



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGIA EXPERIMENTAL

**ESTUDIO IN VITRO DEL EFECTO ACTIVADOR DE LA 7-HIDROXICUMARINA EN
LA LÍNEA CELULAR A549 DE ADENOCARCINOMA PULMONAR HUMANO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

SOTO NÚÑEZ MARIBEL

TUTOR DE TESIS: DR. JUAN ARCADIO MOLINA GUARNEROS.
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. LUIS FELIPE JIMENEZ GARCÍA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM
DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, CD. MX., JUNIO, 2017.



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.



Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 13 de febrero de 2017, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **SOTO NUÑEZ MARIBEL** con número de cuenta **97438502**, con la tesis titulada **“ESTUDIO IN VITRO DEL EFECTO ACTIVADOR DE LA 7-HIDROXICUMARINA EN LA LÍNEA CELULAR A549 DE ADENOCARCINOMA PULMONAR HUMANO”**, realizada bajo la dirección del **DR. JUAN ARCADIO MOLINA GUARNEROS**:

Presidente: DR. JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ
Vocal: DRA. ISABEL SOTO CRUZ
Secretario: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Suplente: DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ
Suplente: DR. ABRAHEM LANDA PIEDRA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 08 de mayo de 2017

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

- Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.
- Al apoyo recibido de CONACYT 98729.
- Al apoyo a Proyectos de Investigación PAPIIT IN216812
- Al Dr. Juan A. Molina Guarneros y a los miembros del comité tutorial: Dr. Luis Felipe Jiménez García y Dr. Abraham Landa Piedra por su tutoría para el desarrollo del presente trabajo.

INDICE

Resumen	1
Abstract	2
1.INTRODUCCIÓN	3
1.1 Epidemiología del cáncer pulmonar	3
1.2 Cáncer de pulmón	4
1.2.1 Clasificación del cáncer de pulmón	4
1.3 Adenocarcinoma	5
1.4 Quimioterapias y Cumarina	7
1.5 Cumarinas	8
1.6 Apoptosis	10
1.6.1 Etapas de la apoptosis	11
1.6.2 La vía extrínseca	12
1.6.3 La vía intrínseca	13
1.6.4 La vía del calcio	14
1.7 Caspasas	15
1.7.1 Estructura de caspasas	16
1.7.2 Especificidad de caspasas	17
1.8 Caspasa 3	18
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo General	20
2.2 Objetivos Secundarios	20
3. HIPÓTESIS	20
4. ANTECEDENTES	21
4.1. Justificación del estudio	23
5. METODOLOGÍA	24
5.1 Cultivo celular	25
5.2 Ensayos de viabilidad celular	25
5.3 Inducción de apoptosis por exposición a 7-hidroxycumarina	26
5.3.1 Ensayos de Concentración-Respuesta	26
5.3.2 Ensayos de curso temporal	26
5.4 Aislamiento y cuantificación de proteína	26
5.5 Ensayos colorimétricos para elaborar cursos temporales y curvas dosis respuesta de la actividad de caspasa 3	27
5.6 Ensayos de inmunoelectrotransferencia	28
5.6.1 Electroforesis SDS-PAGE	28
5.6.2 Transferencia	29
5.6.3 Inmunodetección	29
5.6.4 Análisis semi-cuantitativo de inmunodetección	30
5.7 Observación de cambios morfológicos que indican apoptosis	30

5.8 Ensayos de conductancia de calcio	30
5.8.1 Inhibición de canales activados por reservorios SKF-96363	31
5.9 Microinyección en célula única	32
5.9.1 Elaboración de micropuntas	32
5.9.2 Microinyección de célula única <i>in vitro</i>	33
5.9.3 Ensayos de actividad de caspasa 3 mediante microinyección de célula única	34
5.9.4 Captura y Análisis de Imágenes	34
5.9.5 Análisis Estadístico	35
6. RESULTADOS	36
6.1 Estimación de la viabilidad celular por exposición de las células A-549 a la 7-hidroxicumarina	36
6.2 Determinación de la actividad de caspasa 3	37
6.3 Inmunodetección de procaspasa y caspasa 3	38
6.3.1 Inmunodetección de PARP el sustrato de caspasa 3	42
6.4 Cambios morfológicos característicos de apoptosis en la línea celular A-549 tratadas con 7-hidroxicumarina	43
6.5 Incremento en la conductancia del calcio intracelular en células A-549 tratadas con 7-hidroxicumarina	44
6.5.1 Efecto de la 7-hidroxicumarina en la concentración de calcio intracelular en células A-549.	45
6.5.2 Inhibición de canales activados por reservorios TRP con SFK-96363	47
6.6 Ensayos de microinyección en célula única <i>in vitro</i> tratadas con 7-hidroxicumarina para determinar la cinética de activación de la caspasa 3	48
6.6.1 Evaluación de parámetros del estirador para la fabricación de puntas de microinyección	48
6.6.2 Ensayos de inyección: modificación de presión	49
6.6.3 Ensayos de microinyección en células A-549 sin tratamiento para evaluar la duración de la fluorescencia	50
6.6.4 Microinyección en célula única <i>in vitro</i> para la determinación de la cinética de activación de caspasa 3	51
6.6.5 Cinética de actividad de caspasa 3 resultado de la exposición a 7-hidroxicumarina en células A-549 y análisis de imágenes	52
6.6.6 Incremento en la actividad de caspasa 3 cuando las células son expuestas a 7-hidroxicumarina a diferentes tiempos	59
6.6.7 Análisis de la velocidad inicial de la cinética de caspasa 3	59
7. DISCUSIÓN	63
8. CONCLUSIONES	68
9. LITERATURA CITADA	69
ANEXO	74
Artículo requisito. Single-cell microinjection Assay indicates that 7-hydroxycoumarin induces rapid activation of caspase-3 in A549 cancer cells.	

RESUMEN

En años recientes las cumarinas han sido objeto de estudio debido a su efecto citostático y apoptótico en células cancerosas humanas. El objetivo del presente estudio fue determinar si la 7-hidroxicumarina (7-HC) induce cambios en la actividad de la caspasa 3 en células A-549 de adenocarcinoma pulmonar humano utilizando ensayos colorimétricos, electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS), inmunoelectrotransferencia y microinyección en célula única *in vitro*. Una exposición a 1.85mM de 7-HC indujo 60% de actividad de caspasa 3, así como un notable desdoblamiento de procaspasa 3 y degradación proteolítica de la poli-ADP-ribosa-polimerasa (PARP), sustrato de caspasa 3 (C-3). Asimismo se observaron cambios morfológicos asociados a apoptosis derivados de la exposición a 7-HC en éstas células, además, después de 3 y 6 h de exposición la conductancia del calcio se incrementó en un 27%. Al realizar microinyección en célula única con un sustrato específico y fluorescente de caspasa 3 en células previamente expuestas a 7-HC, se identificó una cinética enzimática típica de la activación de caspasa 3 varias horas antes de que se observen los cambios morfológicos y bioquímicos.

Estos resultados proveen evidencia experimental de la rápida activación *in vivo* de C-3 debido a la exposición a la 7-HC que es el metabolito principal de la biotransformación de cumarina en humanos.

ABSTRACT

In recent years, coumarins have risen intense interest in recent years due to their apoptogenic effects. The aim of the present study was to determine whether 7-hydroxycoumarin (7-HC) induces changes in caspase-3 (C-3) activity in A-549 human lung carcinoma cells. A range of analytical techniques, including colorimetric and fluorometric assays, western blotting, single-cell microinjection, fluorescence microscopy and image analysis were conducted to elucidate the effects of 7-HC. A 24-h exposure to 1.85 mM 7-HC induced a 65% increase in C-3 activity, and a notable conversion of procaspase-3 into C-3, in addition to poly (ADP-ribose) polymerase cleavage. Furthermore, morphological changes associated with apoptosis were observed. Cell exposure to 7-HC for 3 to 6 h increased calcium conductance by 27%. By performing the single-cell microinjection of a specific fluorescent substrate of C-3 into previously 7-HC-exposed cells, a typical enzymatic kinetic profile of C-3 activation was identified a number of hours prior to the morphological and biochemical changes associated with apoptosis being observed. These results suggest that the rapid *in vitro* activation of C-3 is induced by 7-HC, the most relevant biotransformation product of coumarin in humans.

1. INTRODUCCION

1.1 Epidemiología del cáncer pulmonar

El cáncer es la principal causa de muerte en todo el mundo. En 2015 se atribuyeron a esta enfermedad 8,8 millones de defunciones. Los cinco tipos de cáncer que causan un mayor número de fallecimientos son los siguientes: pulmonar (1,69 millones de defunciones), hepático (788,000 defunciones), colorrectal (774,000 defunciones), gástrico (754,000 defunciones) y mamario (571,000 defunciones). De ellos, el cáncer de pulmón constituye la principal causa de muerte a nivel mundial: 14.1 millones de personas fueron diagnosticadas con cáncer en todo el mundo, de las cuales el 13% correspondió a cáncer de pulmón ocupando el primer lugar de enfermedades neoplásicas. Así 1.69 millones de personas murieron a causa de cáncer de pulmón correspondiente al 19% de casos. La tasa de incidencia y mortalidad global estimadas en el año 2012 fueron de 23.1 y 19.4 casos por 100,000 habitantes, respectivamente.¹

El cáncer de pulmón es la primera causa de muerte por cáncer en México. En 2012, la tasa de incidencia y mortalidad fueron de 7.5 y 6.7 casos por 100,000 habitantes, respectivamente.² El índice de fatalidad es de 0.96, es decir, casi el 100% de los pacientes muere a causa de este padecimiento al año, ya que en comparación con los países desarrollados, en México los enfermos con cáncer pulmonar se presentan a recibir atención especializada en etapas más avanzadas de la enfermedad.³

Datos del INEGI indican que el cáncer pulmonar es la tercera causa de muerte en el sexo masculino, con una tasa de mortalidad de 14.71 y la cuarta causa en población femenina, con una tasa de mortalidad de 6.83 por cada 100,000 habitantes.⁴

En Estados Unidos, el instituto Nacional de Cáncer reporta que el estimado de cáncer de pulmón y bronquios para el 2017 representan el 13.2% de todos los casos de cáncer. El número estimado de casos para el año 2017 es de 222,500 y de fallecimientos serán el 25.9% de todos los casos de cáncer⁵ El costo anual promedio en el año 2014 del tratamiento para esta patología fue de 131,664 dólares por paciente.⁶

1.2 Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es una enfermedad que se caracteriza por una división acelerada y descontrolada de células modificadas genéticamente y/o epigenéticamente, que dan origen a tejido neoplásico en el pulmón que adquiere la habilidad de invadir partes adyacentes del cuerpo y de propagarse a otros órganos en un proceso conocido como metástasis.¹

Las células cancerígenas difieren de las células normales del tejido de origen en el control del crecimiento celular, su morfología, en las interacciones entre células, propiedades de adhesión, la estructura del citoesqueleto, secreción de proteínas y expresión génica. Todos estos cambios surgen de mutaciones acumuladas por la alta tasa de división celular, provocada por las primeras mutaciones en proto-oncogenes, genes supresores y genes de reparación de ADN. Los proto-oncogenes son genes cuya mutación o cambio epigenético tiene efectos de ganancia de función, es decir, la expresión de estos genes induce el comportamiento maligno en la célula transformada; mientras que la modificación de los genes supresores provoca la pérdida de función. Los genes supresores generalmente son reguladores negativos de la proliferación celular.

1.2.1 Clasificación del cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón se puede clasificar de acuerdo a estudios citológicos y biopsias en carcinoma de pulmón de células pequeñas o microcítico (CPCP) y carcinoma de pulmón de células no pequeñas o no microcítico (CPCNP).⁷

El CPCNP es el tipo más común de cáncer de pulmón y constituye el 87% de todos los tumores de pulmón. Es de crecimiento más lento y menos sensible a los tratamientos (radioterapia y quimioterapia) que el CPCP y se subdivide en tres subtipos principalmente: carcinoma de células escamosas o epidermoide, carcinoma poco diferenciado y adenocarcinoma.

1.3 Adenocarcinoma Pulmonar

El adenocarcinoma presenta la mayor frecuencia epidemiológica con el 50% de los casos de cáncer de pulmón. Es el subtipo con menor asociación al tabaquismo y el más frecuente en individuos no fumadores. Este tipo de cáncer se localiza generalmente en las regiones periféricas, a partir de células broncoalveolares mucoproductoras con diferenciación glandular. El diagnóstico de adenocarcinoma se realiza por la observación de formaciones glandulares secretoras de moco en cortes histológicos. En ausencia de estos componentes se recomienda realizar un panel de inmunohistoquímica para clasificar a la neoplasia (Figura 1).

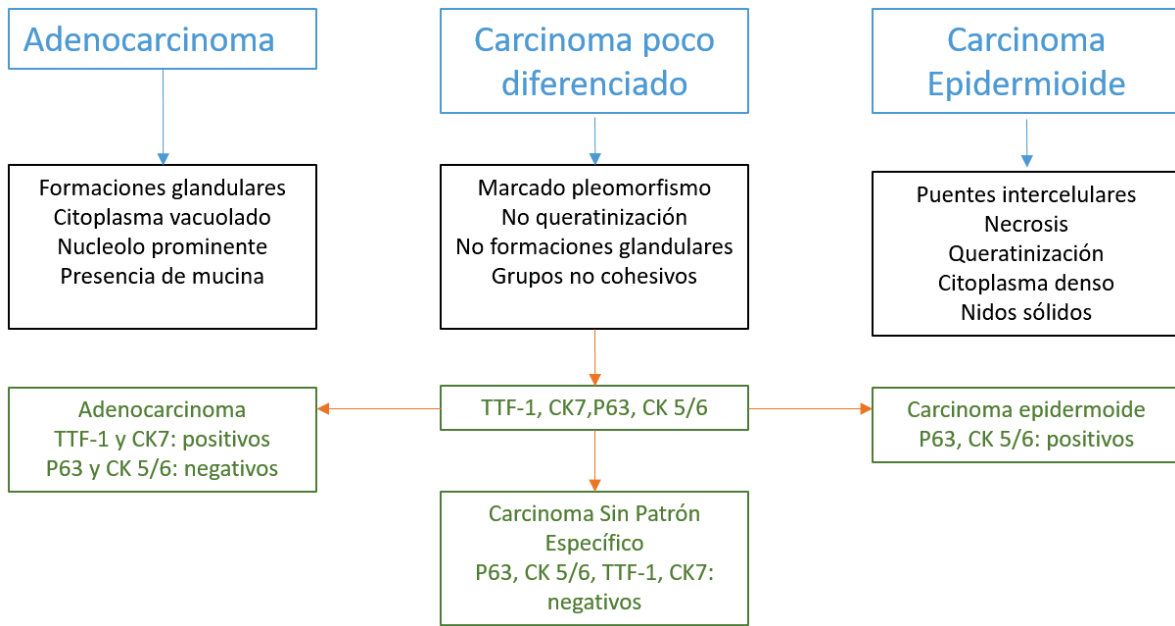


Figura 1. Modelo para diagnóstico de carcinoma de pulmón de células no pequeñas. (Modificada de Arrieta, 2013) TTF-1: Factor-1 de transcripción tiroide, CK 5/6: Citoqueratina 5/6, CK7:Citoqueratina 7, P63: proteína tumoral codificada por el gen TP63.

El adenocarcinoma pulmonar presenta heterogeneidad clínica, radiológica, patológica y molecular, así, se han realizado cambios a su clasificación en las últimas décadas, reflejados en la clasificación de la OMS del 2004 en la que más del 80% de los adenocarcinomas están clasificados como subtipos mixtos, lo que ha resultado en una clasificación no clara. Además, desde el año 2004 mutaciones en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) fueron descritas, asociándose a la patogénesis y factores predictivos del adenocarcinoma. En los últimos años la Asociación para el Estudio del Cáncer Pulmonar, la Sociedad Torácica Americana y la Sociedad Europea Respiratoria, han realizado una nueva clasificación de adenocarcinoma pulmonar.⁸

Tabla I. Clasificación de adenocarcinoma pulmonar IASLC/ATS/ERS.⁹

TIPOS DE ADENOCARCINOMA PULMONAR
Lesiones Preinvasivas
<ul style="list-style-type: none">• Hiperplasia adenomatosa atípica
Adenocarcinoma <i>in situ</i>
<ul style="list-style-type: none">• Mucinoso• No mucinoso• Mixto
Adenocarcinoma mínimamente invasivo
<ul style="list-style-type: none">• Mucinoso• No mucinoso• Mixto
Adenocarcinoma Invasivo
<ul style="list-style-type: none">• Lepídico• Acinar• Papilar• Micropapilar• Sólido

1.4 Quimioterapias y cumarina

De acuerdo al Instituto Nacional de Cáncer de E.U., las terapias para el cáncer son fármacos u otras sustancias que interfieren con moléculas específicas involucradas en el crecimiento celular y la sobrevida. Los fármacos en estas terapias actúan diferente a los quimioterapéuticos y casi siempre tienen efectos adversos menos severos. Actualmente, estos fármacos se utilizan únicamente en etapas avanzadas de cáncer pulmonar, solos o en conjunto con los quimioterapéuticos. Entre Los nuevos fármacos empleados destacan el pemetrexed, el erlotinib, el gefitinib, el crizotinib y el bevacizumab, capaces de aumentar la media de sobrevida en unos cuantos meses aunque con un elevado costo económico.

Tabla II Nuevos Fármacos empleados en el tratamiento de cáncer pulmonar

Bevacizumab Avastin®	Anticuerpo monoclonal recombinante humanizado igG1 que se une al factor de crecimiento endotelial vascular previniendo la proliferación de células endoteliales y formación de nuevos vasos.
Crizotinib Xalcori®	Inhibidor de cinasas, incluyendo la cinasa de linfoma anaplásico (ALK). Previene la expresión de proteínas oncogénicas de fusión, lo que impide la proliferación celular y la prevalencia de estas proteínas en los tumores. (No a la venta en México)
Erlotinib Tarceva®	Inhibidor reversible de la actividad tirosina cinasa del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR). Inhibe la autofosforilación de residuos de tirosina asociados al EGFR moderando la señalización, supervivencia y proliferación celular.
Gefitinib Iressa®	Es de primera línea en cáncer pulmonar de células no pequeñas, con mutación en el EGFR, su afinidad por el factor mutado es mayor que por el silvestre. Previene su autofosforilación bloqueando la proliferación dependiente de EGFR.

Estas terapias frecuentemente son citostáticas, es por eso que es muy importante identificar estos blancos clave en el desarrollo y supervivencia de las células cancerosas. Varias de estas terapias han sido aprobadas por la FDA (Food and Drug Administration) como fármacos huérfanos para tratar tipos específicos de cáncer. Entre estos fármacos huérfanos se encuentra la Cumarina (Onkolox) para tratar el cáncer de riñón desde 1994.¹⁰

1.5 Cumarinas

Las cumarinas son metabolitos secundarios bicíclicos con propiedades aromáticas muy comunes en plantas. Se han aislado cumarinas de 800 especies de plantas y microorganismos y se han reportado más de mil compuestos derivados. Muchas moléculas clasificadas como cumarinas se caracterizan por tener efecto biológico como propiedades antineoplásicas, antibióticas, antifúngicas, antiinflamatorias, antivirales, antipsicóticas, anticoagulantes y antioxidantes.^{11,12} Además, tienen un

papel importante como aditivos en la industria alimenticia por sus propiedades antioxidantes, en la industria farmacéutica y en la industria cosmética se utilizan como fijador y potenciador en perfumes, jabones y detergentes; por sus propiedades fluorescentes también son utilizados como marcadores para análisis y tinciones en estudios clínicos de fase 1 y 2.^{13,14} La estructura básica de las cumarinas contiene un anillo bencénico y un anillo heterocíclico de α -pirona (Figura 2).

