravasación de las células del sistema inmune y aunque no es abundante en condiciones fisiológicas, citocinas proinflamatorias como interleucina 1 (IL-1), IFN- y TNF- pueden inducir su expresión (Hubbard y Rothlen, 2000). Otras moléculas como lipopolisacáridos y especies reactivas de oxígeno también pueden inducir este efecto (Niesen *et al*, 2002).

Otras proteínas de adhesión que interactúan con ICAM-1 son las integrinas LFA-1 (CD11a/CD18) y MAC-1 (CD11b/CD18) que se expresan en neutrófilos, linfocitos y macrófagos (Morandini *et al*, 1998; Liang *et al*, 2008). Ambas moléculas también son importantes para la extravasación de neutrófilos a través del endotelio. Las LFA-1 hacen posible la adhesión inicial del neutrófilo al endotelio, mientras que

MAC-1 hace esta unión más duradera y resistente a la fuerza de corte dada por el torrente sanguíneo (Dong *et al*, 2005). Por otra parte, la interacción entre los linfocitos CD8⁺ con las células tumorales también es regulado por la unión de ICAM-1 con LFA-1. El aumento en la afinidad de estas proteínas prolonga el tiempo de contacto, favorece la liberación de gránulos citolíticos a las células tumorales favoreciendo así la apoptosis (Jonson, 1999; Kindt *et al*, 2007).

El papel de ICAM-1 en el proceso de metástasis es controversial. Por una parte existe evidencia que sugiere la participación de esta proteína como un factor antimetastásico. Por otra, existen datos que proponen que su expresión favorece la metástasis. A continuación se presentan los trabajos que sustentan ambas posiciones.

1.5.1 PAPEL ANTIMETASTÁSICO DE ICAM-1

El proceso de metástasis se ha estudiado inoculando células del melanoma murino B16 a ratones *Knock Out*, es decir, con deleciones en diferentes genes que codifican para proteínas de adhesión. Marvin y col (1998) observaron que ratones *Icam-1^{-/-}* presentaron mayor número de metástasis a hígado con respecto a los ratones silvestres. En un estudio similar con ratones *Icam-1^{-/-}* y *SELL^{-/-}* (selectina-L), también se observó incrementos tanto en el crecimiento del tumor primario, como en el número de metástasis a pulmón (Yamada *et al*, 2005a). La ausencia de *Icam-1* hace ineficiente la adhesión de células NK, T_H y T_C con las células del tumor.

Evidencia de experimentos *in vivo* muestra que la lisis de células tumorales por infiltración de linfocitos se incrementa con la sobreexpresión de *Icam-1*, lo que hace más lento el crecimiento del tumor. Además, la expresión de *Icam-1* en células de tumores primarios fue mayor que la observada en células metastásicas.

Este estudio indica que la magnitud de la respuesta citotóxica del sistema inmune se incrementa con la expresión de Icam-1 (Hamaï *et al*, 2008).

En otro estudio, se observó que en vasos sanguíneos de tumores metastáticos no se expresa *Icam-1*, mientras que en los vasos de los tejidos adyacentes su expresión es alta. Esto produjo la acumulación de linfocitos T en los tejidos adyacentes y no dentro del tumor metastático (Weishaput *et al*, 2007).

1.5.2 PAPEL DE ICAM-1 COMO FACILITADOR DE METÁSTASIS

En contraste con los estudios anteriores, en ciertos contextos celulares, la expresión de ICAM-1 en células de melanoma maligno favorece su potencial metastático.

Dos grupos independientes, Dong (2005) y Liang (2008), observaron en modelos *in vitro* que: i) los neutrófilos incrementan la extravasación de las células de melanoma a través del endotelio. ii) El bloqueo con anticuerpos de ICAM-1, LFA-1, MAC-1 e IL-8 reduce la extravasación de células de melanoma. Estos autores han propuesto que la unión de los neutrófilos con las células de melanoma crea un microambiente que puede alterar la respuesta inmune de la siguiente manera: el incremento de la expresión de IL-8 aumenta la de Mac-1 lo que favorece el reclutamiento de neutrófilos y la unión de los linfocitos con las células de melanoma.

La extravasación de células de melanoma se debe a que éstas expresan ICAM-1 y se unen a los neutrófilos a través de las integrinas. Por otra parte, las células de melanoma expresan la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) la cual también recluta neutrófilos en caso de inflamación crónica, siendo común en casos de cáncer (Dong *et al*, 2005; Liang *et al*, 2008).

In vitro, el TNF- α o IFN- γ incrementan la expresión de *ICAM-1* en diferentes tipos de células de melanoma humano (C1861, A375P, MeWo y MeWo-3S5). La inoculación de células tratadas con estas citocinas en ratones atímicos produce de dos a seis veces más metastásis que en los inoculados con células control. Aunque la correlación entre la expresión de *ICAM-1* y la metastásis fue evidente en este estudio, TNF- α e IFN- γ activan la expresión de otras moléculas, por lo que habría que pensar en relaciones más complejas (Miele *et al*, 1994).

Rosette y col (2005) también observaron una correlación entre *ICAM-1* y el potencial metastásico en diferentes líneas celulares de cáncer mamario (MDA-MB-434, MDA-MB-231 y MCF-7). En este estudio se inhibió la expresión de *ICAM-1* con RNA pequeño de interferencia (siRNA) y se bloqueó a la proteína con anticuerpos, lo que produjo disminución significativa en la invasión *in vitro*. Sin embargo, no hubo cambios en la migración celular, efecto inesperado que los autores no pudieron explicar.

Por otra parte, existe una forma soluble de *ICAM-1* (s*ICAM-1*) que puede interferir en la unión de células de melanoma con células T citotóxicas y NK, evadiendo así al sistema inmune. El incremento en los niveles de s*ICAM-1* tiene relación positiva con la progresión del melanoma y metastásis a hígado. La extirpación del tumor primario disminuye los niveles de s*ICAM-1*, pero la presencia de metastásis los aumenta nuevamente y en forma gradual (Kageshita *et al*, 1993; Yamada *et al*, 2005b).

1.5.3 REGULACIÓN DE *ICAM-1*

La expresión de *ICAM-1* está regulada por diferentes factores de transcripción como es el caso del factor nuclear κ B (NF- κ B), las proteínas de Transducción de Señal y Activación de Transcripción (STAT) y la proteína activadora 1 (AP-1).

Los receptores para IL-1 (IL-1R) y TNF- α (TNF-R1) poseen actividad cinasa intrínseca y al activarse por unión a su ligando, fosforilan y degradan a la proteína inhibidora de NF- κ B (I κ B). Esto activa a NF- κ B lo que permite su translocación al núcleo para unirse a sus elementos de respuesta en el promotor del gen *ICAM-1*.

El receptor para IFN- γ (R-IFN- γ) carece de actividad cinasa intrínseca, por lo que al activarse por su unión a ligando, la porción citosólica se asocia a cinasas de Janus (JAK), que se autofosforilan y a su vez activan por fosforilación a las proteínas STAT. Esto dimeriza a STAT y los transloca al núcleo donde se unen a los elementos de respuesta en el DNA (IRE) (Schroder *et al*, 2004).

Diversas citocinas, factores de crecimiento y el estrés oxidativo incrementan la expresión de *FOS* y *JUN*, que al dimerizarse conforman el complejo conocido como AP-1.

También existen otras vías de señalización, por ejemplo el de la proteína cinasa C (PKC), la cual puede ser activada por factores de inflamación tales como IL-1, TNF- α , IFN- γ , óxido nítrico, lipopolisacáridos, entre otros. La activación de PKC incrementa la estabilidad del mRNA de *ICAM-1* aumentando así su, además de activar a NF- κ B y AP-1 (Roebuck y Finnegan, 1999).

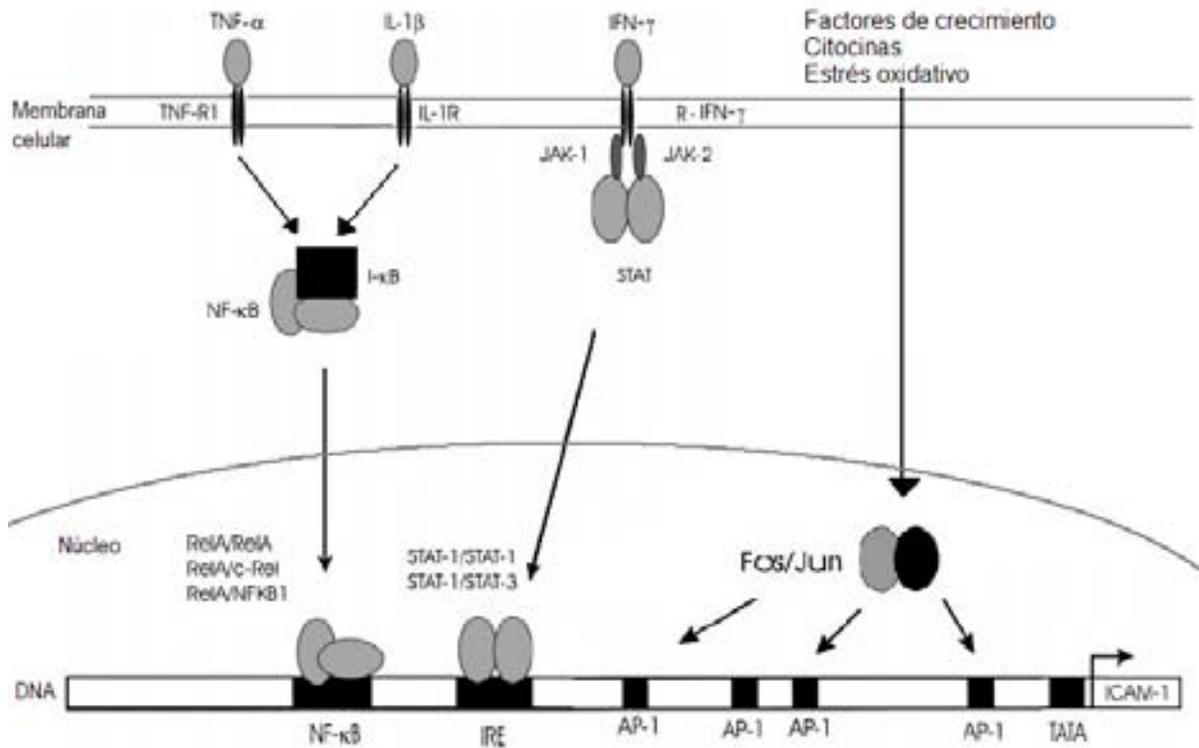


Figura 5. Esquema representativo de los activadores de la expresión de *ICAM-1*. (IRE: elemento de respuesta a IL-1) (Imagen modificada de Roebuck y Finnegan, 1999).