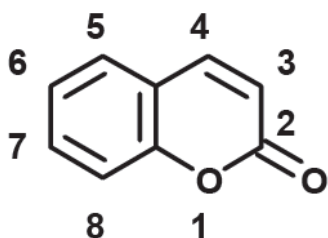


Figura 2. Estructura de la cumarina enumerando los posibles sustituyentes

Se estima que la exposición diaria máxima a la cumarina simple proveniente de alimentos en un individuo es de 20 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, y de 40 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ derivado de productos cosméticos. Una persona de 60 Kg consumiría 3.6 mg por día. No se han observado efectos adversos a la cumarina con un consumo 100 veces superior al derivado de alimentos, es decir, 120 mg por día.¹⁵

La Administración de Seguridad y Salud Ocupacional Estadounidense considera que la cumarina no se debe clasificar como cancerígena para humanos y no se han reportado intoxicaciones por el consumo de esta molécula.¹⁶

En el humano la vía principal de metabolización es la hidroxilación en el carbono 7 catalizada por la enzima CYP2A6 del citocromo P450. La 7-hidroxycumarina se excreta en la orina como glucurónido y su tiempo de vida media en la circulación es de 1.5 horas y el 80% del fármaco es excretado por vía renal.¹⁷ La mayor actividad antiproliferativa de la cumarina es atribuible a este metabolito.¹⁸

Debido a sus propiedades bioquímicas, las cumarinas han sido utilizadas en la clínica para tratar diversas condiciones como linfoedema y otros edemas relacionados,¹⁹ infecciones crónicas^{20,21} o para el tratamiento del cáncer.^{20,22,14} Las cumarinas han atraído el interés en años recientes por su efecto apoptogénico. La inducción de apoptosis por cumarinas naturales y sintéticas se han reportado en células de leucemia humana, líneas celulares de cáncer de pulmón, adipocitos, células Hela, carcinoma hepatocelular, células de hepatoblastoma y de carcinoma de próstata humano.^{23,24,25,26}

La inducción de apoptosis mediada por 7-hidroxicumarina ocurre a través de la vía mitocondrial, modulando al factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B), proteína cinasa mitógeno activada (MAPK) y vía p53 que activan mecanismos dependientes de caspasa-3. Recientemente, se ha descrito la regulación a la baja de Rho GTPasas (RhoGDI α) mediante un enfoque proteómico y de transcripción.²⁷

1.6 APOPTOSIS

La apoptosis es un proceso celular de muerte no necrótica. En organismos multicelulares muchos de los mecanismos que controlan la homeostasis de los tejidos están ligados a procesos apoptóticos.²⁸

La apoptosis se caracteriza por diferentes cambios morfológicos y bioquímicos que inducen a la muerte de la célula,²⁹ como la disminución del volumen celular, el aislamiento respecto de las células que la limitan (en el caso que éstas sean adherentes) y un aspecto esférico. Se generan también unas estructuras a modo de pequeñas evaginaciones esféricas surgidas a partir de la membrana, que se denominan *ampollas*.³⁰ Se sabe que durante la apoptosis se produce una reorganización del citoesqueleto por la proteólisis de muchos de sus componentes generando este tipo de estructuras,

la cromatina se condensa, se presenta fragmentación nuclear y la formación de cuerpos apoptóticos. En las células en proceso de apoptosis también se producen cambios en la asimetría de la membrana. La bicapa lipídica que forma la membrana plasmática tiene una composición y orientación determinada. De los fosfolípidos que conforman la membrana citoplasmática, los que contienen colina, esfingomielinina y fosfatidilcolina, están orientadas al exterior, mientras que la mayoría de los aminofosfolípidos, fosfatidilserina, y fosfatidiletanolamina, están orientados al interior.

Durante la apoptosis, ocurre exteriorización de aminofosfolípidos como uno de los fenómenos más precoces. Este evento es muy importante para el proceso general de la apoptosis, ya que “marca” a las células para su posterior fagocitosis.²⁹

1.6.1 Etapas de la apoptosis

El proceso apoptótico puede dividirse en tres etapas: la iniciación, ejecución y eliminación

- **Iniciación:** existen tres vías para comenzar un proceso apoptótico: la primera es mediada por receptores de muerte en la superficie celular, conocida como vía extrínseca. La segunda es conocida como la vía intrínseca y es mediada por las mitocondrias y la tercera es la vía del calcio y es mediada por cambios en la concentración de calcio en el REL (Figura 2). En estas vías se activa una cadena de señalización mediada por caspasas.
- **Ejecución:** una vez que las caspasas iniciadoras se unen a sus sustratos se activan las caspasas ejecutoras caspasa -3, caspasa-6 y caspasa-7. Las caspasas ejecutoras activas amplifican la cascada proteolítica de las caspasas y degradan los sustratos de muerte llamados así por ser necesarios para la supervivencia celular. La escisión de las proteínas actina, plectina, ROCK-1 y gelsolina provoca la fragmentación de la célula, primero mediante el fenómeno de *formación de ampollas* y finalmente la formación de cuerpos apoptóticos.

- Eliminación: en la membrana celular después del fenómeno de exteriorización de fosfatidilserina y moléculas glucosídicas como ácido siálico que “marcan” los cuerpos apoptóticos, los macrófagos reconocen estas señales y los fagocitan.³¹

1.6.2 La vía extrínseca

En la vía extrínseca señales externas son captadas por las células mediante receptores como Fas, también conocidos como receptores de muerte. Los receptores de muerte pertenecen a la superfamilia TNF (factor de necrosis tumoral) como CD95, TRAIL-R1 y TRAIL-R2, estos receptores poseen un dominio intracelular denominado dominio de muerte y al ser activados se trimerizan y se lleva a cabo la unión de proteínas adaptadoras como FADD en la región intracelular que junto con otras forman un complejo multimérico llamado DISC (Complejo de señalización inductor de muerte) que atrae a la procaspasa iniciadora 8 activada por un corte proteolítico produciendo caspasa 8, que lleva a la muerte celular por la activación de caspasas efectoras.

Cuando la concentración de caspasa 8 es suficiente se inicia la apoptosis, si no es suficiente entonces una proteína de la familia Bcl-2 interviene para amplificar la señal por la vía intrínseca de apoptosis. La proteína BID es escindida por caspasa 8 y una vez activada, provoca la apertura del poro mitocondrial y la salida de citocromo c, en este caso, la vía extrínseca activa a la caspasa 3 indirectamente a través de la vía intrínseca mitocondrial.³¹

1.6.3 La vía intrínseca

La apoptosis también puede ser desencadenada por señales intracelulares originadas por estrés biológico. En esta vía, las proteínas de la familia Bcl-2 regulan la apoptosis ejerciendo su acción sobre la mitocondria.

Las proteínas de la familia Bcl-2 se clasifican en 3 categorías:

- La familia de las proteínas anti-apoptóticas: Bcl-2 y Bcl-Xl
- La familia de las proteínas proapoptóticas de multidominio: Bax y Bak
- La familia de las proteínas proapoptóticas de dominio BH3: Bcl-2, Bid, Bim, PUMA, Bad y NOXA

Señales de muerte intracelulares o intrínsecas pueden ser activadas en condiciones en que el DNA ha sido irreversiblemente dañado como en la exposición a radiación UV, en este caso, la proteína p53 reconoce la ruptura del DNA, al reconocerlo, va a promover la expresión de proteínas proapoptóticas de la subfamilia BH3 como NOXA y PUMA. La proteína PUMA en el citoplasma interactúa con proteínas proapoptóticas como Bax que se activa producto de un cambio conformacional insertándose en la membrana mitocondrial para formar un poro en la membrana mitocondrial externa, esto permite la liberación de diversas moléculas del espacio intermembranal, entre ellas el citocromo c y otros promotores de apoptosis como Smac/Diablo (Segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria/Proteína de unión dirigida a IAP con bajo punto isoelectrico) y AIF (Factor inductor de apoptosis). El citocromo c una vez en el citoplasma forma un complejo con el factor-1 activador de la proteasa apoptótica (siglas del inglés *apoptotic protease activating factor-1*(APAF-1)) y ATP que se ordena en forma cíclica, dando origen al complejo multimérico llamado apoptosoma, que une procaspasa 9 a través de uno de los dominios de APAF-1, la procaspasa 9 puede entonces formar dímeros y activarse por autoprocésamiento a caspasa 9.³² La caspasa 9 activada efectúa el procesamiento de caspasas efectoras como caspasa 3, desencadenando las últimas fases de la apoptosis.

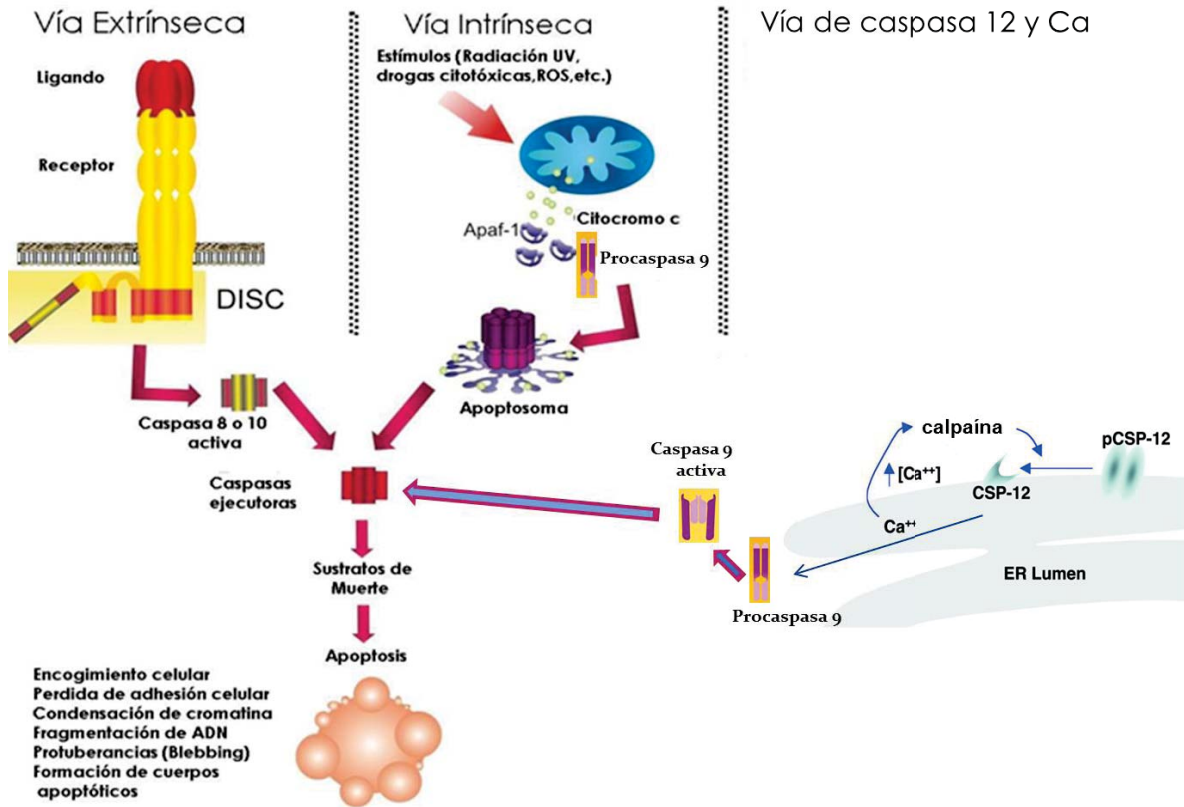


Figura 3. Vías de inducción de apoptosis. Modificado de López-González JS, 2008.

1.6.4 La vía del calcio

Nakagawa T, en el año 2000 sugerían la existencia de una nueva vía apoptótica en la que caspasa 12 funciona como la caspasa iniciadora que activa la cascada de caspasas en respuesta por pérdida de la homeostasia en el retículo endoplásmico (RE), causada por factores como privación de glucosa, hipoxia, disminución de calcio y estrés oxidativo; todos estos procesos pueden inducir la acumulación de proteínas desplegadas o mal plegadas en el lumen del RE, condición conocida como estrés del RE.³³ La caspasa 12 que se encuentra localizada en el RE, se activa al existir un desequilibrio en la homeostasis del calcio cuando ha y estrés en el RE.³⁴ En condiciones basales la caspasa 12 se encuentra asociada a TRAF2 (Factor 2 asociado a TNFR), cuando se presenta estrés en el RE se disocian promoviendo la dimerización de caspasa 12.³⁵ El calcio liberado del retículo endoplásmico liso (REL), es rápidamente captado por las mitocondrias y luego devuelto al REL. La mayor parte del

calcio se encuentra en el lumen del REL ya que si la mitocondria se satura de calcio, resulta en un metabolismo anormal y activación de la apoptosis por vía intrínseca.³⁶ Por su parte, en el REL un incremento en el flujo de calcio activa a la calpaína y esta escinde a la procaspasa 12 activando a esta caspasa iniciadora^{33,37} que posteriormente activa a la caspasa 9 y ésta última a la caspasa 3.^{38,39,40}

1.7 Caspasas

Las caspasas (*cisteín-aspartil proteasas*) son proteasas intracelulares que propagan la muerte celular, la proliferación e inflamación. Una vez activadas las caspasas por un estímulo específico activan la proteólisis de sus sustratos para provocar una serie de eventos que culminan en la respuesta biológica deseada.

Las caspasas son enzimas con residuos de cisteína en su sitio catalítico que reconocen y cortan sus sustratos después de un residuo de ácido aspártico. Éstas son sintetizadas como zimógenos y constan de un prodominio N-terminal, una subunidad grande (p20) y una subunidad pequeña (p10) (Fig 4.A).

Las caspasas apoptóticas se clasifican de acuerdo a su actividad inflamatoria o apoptótica. Las caspasas apoptóticas a su vez se subdividen en iniciadoras y efectoras basadas en su secuencia de activación, su función en la apoptosis y de acuerdo a la longitud de su prodominio, en los cuales se encuentran dominios efectores de muerte (DED) y dominios de reclutamiento de caspasas (CARD), ambos dominios pertenecen a la superfamilia de los dominios de muerte.⁴¹

Las caspasas iniciadoras: caspasa-8, caspasa-10, caspasa-9 y caspasa-2, tienen prodominios más largos y en su mayoría son monoméricas en su preforma (Fig. 4A). Este grupo de caspasas se activan a través de proximidad inducida que involucran proteínas adaptadoras que interactúan con los

prodominios promoviendo la dimerización de las caspasas por reclutamiento a complejos multiméricos.⁴²

Las caspasas efectoras: caspasa-3, caspasa-6 y caspasa-7, tienen prodominios más cortos (Fig. 4A) y existen en las células como homodímeros preformados e inactivos, que son convertidos a la enzima activa por procesamiento proteolítico de las caspasas iniciadoras.

Las caspasas inflamatorias son la caspasa-1, caspasa-4, caspasa-5, caspasa-11, caspasa-12, caspasa-13 y caspasa-14, de las cuales las primeras 3 está descrito que inducen paraptosis que es un tipo de muerte celular asociado a la activación masiva de células sintetizadoras de citocinas inflamatorias.

1.7.1 ESTRUCTURA DE CASPASAS

El sello molecular de la apoptosis es la activación de las caspasas en respuesta a un estímulo apoptótico. Las caspasas son sintetizadas como procaspasas y deben atravesar un proceso de activación durante la apoptosis. El procesamiento proteolítico de una procaspasa en residuos específicos de aspartato da como resultado la caspasa madura, el heterotetrámero resultante está compuesto por dos subunidades largas, dos cortas y la pérdida del prodominio (Fig. 4B). Cada heterodímero (p20-p10) está formado por interacciones hidrofóbicas resultando en la formación de hojas β paralelas, compuesta de 6 hebras beta antiparalelas, en total 12 hebras para los dos heterodímeros rodeadas por α -hélices (Fig 4C). En el heterotetrámero de la caspasa, los dos

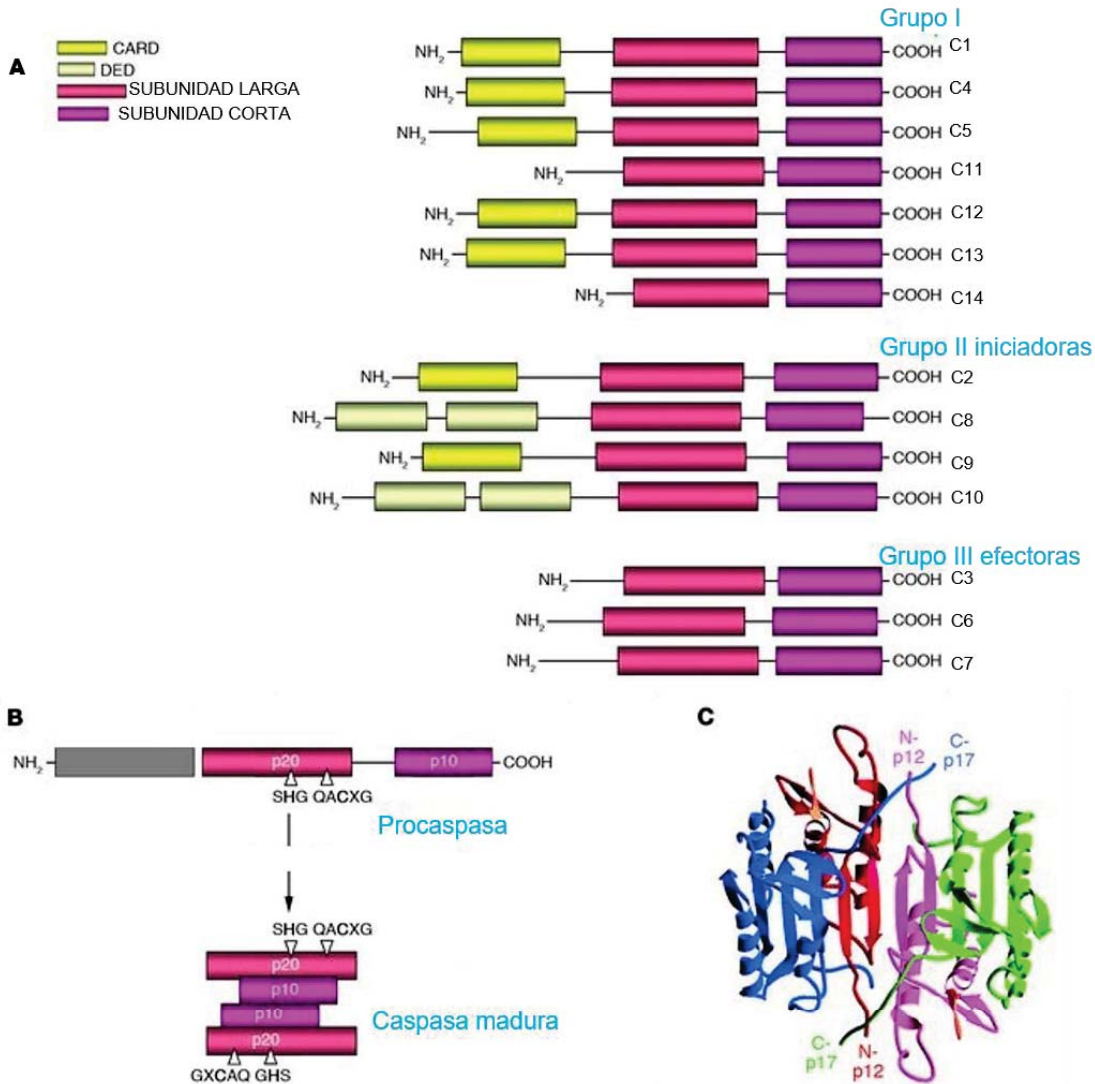


Figura 4. Estructura de las caspasas. (A) La familia de caspasas. Se presentan tres grandes grupos de caspasas. Grupo I: caspasas inflamatorias; grupo II: caspasas iniciadoras de apoptosis; grupo III caspasas efectoras de apoptosis. Están indicados CARD, DED y las subunidades largas y cortas. (B) Esquema de la activación de procaspasas. La proteólisis de procaspasa en residuos específicos de aspartato deriva en la formación de la caspasa madura, que comprende al heterotetrámero p20₂-p10₂ y la liberación del prodominio. Se muestran los residuos involucrados en la formación del sitio activo. (C) Estructura 3D del heterotetrámero de caspasa 3. Las terminaciones carboxi y amino terminal de cada subunidad están indicadas, así como los sitios activos con flechas naranjas. Imagen modificada de Lavrick IN. J Clin Invest, Vol. 115(10), 2665-72, 2005.

heterodímeros se alinean de manera que los dos sitios activos se posicionan en terminaciones opuestas de la molécula (Fig 4B). El sitio activo está formado por aminoácidos de ambas subunidades.⁴¹

1.7.2 ESPECIFICIDAD DE CASPASAS

Las caspasas reconocen 4 aminoácidos S4-S3-S2-S1. La escisión se lleva a cabo después de S1 que usualmente es una asparagina, en las caspasas de mamíferos S3 es glutamina, por lo que la especificidad de las caspasas puede describirse como X-Glu-X-Asp. Caspasas 1, 4 y 5 (grupo 1, Fig 4A) reconocen la secuencia WEHD; caspasas 2, 3 y 7 tienen preferencia por la secuencia DEXD; mientras que caspasas 6, 8 y 9 reconocen la secuencia (L/V)EXD. Es interesante que el sitio de ruptura entre la subunidad larga y la corta de las caspasas iniciadoras contiene su propio péptido de reconocimiento, lo que es congruente con el mecanismo propuesto de auto activación para las caspasas iniciadoras.⁴³

1.8 CASPASA 3

Caspasa 3 es uno de los componentes clave en la apoptosis, es activada directamente por caspasa 8 y 9. Caspasa 3 es sintetizada como una proenzima de 32 kDa y es procesada durante apoptosis en su forma activa, compuesta por dos subunidades, p17 y p12 (Fig 4C). La caspasa 3 activada es responsable de la ruptura de sustratos necesarios para la supervivencia de la célula, e incluso del procesamiento de otras caspasas como la 2, 6, 7 y 9.⁴⁴ Entre los sustratos susceptibles a caspasa 3 se encuentran: la poli-ADP ribosa polimerasa (PARP), enzima que participa en la reparación del ADN y la vigilancia e integridad del genoma; α -fodrina, cuya proteólisis contribuye a los re-arreglos estructurales incluyendo la formación de ampollas en apoptosis; gelsolina, proteína importantes

para la polimerización de la actina, por lo tanto se pierde la regulación sobre la dinámica de los filamentos de actina, desmantelándose el citoesqueleto que causa que las células pierdan adherencia, se vuelvan redondas y presenten fragmentación nuclear; la proteína ICAD ,inhibidora de una DNasa localizada en el núcleo, caspasa 3 entra al núcleo a través de los poros nucleares y degrada ICAD promoviendo la actividad de endonucleasa de CAD, que rompe al DNA en fragmentos internucleosómicos dañando irreversiblemente a la célula; la lamina nuclear, proteína que forma los filamentos intermedios que recubren por dentro la envoltura del núcleo, esta ruptura ayuda a promover la condensación de la cromatina y la ruptura nuclear.⁴⁵

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Identificar si durante el proceso de apoptosis inducido por la 7-hidroxicumarina en células A-549 de adenocarcinoma pulmonar humano se activa la caspasa 3.

2.2 Objetivos secundarios

1. Determinar si hay una relación concentración-respuesta en la inducción a apoptosis inducida por 7-hidroxicumarina en células A-549.
2. Aportar evidencia de la activación enzimática de caspasa 3, inducida por 7-hidroxicumarina en células A-549, mediante ensayos específicos de la actividad de la caspasa.
3. Determinar mediante ensayos de conductancia si el calcio participa en la inducción a apoptosis en células A-549 expuestas a 7-hidroxicumarina.
4. Conocer la cinética de la activación enzimática *in vitro* de la caspasa 3, inducida por 7-hidroxicumarina en células A-549, mediante ensayos de microinyección en célula única.

3 HIPÓTESIS

La 7-hidroxicumarina inducirá apoptosis en células A-549 de adenocarcinoma pulmonar humano, a través de la activación de caspasa 3. Este efecto será dependiente de la concentración y del tiempo y su actividad tendrá una cinética enzimática de primer orden.

4 ANTECEDENTES

En estudios previos, hemos encontrado que la 7-hidroxicumarina *in vitro* induce un efecto apoptótico en las células de A-549 de adenocarcinoma pulmonar humano, estimado mediante los cambios morfológicos característicos de la apoptosis, la activación de la vía intrínseca de la apoptosis, incrementando la actividad enzimática de la caspasa 3, estimada por ensayos colorimétricos empleando sustratos e inhibidores específicos de esta enzima.

En estudios anteriores se han realizado ensayos en ratones con este tipo de cáncer y en líneas celulares tratadas con la cumarina y sus derivados simples en los cuales se demuestra la existencia de actividad citostática y citotóxica:

- Zacharaski *et al.*, en 1981, demostraron en un estudio de pacientes control con carcinoma de pulmón de células pequeñas tratados con una combinación de quimioterapia más radioterapia, donde la mediana en la supervivencia de este grupo (25 semanas) se duplicaba si se agregaba al tratamiento la warfarina.⁴⁶
- Marshall, en 1994, demostró los efectos inhibidores del crecimiento *in vitro* de varias líneas celulares tumorales humanas por cumarina y 7-hidroxicumarina con concentraciones de 250-300 µg/mL, incluyendo la línea A-549 de adenocarcinoma pulmonar humano.⁴⁷
- Kawaii, en 2001, encontró que la CI_{50} de la cumarina en las células A-549 es mayor a 400µM.⁴⁸
- Jiménez-Orozco *et al.*, en 2001, demostraron que en las células A-427 de adenocarcinoma pulmonar humano tratadas por 72 horas, la CI_{50} de la cumarina fue de 257 µg/mL y la de 7-hidroxicumarina de 100 µg/mL. Estos compuestos inhiben la transición de la fase G1/S del ciclo celular a 160 µg/mL (1mM) y describió el mecanismo de acción: la disminución de ciclina D1, sin afectar su ARNm, por lo que se sugirió que la disminución de esta ciclina es post- transcripcional.⁴⁹
- López González *et al.*, en 2004, demostraron que en la línea celular A-427 de carcinoma pulmonar las células tratadas con etanol (2.4 % (v/v)) 12% son positivas a Anexina V, un marcador de apoptosis (estimado mediante citometría de flujo), cuando son expuestas

respectivamente a 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cumarina y 7-hidroxycumarina durante 4 horas, se encontró un 18 y 22% de células positivas a Anexina V.²³

- Jing-Yuan et al., en 2007, demostraron que la inducción a apoptosis por exposición a cumarina en células HeLa incrementaba la concentración de Ca^{2+} y la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), también disminuía el potencial de membrana mitocondrial. La producción de ERO podría estar causando daño al DNA y alteraciones en los niveles de Ca^{2+} en el retículo endoplásmico. La cumarina al disminuir el potencial de membrana mitocondrial indujo la liberación de citocromo c y activación de caspasa 3.⁴⁰
- Musa *et al.*, en 2012, demostraron que derivados de cumarina disminuyen el crecimiento tumoral en células A-549 de adenocarcinoma pulmonar humano midiendo la disminución de la expresión de Bcl-2 y el aumento de la expresión de Bax.⁵⁰
- Kim et al., en 2015, demostraron que esculetina induce apoptosis en células HT-29 de cáncer colorrectal induciendo estrés al retículo endoplásmico. El tratamiento con esculetina incremento el calcio intracelular, la expresión de proteínas relacionadas a estrés del RE y de caspasa 12.⁵¹
- Chang et al., en 2016, demostraron que esculetina induce incrementos en la concentración de Ca^{2+} intracelular en algunas líneas celulares de cáncer de mama y que este incremento era revertido por el bloqueador 2-aminoetoxidifenil borato (2-ABP); sin embargo se utilizaba taspigargina un inductor apoptótica de la vía del calcio en estas células, la esculetina inhibía el incremento de calcio intracelular y viceversa.⁵²

4.1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El cáncer pulmonar se encuentra entre las principales causas de mortalidad por cáncer en nuestro país y mundialmente constituye un problema de salud pública. Actualmente se utilizan terapias que utilizan fármacos con blancos específicos; en cáncer pulmonar únicamente se utilizan en etapas de cáncer pulmonar avanzadas solas o en conjunto con los quimioterapéuticos. Por lo anterior, es de suma importancia estudiar y definir estos blancos en los procesos celulares que son sujetos a ser modificados por este tipo de fármacos. Se han descrito propiedades apoptóticas de algunas cumarinas simples (cumarina y 7-HC) en células de adenocarcinoma pulmonar humano A-549.⁴⁷ Por lo que estudiaremos el efecto de la 7-HC sobre la activación de la caspasa 3, una molécula blanco en la inducción de muerte celular y además documentar como ocurre este proceso en la célula viva.

5. METODOLOGÍA

Reactivos Químicos		
Ionomicina Medio de cultivo RPMI-1640	Gibco Life Technologies	Carlsbad, CA, USA
MTT Estuche de caspasa 3 Penicilina-estreptomina ExtrAvidina-Fosfatasa Alcalina	Sigma Aldrich	St. Louis, MO, USA
Rodamina 110, bis-(N—CBZ-L-aspartil-L-glutamil-L-valil-L-ácido aspártico) (Z-DEVD-R110)	Invitrogen Life Technologies	Camarillo. CA, USA
Dextran Rojo Texas (3000 MW) Dextran- fluoresceína isotiocianato (FITC) (3000 MW) Fura-2AM	Molecular Probes Life Technologies	Carlsbad, CA, USA
Estuche Micro BCA Protein Assay	Pierce Biotechnology, Inc	Rockford, IL USA
5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato/cloruro de nitroazul de tetrazolio (BCIP/NBT)	Roche Diagnostics	Basel, Suiza
Celulares		
Células de adenocarcinoma pulmonar humano. A-549 (ATCC® CRM-CCL-185)	American Culture Collection	Rockville MD USA
Monoclonal anti-caspasa3 clona 4-1-18 (#MA1-16843) Monoclonal anti-poli (ADP-ribosa)polimerasa (PARP) clona 123 (#43600)	Zymed Laboratories, Inc.	San Francisco, CA, USA
Suero Fetal Bovino	GE Healthcare Life Sciences	Logan, UT, USA
Materiales		
Capilares de Borosilicato (1B100F-4)	World Precision Instruments,Ltd	Sarasota, FL, USA
Frascos de cultivo 80 cm ² Placas de 6 pozos	Nunc A/S	Rocskilde, Dinamarca
Caja de poliestireno 35X10 mm	Corning	Nueva York, NY, USA

5.1 Cultivo Celular

Células de adenocarcinoma pulmonar humano A549 fueron mantenidas en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino inactivado al 10%, 100 U/mL penicilina-estreptomicina, a 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO₂.

Las células se dejaron crecer hasta formar una monocapa y para ensayos de microinyección se tripsinizaron y sembraron en cajas de 6 pozos o cajas Petri a una densidad de 2X10⁵ células por pozo; se dejaron adherir por 24 horas y fueron expuestas a una solución etanólica de 7-hidroxycumarina o a etanol únicamente (control). En todos los casos la concentración final de etanol fue de 3% (v/v).

5.2 Ensayos de viabilidad celular

El efecto de la 7-hidroxycumarina sobre la viabilidad de las células fue estimado mediante la prueba de MTT (Bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)).⁵³ Este ensayo se basa en la reducción de la sal de tetrazolio soluble por las mitocondrias de las células viables. El producto de la reducción, es el formazán que es colorido e insoluble. El formazán es disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) y se realizan mediciones en un espectrofotómetro. La cantidad de formazán formado es proporcional al número de células viables.

Las células fueron sembradas a una densidad de 5 X 10⁵ en cajas de cultivo de 96 pozos. Fueron expuestas a etanol (control) o a una solución etanólica de 7-hidroxycumarina (1.85mM) por 24h, en todos los casos, la concentración final del disolvente fue de 3% (v/v); el número de células viables fue estimado por tratamiento con 20 µl/pozo de MTT (5mg/ml) durante 4h, permitiendo que la succinato deshidrogenasa en las células viables redujera el MTT a cristales púrpura de formazán. El

medio fue aspirado y se añadieron 100µl de dimetilsulfóxido (DMSO)/pozo. Los cristales se disolvieron en el DMSO y se midió la absorbancia a 570nm en un lector de placas (Biotek Instruments, Inc., VT, USA). El porcentaje de inhibición de la viabilidad celular (%IC) se calculó con la siguiente formula: %IC= [(1-absorbancia de las células expuestas a 7-HC en etanol/absorbancia de las células expuestas a etanol) X 100].

5.3 Inducción de apoptosis por exposición a 7-hidroxycumarina

5.3.1 Curvas dosis-respuesta

Las células en cultivo fueron expuestas por separado a 0.3, 0.6, 0.92 o 1.85mM de 7-HC o etanol durante 24h. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

5.3.2 Ensayos de curso temporal

Las células en cultivo fueron expuestas por separado a 1.85mM de 7-HC o etanol durante 6, 12, 18 o 24h. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

5.4 Aislamiento y cuantificación de Proteína

Después de los tratamientos correspondientes, las células se tripsinizaron con 1 ml de tripsina (diluida 100 ml de tripsina + 10 ml de medio sin suero) se incubaron 1 min a 37°C con agitación vigorosa, el medio se colocó en un tubo estéril y se centrifugaron durante 5 min a 420 XG; se decantó el sobrenadante y se desechó, se resuspendió el botón de células en 1 mL de medio con suero y se cuantificaron en una cámara de Neubauer. Posteriormente, se centrifugaron 5 min a 420 xg y el

botón celular se resuspendió en 5 ml de PBS estéril, se centrifugó nuevamente 5 min a 420 xg y el botón celular se resuspendió en amortiguador de lisis (Tris 20mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, NaOH 1 mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, Tritón X-100 1%). Se utilizaron 500 μ L del amortiguador de lisis por cada 1×10^6 células y se añadieron 10 μ L de inhibidor de proteasas [2.5 mM pirofosfato de sodio, 1 mM β -glicerolfosfato, 1 mM ortovanadato de sodio, 1 μ g/mL aprotinina, 1 μ g/mL leupeptina y 100 μ g/ml PMSF (fenilmetilsulfonil fluoruro)] por cada mL de amortiguador.

Se colocó la solución a tubos Eppendorf de 1 mL y se incubó 30 min en hielo con agitación constante. Se centrifugó durante 15 min a 13,000 xg y se removió el sobrenadante donde se encontraban disueltas las proteínas que se mantuvieron en congelación hasta su análisis.

La concentración de proteínas fue estimada usando el estuche Micro BCA Protein Assay. Un método colorimétrico que es compatible con proteínas en soluciones que contienen sales y detergentes. El reactivo de detección es el ácido bicinonínico(BCA) y Cu^{+1} , que se forma por la reducción de Cu^{+2} en un medio alcalino. El producto de la reacción de quelación de 2 moléculas de BCA y un Cu^{+1} es un producto morado soluble en agua que absorbe a 562nm.

5.5 Ensayos colorimétricos para elaborar cursos temporales y curvas dosis-respuesta de la actividad de Caspasa 3

Para determinar la activación de la caspasa 3 en los lisados celulares se utilizó un método colorimétrico basado en la hidrólisis del péptido sustrato de las caspasas acoplado a p-nitroanilina (Ac-DEVD-pNA), si el péptido es hidrolizado por la caspasa se libera al medio la p-nitroanilina que puede ser detectada a 405nm en un lector de ELISA. Por lo tanto, la cantidad de p-nitroanilina liberada (absorbancia) está relacionada con la actividad de la caspasa.

Se realizó la determinación de la actividad de caspasa 3 en lisados de células A549 que fueron expuestas a soluciones etanólicas de 7-HC (0.3, 0.61, 1.23 y 1.85 mM) durante 24h por triplicado. Para determinar el curso temporal se expusieron a 1.85 mM de solución etanólica de 7-HC durante 6, 12 o 24h. Al final del ensayo se midió la absorbancia a 405nm en un lector de placas (ELx800). En ambos casos se utilizó un control de células tratadas únicamente con el solvente. Los porcentajes de incremento de respuesta de los diferentes tratamientos fueron determinados y graficados como un índice de actividad enzimática. El promedio de las absorbancias de los ensayos de células expuestas al disolvente únicamente, fue tomado como referencia (valor de 100%). Se determinó el porcentaje de incremento con cada tratamiento con respecto a su control y se restó del control; al valor resultante se llama índice de actividad de caspasa 3.

Para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas en la actividad de caspasa 3 en las muestras de lisados de células de adenocarcinoma pulmonar A549 se realizó la prueba de análisis de varianzas (ANOVA) y posteriormente la prueba de Dunnett (SigmaStat V. 3.1) respecto a células únicamente expuestas a etanol al 3% ya que éste es el disolvente de los compuestos cumarínicos. Se consideró una significancia de $p \leq 0.05$. Se elaboraron las gráficas con el software SigmaPlot V. 11).

5.6 Ensayos de Inmunoelectrotransferencia

5.6.1 Electroforesis SDS-PAGE

Para la electroforesis SDS-PAGE, electroforesis en geles de poliacrilamida que se realizaron en presencia de dodecil sulfato de sodio, se prepararon geles al 17% de acrilamida-bisacrilamida para separar procaspasa 3, caspasa 3 y de 12% para PARP, se cargaron entre 20 y 25 μg de proteína por carril. Las muestras se prepararon en amortiguador (0.125M Tris-Cl, 4% SDS, 20% v/v Glicerol,

0.2M DTT, 0.02% Azul de bromofenol, 1:20 β -mercaptoetanol, pH 6.8). Se calentó a 90°C por 1 min. Los geles se corrieron en amortiguador de Tris-SDS (0.025M Tris, 0.192 M Glicina, 0.1% SDS, pH8.3). A 250 V y 14 mA.

5.6.2 Transferencia

Las proteínas se transfirieron a una membrana PVDF en una cámara semi-seca. Utilizando amortiguador de transferencia (25 mM Tris, 192 mM Glicina, 20% MetOH), en el que se equilibró el gel y la membrana antes de someterse a la transferencia. La transferencia se llevó a cabo a 25 V y 300 mA durante 2 horas. Una vez transferidas las proteínas a la membrana, se realizó una tinción con Rojo de Ponceau como control de la transferencia. Se destiñó con agua y posteriormente con NaOH 0.1N.

5.6.3 Inmunodetección

La membrana se bloqueó durante 1 hora con leche descremada al 5% en PBS-Tween 3%. Posteriormente, se retiró esta solución bloqueadora y se añadió el anticuerpo primario, anti-caspasa 3 (1:250) o anti PARP (1: 1,000) en PBS-Tween 3% y se dejó incubar a 5°C toda la noche. Posteriormente, se realizaron lavados con PBS y se adicionó el anticuerpo secundario de cabra anti-ratón IgG- biotinilado (1:10,000) en PBS-Tween a 37°C; se incubó en agitación a temperatura ambiente durante 1 h. Se realizaron lavados con PBS y para el anticuerpo secundario biotinilado se adicionó estreptavidina-fosfatasa alcalina (0.15 μ g/ml) durante 1 hora en agitación. Se realizaron los lavados necesarios con PBS. Las proteínas de interés se revelaron con 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato/ nitroazul de tetrazolio (BCIP/NBT) un sustrato de la fosfatasa alcalina que precipitó formando bandas de color púrpura donde se localiza la proteína de interés.

5.6.4 Análisis semi-cuantitativo de inmunoelectrotransferencia

Las inmunodetecciones se realizaron por triplicado, se midió la intensidad de la tinción sobre las membranas PVDF después de realizar los respectivos ensayos con diferentes anticuerpos usando un fotodocumentador (Molecular Imager® Gel Doc™ and ChemiDoc™ Systems) y analizando las imágenes con el software de análisis Quantity One 1-D versión 4.6.9 (BioRad laboratorios Inc).

5.7 Observación de cambios morfológicos que indican apoptosis

En cajas de cultivo estériles de 6 pozos Nunc, se sembraron 2.5×10^5 células de cada línea celular y se dejaron adherir toda la noche. Al día siguiente se les añadió 7-HC a 1.85mM y se apartaron dos pozos uno de los cuales fue el control absoluto ya que permaneció con medio RPMI durante todo el ensayo y otro correspondió al control del solvente de las cumarinas (etanol al 3%). Fueron observadas en un microscopio invertido Nikon TSF-100, en contraste de fases para identificar los cambios morfológicos, se fotodocumentaron los cambios a los diferentes tiempos de exposición de 7-HC, correspondientes a 6, 12 y 24 horas, con una cámara DXM1200c (Nikon Corporation, Tokio, Japón).