2. JUSTIFICACIÓN

La inflamación crónica participa de varias maneras en los procesos carcinogénicos y en la desregulación de la proliferación celular. Por ello, se ha propuesto el uso de agentes antiinflamatorios como adyuvantes en la quimioterapia.

La dafnetina (6, 7-dihydroxicumarina) es la cumarina simple con mayor actividad antiproliferativa *in vitro*, pero su actividad antitumoral *in vivo* aún no ha sido suficientemente estudiada. Este compuesto es un metabolito secundario que se encuentra en una gran cantidad de especies vegetales. Además posee propiedades antioxidantes y antiinflamatorias que se han evaluado en modelos murinos de artritis. Uno de los mecanismos antiinflamatorios de la dafnetina es la inhibición de la síntesis de TNF- α .

Resultados preliminares indican que la administración de dafnetina a ratones inoculados con células de melanoma murino B16-F10 disminuye la inflamación en los tumores e incrementa la supervivencia. El efecto antiinflamatorio resultó más evidente en los ratones que recibieron pretratamiento con dafnetina dos semanas antes de la inoculación. En el presente trabajo se propuso el estudio *in vitro* e *in vivo* de la expresión de una proteína que participa tanto en procesos inflamatorios como cancerígenos. Se decidió evaluar la expresión de *Icam-1* debido a que esta proteína es regulada por TNF- α . Aunque se ha reportado que altas concentraciones de TNF- α puede tener efecto antitumoral, en bajas concentraciones participa activamente en la inflamación crónica y en procesos tumorales.

Por esta razón, en este trabajo se decidió evaluar y contrastar la respuesta obtenida del tratamiento con dafnetina de ensayos *in vitro* e *in vivo* en células del melanoma murino B16-F10. Las muestras de tumores fueron obtenidas dos semanas después de la inoculación de estas células en los ratones C57BL/6.

El segundo propósito de este trabajo fue estandarizar las condiciones para evaluar en este modelo murino la transcripción de genes involucrados tanto en el proceso inflamatorio como el de carcinogénesis.

2.1 HIPÓTESIS

La dafnetina inhibe la biosíntesis de TNF- α , entonces el tratamiento con dafnetina podría disminuir la expresión de *Icam-1* tanto *in vivo* como *in vitro*.

Los efectos antiinflamatorios de la dafnetina podrían contribuir a las posibles acciones antitumorales *in vivo*.

2.2 OBJETIVOS GENERALES

- Evaluar *in vitro* e *in vivo* la expresión de *Icam-1* en células B16-F10 tratadas con dafnetina.
- Evaluar el efecto antitumoral o quimio protector de la dafnetina en un modelo murino.

2.2.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Estandarizar la técnica de PCR para la evaluación del efecto de la dafnetina.
- Determinar el gen de referencia para la medición del efecto de la dafnetina sobre diferentes genes.
- Evaluar *in vitro* los posibles efectos que la dafnetina tenga sobre la expresión de *Icam-1*.
- Corroborar en un modelo murino los resultados obtenidos en cultivos celulares.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 REACTIVOS Y MEDIOS

La dafnetina (7,8-dihidroxicumarina), dimetil sulfóxido (DMSO), 2-propanol y etanol absoluto fueron obtenidos comercialmente de Sigma-Aldrich (St Lois, MO). El suero fetal bovino fue obtenido comercialmente de PAA Laboratories (Canadá) y el medio RPMI 1640 con rojo fenol, de Gibco (Grand Island, NY). La mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, el Trizol®, SYBR GreenER qPCR SuperMix Universal, SuperScript III First-Strand Syntesis SuperMix for q RT-PCR y el geNorm™ Housekeeping Gene Selection Kit fueron obtenidos comercialmente de Invitrogen™ (Carlsbad, Ca). Los cebadores para *ICAM-1* fueron sintetizados por Invitrogen™ con base en una secuencia reportada en la literatura (Dai *et al*, 2008).

Tabla 2. Secuencia de los cebadores de *Icam-1* utilizados

<i>Icam-1-F</i>	GGGACCACGGAGCCAAT
<i>Icam-1-R</i>	GCTTTGGGATGGTAGCTGGAA

3.2 LÍNEA CELULAR

La línea de melanoma murino B16-F10 fue obtenida del American Type Culture Collection (ATCC Número CRL-6475). Esta línea celular fue generada de ratones C57BL/6, los cuales desarrollan espontáneamente melanoma, es altamente metastásica y tiene baja producción de melanina (Kochenderfer y Gress, 2007). Este tipo de melanoma es poco inmunogénico y expresa moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC1) en bajos niveles, lo cual dificulta su reconocimiento por las células CD8⁺ (Seliger, 2001).

3.3 MEDIO Y CONDICIONES DE CULTIVO

Las células fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con 5% de suero de fetos de bovino con complemento inactivado por calor en botellas de 25 cm² de área de cultivo (NUNC), a una temperatura de 37°C, en atmósfera humidificada y con inyección de CO₂ al 5%.

3.4 ENSAYOS *IN VITRO*

La dafnetina se probó en las siguientes concentraciones 10, 20 y 40 M. Para cada tratamiento se sembraron 200 000 células en 15 mL de medio, en cajas de Petri de 100 cm² (NUNC, Denmark) por 72 horas. Como disolvente del fármaco se utilizó DMSO y su concentración final en el medio de cultivo fue de 0.0001% V/V. Para cada ensayo hubo un control de disolvente y un control absoluto (células que no recibieron tratamiento ni disolvente). Al término del tiempo de exposición, se obtuvo un millón y medio de células para realizar la extracción de RNA. En el caso de la concentración de 40 M fueron sembradas dos cajas de Petri para tener un número final de células similar a los de los tratamientos de 10 y 20 M.

3.5 ENSAYOS *IN VIVO*

Los ratones de la cepa C57BL/6 fueron adquiridos de Harlan México. Se utilizaron ratones machos de 6 a 7 semanas de edad con un peso de 18 a 20 gramos, que se mantuvieron en el Bioterio del Departamento de Farmacología bajo las siguientes condiciones: a) jaulas de material impermeable, transparente, de bordes redondos, con piso sólido, b) con libre acceso a comida y agua, c) con cambio de lecho estéril tres veces por semana, d) cada jaula tuvo 3 animales.

Después de una amplia exploración de condiciones experimentales se estandarizaron las siguientes condiciones para la obtención de tumores: a cada ratón se le inoculó 10^5 células de melanoma murino B16-F10 en un volumen de 200 μ L de forma subcutánea. Al término de un mes, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y los tumores fueron obtenidos para la extracción de RNA.

Evaluación *in vivo* de la dafnetina: Se administró dafnetina (80 mg/kg de peso corporal por vía oral) dos semanas antes y dos semanas después de la inoculación de las células, al término de las cuales los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical (según la Guía de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999) y se obtuvieron los tumores para la posterior extracción de RNA.

En un trabajo previo de nuestro grupo de trabajo, se observó que en tiempos largos, los tumores de los ratones inoculados con células B16-F10, no presentaban diferencias en cuanto al tamaño con respecto a los tratados con dafnetina (datos no publicados), por lo que se pensó en realizar ensayos más cortos para poder observar cambios significativos al inicio de la aparición del tumor. Se determinó que un tiempo de dos semanas de desarrollo del tumor sería adecuado, ya que en otros artículos se estudian los tumores después de este tiempo, obteniendo resultados satisfactorios (Marvin *et al*, 1997; Yamada *et al*, 2005a).

3.6 EXTRACCIÓN DE RNA

Para la **extracción de muestras *in vitro***: al tercer día de incubación, se retiró el medio a las células y se lavaron con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Posteriormente, se agregó 1 mL de Trizol® y se raspó la caja para desprender las células. En el caso de la **extracción de las muestras de tumores**: los tumores se pusieron directamente en Trizol®. Se añadieron 200 μ L de cloroformo:alcohol isoamílico, se centrifugó por 5 minutos a 8 000 rpm. La fase acuosa fue recuperada y se agregaron 500 μ L de isopropanol, esto se dejó

incubando a -20 °C por tres horas, para centrifugar posteriormente media hora a 4 °C, 12 000 rpm. Se eliminó todo el sobrenadante y se hicieron dos lavados con etanol, centrifugando 10 minutos a 12000 rpm y dejando secar el exceso de etanol. El RNA obtenido fue resuspendido en 40 µL de agua con 0.01% de dietil pirocarbonato (DEPC). Para determinar la pureza de las muestras, se realizaron diluciones para medirlas en el espectrofotómetro a 260 y 280 nm. La relación entre ambas longitudes de onda debe de ser entre 1.6 y 3.0. Se corrieron geles de agarosa al 1% para determinar la integridad del RNA en una cámara Bio-Rad Mini-Sub® Cell GT a 70 mV.

El cDNA fue obtenido mediante el kit SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR siguiendo las indicaciones del proveedor. Posteriormente, se llevó a cabo el PCR en tiempo real utilizando SYBR GreenER qPCR SuperMix Universal en un rotor Corbett con el programa Rotor Gene 6000.

Tabla 3. Las condiciones de corrida para el PCR en tiempo real.

Activación enzimática	50 ciclos	
95 °C/10 min	95 °C/15s (desnaturalización)	60 °C/60s (alineamiento y elongación)

3.7 PRUEBAS ESTADÍSTICAS

Para los análisis estadísticos en el presente trabajo se utilizó el programa de Sigma Stat.

En el caso de los ensayos *in vitro*, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), mientras que en los ensayos *in vivo*, se realizaron pruebas de T de Student.

4. ESTANDARIZACIÓN

En la técnica de PCR en tiempo real se registran continuamente señales de fluorescencia de una o más reacciones de la polimerasa en cierto número de ciclos de amplificación (Shipley, 2006). Con esta técnica las señales de fluorescencia de cada reacción son transformadas a valores numéricos que se grafican en unidades de fluorescencia contra ciclos (ver figura 6).

El valor Ct (por sus siglas en inglés threshold cycle) indica el ciclo en el que se ha llegado a un umbral determinado de unidades de fluorescencia (Livak y Schmittgen, 2001). Éste es un valor que se elige entre el inicio de la fase exponencial y la interfase, además debe de estar después del “ruido”, que es la parte de la curva que se encuentra antes de la fase exponencial de la reacción de amplificación (Pfaffl, 2006).

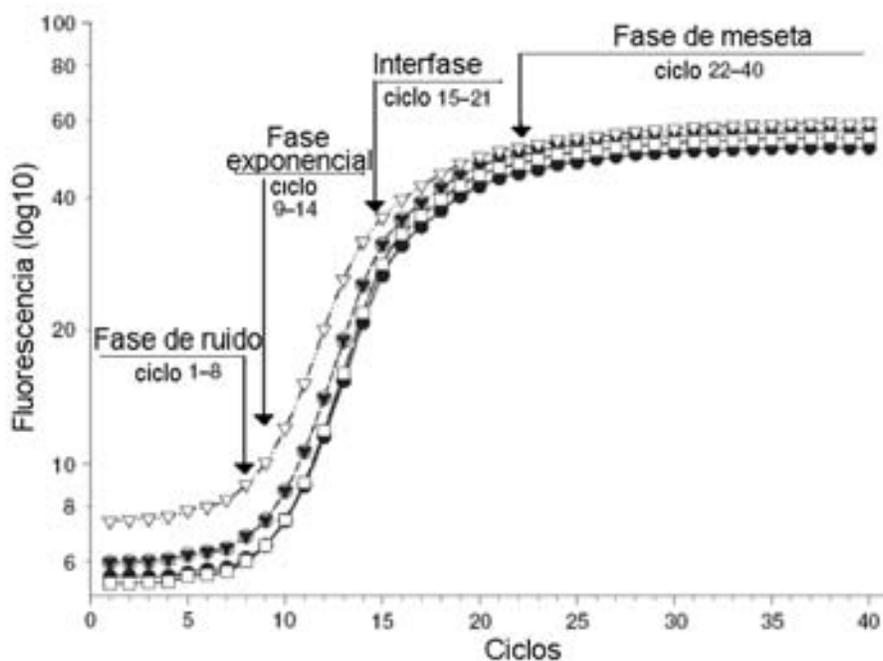
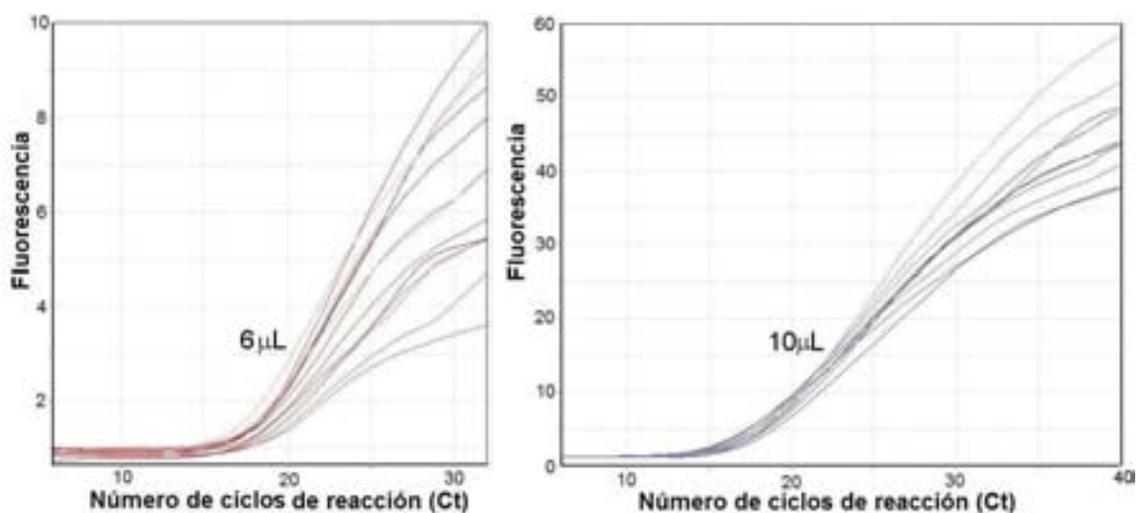


Figura 6. Fases que se observan durante la graficación de los valores de fluorescencia obtenidas durante diferentes ciclos de amplificación en la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Pfaffl, 2006).

Las reacciones se realizan en volúmenes pequeños que deben ser determinados de acuerdo a los reactivos, al equipo, características del estudio, etcétera. Cada tratamiento se analiza por triplicado y el valor de desviación estándar de los Ct debe ser menor a 0.5, ya que el fabricante (Invitrogen™) establece que valores mayores indican errores en el pipeteo de los reactivos.

El volumen de reacción recomendado por el fabricante es de 50 μ L, pero para optimizar el uso de los reactivos se evaluaron distintos volúmenes de reacción (6, 10, 12 y 25 μ L). Como se observa en la gráfica 1, en las reacciones donde se utilizaron 6 μ L como volumen de reacción, la dispersión fue mayor que la observada en las de 10 μ L. Se encontró que el volumen mínimo donde se observaba menor variación fue de 10 μ L, por ello se trabajó con este último volumen en todos los casos.



Gráfica 1. Determinación del volumen de reacción. La intensidad de fluorescencia obtenida con 6 μ L de reacción alcanza como máximo 10 unidades (desviación estándar de 1.86), mientras que con 10 μ L se alcanzan casi 60 unidades (desviación estándar de 0.21).

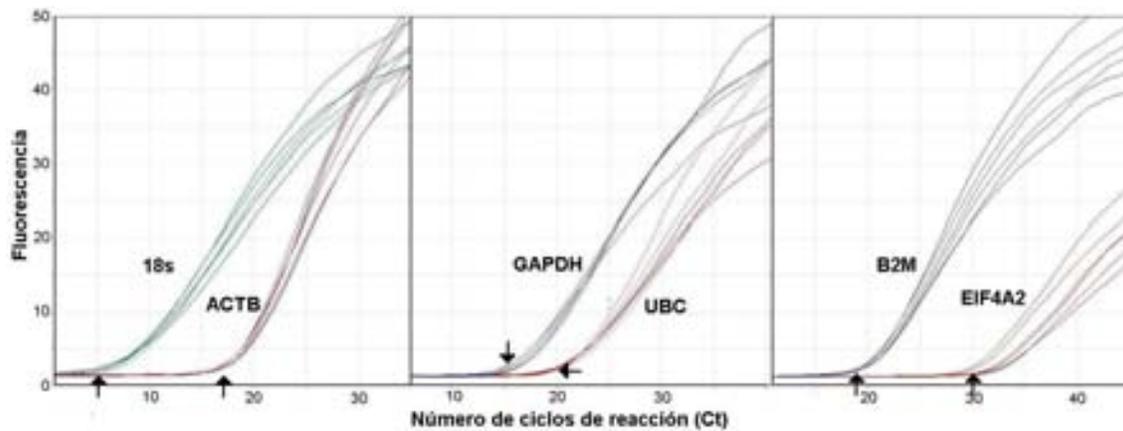
4.1 DETERMINACIÓN DEL GEN DE REFERENCIA

En el PCR en tiempo real, para evaluar la expresión relativa de un gen problema (gen x) se requiere determinar un gen de referencia que se utilizará como comparativo para evaluar la expresión relativa del gen x. Para que un gen constitutivo pueda ser utilizado como gen de referencia, su expresión debe tener la menor variación posible entre el control absoluto, el control de disolvente y los tratamientos (10, 20 y 40 μ M de dafnetina). **El valor M (medida de estabilidad del gen)** es el promedio de las variaciones de un gen constitutivo con respecto a otros genes constitutivos también evaluados (Vandesompele et al, 2002). Este valor se refiere a la tasa de expresión, en todos los tratamientos, de dos genes cuya regulación es independiente. Entre menor sea el valor de M, mayor será la estabilidad (Piantoni et al, 2008). El programa *geNorm* de *Primer Design Ltd* determina el valor de M a partir de los valores experimentales de Ct. Este programa recomienda que el valor de M sea menor a 1.5. La tabla 4 contiene los valores de Ct y de M para los distintos genes constitutivos que fueron evaluados. En el modelo murino que estudiamos, los dos genes con valores de M menores, es decir, con mayor estabilidad fueron *Gapdh* (0.524) y *Ubc* (0.551).