5.8 Ensayos de conductancia de calcio

Para determinar el flujo de calcio, 3×10^6 células A549 fueron expuestas (por triplicado) a una solución etanólica de 7-HC (0.9 o 1.85mM) por 3, 6 y 12 h. Una vez transcurrido el tiempo de exposición se lavan y se dejan en un amortiguador de fosfatos, se trataron por 40 min a 37°C con

4 μ M de Fura-2 AM (indicador de calcio fluorescente UV-excitabile), es permeable a la célula y una vez que se une al calcio, se detecta a 363 nm (verde) cuando está libre de calcio y de 335nm (azul) cuando se encuentra saturado. Posteriormente, las células se centrifugaron a 300 x g por 5 min en 5ml de PBS. El botón disuelto en 100 μ l de medio RPMI sin suero se vació en una celda calentada a 37°C y un volumen final de 2.5 ml de PBS, que permanece en constante agitación. Se utilizó ionomicina como control positivo. Después se adicionaron 6mM de EGTA para quelar el calcio.

La fluorescencia fue detectada a 488nm usando un filtro óptico (Andover Corporation, Salem, NH, USA). La excitación de Fura-2 AM se lleva a cabo a 340/380nm utilizando un monocromador de Photon Technology International (PTI; Monmouth Junction, NJ, USA). Los datos se obtuvieron y digitalizaron a 0.83Hz usando Interfase PTI.

Se realizó el análisis estadístico a los promedios de fluorescencia obtenidos de los diferentes tratamientos. Primero mediante ANOVA donde se detectaron las diferencias significativas entre los tratamientos y luego con el método de Holm-Sidak se realizaron múltiples comparaciones contra el control (etanol).

5.8.1 Inhibición de canales activados por reservorios SKF-96363

Para determinar si el incremento de calcio observado proviene de las pozas internas de calcio en el retículo endoplásmico, 3X10⁶ células A549 fueron expuestas (por triplicado) al mismo tiempo a 1.85mM de 7-HC durante 6h y al bloqueador de canales TRP: SKF-96363 (Cayman Chemical Co.). Una vez transcurrido el tiempo de exposición se lavan y se dejan en un amortiguador de fosfatos y se procede a realizar los ensayos de determinación de calcio descritos anteriormente.

5.9 Microinyección en célula única

La microinyección es una técnica de introducción de moléculas exógenas o células como proteínas, péptidos, cDNA's, fármacos, espermatozoides directamente en el núcleo o en el citoplasma mediante microagujas.

5.9.1 Elaboración de microagujas

Las microagujas de microinyección se elaboran a partir de capilares de borosilicato. . Antes de someterlas al estiramiento, los capilares se lavaron 24h con HCL 0.5N y posteriormente 24h más con etanol al 70%. Después estos se enjuagaron 4 veces con agua destilada y se secaron en horno durante 3h a 180 °C.

Las microagujas fueron elaboradas en el estirador p-97 (Sutter Instrument Co. Novato, CA , USA), los capilares de vidrio se colocan en una cámara rodeados al centro por un filamento metálico que se somete a calentamiento eléctrico. Después una fuerza lineal y horizontal jala los extremos del capilar para crear 2 micropuntas. Al final del estiramiento, se expulsa un gas con determinada presión (generalmente nitrógeno o aire comprimido) verticalmente desde abajo del filamento metálico con el objetivo de romper el vidrio, para obtener microagujas de aproximadamente 0.2µm de diámetro y una forma alargada con punta filosa para evitar ruptura irregular de la membrana celular, se determina HEAT (temperatura de fundición del vidrio); P (Presión del aire durante la fase de enfriamiento); Pull (fuerza del estirador); VEL (velocidad de estiramiento determinado por la velocidad del vidrio); TIME (tiempo de enfriamiento).

5.9.2 Microinyección de célula única *in vitro*

La microinyección se llevó a cabo en un microscopio Nikon TS100 (Nikon Corporation, Tokio, Japón) equipado con un microinyector programable IM-300 y un micromanipulador hidráulico MHW-3 (Narishige International, Ltd, London, UK)

Determinación de tiempo y presión de microinyección

Se elaboraron 6 microagujas de microinyección como se describió anteriormente. Se cargó la microaguja con microcargadores y micropipeta (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania), utilizando una solución de microinyección filtrada que consistía en : Dextran fluoresceína 0.1% para la determinación de los parámetros de presión y tiempo de inyección en células A549 de adenocarcinoma pulmonar humano. Se retira el medio de cultivo de la caja Petri y se vertió 1 ml de PBS. Se montó la punta de inyección en el “holder” del micromanipulador y se ajustaron los parámetros de microinyección en el controlador.

El tiempo de inyección se determinó midiendo la duración de la fluorescencia de 200 a 400ms

La presión de microinyección se determinó comenzando con 2 psi e incrementos de 0.5psi por microinyección hasta observar una adecuada duración de la fluorescencia.

Una vez determinados los parámetros de tiempo (200-400 ms) y presión (6.5psi), se posicionó con ayuda del micromanipulador a 45°C de la base de la caja Petri. Se colocó la punta sobre la superficie de la membrana celular y se desplaza la aguja con movimientos micrométricos hasta penetrar la membrana celular. Se presionó el botón Inject y se capturaron y almacenaron las fotografías obtenidas con la cámara del microscopio y el software NIS-Elements Ar 3.2 (Ver captura y análisis de imágenes)

5.9.3 Ensayos de actividad de caspasa 3 mediante microinyección de célula única

Se realizaron ensayos de microinyección en célula única de células expuestas a etanol o a 1.85 mM de 7-hidroxycumarina por 3, 6, 12, 18 y 24h para poder construir cursos temporales con los resultados. Para determinar la actividad de caspasa 3, se preparó la solución de microinyección con el sustrato específico de caspasa 3 acoplado a un fluorocromo: bis-(N-CBZ-L-aspartil-glutamil-L-valil-L-aspartil)-R110 (1.3mg/ml) y Rojo de Texas (0.3 mg/ml), éste último con la finalidad de comprobar que la microinyección hubiera sido exitosa. Se retiró el medio de cultivo con el tratamiento de 7-hidroxycumarina; se lavaron y se vertió 1ml de PBS estéril en la caja Petri. Se transfirió la solución de microinyección a la microaguja con un microcargador. Se microinyectaron de 3 a 5 células por ensayo.

5.9.4 Captura y Análisis de Imágenes

Se capturaron imágenes en contraste de fase y con filtro para fluorescencia verde, para descartar fluorescencia per sé en las células únicamente tratadas con disolvente. Después de microinyectar el sustrato de C3, se capturaron las imágenes a 400X usando un filtro para fluorescencia roja que verificaba que la célula fue microinyectada (rojo de Texas). Inmediatamente después se cambia al filtro para fluorescencia verde y se capturaron imágenes cada 20 segundos durante 10 min. Este método se estandarizó basándonos en los cambios en la intensidad de fluorescencia de cada imagen. Las capturas fueron digitalizadas con el software NIS-Elements Ar 3.2 versión 3 (Nikon corporation) calibrado para capturas tomadas con el objetivo 40X midiendo la intensidad de fluorescencia verde por pixel en el área correspondiente a las células microinyectadas (R110:520 nm) asociada directamente a la actividad de caspasa 3. Se graficaron las intensidades de fluorescencia verde por pixel contra los tiempos post- inyección para realizar los cursos temporales

correspondientes a los diferentes tiempos de exposición de las células A549 al compuesto cumarínico y su disolvente (Sigma Plot V 11.0)

5.9.5 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza ANOVA para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas dentro de cada grupo de células estudiadas. Si lo había se hicieron múltiples comparaciones versus control (pruebas post-hoc). También se hicieron pruebas t de student entre el grupo tratado con etanol y la 7- HC para cada tiempo estudiado. Finalmente, se determinaron regresiones lineales, se calcularon las pendientes de las velocidades iniciales de los cursos temporales obtenidos de la cinética de la caspasa 3 entre 0 y 60 s y se realizó la prueba de t, para determinar si las pendientes eran diferentes de cero (SigmaStat V 3.5); se consideró una $P < 0.05$ para indicar diferencias significativas.

6. RESULTADOS

6.1 Estimación de la viabilidad celular por exposición de las células A-549 a la 7-hidroxicumarina

En ensayos anteriores encontramos la concentración de 7- hidroxicumarina para inducir cambios morfológicos característicos de apoptosis y un incremento en la expresión de proteínas apoptóticas (Bax) y una disminución de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2), con base en esos resultados , células A-549 fueron expuestas a 1.85mM de 7-Hidroxicumarina (7-HC) y se realizaron ensayos con bromuro de difeniltetrazolio (MTT) para determinar la viabilidad celular.

En las células de la línea A-549 se observó una reducción concentración-dependiente de manera lineal de la viabilidad a partir del tiempo cero, a las 3 h fue del 10%, a las 12 horas fue de 30.3% y llegó a su máximo a las 24 horas de la exposición (reducción de 39%) (Fig. 5). Entre las 12 y las 24 horas solamente disminuyó en 9.9%.

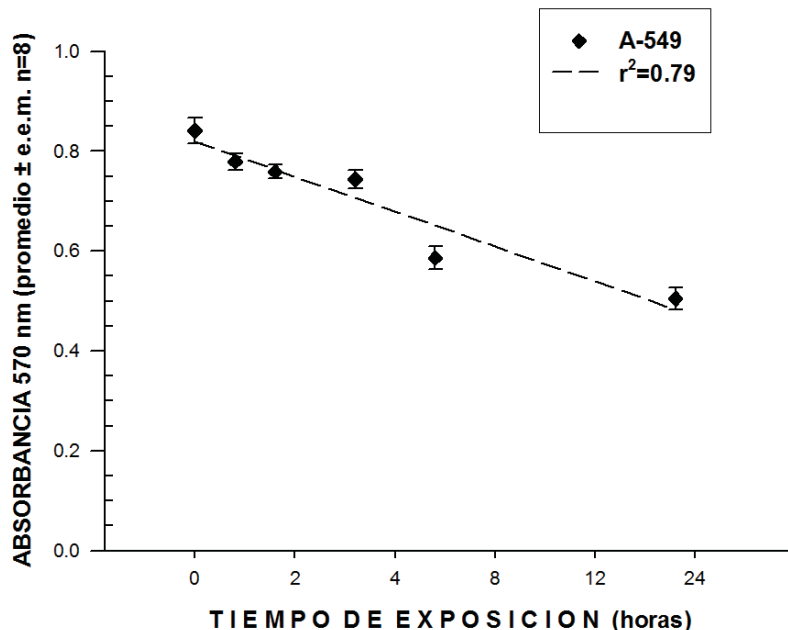


Figura 5. Estimación de la viabilidad en células A-549 expuestas a 1.85 mM de 7-hidroxicumarina a tiempos de 0 a 24 h, mediante la reducción de MTT

6.2 Determinación de la actividad de caspasa 3

Para determinar la activación de caspasa 3 en lisados celulares de células A-549 expuestas a 7-hidroxicumarina, a distintas concentraciones y por distintos tiempos de exposición, se utiliza un método colorimétrico basado en la hidrólisis de un péptido sustrato de las caspasas acoplado a p-nitroanilina (Ac-DEVD-pNA), si el péptido es hidrolizado por la caspasa se libera al medio la p-nitroanilina y se detecta a 405nm en un lector de ELISA. Por lo tanto, la cantidad de p-nitroanilina liberada (Absorbancia) puede ser relacionada con la activación de la caspasa 3.

En la figura 6 se observa que la actividad de caspasa 3 en células expuestas a 1.85mM de 7-hidroxicumarina durante 24 horas presenta un incremento significativo de 65% en la actividad de caspasa 3, respecto a las células expuestas únicamente a etanol y a las células expuestas a concentraciones menores. La actividad de caspasa 3 en células tratadas con 0.3, 0.61, y 1.23 mM de 7-hidroxicumarina no presenta diferencias significativas respecto al control de disolvente.

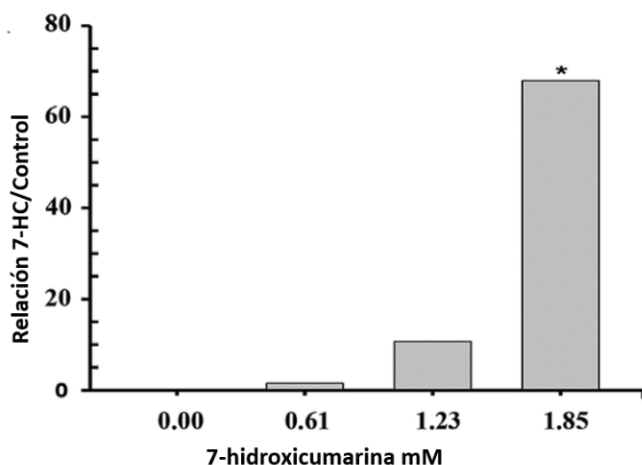


Figura 6. Ensayo colorimétrico para la estimación de la actividad de caspasa 3 en lisados de células A-549 expuestas a 0,0.61,1.23 y 1.85 mM de 7-HC basados en la hidrólisis del péptido (Ac-DEVD-pNA). Se observa un incremento significativo de 65%, de la actividad de caspasa 3 respecto al control en los lisados correspondientes a la exposición a 1.85mM de 7-HC (P=0.009 con prueba de Dunnett).

Para la determinación de la actividad de caspasa 3 cuando la variable es el tiempo de exposición, se utiliza la metodología antes descrita exponiendo a las células A-549 a 1.85mM por 6,12 y 24 h.

Se observa en este curso temporal que la actividad de caspasa 3 en células expuestas a 1.85 mM de 7-HC durante 24 horas presenta un incremento significativo en la actividad de caspasa 3 comparado con el solvente y respecto a todos los demás tratamientos. (Fig. 7)

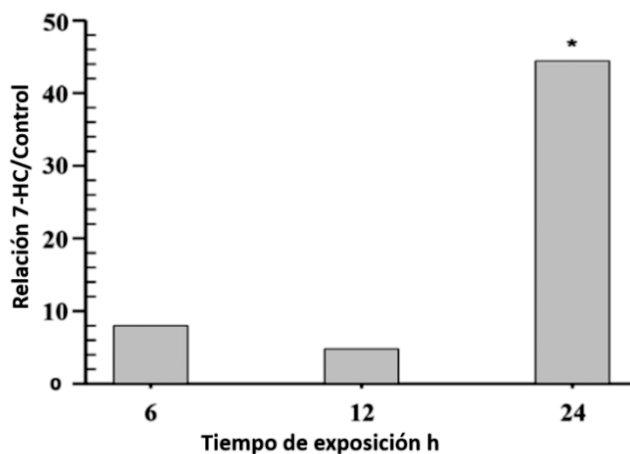


Figura 7. Ensayo colorimétrico para la estimación de la actividad de caspasa 3 en lisados de células A-549 expuestas 1.85 mM de 7-HC durante 6, 12, 18 y 24h basados en la hidrólisis del péptido (Ac-DEVD-pNA), se observa un incremento significativo de 44% respecto al control de la actividad de caspasa 3 en los lisados correspondientes a la exposición durante 24h ($P < 0.05$ con prueba de Dunnett).

6.3 Inmunodetección de procaspasa 3 y caspasa 3

La caspasa 3 se encuentra como procaspasa 3 en estado inactivo. Si el tratamiento con 7-hidroxicumarina resulta en la activación de esta caspasa, la enzima será escindida para adquirir su forma activa, de tal manera que la procaspasa 3 de 32 kDa es procesada en dos péptidos de 17 y 12 kDa. La procaspasa 3 y el péptido de 17 kDa (p17) pueden ser detectados haciendo mediciones por inmunoelectrotransferencia, de lisados de células A-549 (1.5×10^6 /ml) expuestas durante 24 h a concentraciones de 0.3, 0.61, 0.92 y 1.85 mM. La figura 8 muestra una inmunodetección representativa de procaspasa y caspasa 3 (p17) bajo estas condiciones.

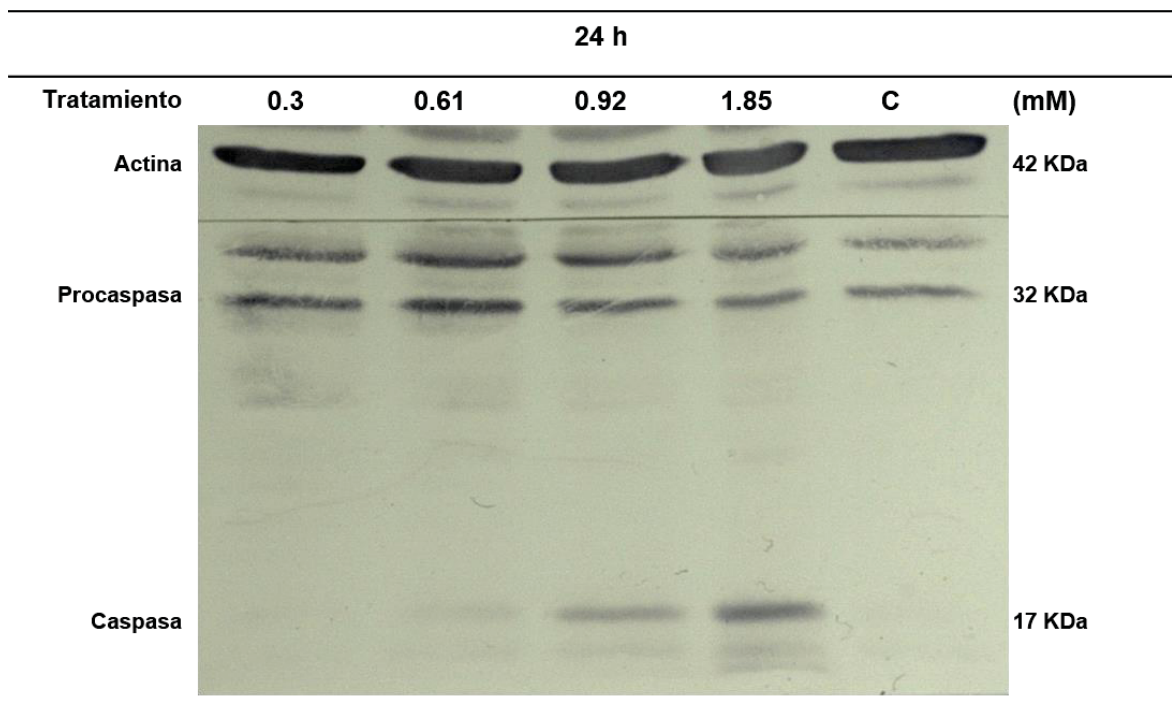


Figura 8. Inmunodetección representativa que muestra los cambios en la inmunodetección de proteínas de los lisados de A-549 expuestas a diferentes concentraciones de 7-HC durante 24h. La procaspasa se detecta a 32 kDa, si es activada el fragmento se detectan a 17 kDa. También se observó un pegado inespecífico a un péptido de peso molecular menor a 17kDa. Los ensayos de inmunodetección de caspasa 3 se realizaron por triplicado, aquí se observa uno representativo.

En general, la caspasa 3 activa se visualiza de manera muy tenue en células expuestas a 0.61 mM de 7-hidroxycumarina y la banda se intensifica más en células tratadas con 1.23 mM y es intensa en células tratadas con 1.85mM. Cuando las células son expuestas únicamente al disolvente, la caspasa 3 activa es prácticamente imperceptible. Las inmunodetecciones fueron analizadas mediante densitometrías; al analizar los datos obtenidos de las densitometrías (Fig. 9) se encontró que la expresión de caspasa 3 activa es mayor, de manera significativa en células expuestas a 1.85mM de 7-hidroxycumarina, respecto a las expuestas únicamente a etanol. Y que la expresión de procaspasa 3 no presenta variaciones significativas entre los tratamientos.

EXPRESIÓN DE PROCASPASA 3 Y CASPASA 3 EN CÉLULAS EXPUESTAS A 7-HIDROXICUMARINA A DIFERENTES CONCENTRACIONES

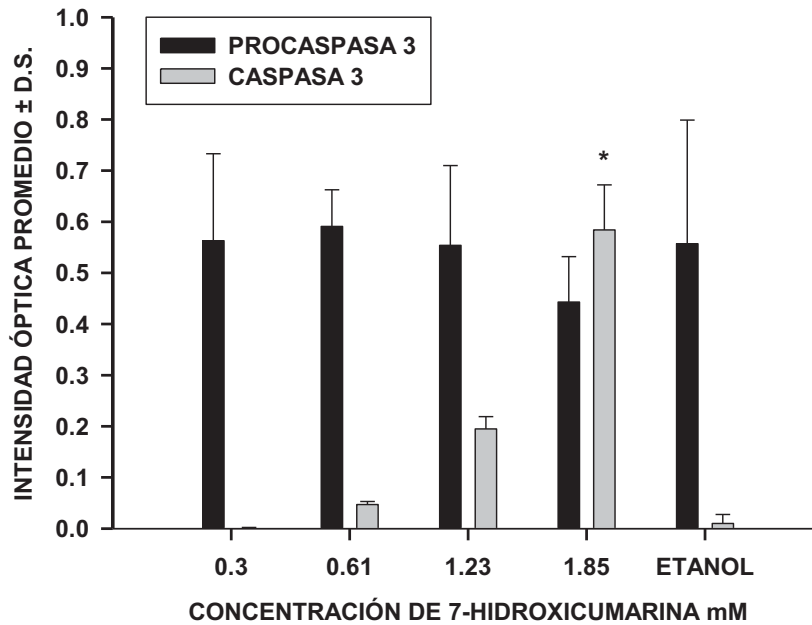


Figura 9. Análisis densitométrico de la expresión de procaspasa 3 y caspasa 3 de células expuestas a diferentes concentraciones de 7-HC durante 24h. Se observa un incremento significativo en las bandas correspondientes a la caspasa 3 activa cuando las células son tratadas con 1.85mM de 7-HC. ($P < 0.05$. Prueba de t de Student). * Diferencia significativa respecto a células tratadas con etanol.

Para conocer el efecto del tiempo de exposición del compuesto cumarínico sobre la expresión y activación de caspasa 3 se realizaron las inmunodetecciones correspondientes. La figura 10 muestra una inmunodetección representativa de caspasa 3. La caspasa 3 activa es casi imperceptible en células expuestas a 1.85mM de 7-hidroxicumarina durante 6, 12 y 18 horas y se intensifica más en células expuestas durante 24 horas. Cuando las células son expuestas únicamente al disolvente no se detecta caspasa 3 activa. El ensayo se realizó por triplicado y fueron analizados mediante densitometrías.

El análisis de las densitometrías (Figura 11) muestra que la expresión de caspasa 3 activa presenta diferencias significativas a las 6, 12, 18 y 24 horas de exposición a 1.85mM de 7-hidroxicumarina. También se observa un incremento significativo en la expresión de procaspasa 3 respecto al

control de Etanol a las 6 y 12 horas de exposición, es decir que es un evento temprano en el tratamiento de las células con el compuesto cumarínico. A las 24 horas el incremento en la expresión de caspasa 3 activa presenta también diferencia significativa respecto a las 18h y la expresión de procaspasa 3 disminuye significativamente respecto al control de etanol y las 18h.

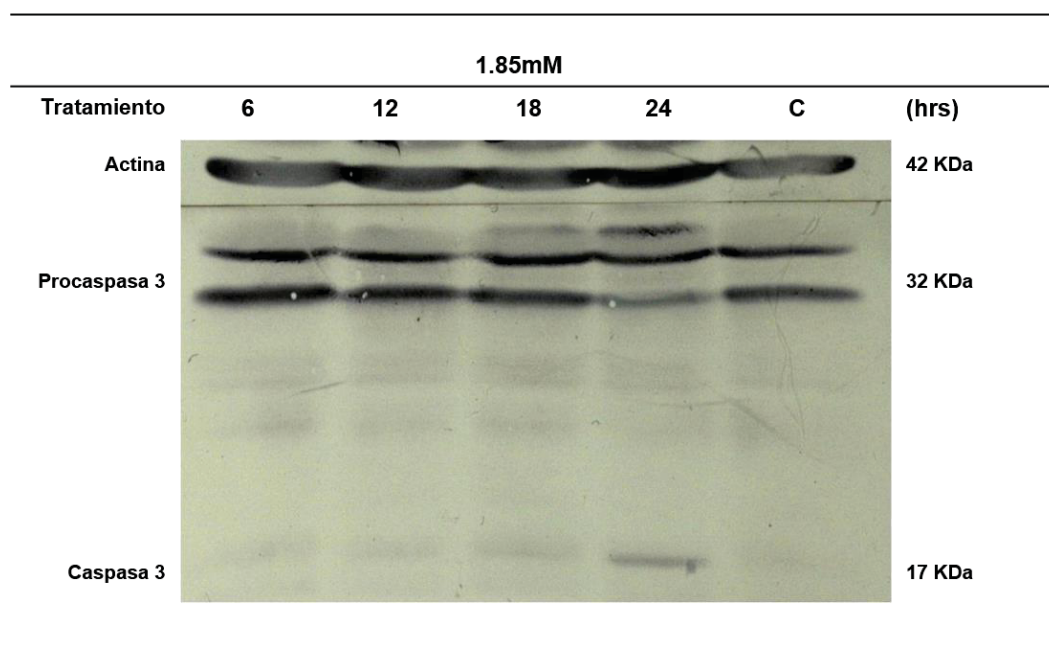


Figura 10. Imagen representativa que muestra los cambios en la inmunodetección de proteínas de los lisados de A-549 expuestas a 1.85 mM de 7-HC durante diferentes tiempos. La procaspasa se detecta a 32 kDa, si es activada los fragmentos se detectan a 17 kDa. Los ensayos de inmunodetección de caspasa 3 se realizaron por triplicado, aquí se observa uno representativo.

EXPRESIÓN DE PROCASPASA 3 Y CASPASA 3 EN CÉLULAS EXPUESTAS A 1.85 mM DE 7-HIDROXICUMARINA POR DIFERENTES HORAS

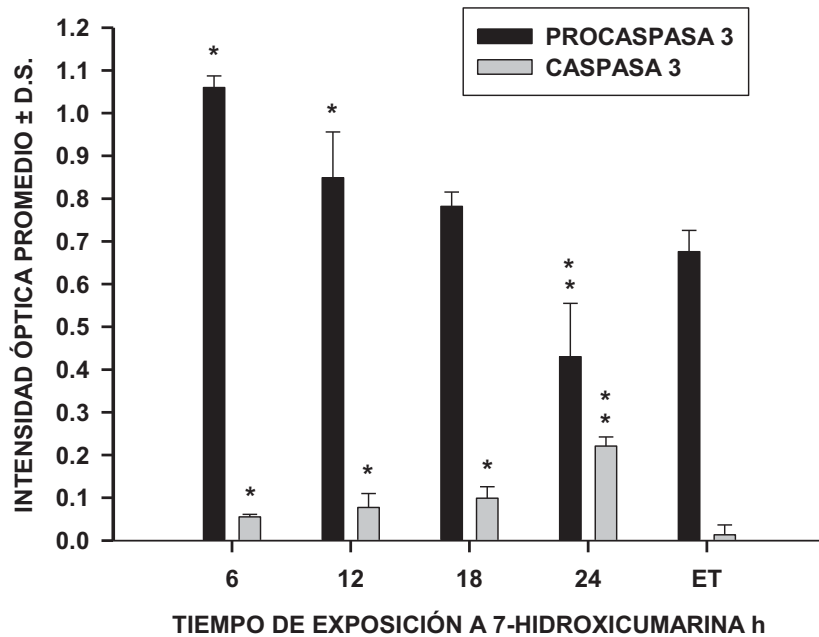


Fig. 11. Análisis densitométrico de la expresión de procaspasa 3 y caspasa 3 de células expuestas a 1.85 mM de 7-HC durante 6, 12, 18 y 24h. Se observa un incremento significativo de la procaspasa 3 a 6y 12h de exposición y una disminución significativa a las 24h con respecto a las células tratadas únicamente con el etanol. La caspasa 3 presenta un incremento significativo a todos los tiempos de exposición y a las 24 h esta diferencia es significativa en comparación con los demás tiempos de exposición ($P < 0.05$. Prueba de t). *Diferencia significativa respecto a células tratadas con etanol. **Diferencia significativa respecto a todos los tratamientos.

6.3.1 Inmunodetección de PARP, sustrato de caspasa 3

Uno de los sustratos de la caspasa 3 durante la apoptosis es PARP (poli adenosin ribosa difosfato polimerasa), enzima involucrada en la reparación del ADN y por lo tanto en la integridad del genoma. La ruptura proteolítica de PARP por caspasa 3, deriva en un cambio en su patrón electroforético de una banda de 116 kDa a una de 85 kDa, la cual identificamos con un anticuerpo anti-PARP. Asimismo, la degradación de PARP fue utilizada como indicador de la activación de caspasa 3 en respuesta a la exposición a 7-hidroxycumarina en las células A-549.

Posterior a la inducción de apoptosis de las células A-549 con 1.85 mM de 7-hidroxycumarina durante 24h, se observaron en los inmunoblots cambios en la banda correspondiente a PARP, se

observó intensa la que corresponde a las células tratadas únicamente con etanol y muy tenue la que corresponde a células expuestas a 7-hidroxicumarina (Figura 12); aunque no se observó la banda correspondiente al producto de degradación de PARP, logramos detectar una disminución en la banda correspondiente a la enzima íntegra a 116kDa .

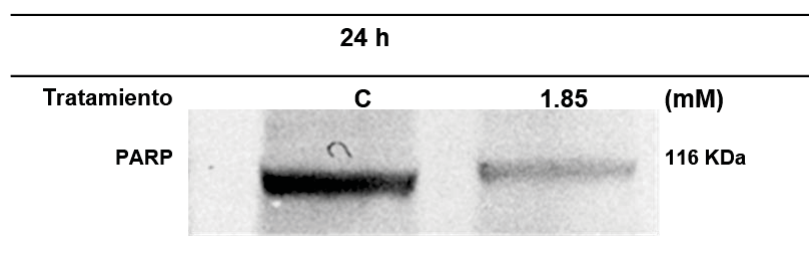


Figura 12. Efecto de la caspasa 3 sobre el sustrato PARP, evidenciada por la degradación de PARP. Se observa la disminución de la intensidad de las bandas (118 kDa) en células expuestas a 1.85 mM 7-hidroxicumarina durante 24 horas.

6.4 Cambios morfológicos característicos de apoptosis en la línea celular A-549 tratada con 7-hidroxicumarina

Para evaluar la inducción de apoptosis con los compuestos cumarínicos se estudió en la línea celular, el efecto de una concentración de 1.85mM de 7-hidroxicumarina y se observaron las células en microscopio invertido con contraste de fases y se tomaron fotografías a las 6, 12 y 24 horas de exposición. A las 6 horas de haber añadido 7-hidroxicumarina, no se observaron cambios morfológicos en las células. Se observaron cambios morfológicos característicos de apoptosis, a partir de las 12 horas, como la disminución del volumen celular, su aspecto esférico, pérdida de adherencia, formación de ampollas en la membrana celular y aparición de cuerpos apoptóticos, como resultado del fraccionamiento celular en las células A-549 y continuaron presentándose hasta las 24 horas de exposición.

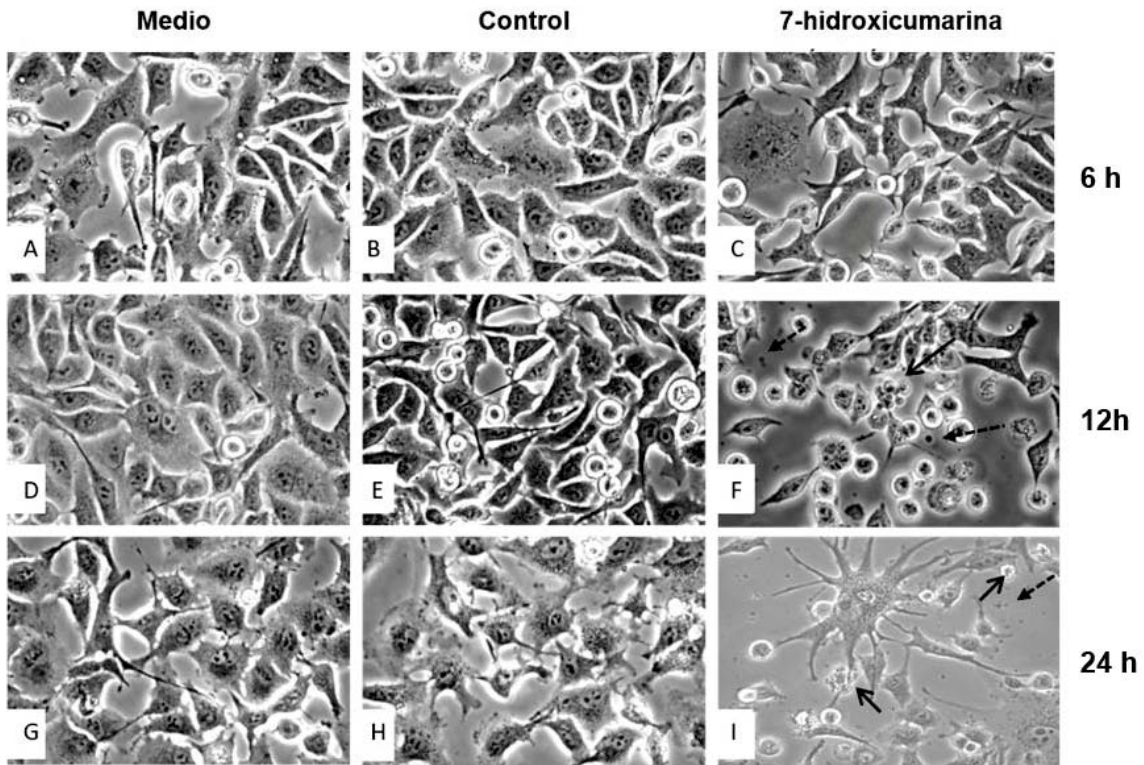


Figura 13. Imágenes de microscopía por contraste de fases (x400) que muestra las diferencias en la morfología de células A-549 seguidas de un tratamiento con 3% de Etanol (control), con 1.85 mM de 7-HC o sin tratamiento (medio RPMI 1640). Las imágenes fueron capturadas a 6h, 12h o 24h. Los cambios morfológicos asociados a apoptosis están marcados con flechas continuas (ampollas) y flechas segmentadas (cuerpos apoptóticos).

6.5 Incremento en la conductancia del calcio intracelular en células A-549 tratadas con 7-hidroxicumarina

El estrés al retículo endoplásmico puede resultar en activación de la apoptosis. La caspasa 12 se activa en respuesta a estrés en el RE al existir un desequilibrio en la homeostasis del calcio o por acumulación de proteínas en exceso, por lo tanto, es relevante para nuestro proyecto determinar si la 7-hidroxicumarina modula de alguna manera las concentraciones de calcio intracelular y si existe una relación entre el incremento de las concentraciones de calcio intracelular y la inducción a apoptosis con la 7-hidroxicumarina.

Se realizaron mediciones de la concentración de calcio intracelular $[Ca^{2+}]$ con el objeto de detectar diferencias en la detección de calcio de acuerdo al número de células.

La Figura 14 muestra las diferencias que encontramos al utilizar durante el ensayo células en medio RPMI con suero fetal bovino y células en PBS estéril. El medio con suero fetal bovino no permite que las diferencias en la detección de calcio sean detectables, por lo que concluimos que los ensayos debían realizarse con las células resuspendidas en PBS estéril. En segundo lugar se pudo observar que la cantidad de células óptima para realizar los ensayos es 2.5×10^6 células, que es el número celular utilizado en los ensayos posteriores.

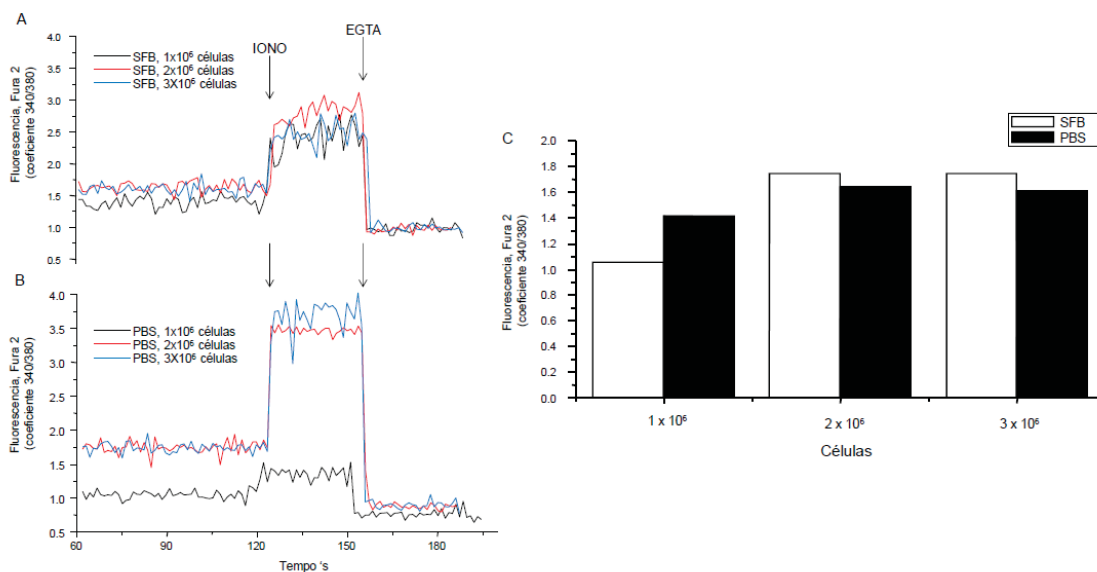


Figura 14. Establecimiento de parámetros para la detección de las diferencias en la concentración de calcio intracelular: 1×10^6 , 2×10^6 y 3×10^6 células de la línea A-549 resuspendidas en (A) Medio RPMI con suero fetal bovino o (B) PBS estéril. (C) Diferencias en la detección de fluorescencia del Fura-2 que se relaciona con la concentración de calcio cuando se utilizan diferente número de células suspendidas en PBS.

6.5.1 Efecto de la 7-hidroxycumarina en la concentración de calcio intracelular en células A-549.

Identificadas las condiciones se sembraron 2.5×10^6 células A-549 en cajas de 75cm^2 (Nunc), fueron expuestas a 0.92 y 1.85 mM de 7-hidroxycumarina disuelta en etanol durante 3, 6 y 12 horas;

también se expusieron las células a los volúmenes de etanol utilizados en los tratamientos con las cumarinas a manera de tener un control del disolvente de nuestro compuesto de interés durante 3, 6 y 12 horas. Una vez finalizado el tiempo de exposición se siguió el procedimiento ya descrito anteriormente para la determinación de calcio.

En la figura 15 se observa que hay una tendencia hacia el incremento de calcio en las células que fueron expuestas a la 7-hidroxycumarina y que éste incremento está directamente relacionado a la dosis y al tiempo de exposición (3 y 6 horas). El ensayo de las 12 horas, únicamente se hizo la determinación con la concentración más alta del compuesto cumarínico y se observa una disminución en la concentración de calcio detectado tanto en células tratadas como con etanol.