Tabla 4. Genes evaluados para determinar el gen de referencia que se utilizará en ensayos subsecuentes.

Abreviación	Nombre	Ct*	M
<i>Gapdh</i>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	15.8	0.524
<i>Ubc</i>	Ubiquitina C	20.2	0.551
<i>Actb</i>	-Actina	17.3	0.622
<i>B2m</i>	-2-microglobulina	19.4	0.629
18s RNA	Subunidad 18s de RNA _r	5.3	0.783
<i>Eif4a2</i>	Factor de inicio de traducción eucariótico 4A2	30.6	1.419

*El valor de Ct corresponde al ciclo donde se inicia la fase exponencial de la reacción.



Gráfica 2. Gráficas obtenidas de los genes evaluados mediante el programa Corbett Rotor-Gene™ 6000. → Indica el ciclo donde inicia la fase exponencial de la reacción de cada gen.

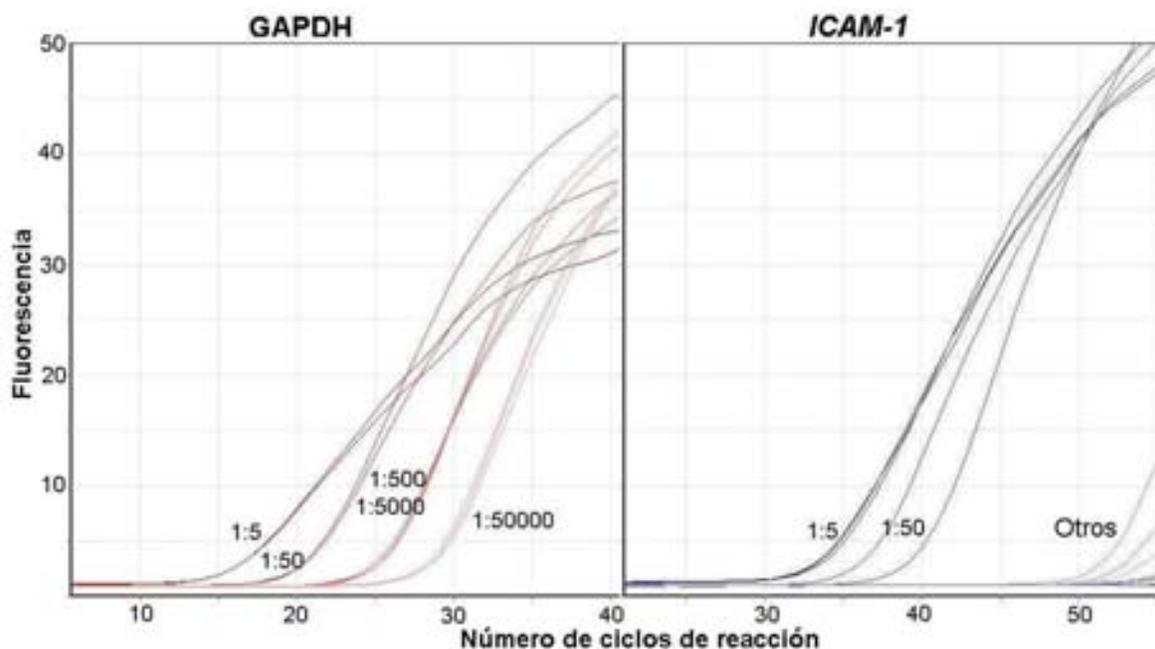
La fase exponencial de amplificación de la reacción para el cDNA es diferente para cada gen (gráfica 2), por ejemplo, la fase de amplificación exponencial de 18s se inicia entre los ciclos 5 y 10, mientras que para *Eif4a2* es aproximadamente de 30 ciclos, siendo este gen el que presentó mayor variación ($M= 1.419$).

4.2 DETERMINACIÓN DEL RANGO DINÁMICO DE LA REACCIÓN

La determinación del rango dinámico de la reacción es útil tanto para establecer la cantidad de cDNA que se utilizará en cada reacción, como para determinar el gen constitutivo que presenta menor variación a diferentes concentraciones de cDNA.

En un inicio se evaluaron diluciones 1:5, 1:50, 1:500, 1:5000 y 1:50000 del control absoluto (sin tratamiento). Las diluciones se realizaron a partir de 20 μ L de cDNA sintetizado de 1 μ g de RNA total. En la gráfica 3 se observa que la amplificación de *Gapdh* a distintas diluciones de cDNA presenta un patrón regular, lo que indica que su rango dinámico es muy amplio. En contraste, en el caso de *Icam-1*, en la dilución 1:5 hay poca dispersión en los datos, pero a partir de la dilución 1:50 las dispersiones son mayores. En las diluciones posteriores, las amplificaciones se

encuentran después del ciclo 50. Más de 50 ciclos no son recomendables, debido a que la amplificación puede ser inespecífica, además de la obtención de dímeros.



Gráfica 3. Determinación del rango dinámico de la reacción.

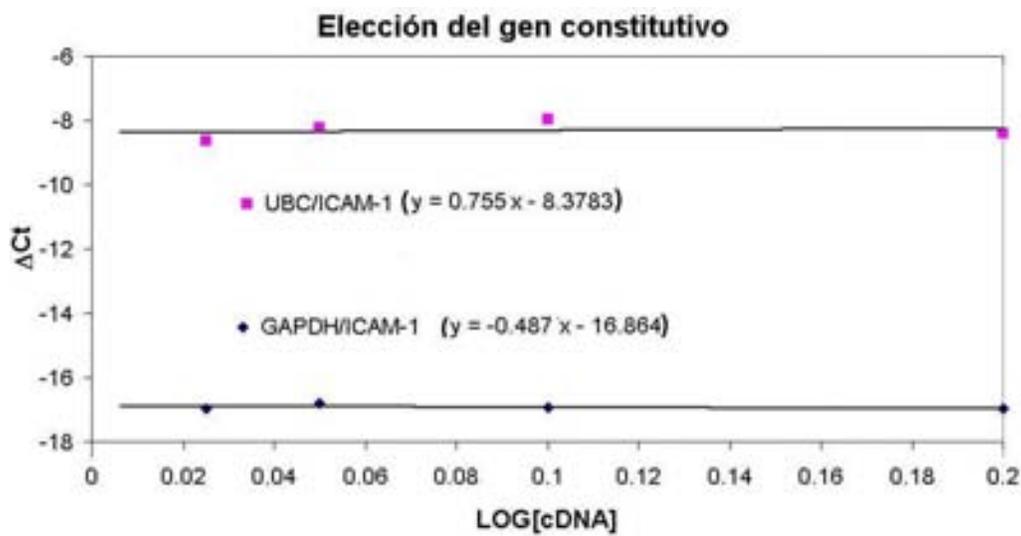
A partir de estos datos se hicieron diluciones menores del cDNA de los controles absolutos para calcular los valores Ct y posteriormente los de Δ Ct de *Icam-1* con respecto a los genes constitutivos (tabla 5). A bajas concentraciones de cDNA (0.00625 L) no se detecta la reacción de amplificación de *Icam-1*.

Tabla 5. Determinación de Δ Ct de ICAM-1 con respecto a *GAPDH* y *UBC*.

L de cDNA*	Log Conc	Ct <i>Gapdh</i>	Ct <i>Ubc</i>	Ct <i>Icam-1</i>	Δ Ct <i>Gapdh/Icam-1</i>	Δ Ct <i>Ubc/Icam-1</i>
0.00625	-2.2	13.74	21.19	-----	-----	-----
0.0125	-1.9	12.97	20.70	28.8	-15.83	-8.1
0.025	-1.6	12.06	20.37	29.02	-16.96	-8.65
0.05	-1.3	11.21	19.76	27.99	-16.78	-8.23
0.1	-1.0	10.4	19.37	27.33	-16.93	-7.96
0.2	-0.7	9.63	18.21	26.60	-16.97	-8.39

*Microlitros de cDNA utilizados en 10 L de reacción: de 0.0625 a 1 L.

Los datos de ΔC_t de la tabla 5 fueron graficados para determinar cuál de los dos genes constitutivos tiene menores variaciones a diferentes concentraciones de cDNA. El valor de la pendiente que se aproxime más a cero tiene menor variación; en la gráfica 4 se observa que la pendiente de *Gapdh/Icam-1* se acerca más a este valor, por lo que es el más adecuado como gen de referencia para este estudio.



Gráfica 4. Variación de la ΔC_t de *Icam-1* con respecto a los genes *Ubc* y *Gapdh*.

4.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CEBADOR

En la tabla 6 se puede observar que no hay diferencias significativas en el ciclo (Ct) con una fluorescencia de 0.018 unidades, así que se eligió la concentración que mostraba menor desviación estándar (st dev), 300 nM.

Tabla 6. Evaluación de la concentración de cebador en la reacción con respecto al Ct obtenido.

Concentración de cebador de <i>Icam-1</i> (nM)	Ct	st dev
150	27.4	0.98
300	26.6	0.19
500	27.6	0.37
1000	27.1	1

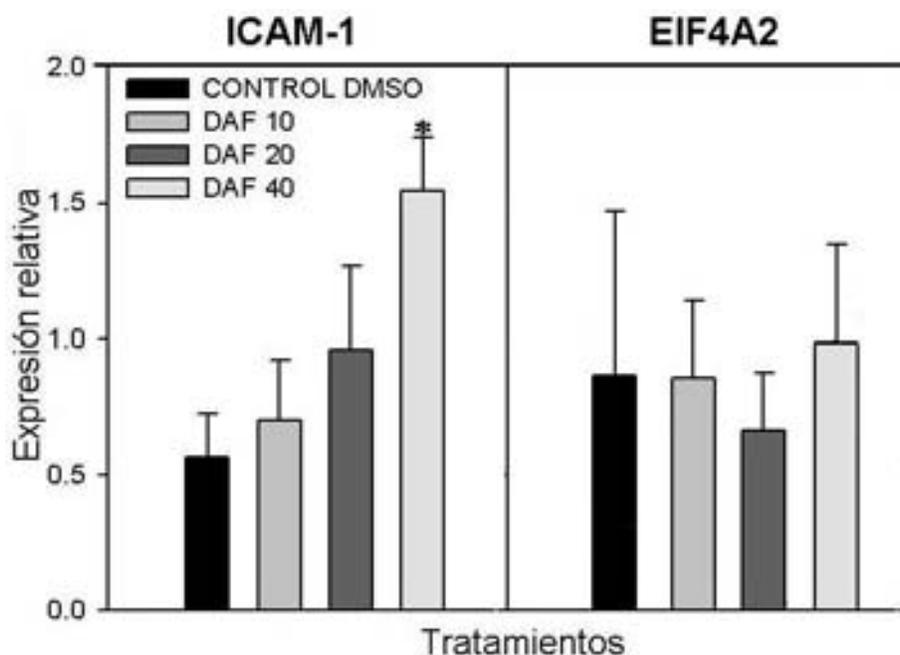
De acuerdo a las determinaciones anteriores se estableció el uso del gen *Gapdh* como gen de referencia, la concentración de cDNA 0.5 μ L y de 300 nM de cebador en un volumen de reacción de 10 μ L. Los resultados fueron analizados mediante el cálculo de $\Delta\Delta Ct$ de acuerdo a la recomendación de Livak y Schmittgen (2001).

$$\Delta\Delta CT = (Ct_{gen\ de\ interés} - Ct_{gen\ de\ referencia})_{Tratamiento} - (Ct_{gen\ de\ interés} - Ct_{gen\ de\ referencia})_{Control}$$
$$Expresión\ relativa = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

5. RESULTADOS

5.1 EXPRESIÓN *IN VITRO* DE *ICAM-1* EN CÉLULAS DEL MELANOMA MURINO B16-F10

En la gráfica 5 se observa un incremento gradual en la expresión de *Icam-1* que depende de la concentración de dafnetina a la que fueron expuestas las células de melanoma murino B-16-F10. Se realizó una ANOVA con el programa SigmaStat para analizar los resultados y se observó que existen diferencias significativas en la expresión de *Icam-1* en la concentración de 40 μ M de dafnetina con respecto al control. En cuanto a *Eif4a2*, no hay diferencias significativas en su expresión, se decidió estudiarlo debido a que era el gen de referencia con mayor variación dentro de los tratamientos. Sólo se puede decir que no es buen gen de referencia. Se realizaron ensayos con células estimuladas de TNF- α como control positivo, en los que se observó la misma tendencia (datos no mostrados).



Gráfica 5. Expresión relativa de *Icam-1* y *Eif4a2* con respecto a *Gapdh*.

Resultados obtenidos de tres ensayos independientes.

* $P < 0.05$

5.2 EXPRESIÓN DE *ICAM-1* EN RATONES NO TRATADOS

En ratones no tratados se observó que a un mes de la inoculación de células, los tumores producidos presentaron diferencias de tamaño, por lo que se dividieron en dos grupos en base al peso. Los tumores con un peso mayor a 5 g fueron considerados en un grupo y los tumores con un peso menor a 4 g fueron considerados en otro grupo (tabla 7).

La expresión relativa de *Icam-1* fue mayor en tumores de poco peso con diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.5$) al compararse con los tumores de mayor peso.

Tabla 7. Expresión relativa de *Icam-1* en tumores extraídos de ratones de la cepa C57BL/6 inoculados con células de melanoma murino B16-F10.

	n	Peso del tumor (g)		Expresión relativa de <i>Icam-1</i>	
		promedio	st dev	promedio	st dev
Tumores de mayor peso	5	6.5	1.15	1.3	0.28
Tumores de menor peso	3	2.9	1.02	3.6	1.10

5.3 EXPRESIÓN DE *ICAM-1* EN RATONES TRATADOS CON DAFNETINA

En otro estudio *in vivo*, se administró una dosis de 80 mg/kg de peso de dafnetina por vía oral a ratones inoculados con células de melanoma murino B16-F10. A las dos semanas de la inoculación fueron sacrificados por dislocación cervical. De 6 animales tratados, dos ratones no desarrollaron tumores (30 %), un ratón desarrolló un tumor incipiente del que no se pudo obtener RNA (20 %) y sólo de tres (50 %) se obtuvieron muestras adecuadas para realizar la extracción de RNA. En la tabla 8, se observa que los cambios en la expresión de *Icam-1* no son significativos, sin embargo, el peso de los tumores de los ratones tratados es menor y estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

Tabla 8. Expresión relativa de *Icam-1* en tumores extraídos de ratones de la cepa C57BL/6 tratados con dafnetina e inoculados con células de melanoma murino B16-F10.

	Peso del tumor (g)			Expresión relativa de <i>Icam-1</i>	
	n	promedio	st dev	promedio	st dev
Control	3	0.96	0.19	0.85	0.34
Dafnetina	3	0.32	0.43	1.21	1.01

6. DISCUSIÓN

En el presente estudio se determinó que de seis genes constitutivos sólo la expresión de *Gapdh* y *Ubc* pueden ser empleadas como referencia en la técnica de PCR en tiempo real. La estabilidad de la expresión de dichos genes es mayor (valor de M menor) y con menores variaciones en sus rangos dinámicos con respecto al gen problema. En base a estos valores, se eligió a *Gapdh* como referencia.

La elección de los cebadores para un gen problema se realiza en base a la especificidad de la secuencia y a su respectiva temperatura de desnaturalización (T_m), que debe ser cercana a la de los cebadores de los genes constitutivos para que amplifique a temperaturas de ciclaje similares.

Como no contamos con la secuencias de los genes constitutivos ni con sus respectivos valores de T_m , de acuerdo a las instrucciones del proveedor, se buscaron en la bibliografía secuencias de cebadores de los genes problema con una T_m cercana a 60 °C. Se verificó con el programa BLASTN de PubMed (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) la especificidad de los mismos. En el caso de los cebadores para *Icam-1* (Dai *et al*, 2008), se observó una amplificación adecuada en las condiciones de corrida de los genes constitutivos.

Sin embargo, en el caso de los cebadores para prostaglandina endoperóxido sintasa 2 (*Ptgs2*) y para metaloproteasa 2 (*Mmp2*) reportados por Scarfi y col. (2007) no observamos amplificación. Ambos cebadores tienen una T_m de 60 °C y sus condiciones de ciclaje son idénticas a las de los cebadores de los genes constitutivos. Se exploraron otras condiciones de corrida, tanto de las muestras del cultivo celular como de las muestras de tumores, pero no observamos amplificación. Esto nos indica que no siempre son confiables los datos publicados.

Posteriormente, se evaluó la expresión de *Ptgs2* con cebadores específicos sintetizados por *PrimerDesign Ltd* (con T_m de 56.5 °C) y observó amplificación en las muestras *in vivo* de tumores pero no en las muestras *in vitro* de células B16-F10. Incluso, como control positivo del sistema *in vitro*, se estimularon las células con TNF- α a varias concentraciones y tiempos de exposición, pero tampoco se observó amplificación. Esto indica que la expresión del gen también depende de las características particulares del modelo biológico.

Se ha reportado que muchas proteínas con actividad cinasa de tirosina (TK) son proto-oncogenes y la fosforilación y activación de en sus tirosinas regulan eventos críticos en el control de la proliferación y en la malignización celular (Alberts *et al*, 2008). Por tanto, la inhibición de estas proteínas se ha propuesto como un blanco farmacológico (Tamura y Fukuoka, 2003).

El efecto antiproliferativo de la esculetina a través de la inhibición de TK se ha observado en modelos de daño vascular en rata (Huang *et al*, 1993, Pan SL *et al*, 2005). En contraste, los efectos antiproliferativos de esta cumarina son más limitados en tumores sólidos (Hofmanova *et al*, 2002), probablemente debido a que las células malignizadas tienen mayores anormalidades en sus vías de señalización. La dafnetina es un inhibidor TK más potente y con mayores efectos antiproliferativos que la esculetina. Sin embargo, *in vitro*, la dafnetina sólo inhibe la actividad de las cinasas ERK1 y ERK2 desde concentraciones de 200 μ M y a concentraciones bajas induce diferenciación celular (Finn *et al*, 2004).

En un modelo de inoculación subcutánea de células del melanoma murino B16-F10 en ratones singénicos C57BL/6, recientemente se ha evaluado la actividad antitumoral de la dafnetina *in vivo* (Villegas, 2008). Los tumores de los ratones tratados presentaron menos procesos inflamatorios que los ratones controles. Por lo que en el presente trabajo decidimos evaluar a concentraciones bajas (10, 20 y 40 μ M) las acciones de dafnetina sobre la expresión de genes que participen en la inflamación y el crecimiento tumoral *in vivo*.