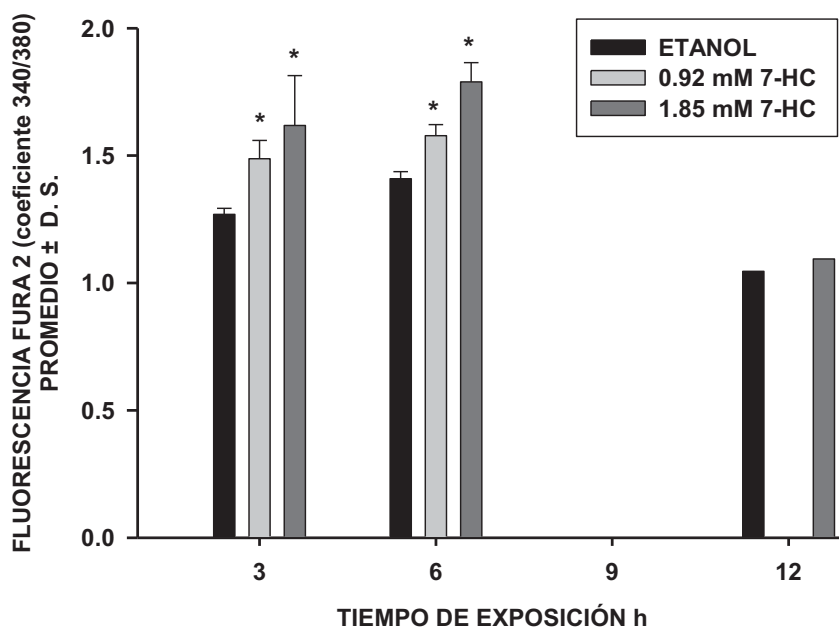


Figura 15. Variación de la concentración de calcio intracelular en células A-549 expuestas a a 0,0.92 y 1.85 mM 7-hidroxycumarina durante 3, 6 y 12 horas. Se observan las diferencias significativas en la concentración de calcio a las 3 y 6h comparadas con el etanol (control negativo). (P<0.05). *Diferencia significativa respecto a células tratadas con etanol.

Se realizaron repeticiones de los ensayos a dos tiempos de exposición a la 7-hidroxicumarina (3 y 6 horas) y dos concentraciones 0.92 y 1.85 mM en PBS. Los datos obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y posteriormente utilizando la prueba de Holm-Sidak para hacer comparaciones múltiples versus el control y los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas respecto al etanol en ambas concentraciones de 7-hidroxicumarina utilizadas a las 3 y a las 6h. Estos resultados coinciden con lo observado en los ensayos preliminares donde el incremento de calcio es dependiente de la concentración y del tiempo de exposición a la 7-hidroxicumarina.

6.5.2 Inhibición de canales activados por reservorios TRP con SKF-96363

Para determinar si el incremento de calcio observado proviene de las pozas internas de calcio en el retículo endoplásmico, utilizamos el bloqueador SKF-96363, de canales de calcio TRP (Receptores de potencial transitorio) y por ende el flujo de calcio, el cual se adicionó al mismo tiempo que la 7-hidroxicumarina (1.85mM/6hrs). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 16 donde sólo se observa una inhibición parcial del incremento de calcio y no una total como se esperaría, si el origen del calcio que estamos detectando fueran los depósitos en el retículo endoplásmico. Sin embargo, no podemos deducir con este ensayo y utilizando sólo este inhibidor de donde proviene el calcio que estamos detectando. Lo que si detectamos es que incrementa a consecuencia del tratamiento con la 7-hidroxicumarina y que posiblemente esté participando en la inducción a apoptosis en éstas células.

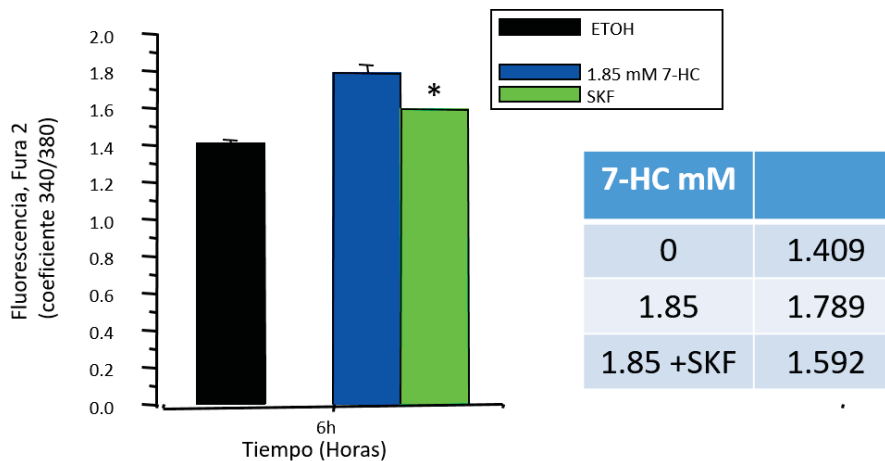


Figura 16. Ensayo de inhibición de canales SOC utilizando al inhibidor SKF-96363 en células tratadas con el inhibidor y 1.85mM de 7-hidroxicumarina durante 6h. Se observa una inhibición significativa y parcial del incremento de calcio inducido por la exposición a 7-HC.

Estos resultados nos muestran que hay un incremento en las concentraciones de calcio intracelular a consecuencia de la exposición, el paso siguiente será determinar si la apoptosis mediada por 7-hidroxicumarina esta modulada por el calcio que al incrementar induce la producción de especies reactivas de oxígeno, que alteren a la membrana mitocondrial y activen la vía intrínseca o si también hay una comunicación con la vía del retículo endoplásmico y si la caspasa 12 está participando.

6.6 Ensayos de microinyección en célula única *in vitro* tratadas con 7-hidroxicumarina para determinar la cinética de activación de la caspasa 3.

6.6.1 Evaluación de parámetros del estirador para la fabricación de puntas de microinyección.

Se evaluó la forma de las puntas para determinar los parámetros base. Aunque es importante mencionar que cada que se va a realizar un ensayo se deben verificar estos parámetros ya que factores como la temperatura y la humedad llegan a modificarlos. La Figura 17 muestra estas evaluaciones primarias utilizando la opción “Clean” del Microinyector.

Los parámetros estándar encontrados fueron:

Heat	Pull	Vel	Time
375	200	70	200

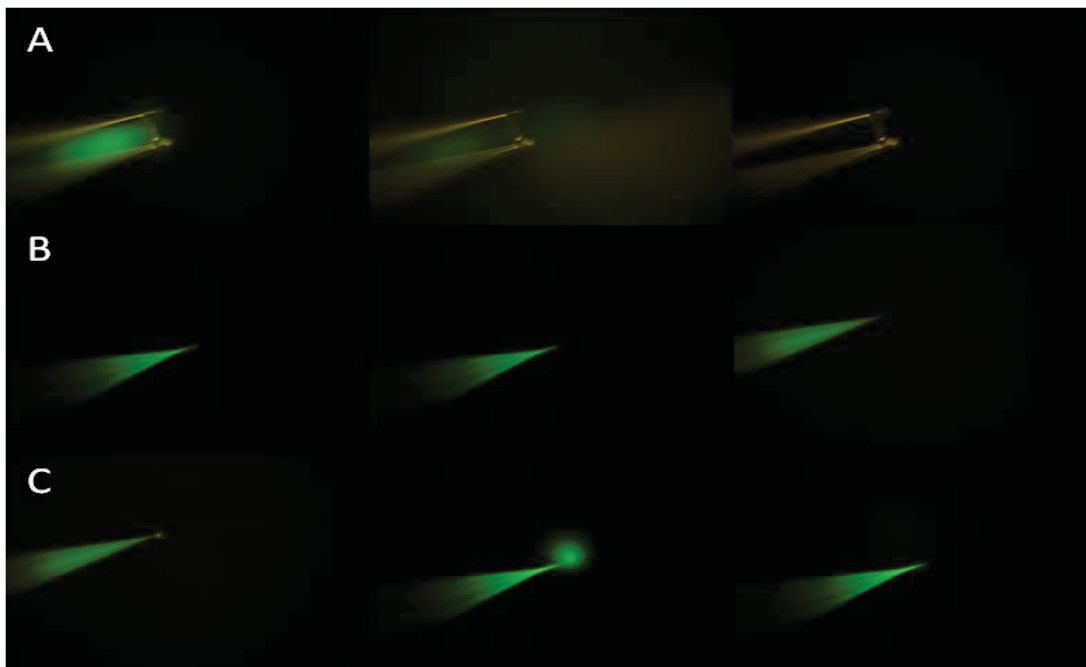


Figura 17. Sondeo inicial de la fabricación de puntas de microinyección para encontrar los parámetros base. A. Punta abierta y fracturada que permite que el reactivo permeabilice sin control. **B.** Punta demasiado cerrada e impermeable aunque se incremente la presión de la inyección. **C.** Punta ideal ya que no es permeable a menos que se le ejerza una presión estándar establecida por la función clean del microinyector. Imagen 20X

6.6.2 Ensayos de inyección: modificación de la presión.

A continuación, se realizaron pruebas de la presión de inyección con el microinyector, ya que un nivel muy bajo puede no inyectar el volumen deseado y uno muy alto puede causar daños a la membrana. Se probaron varias presiones, en la figura 18 se muestran los 3 ejemplos más cercanos a la presión necesaria y que la literatura indica como la presión típica de inyección entre 120-200 hPa (Ikeda,2004).

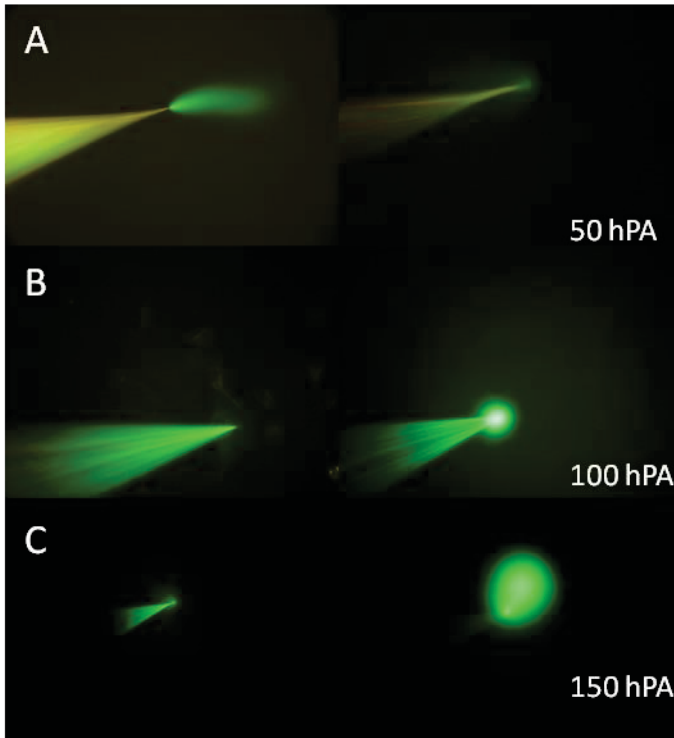


Figura 18. Variación de la Presión ejercida para la microinyección. **A.** La presión es muy poca e incluso la fluoresceína se difunde al medio rápidamente. **B.** Presión adecuada para volúmenes de inyección bajos p. ej. Microinyección nuclear. **C.** Presión adecuada para volúmenes de inyección medios. (Microinyección citoplásmica). Imagen 20X

6.6.3 Ensayos de microinyección en células A-549 sin tratamiento para evaluar la duración de la fluorescencia.

Se realizaron ensayos de microinyección utilizando fluoresceína en células A-549 tomando como referencia los datos de la literatura se realizaron variaciones en la velocidad de inyección en un rango de: 300 a 700 $\mu\text{m/s}$ (Ikeda,2004). Probamos velocidades desde 50 hasta 500 $\mu\text{m/s}$ ya que la fluorescencia observada a partir de los 400 $\mu\text{m/s}$ es de 120 min, superior a lo que necesitamos para observar la dinámica de activación de caspasas. En la figura 19 se muestran imágenes representativas de estas microinyecciones, la velocidad sugerida es de 400 $\mu\text{m/s}$.

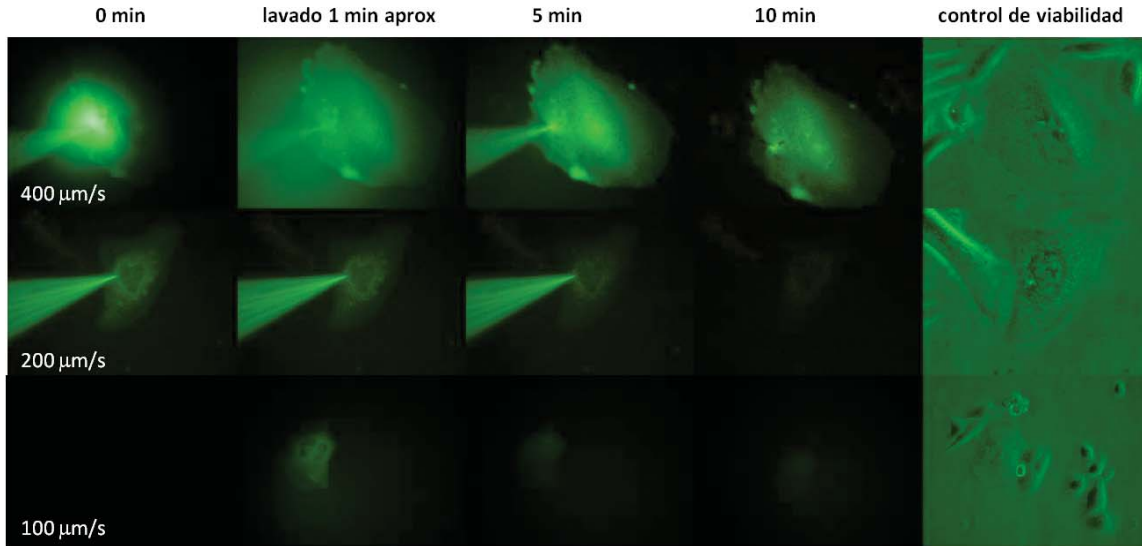


Figura 19. Variación del parámetro de velocidad de microinyección. Estas imágenes muestran una relación dependiente entre la velocidad de microinyección y la durabilidad de esta fluorescencia. Se muestran 3 series de ensayos de manera horizontal y en las columnas se muestran las células al momento de ser microinyectadas (cuando se pudo obtener la toma), posteriormente la columna del lavado donde se retira el medio y se pone medio nuevo para evitar el ruido de la fluoresceína que no entró a la célula, posteriormente imágenes a los 5 y 10 min. La última columna corresponde al control de viabilidad donde se tiene la imagen en contraste de fases para observar que la morfología de la célula no ha cambiado y que sólo la célula microinyectada es la que fluoresce.

6.6.4 Microinyección en célula única *in vitro* para la determinación de la cinética de activación de caspasa 3

Para determinar si la actividad basal de la caspasa 3, es decir sin inducción por la 7-hidroxicumarina (7-HC), era perceptible y podría ser un factor de ruido en nuestras mediciones, se inyectó el sustrato de caspasa 3 DEVD-R110 (verde) combinado con Rojo de Texas (rojo), utilizado como marcador de una correcta microinyección, en células sin tratamiento. Como resultado las imágenes obtenidas de estos ensayos sólo presentan fluorescencia roja correspondiente al marcador y la actividad basal perceptible de caspasa 3 no es representativa (Fig. 20).

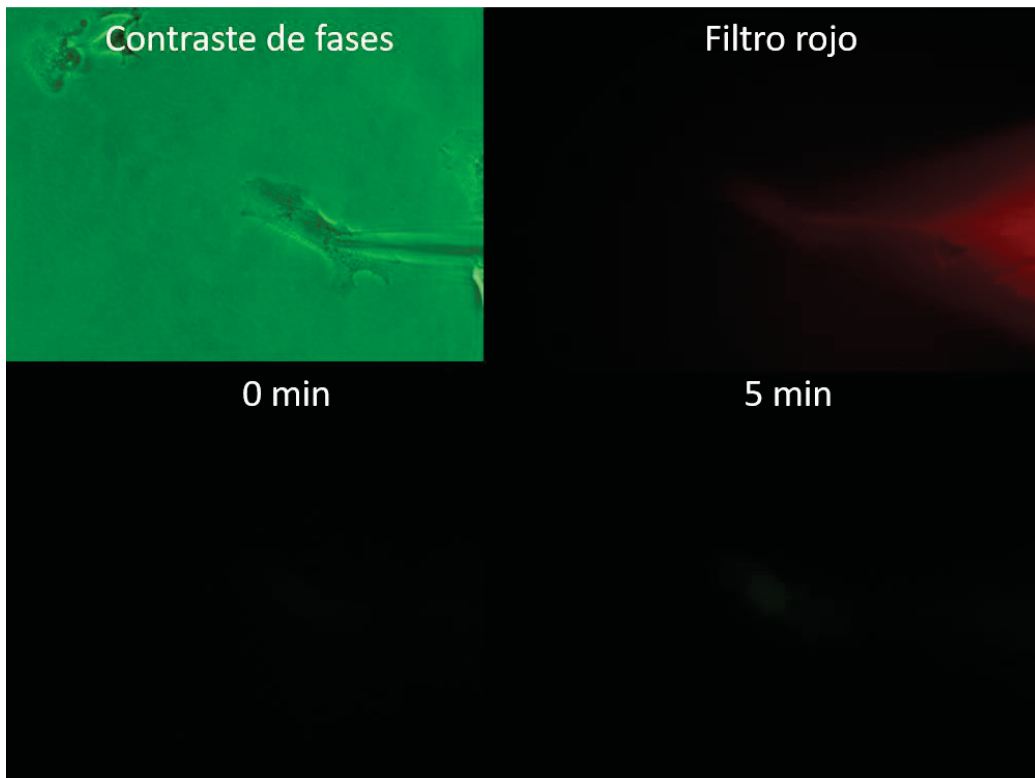


Figura 20. Dinámica de activación de caspasa 3 en una célula representativa A-549 sin exposición a 7-HC. A) Contraste de fase de la célula inyectada. B) Marcador Rojo de Texas. C y D) Ausencia de fluorescencia verde a los 0 y 5 min.

6.6.5 Cinética de actividad de caspasa 3 por exposición a 7-hidroxycumarina en células A-549 y Análisis de Imágenes.

Para determinar la activación de la caspasa 3 inducida por la 7-HC en células A-549, se expusieron estas células a 1.85 mM de 7-HC durante diferentes tiempos: 3, 6, 12, 18 y 24 h. Después se microinyectaron con el sustrato de caspasa 3 DEVD-R110 combinado con Rojo de Texas. Las imágenes obtenidas nos permitieron cuantificar la intensidad de fluorescencia contra el tiempo y construir cursos temporales de dicha activación por 7-HC o etanol (el disolvente del compuesto cumarínico). El proceso fue documentado capturando imágenes digitales con un intervalo de 5 segundos por un periodo de 10 minutos. (Figuras 21,23,25,27,29)

Después se realizó un análisis de imágenes a partir de áreas similares en cada célula, midiendo la relación intensidad/píxel de fluorescencia verde; los valores promedio se utilizaron para construir las curvas (Figuras 22,24,26,28,30).

Para el curso temporal de actividad de la caspasa 3 de células A-549 expuestas a diferentes tiempos al compuesto cumarínico o su disolvente, se realizó análisis de varianza (Kruskal-Wallis) y en todos los tiempos de exposición se encontraron diferencias estadísticamente significativas dentro del grupo, posteriormente prueba para identificar los grupos diferentes al tiempo cero y finalmente t de Student entre los datos obtenidos con 7-HC a diferentes tiempos de medición, para encontrar diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos. La tabla III resume las pruebas empleadas y las diferencias encontradas.

Tabla III. Diferencias estadísticas encontradas a los diferentes tiempos de exposición en los cursos temporales de la actividad de caspasa 3 de células A-549 expuestas a 1.85Mm DE 7-HC.