Tanto *in vitro* como *in vivo*, se ha observado que la dafnetina inhibe la biosíntesis de TNF- α y produce efectos antiinflamatorios (Yesilada *et al*, 2001; Gao *et al*, 2008). Debido a que esta molécula participa tanto en la inflamación como en la vía de señalización de *Icam-1*, en el presente trabajo se estudió, tanto *in vitro* como *in vivo*, la expresión de esta molécula y su modificación farmacológica por dafnetina. Se ha propuesto la inhibición de *Icam-1* como un blanco farmacológico para disminuir metástasis y la progresión tumoral (Kageshita *et al*, 1993; Miele *et al*, 1994; Dong *et al*, 2005; Rosette *et al*, 2005; Yamada *et al*, 2005b; Liang *et al*, 2008; Yamada *et al*, 2008). López-González y colaboradores (2008), reportaron que la cumarina disminuía la expresión de *Icam-1* en las células del melanoma murino B16-F10.

Partiendo de los datos arriba indicados, supusimos que la dafnetina disminuiría la expresión de *Icam-1* en las células B16-F10, en contraste, en nuestros experimentos *in vitro* observamos lo contrario. Al incubar simultáneamente las células con TNF- α y dafnetina, se observaron incrementos estadísticamente significativos a concentraciones más bajas (datos no mostrados). Esto indica que pese a su analogía estructural, la dafnetina tiene efectos distintos que los observados con la cumarina por el grupo de López-González (2008).

Aunque algunos autores relacionan la expresión de *ICAM-1* con un incremento en la metástasis y desarrollo tumoral, otros autores la relacionan con una facilitación del sistema inmune para limitar el desarrollo del tumor. Nuestros resultados son coherentes con esta última propuesta. En el tratamiento de cáncer, las células más diferenciadas se asocian a un mejor diagnóstico. Las células tumorales más diferenciadas tienen una expresión mayor de moléculas clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-1) e ICAM-1 en su superficie, lo que les confiere mayor antigenicidad (Carlson *et al*, 2008). Esto implicaría una mayor sensibilidad de las células malignas hacia los linfocitos T citotóxicos y células NK. En nuestros resultados, a dos semanas de la inoculación de las células, la mayor

expresión de *Icam-1* en los tumores de peso bajo concuerda con esta posibilidad, al igual que nuestras observaciones *in vitro*, tanto a la concentración de 40 μ M de dafnetina y TNF- α más 20 μ M de dafnetina.

In vivo, después de dos semanas de la inoculación de las células, se observó un retraso en la aparición de los tumores: algunos ratones tratados con dafnetina aún no habían desarrollado tumores al momento de ser sacrificados; otros ratones presentaron tumores de menor peso y tamaño que los ratones control. Sin embargo, entre los tumores del grupo control y del grupo tratado no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de *Icam-1*.

Las inconsistencias observadas entre los ensayos *in vitro* e *in vivo* con la dafnetina pueden ser el resultado de varios factores. Los modelos *in vivo* involucran procesos de mayor complejidad, como la participación del sistema inmune que no están involucrados con el modelo *in vitro*. Quizá las células B16-F10 podrían tener importantes cambios durante la progresión del tumor, desafortunadamente este modelo *in vivo* no nos permite obtención de muestras a diferentes tiempos para evaluar la cinética de expresión de *Icam-1*.

Otra característica del modelo *in vivo* que quizá limite el estudio de las acciones de la dafnetina es que las células B16-F10 tienen poca inmunogenicidad y baja expresión de moléculas Mhc1, lo que dificulta su reconocimiento por las células CD8⁺ (Seliger, 2001). Estas características podrían ser una variación biológica al modelo experimental que no se contempló en este estudio.

El efecto de la dafnetina en la aparición de tumores es bastante claro, por lo que se debe estudiar la expresión de otros genes relacionados con los procesos antiproliferativos y antiinflamatorios.

7. CONCLUSIONES

Las condiciones adecuadas para estudiar el efecto de la dafnetina en el modelo de tumor murino inducido por la inoculación de células B16-F10 sobre la expresión de genes problema son las siguientes:

- El gen de referencia ideal es *Gapdh* por no presentar variación en su expresión con respecto a los controles y los tratamientos.
- Un volumen de reacción de 10 μ L es adecuado.
- Para evaluar otro gen, es necesario determinar el rango dinámico, ya que es independiente de cada gen.

In vitro, la dafnetina incrementó en forma significativa la expresión de *Icam-1* a la concentración de 40 μ M.

In vivo, en ratones no tratados, los tumores de un mes de menor peso tuvieron una mayor expresión de *Icam-1* que los tumores de mayor peso.

No existe una correlación entre la dosis de dafnetina administrada a los ratones con la expresión de *Icam-1*, lo que sugiere que otras proteínas deben estar involucradas en la disminución de la aparición de tumores.

Se propone que la dafnetina posee un efecto quimioprotector, ya que retarda el tiempo de aparición y el tamaño de los tumores.

Dado que no hubo relación con la administración de dafnetina en los ratones, debe existir otro mecanismo por el cual actúa este compuesto. Por ello se propone estudiar otros genes, tales como ciclina D1 (*Ccnd1*), caderina-1 (*Cdh1*) y *Mmp2*. Estos genes pueden ser indicadores de diferenciación y proteínas que pueden favorecer la migración.

REFERENCIAS

1. Abel EL, DiGiovanni J. Environmental Carcinogenesis: en The Molecular Basis of Cancer. Meloni D ed. 3^a Edición. Saunders Elsevier. Filadelfia, EUA. 99-102, 2008
2. Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol.* 72: 1605-21, 2006
3. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. The Molecular Biology of the Cell. 5^a Edición. Garland Science. Nueva York, EUA. 922-925, 2008.
4. Allavena P, Sica A, Vecchi A, Locati M, Sozzani S, Mantovani A. The chemokine receptor switch paradigm and dendritic cell migration: its significance in tumor tissues. *Immunol Rev.* 177: 141–49, 2000
5. Anisimov VN. Biology of Aging and Cancer. *Cancer Control.* 14: 23-31, 2007
6. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet.* 357: 539-45, 2001
7. Bergsmedh A, Szeles A, Henriksson M, Bratt A, Folkman MJ, Spetz AL, Holmgren L. Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 6407–6411, 2001
8. Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome. *Cell.* 128: 669-81, 2007
9. Blanke C. Role of COX-2 Inhibitors in Cancer Therapy. *Cancer Invest.* 22: 271–282, 2004
10. Blenkiron C, Miska EA. miRNAs in cancer: approaches, aetiology, diagnostics and therapy. *Hum Mol Genet.* 16 Spec No 1: R106-13, 2007
11. Brigati C, Noonan DM, Albini A, Benelli R. Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes? *Clin. Exp. Metastasis.* 19: 247–258, 2002
12. Burke F, Relf M, Negus R, Balkwill F. A cytokine profile of normal and malignant ovary. *Cytokine.* 8: 578–85, 1996.

13. Carlson LM, Pålman S, De Geer A, Kogner P, Levitskaya J. Differentiation induced by physiological and pharmacological stimuli leads to increased antigenicity of human neuroblastoma cells. *Cell Res.* 18: 398-411, 2008
14. Chun K-S, Surh Y-J. Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. *Biochem Pharmacol.* 68: 1089–1100, 2004
15. Clària J, Romano M. Pharmacological Intervention of Cyclooxygenase-2 and 5-Lipoxygenase Pathways. Impact on Inflammation and Cancer. *Curr Pharm Des.* 11: 3431-3447, 2005
16. Cohen AJ. Critical review of the toxicology of coumarin with special reference to interspecies differences in metabolism and hepatotoxic response and their significance to man. *Food Chem Toxicol.* 17: 277-289, 1979
17. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 420: 860-7, 2002
18. Dai XD, Yin M, Jing W, DU HQ, Ye HY, Shang YJ, Zhang L, Zou YY, Qu ZP, Pan J. Expressions of atherosclerosis-related genes in aorta in young apoE/LDLR double knockout mice. *A P Sinica.* 60: 43-50, 2008
19. Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet.* 10:704-14, 2009
20. Denkert C, Köbel M, Berger S, Siegert A, Leclere A, Trefzer U, Hauptmann S. Expression of cyclooxygenase 2 in human malignant melanoma. *Cancer Res.* 61: 303–308, 2001
21. Damelin M, Sun YE, Sodja VB, Bestor TH. Decatenation checkpoint deficiency in stem and progenitor cells. *Cancer Cell.* 8: 479–484, 2005
22. De Rosa S, Mitova M, Handjieva N, Calis I. Coumarin glucosides from *Cruciata taurina*. *Phytochemistry.* 59: 447-50, 2002
23. De Visser KE, Coussens LM. The interplay between innate and adaptive immunity regulates cancer development. *Cancer Immunol Immunother.* 54: 1143–1152, 2005
24. Dexeus FH, Logothetis CJ, Sella A, Fitz K, Amato R, Reuben JM, Dozier N. Phase II study of coumarin and cimetidine in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 8: 325-9, 1990