Tiempo de Exposición (h)	Prueba post-hoc	Diferencias respecto t=0 (seg) p<0.05	Prueba de t de Student p<0.05
3	Tukey	60, 120, 180	40, 60, 120
6	Mann-Withney	60, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480	Sin diferencias
12	Dunn's	40, 60, 120	Sin diferencias
18	Tukey	40, 60	Sin diferencias
24	Dunn's	40, 60, 120, 180	Sin diferencias

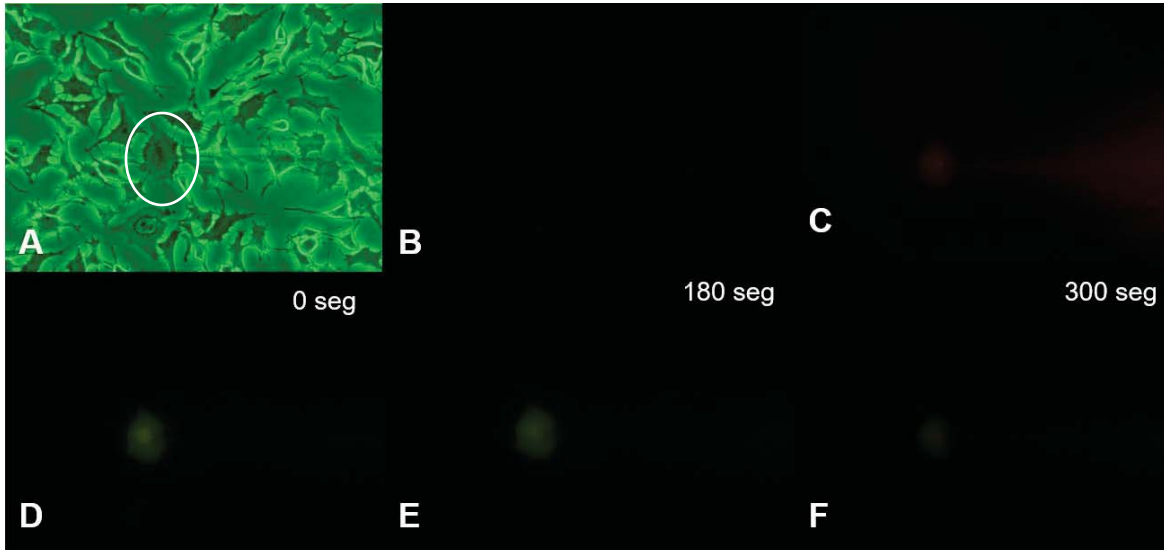


Figura 21. Dinámica de la activación de caspasa 3 en una célula representativa A-549 expuesta a 1.85 mM de 7-HC durante 3 h. A) Contraste de fase de la célula inyectada. B) Control de fluorescencia en la célula antes de inyectarse. C) Fluorescencia correspondiente al Rojo de Texas. D-F) Cambios de intensidad en la fluorescencia verde de R-110 asociada a la actividad de caspasa 3. Imagen 40X

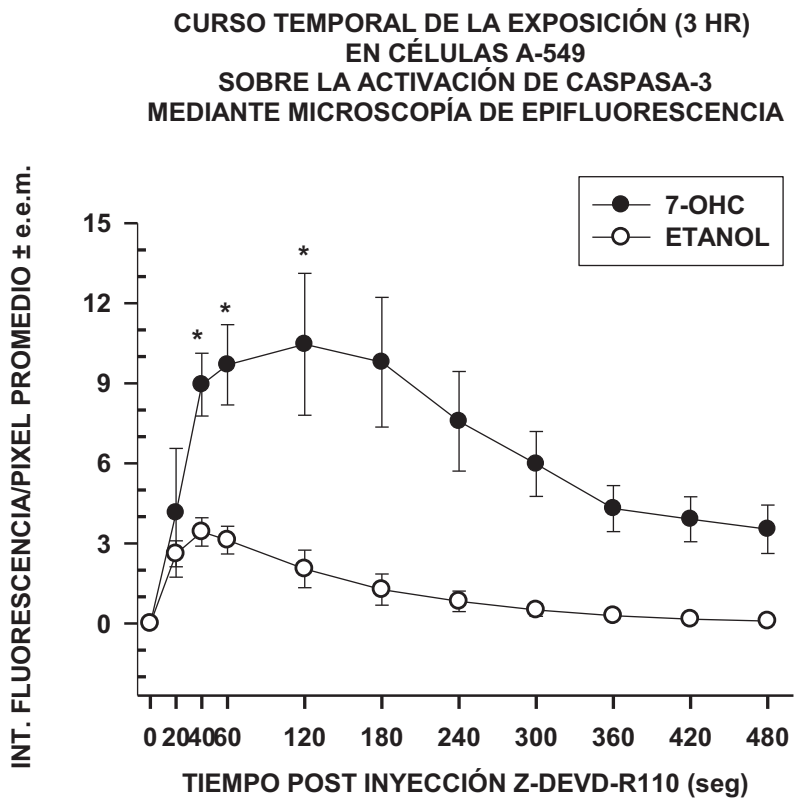


Figura 22. Cinética de las intensidades de fluorescencia R-110 asociada a la actividad de caspasa 3 que muestra el curso temporal de esta actividad en células A-549 expuestas durante 3 h a 1.85mM de 7-HC o únicamente a su disolvente etanol. Se realizó análisis de varianza (Kruskal-Wallis) y t de Student.

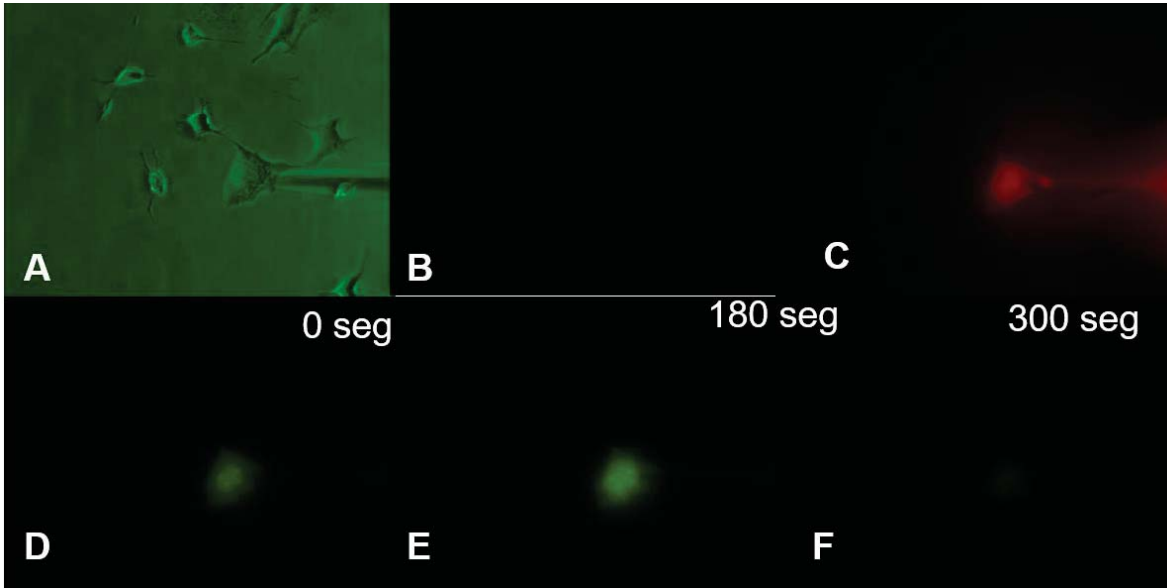


Figura 23. Dinámica de la activación de caspasa 3 en una célula representativa A-549 expuesta a 1.85 mM de 7-HC durante 6 h. A) Contraste de fase de la célula inyectada. B) Control de fluorescencia en la célula antes de inyectarse. C) Fluorescencia correspondiente al Rojo de Texas. D-F) Cambios de intensidad en la fluorescencia verde de R-110 asociada a la actividad de caspasa 3. Imagen 40X

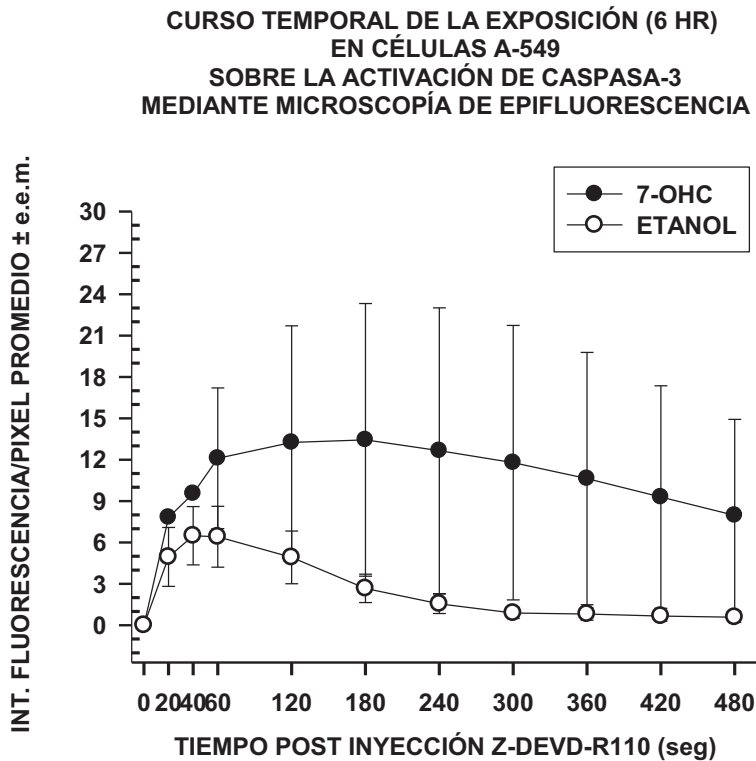


Figura 24. Cinética de las intensidades de fluorescencia R-110 asociada a la actividad de caspasa 3 que muestra el curso temporal de esta actividad en células A-549 expuestas durante 6 h a 1.85 mM de 7-HC o únicamente a su disolvente etanol. Se realizó análisis de varianza (Kruskal-Wallis) y t de Student sin encontrarse diferencias significativas.

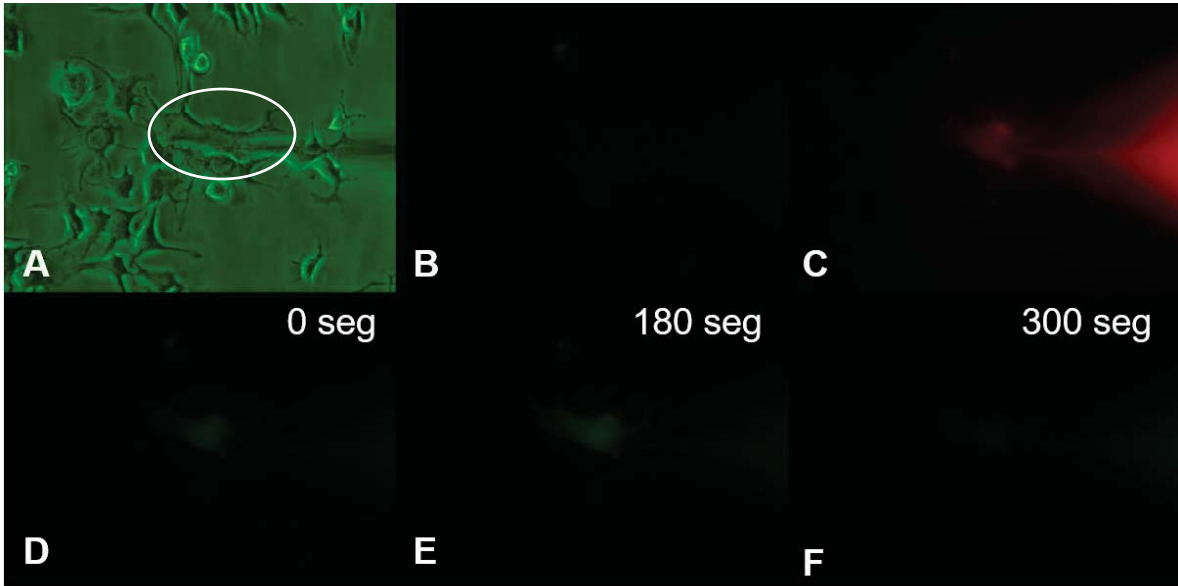


Figura 25. Dinámica de la activación de caspasa 3 en una célula representativa A-549 expuesta a 1.85mM de 7-HC durante 12 h. A)Contraste de fase de la célula inyectada. B) Control de fluorecencia en la célula antes de inyectarse. C) Fluorecencia correspondiente al Rojo de Texas. D-F) Cambios de intensidad en la fluorecencia verde de R-110 asociada a la actividad de caspasa 3. Imagen 40X

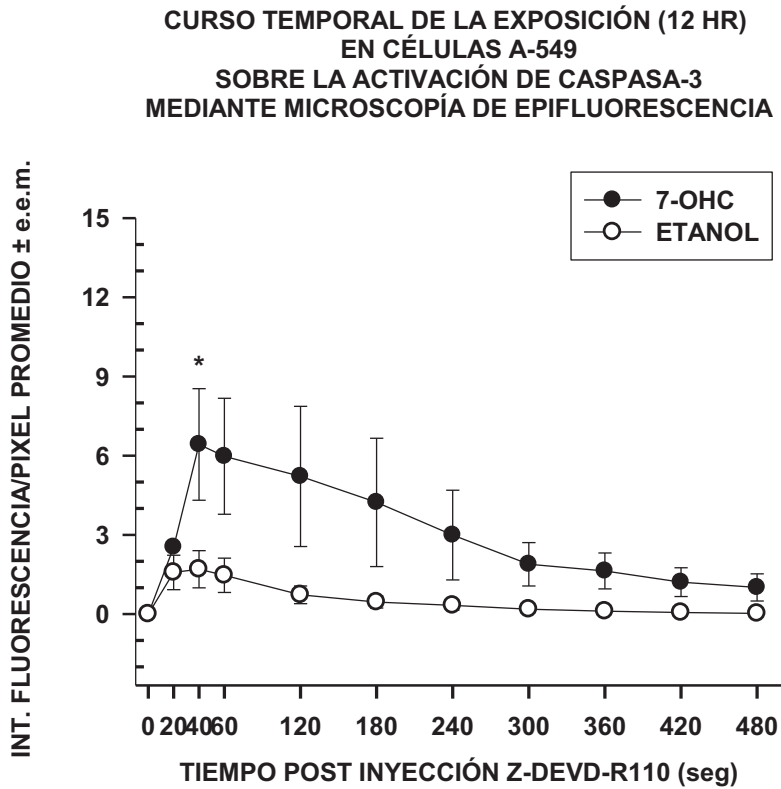


Figura 26. Cinética de las intensidades de fluorecencia R-110 asociada a la actividad de caspasa 3 que muestra el curso temporal de esta actividad en células A-549 expuestas durante 12 h a 1.85 mM 7-HC o únicamente a su disolvente etanol. Se realizó análisis de varianza (Kruskal-Wallis) y t de Student encontrándose diferencia significativa sólo a 40 segundos.

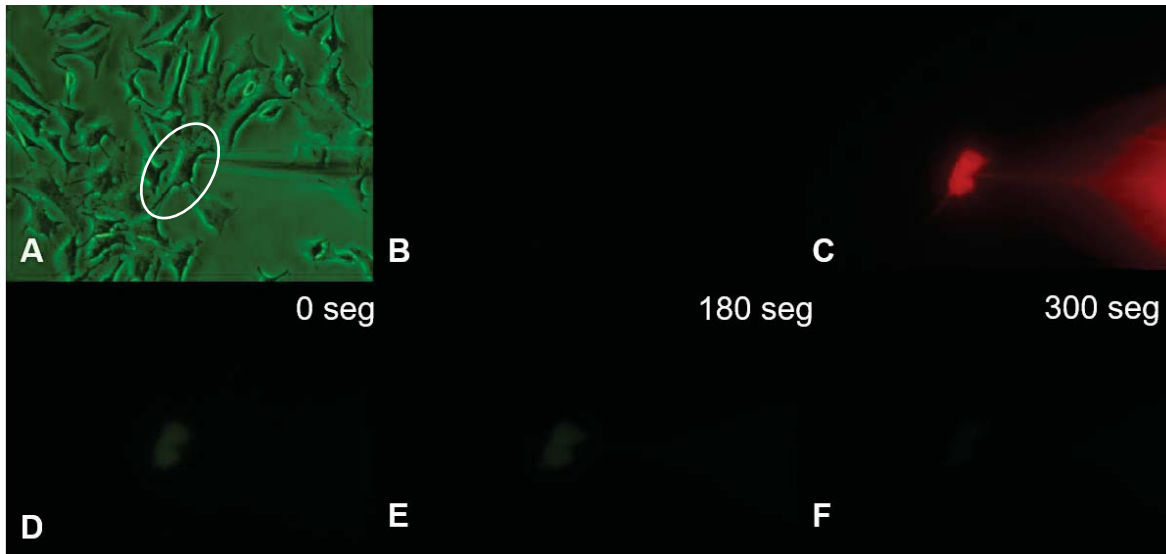


Figura 27. Dinámica de la activación de caspasa 3 en una célula representativa A-549 expuesta a 1.85 mM de 7-HC durante 18 h. A) Contraste de fase de la célula inyectada. B) Control de fluorescencia en la célula antes de inyectarse. C) Fluorescencia correspondiente al Rojo de Texas. D-F) Cambios de intensidad en la fluorescencia verde de R-110 asociada a la actividad de caspasa 3. Imagen 40X

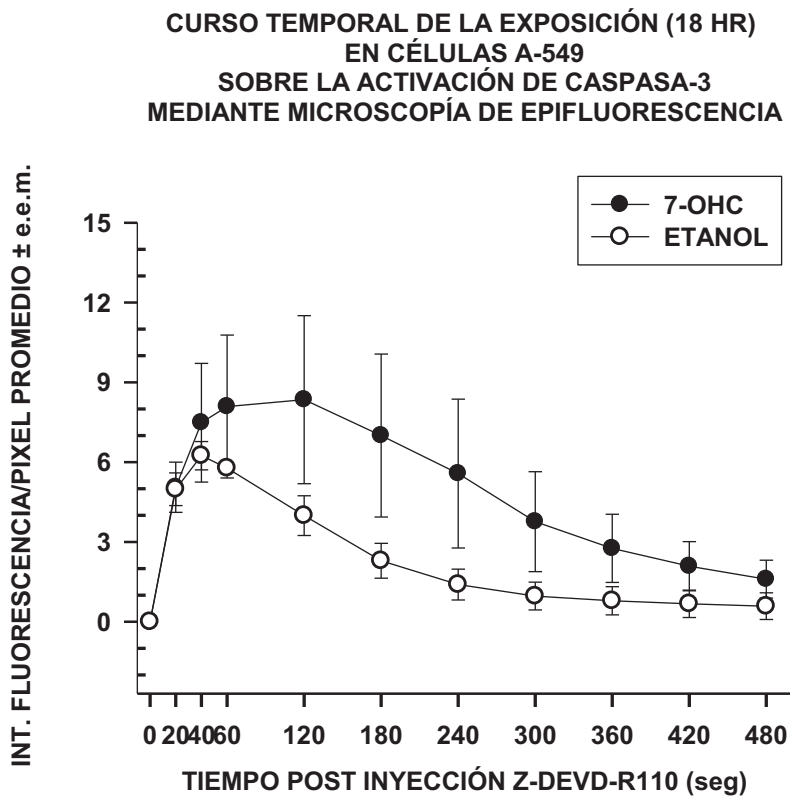


Figura 28. Cinética de las intensidades de fluorescencia R-110 asociada a la actividad de caspasa 3 que muestra el curso temporal de esta actividad en células A-549 expuestas durante 18 h a 1.85mM de 7-HC o únicamente a su disolvente etanol. Se realizó análisis de varianza (Kruskal-Wallis) y t de Student. Y no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.

6.6.6 Incremento en la actividad de caspasa 3 cuando las células son expuestas a 7-hidroxicumarina a diferentes tiempos

Con los datos obtenidos de los cursos temporales construidos pudimos determinar el incremento en la actividad de caspasa 3 de células A-549 tratadas con 1.85 mM de 7-hidroxicumarina durante diferentes tiempos, respecto a la actividad de caspasa 3 de células A-549 no tratadas con 7-hidroxicumarina. En todos los tiempos de exposición al compuesto cumarínico existe un incremento en la actividad de caspasa 3. Teniéndose el mayor incremento a las 3 horas de exposición con 512% de incremento. También se determinaron los tiempos máximos de estos cursos temporales, los datos obtenidos de los incrementos y los Tmax se encuentran en la Tabla IV.

Tabla IV. Porcentajes de incremento de la actividad de caspasa 3 en células expuestas a 7-HC por diferentes horas respecto al disolvente etanol y tiempos máximos de actividad de caspasa 3 para cada tratamiento. (IF) Promedio de Intensidad de Fluorescencia/pixel

T de exposición a 7-HC (h)	IF etanol	IF 7-HC	% de Incremento de actividad de caspasa 3	Tmax de actividad de caspasa 3 (seg)
3	2.04	10.46	512	120
6	2.67	13.44	503	180
12	1.70	6.42	378	40
18	3.99	8.34	209	120
24	3.56	6.6	185	60

6.6.7 Análisis de la velocidad inicial de la cinética de caspasa 3

En cada cinética se observa una fase de incremento exponencial, seguida de una meseta y una fase exponencial de disminución de la fluorescencia.