25. Dong C, Slattery MJ, Liang S, Peng HH. Melanoma Cell Extravasation under Flow Conditions Is Modulated by Leukocytes and Endogenously Produced Interleukin 8. *Mol Cell Biomech.* 2: 145-159, 2005
26. Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science.* 300: 455, 2003
27. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med.* 358: 1148-59, 2008
28. Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zanesi N, Callegari E, Liu S, Alder H, Costinean S, Fernandez-Cymering C, Volinia S, Guler G, Morrison CD, Chan KK, Marcucci G, Calin GA, Huebner K, Croce CM. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:15805-10, 2007
29. Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet.* 7: 21-33. 2006
30. Fentem JH, Fry JR. Species differences in the metabolism and hepatotoxicity of coumarin. *Comp Biochem Physiol.* 104C: 1-8, 1993
31. Fylaktakidou KC, Hadjipavlou-Litina DJ, Litinas KE, Nicolaidis DN. Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities. *Curr Pharm Des.* 10: 3813 - 33, 2004
32. Finn GJ, Creaven B, Egan DA. Study of the *in vitro* cytotoxic potential of natural and synthetic coumarin derivatives using human normal and neoplastic skin cell lines. *Melanoma Res.* 11: 461-7, 2001
33. Finn GJ, Kenealy E, Creaven B, Egan DA. *In vitro* cytotoxic potential and mechanism of action of selected coumarins, using human renal cell lines. *Cancer Lett.* 183: 61 – 8, 2002
34. Finn GJ, Creaven BS, Egan DA. Daphnetin induced differentiation of human renal carcinoma cells and its mediation by p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem Pharmacol.* 67: 1779–1788, 2004
35. Gao Q, Shan J, Di L, Jiang L, Xu H. Therapeutic effects of daphnetin on adjuvant-induced arthritic rats. *J Ethnopharmacol.* 120: 259–263, 2008
36. Gonda TA, Tu S, Wang TC. Chronic inflammation, the tumor microenvironment and carcinogenesis. *Cell Cycle.* 8: 2005-2013, 2009

37. Hamaï A, Meslin F, Benlalam H, Jalil A, Mehrpour M, Faure F, Lecluse Y, Vielh P, Avril MF, Robert C, Chouaib S. ICAM-1 has a critical role in the regulation of metastatic melanoma tumor susceptibility to CTL lysis by interfering with PI3K/AKT pathway. *Cancer Res.* 68: 9854-64, 2008
38. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 100:57-70, 2000
39. He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, Volinia S, Calin GA, Liu CG, Franssila K, Suster S, Kloos RT, Croce CM, de la Chapelle A. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102: 19075–19080, 2005
40. Hofmanova J, Soucek K, Pachernik M, Kovarikova M, Hoferova Z, Minksova K, Netikova J, Kozubik A. Lipoxygenase inhibitors induce arrest of tumor cells in S-phase of the cell cycle. *Neoplasma.* 49: 362-7, 2002
41. Hoult JR S, Payá M. Pharmacological and Biochemical Actions of Simple Coumarins: Natural Products with Therapeutic Potential. *Gen Pharmacol.* 27: 713-722, 1996
42. Hubbard AK, Rothlein R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med.* 28: 1379-86, 2000
43. Iñiguez M, Rodríguez A, Volpert O, Fresno M, Redondo J. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. *Trends Mol Med.* 9: 73-78, 2003
44. Jackson RJ, Standart N. How do microRNAs regulate gene expression? *Sci STKE.* 367:re1, 2007
45. Jimenez-Orozco FA, Molina-Guarneros JA, Mendoza-Patino N, León-Cedeño F, Flores-Pérez B, Santos-Santos E, Mandoki JJ. Cytostatic activity of coumarin metabolites and derivatives in the B16-F10 murine melanoma cell line. *Melanoma Res.* 9: 243-247, 1999
46. Johnson JP. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 18: 345–357, 1999
47. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell.* 128: 683-92, 2007
48. Kageshita T, Yoshii A, Kimura T, Kuriya N, Ono T, Tsujisaki M, Imai K, Ferrone S. Clinical relevance of ICAM-1 expression in primary lesions and serum of patients with malignant melanoma. *Cancer Res.* 53: 4927-32, 1993

49. Kawaii S, Tomono Y, Ogada K. The antiproliferative effect of coumarins on several cancer cell lines. *Anticancer Res.* 21: 917-24, 2001
50. Kawase M, Sakagami H, Hashimoto K, Tani S, Hauer H, Chatterjee SS. Structure-cytotoxic activity relationships of simple hydroxylated coumarins. *Anticancer Res.* 23: 3243-6, 2003
51. Keibel A, Singh V, Sharma MC. Inflammation, Microenvironment, and the Immune System in Cancer Progression. *Curr Pharm Des.* 15: 1949-1955, 2009
52. Kimura Y, Okuda H, Arichi S, Baba K, Kozawa M. Inhibition of the formation of 5-hydroxy-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid from arachidonic acid in polymorphonuclear leukocytes by various coumarins. *Biochim Biophys Acta.* 834: 224-9, 1985
53. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. 2006. *Kuby Immunology.* 6^a Edición. W. H. Freeman and Company, Nueva York. 450-456, 2006
54. Kochenderfer JN, Gress RE. A Comparison and Critical Analysis of Preclinical Anticancer Vaccination Strategies. *Exp Biol Med (Maywood).* 232: 1130-41, 2007
55. Kokron O, Gasser G, Schimdt PR. Cimetidine and coumarin therapy of renal cell carcinoma. *Oncology.* 48: 102-106, 1991
56. Kollias G, Douni E, Kassiotis G, Kontoyiannis D. On the role of tumor necrosis factor and receptors in models of multiorgan failure, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *Immunol Rev.* 169: 175–94, 1999
57. Kolodziej H, Kayser O, Woerdenbag HJ, van Uden W, Pras N. Structure-cytotoxicity relationships of a series of natural and semi-synthetic simple coumarins as assessed in two human tumour cell lines. *Z Naturforsch C.* 52: 240-4, 1997
58. Kondo Y, Shen L, Cheng AS, Ahmed S, Bumber Y, Charo C, Yamochi, T, Urano T, Furukawa K, Kwabi-Addo B, Gold DL, Sekido Y, Huang TH, Issa JP. Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation. *Nat. Genet.* 40: 741–750, 2008

59. Kristensen LS, Nielsen HM, Hansen LL. Epigenetics and cancer treatment. *Eur J Pharmacol.* 625:131-142, 2009
60. Kundu JK, Surh YJ. Inflammation: Gearing the journey to cancer. *Mutat Res.* 659: 15–30, 2008
61. Lake BG. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. *Food Chem Toxicol.* 37: 423-53, 1999
62. Liang S, Slattery MJ, Wagner D, Simon SI, Dong C. Hydrodynamic shear rate regulates melanoma-leukocyte aggregation, melanoma adhesion to the endothelium, and subsequent extravasation. *Ann Biomed Eng.* 36: 661-71, 2008
63. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature.* 396: 643-9, 1998
64. Liang S, Sharma A, Peng HH, Robertson G, Dong C. Targeting mutant (V600E) B-Raf in melanoma interrupts immunoediting of leukocyte functions and melanoma extravasation. *Cancer Res.* 67: 5814-20, 2007
65. Liu J, Tian J, Li Y, Yao X, Hu Z, Chen X. Binding of the bioactive component daphnetin to human serum albumin demonstrated using tryptophan fluorescence quenching. *Macromol Biosci.* 4: 520–5, 2004
66. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *METHODS* 25. 402–408, 2001
67. Lodish H, Berk A, Zipursky L, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Cancer: en Molecular Cell Biology.* W. H. Freeman and Company. Nueva York. 1054–1084, 1999
68. Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP. Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:776-81, 2003
69. Lopez-Gonzalez JS, Prado-Garcia H, Aguilar-Cazares D, Molina-Guarneros JA, Morales-Fuentes J, Mandoki JJ. Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxycoumarin on human lung carcinoma cell lines. *Lung Cancer.* 43: 275-83, 2004

70. Lopez-Gonzalez JS, Prado-Garcia H, Molina-Guarneros JA, Mendoza-Patiño N, Rosas-Medina P, Mandoki JJ. Mechanisms of antitumor effects of simple coumarins in murine melanoma and human non-small cell lung carcinoma cell lines: en Coumarin anticoagulant research progress. Edardes J ed. Nova Science Publishers, Inc. Nueva York, EUA. 99-112, 2008
71. Marshall ME, Mendelsohn L, Butler K, Riley LK, Cantrell J, Harvey J, Wiseman C, Taylor T, Macdonald JS. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with coumain (1, 2-benzopyrone) and cimetidine: a pilot study. *J Clin Oncol.* 5: 862-866, 1987
72. Marshall ME, Butler K, Cantrell J, Harvey J, Wiseman C, Mendelsohn L. Effects with coumain (1,2-benzopyrone) and cimetidine: a pilot study. *J Clin Oncol.* 8: 62-69, 1989
73. Marshall ME, Butler K, Cantrell J, Wiseman C, Mendelsohn L. Treatment of advanced malignant melanoma with coumarin and cimetidine: a pilot study. *Cancer Chemother Pharmacol.* 24: 65-6, 1989
74. Marshall ME, Butler K, Fried A. Phase I evaluation of coumarin (1,2-benzopyrone) and cimetidine in patients with advanced malignancies. *Mol Biother.* 3: 170-8, 1991
75. Marshall ME, Kervin K, Benefield C, Umerani A, Albainy-Jenei S, Zhao Q, and Khazaeli MB. Growth-inhibitory effects of coumarin (1,2- benzopyrone and 7-dihydroxycoumarin on human malignant cell lines *in vitro*. *J Cancer Res Clin Oncol.* 120 (Suppl): S2-S10, 1994.
76. Marvin MR, Southall JC, Trokhan S, DeRosa C, Chabot J. Liver metastases are enhanced in homozygous deletionally mutant ICAM-1 or LFA-1 mice. *J Surg Res.* 80: 143-8, 1998
77. Masumoto H, Hawke D, Kobayashi R, Verreault A. A role for cell-cycle-regulated histone H3 lysine 56 acetylation in the DNA damage response. *Nature.* 436: 294-8, 2005
78. Michor F, Iwasa Y, Vogelstein B, Lengauer C, Nowak MA. Can chromosomal instability initiate tumorigenesis? *Semin Cancer Biol.* 15: 43-9. 2005

79. Miele ME, Bennett CF, Miller BE, Welch DR. Enhanced metastatic ability of TNF- α -treated malignant melanoma cells is reduced by intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD54) antisense oligonucleotides. *Exp Cell Res.* 214: 231-41, 1994
80. Mohler JL, Gomella LG, Crawford ED, Glode LM, Zippe CD, Fair WR, Marshall ME. Phase II evaluation of coumarin (1,2-benzopyrone) in metastatic prostatic carcinoma. *Prostate.* 20:123-31, 1992
81. Morandini R, Boeynaems JM, Hedley SJ, MacNeil S, Ghanem G. Modulation of ICAM-1 expression by α -MSH in human melanoma cells and melanocytes. *J Cell Physiol.* 175: 276-82, 1998
82. Mu LY, Wang QM, Ni YC. In vitro antimalarial effect of daphnetin relating to its iron-chelating activity. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi.* 20: 83-5, 2002
83. Niessen HW, Krijnen PA, Visser CA, Meijer CJ, Hack CE. *Ann N Y Acad Sci.* 973: 573-85, 2002
84. Opdyke DL. Monographs on fragrance raw materials. *Food Cosmet Toxicol.* 12: 807S–1016S, 1974.
85. Pfaffl MW. Relative quantification: en Real Time PCR. Dorak MT ed. Taylor and Francis Group. New Castle. 63-80, 2006.
86. Piantoni P, Bionaz M, Graugnard DE, Daniels KM, Akers RM, Loo JJ. Gene expression ratio stability evaluation in prepubertal bovine mammary tissue from calves fed different milk replacers reveals novel internal controls for quantitative polymerase chain reaction. *J Nutr.* 138: 1158-64, 2008
87. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer.* 4: 71-8, 2004
88. Qin S, Parthun MR. Histone H3 and the histone acetyltransferase Hat1p contribute to DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol.* 22: 8353-65, 2002
89. Ramzi SC, Vinay K, Stanley LR. *Patología Estructural y funcional.* 5ta Edición. Edit Interamericana Mc Graw Hill. Págs. 57-104, 1995.
90. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414: 105–111, 2001

91. Roebuck KA, Finnegan A. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J Leukoc Biol.* 66: 876-88, 1999.
92. Román-Rosales AA. Estudio *in vitro* e *in vivo* de los efectos estrogénicos de esculetina y dafnetina. (Tesis de licenciatura) Facultad de Química, UNAM. 50 páginas. 2007.
93. Rosette C, Roth RB, Oeth P, Braun A, Kammerer S, Ekblom J, Denissenko MF. Role of ICAM1 in invasion of human breast cancer cells. *Carcinogenesis.* 26: 943-50, 2005
94. Sawan C, Vaissière T, Murr R, Herceg Z. Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. *Mutat Res.* 642: 1-13, 2008
95. Scarfi S, Benatti U, Pozzolini M, Clavarino E, Ferraris C, Magnone M, Valisano L, Giovine M. Ascorbic acid-pretreated quartz enhances cyclooxygenase-2 expression in RAW 264.7 murine macrophages. *FEBS J.* 274: 60-73, 2007
96. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 75: 163-89, 2004
97. Seliger B, Ritz U, Abele R, Bock M, Tampé R, Sutter G, Drexler I, Huber C, Ferrone S. Immune escape of melanoma: first evidence of structural alterations in two distinct components of the MHC class I antigen processing pathway. *Cancer Res.* 61: 8647-50, 2001
98. Shilling WH, Crampton RF, Longland RC. Metabolism of coumarin in man. *Nature.* 221: 664-5, 1969
99. Shipley GL. An introduction to real-time PCR: en Real Time PCR. Dorak MT ed. Taylor and Francis Group. New Castle. 1-29, 2006
100. Sica A, Allavena P, Mantovani A. Cancer related inflammation: the macrophage connection. *Cancer Lett.* 267: 204-15, 2008
101. Sinha S, Qidwai T, Kanchan K, Anand P, Jha GN, Pati SS, Mohanty S, Mishra SK, Tyagi PK, Sharma SK; Indian Genome Variation Consortium, Venkatesh V, Habib S. Variations in host genes encoding adhesion molecules and susceptibility to falciparum malaria in India. *Malar J.* 7: 250, 2008

102. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature*. 414: 98-104, 2001
103. Su XL, Lin RC, Wong SK, Tsui SK, Kwan SY. Identification and characterisation of the chinese herb Langdu by LC-MS/MS analysis. *Phytochem Anal*. 14: 40-7, 2003
104. Subbaramaiah K, Dannenberg A. Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment. *Trends Pharmacol Sci*. 24: 96-102, 2003
105. Tamura K, Fukuoka M. Molecular target-based cancer therapy: tyrosine kinase inhibitors. *Int J Clin Oncol*. 8(4):207-11, 2003
106. Takanami I, Takeuchi K, Kodaira S. Tumor-associated macrophage infiltration in pulmonary adenocarcinoma: association with angiogenesis and poor prognosis. *Oncology*. 57: 138-42, 1999
107. Thornes RD, Lynch G, Sheehan MV. Cimetidine and coumarin therapy of melanoma. *Lancet*. 2: 328, 1982
108. Thornes RD, Lynch G. Combination of cimetidine with other drugs for treatment of cancer. *N Engl J Med*. 308: 591-592, 1983
109. Thornes RD, Daly L, Lynch G, Breslin B, Browne H, Browne HY, Corrigan T, Daly P, Gaffney E. Treatment with coumarin to prevent or delay recurrence of malignant melanoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 120 Suppl: S32-4, 1994
110. Tsung K, Dolan JP, Tsung YL, Norton JA. Macrophages as effector cells in interleukin 12 -induced T cell-dependent tumor rejection. *Cancer Res*. 62: 5069-5075, 2002
111. Tysnes BB, Bjerkvig R. Cancer initiation and progression: involvement of stem cells and the microenvironment. *Biochim Biophys Acta*. 1775: 283-97, 2007
112. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 3: RESEARCH0034, 2002
113. Velasco-Velázquez MA, Molina-Guarneros JA, Barrera Oviedo D, Jiménez Orozco A, Mendoza-Patiño N, Mandoki JJ. Anormalidades en el sistema

- adhesivo de neoplasias pulmonares. Revista del Instituto Nacional de Cancerología. 46: 189-195, 2000
114. Villegas-Velázquez I. Estudio de los efectos antitumorales *in vivo* de dafnetina en ratones "C57BL/6" inoculados con células del melanoma murino B16. (Tesis de licenciatura) Universidad Autónoma Metropolitana. 27 páginas. 2007
115. Wang QM, Ni YC, Guo J, Wu JT, Qian YJ. Comparative study on schizontocidal activity of recrystallized or crude daphnetin against malaria parasites. Biomed Environ Sci. 17:397-401, 2004
116. Weber US, Steffen B, Siegers CP. Antitumor activities of coumarin, 7-hydroxy-coumarin and its glucoronide en several human tumor cell lines. Res Commun Mol Pathol Pharmacol. 99: 193-206, 1998
117. Weishaupt C, Munoz KN, Buzney E, Kupper TS, Fuhlbrigge RC. T-cell distribution and adhesion receptor expression in metastatic melanoma. Clin Cancer Res. 13: 2549-56, 2007
118. a. Yamada M, Yanaba K, Hasegawa M, Matsushita Y, Horikawa M, Komura K, Matsushita T, Kawasuji A, Fujita T, Takehara K, Steeber DA, Tedder TF, Sato S. Regulation of local and metastatic host-mediated anti-tumour mechanisms by L-selectin and intercellular adhesion molecule-1. Clin Exp Immunol. 143: 216-27, 2005
119. b. Yamada M, Yanaba K, Takehara K, Sato S. Clinical significance of serum levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 and soluble L-selectin in malignant melanoma. Arch Dermatol Res. 297: 256-60, 2005
120. Yang EB, Zhao YN, Zhang K, Mack P. Daphnetin, one of coumarin derivatives, is a protein kinase inhibitor. Biochem Biophys Res Commun. 260: 682 - 5, 1999
121. Yesilada E, Taninaka H, Takaishi Y, Honda G, Sezik E, Momota H, Ohmoto Y, Taki T. *In vitro* inhibitory effects of Daphne oleoides ssp. oleoides on inflammatory cytokines and activity-guided isolation of active constituents. Cytokine. 13: 359 - 64, 2001

122. You YH, Pfeifer GP. Similarities in sunlight-induced mutational spectra of CpG-methylated transgenes and the p53 gene in skin cancer point to an important role of 5-methylcytosine residues in solar UV mutagenesis. *J Mol Biol.* 305: 389-99, 2001
123. Zhang W, Zhang WD, Li TZ, Zhang C, Liu RH, Zhou Y, Su J. Studies on the chemical constituents in roots of *Daphne odora var. Atrocaulis*. [Zhongguo Zhong Yao Za Zhi](#). 7: 513 – 5, 2005
124. Zänker KS, Blumel G, Lange J, Stewart JR. Coumarin in melanoma patients: an experimental and clinical study. *Drugs Exp. Clin. Res.* 10: 767-774, 1984