Se analizaron las velocidades iniciales de los cursos temporales obtenidos de la actividad de la caspasa 3 inducida por la exposición a 7-hidroxicumarina, en busca de procesos lineales para

ambos tratamientos. (Fig. 31-35). Al tiempo de exposición de 3 horas la regresión lineal de la cinética para la 7-HC tiene pendiente diferente de cero entre 0 y 60 segundos ($r^2=0.934$ y $p=0.033$), a diferencia de la regresión lineal del etanol que no tiene pendiente diferente de cero ($p=0.186$) (Fig. 31). En la cinética de la exposición a la 7-HC a las 6 h solamente la regresión de la 7-HC ($r^2=0.965$) mostró pendiente diferente de cero ($p=0.018$), la regresión del Etanol no mostró pendiente diferente de cero ($p=0.123$) (Fig. 32). A los demás tiempos de exposición a la 7-HC 12, 18 y 24h las regresiones lineales no mostraron pendientes distintas de cero.

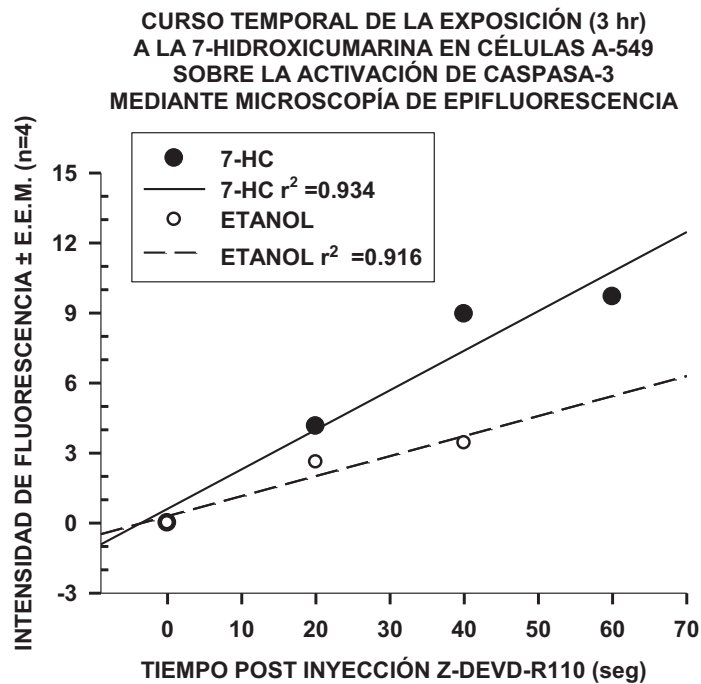


Figura 31. Análisis de velocidad inicial mediante regresión lineal del curso temporal de la exposición durante 3h a la 7-HC en células A-549 sobre la activación de caspasa 3. La pendiente para el tratamiento con 7-HC es distinta de cero ($p=0.033$ prueba t de student) y la del etanol no ($p=0.186$ prueba t de student).

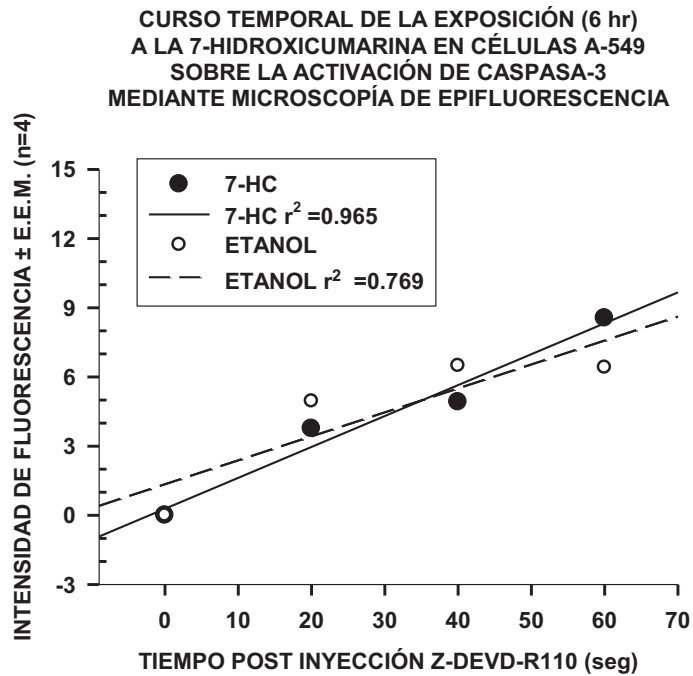


Figura 32. Análisis de velocidad inicial mediante regresión lineal del curso temporal de la exposición durante 6h a la 7-HC en células A-549 sobre la activación de caspasa 3. La pendiente para el tratamiento con 7-HC es distinta de cero ($p=0.018$ prueba t de student) y la del etanol no ($p=0.126$ prueba t de student).

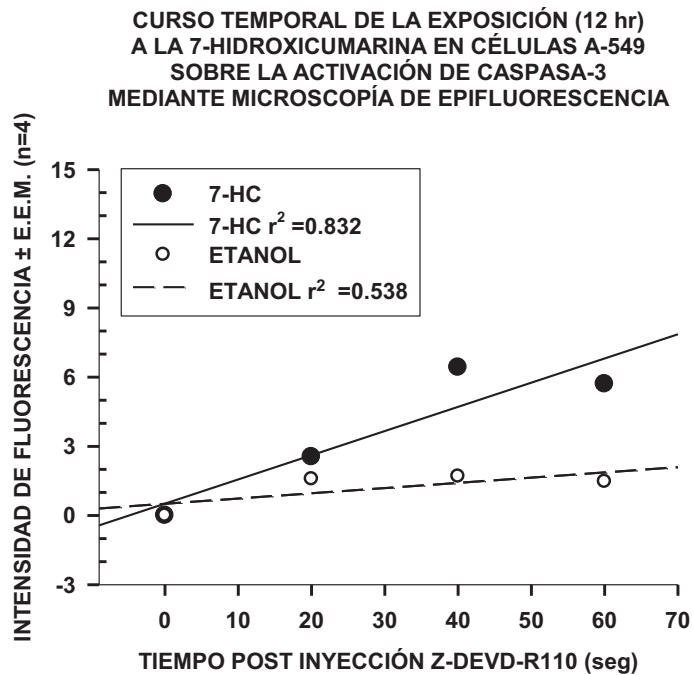


Figura 33. Análisis de velocidad inicial mediante regresión lineal del curso temporal de la exposición durante 12h a la 7-HC en células A-549 sobre la activación de caspasa 3. Las pendientes para el tratamiento con 7-HC y etanol no son distintas de cero ($p=0.087$ y $p=0.266$ prueba t de student respectivamente).

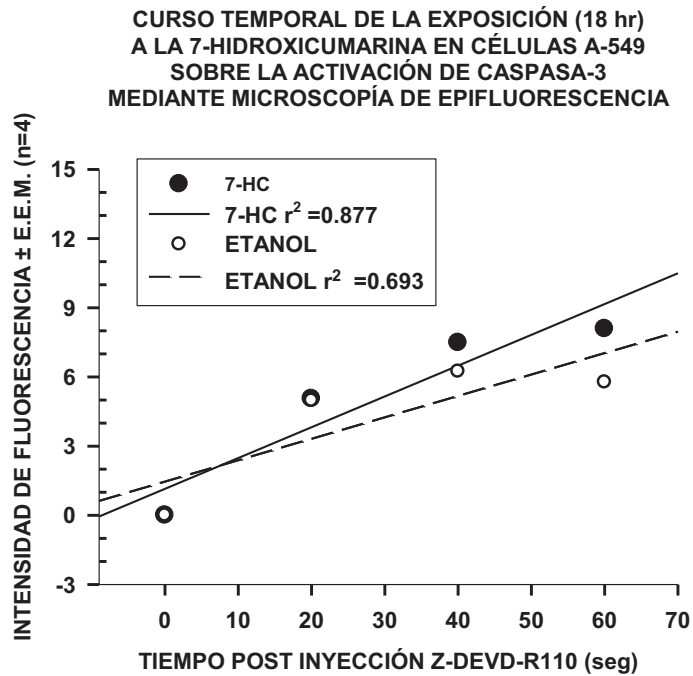


Figura 34. Análisis de velocidad inicial mediante regresión lineal del curso temporal de la exposición durante 18h a la 7-HC en células A-549 sobre la activación de caspasa 3. Las pendientes para el tratamiento con 7-HC y etanol no son distintas de cero ($p=0.063$ y $p=0.167$ prueba t de student respectivamente).

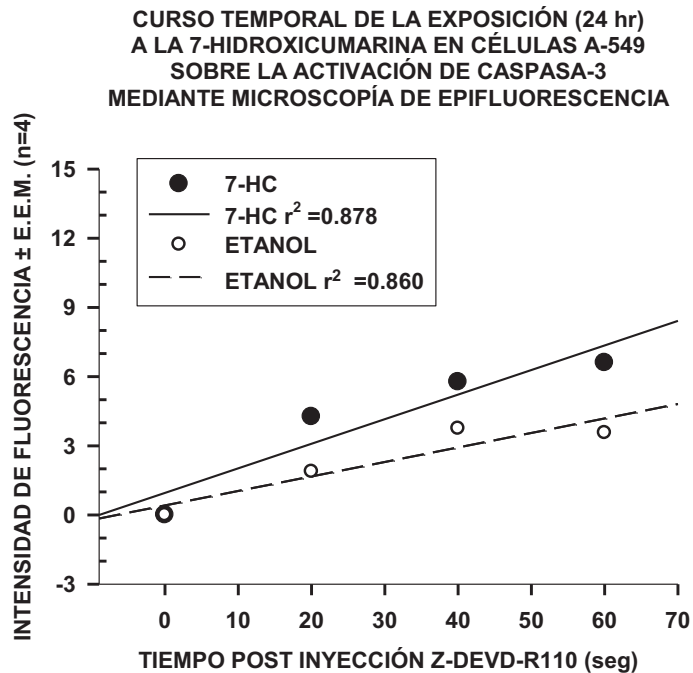


Figura 35. Análisis de velocidad inicial mediante regresión lineal del curso temporal de la exposición durante 24h a la 7-HC en células A-549 sobre la activación de caspasa 3. Las pendientes para el tratamiento con 7-HC y etanol no son distintas de cero ($p=0.063$ y $p=0.072$ prueba t de student respectivamente).

7. Discusión

En el presente trabajo se estudió la participación de la caspasa 3, en la inducción a apoptosis de células de adenocarcinoma pulmonar humano A-549 durante la exposición de 7-hidroxicumarina a diferentes concentraciones y tiempos.

A partir de las 12 horas de exposición a 7-hidroxicumaina se observaron al microscopio los siguientes cambios morfológicos asociados a apoptosis: encogimiento celular, la formación de vesículas membranales (blebbing) y los cuerpos apoptóticos, característicos de este tipo de muerte celular.³¹

En estudios previos, se demostró mediante citometría de flujo que la exposición de células A-427 de adenocarcinoma pulmonar humano a 0.98mM de 7-hidroxicumarina durante 4-6 horas, producía un incremento de 22 % de células positivas a Anexina V, un marcador de apoptosis temprana, comparado con el 12% cuando son expuestas a etanol (2.4% v/V).²³

Cuando analizamos los cambios moleculares observamos diferencias a partir de las tres horas de exposición, sin embargo, los cambios significativos se presentaron en su mayoría a las 24h de exposición con 1.85mM de 7-hidroxicumarina. Utilizando lisados celulares de las células inducidas a apoptosis con 7-hidroxicumarina se cuantificó la activación de caspasa 3, mediante la conversión de la procaspasa a caspasa 3 o utilizando sustratos específicos de la caspasa; y se demostró que esta activación era dependiente de la concentración de la 7-hidroxicumarina. El incremento en la actividad de caspasa 3 a las 24h de exposición fue del 67%; esto concuerda con lo reportado por Kim *et al* 2005, que observó el máximo efecto sobre la actividad de la caspasa 3 en células HL-60 tratadas por 25h con escopoletina (6-metoxi, 7-hidroxicumarina). En los ensayos realizados de inmunoelectrotransferencia se mostró que el desdoblamiento de procaspasa 3 a caspasa 3 también

es dependiente de la concentración y el tiempo; y que se presentan cambios sugerentes de procesos tempranos en esta inducción como el incremento en procaspasa 3.

La presencia de caspasa 3 activa debía estar asociada a la degradación de alguno de sus sustratos, observamos la disminución en la inmunodetección de la poli ADP-ribosa polimerasa (PARP), un sustrato de caspasa 3, proveniente de lisados de células expuestas a 1.85mM de 7-hidroxycumarina durante 24h, esta disminución también fue descrita por Eung-Kyung *et al* en 2005, en células HL-60 tratadas con escopoletina donde reporta la activación de caspasa 3 evidenciado por la escisión de PARP de 116 a 85kDa.⁵⁴

Nuestro grupo de trabajo en ensayos previos estudió la participación de la caspasa 8, enzima de la vía extrínseca de la apoptosis en la activación de caspasa 3 por exposición a la 7-hidroxycumarina sin que ésta presentara actividad. Por lo que se determinó como vía de activación apoptótica la vía intrínseca de la apoptosis mediante la activación de caspasa 7 por la vía mitocondrial y como consecuencia la activación de caspasa 3. Sin embargo, la caspasa 3 puede ser también activada por caspasa 12 mediante una vía que requiere el incremento intracelular de calcio. Chuang *et al*, en 2007, demostraron incrementos significativos en el flujo de calcio en células HeLa expuestas durante 24h con 25-100 μ M de cumarina, utilizando citometría de flujo;⁵⁵ en este estudio efectos sobre el flujo de calcio fueron detectados a concentraciones milimolares mayores de 7-hidroxycumarina durante 3h.

Hasta donde sabemos no se ha utilizado la microinyección en célula única para estudiar la activación de caspasas. Los resultados indican que la 7-hidroxycumarina induce rápidamente la activación de caspasa 3. La concentración que induce esta rápida activación de caspasa 3 es 1.85mM, esta

concentración disminuye la viabilidad solo un 10% después de 3h de exposición. La mayoría de los estudios muestran concentraciones máximas de cumarinas simples en un rango entre 60 y 200 μM en los que se observa una reducción en la viabilidad significativa desde 24 hasta 72 h.^{14,24,55,56,57,58} Sin embargo, no pudimos determinar si ésta rápida activación se debe a la unión de 7-hidroxicumarina con ligandos intracelulares en particular. Zlabinger *et al*, en 1994, utilizando cumarina marcada radioactivamente (^{14}C) y monocitos humanos, en ensayos de binding, demostró la presencia de sitios de unión para la cumarina en número relativamente alto (7.5×10^8 / célula); pero con una afinidad baja: $K_a \sim 2 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$.⁵⁹ Ensayos de inhibición con 7-hidroxicumarina revelaron que una concentración molar 4 veces mayor de esta sustancia era necesaria para desplazar el 50% de la cumarina de su sitio de unión, por lo que pueden existir sitios de unión para la 7-hidroxicumarina diferentes a los de la cumarina en teoría los efectos que observamos a 1.85 mM puede deberse a que en las células A-549 se encuentran estos sitios de unión.

En cada curva obtenida en el presente trabajo, se observó un incremento exponencial, una meseta y un decremento exponencial componentes característicos de una cinética enzimática, de todas las cinéticas, el efecto más representativo se presentó a las 3 horas de exposición donde la cinética de actividad de caspasa 3 de las células tratadas presenta diferencias con las células tratadas sólo con etanol. A mayores tiempos las células tratadas con 7-hidroxicumarina siguen presentando una tendencia y forma de la curva similar a la de tres horas, pero para encontrar diferencias significativas es probable que se necesite aumentar la n en cada ensayo, esperando disminuir con ello, las desviaciones entre los efectos la 7-hidroxicumarina de los datos obtenidos con etanol a mayores tiempos de exposición. Las comparaciones de las velocidades iniciales a través de regresiones lineales indicaron para el tiempo de exposición de tres horas que la regresión correspondiente a la

7-hidroxycumarina es una pendiente, por lo tanto se considera una cinética típica de primer orden para caspasa 3 bajo estas condiciones. A ningún otro tiempo de exposición se puede observar esto ya que los intervalos de confianza son muy amplios y no se pueden detectar diferencias de las regresiones obtenidas respecto al eje. Aunque también con el tratamiento a las 6 horas se puede observar una pendiente, no hay diferencias significativas con las células tratadas sólo con etanol.

Por otro lado, las cinéticas obtenidas son confiables, específicas y reproducibles, nos permitieron hacer un análisis cuantitativo a través de la fotografía digital y análisis de imágenes pixel por pixel, lo cual permite obtener información que por otros métodos sería muy difícil de obtener e imposible hacer *in vitro* en células vivas. Con esta información se pudo conocer la dinámica de la caspasa 3 dentro de la célula y se pudo observar que la actividad de esta caspasa no está circunscrita a ningún organelo de la célula, sino que su presencia es ubicua en el citoplasma lo cual es consistente con su activación mediante la vía intrínseca de apoptosis.

Efectos citotóxicos y citostáticos, se han reportado para diversas cumarinas de origen natural como esculetina^{56,57} y Osthol^{26,60} y sintéticas como quercetina.⁵⁸ Sin embargo, para la mayoría de ellas solo se reportan estudios de fase preclínica, en contraste las cumarinas han sido sujetas además a estudios clínicos fase I y fase II. Sus efectos y propiedades farmacocinéticas en humanos ya han sido reportados, al igual que su pronta conversión a 7-hidroxycumarina, metabolito al cual se le atribuye la actividad de mayor relevancia de la cumarina y su rara toxicidad a los pacientes.²¹ En un estudio fase I se determinó su pronta conversión a 7-hidroxycumarina, en éste estudio los pacientes recibieron dosis diarias entre 1000 y 7000 mg, presentando pocos efectos colaterales.⁴⁷ También ha sido reportado que la 7-hidroxycumarina no es sustrato de las proteínas relacionadas a resistencia de múltiples fármacos (MDR por sus siglas en inglés).^{20,61,62} La 7-hidroxycumarina también ha sido

utilizada en ensayos clínicos fase II, y ha sido designada como fármaco huérfano por la FDA (EU),¹⁰ por lo que existe la posibilidad de que se hagan estudios posteriores donde los resultados exitosos de la 7-hidroxycumarina deriven en su empleo conjunto con las terapias convencionales como tratamiento para el cáncer pulmonar.

8. Conclusiones

- La exposición a 7-hidroxicumarina en células A-549 de adenocarcinoma pulmonar humano induce cambios en la actividad de caspasa 3 y estos cambios son dependientes de la concentración y del tiempo.
- La exposición a 7-hidroxicumarina en células A-549 produce cambios en el calcio intracelular sin embargo falta determinar si la vía de caspasa 12 está participando en la inducción a apoptosis.
- Se determinó la dinámica *in vitro* de la actividad específica de caspasa 3, inducida por el tratamiento a 7-hidroxicumarina en células de adenocarcinoma pulmonar humano A-549, mediante la técnica de microinyección en célula única, por microscopía de epifluorescencia.
- La activación de caspasa 3 por exposición a la 7-hidroxicumarina se presenta como una cinética enzimática y a tiempos muy tempranos de exposición presenta un comportamiento de primer orden.

9. Literatura Citada

1. World Health Organization. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
2. Arrieta O, Guzmán E. Cáncer de pulmón de células no pequeñas. Clínicas Oncológicas de Iberoamérica. Editorial Médica PyDESA. 1ª ed. 2016. México D.F. p3.
3. Arrieta O, Guzmán-de Alba E, Alba-López LF, Acosta-Espinoza A, Alatorre-Alexander J, Alexander-Meza JF, *et al.* Consenso nacional de diagnóstico y tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas. Rev Invest Clin. 2013; 65 (Suppl 1): s5-s84
4. INEGI Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Disponible en www.inegi.org.mx
5. U.S. National Cancer Institute (NCI): Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. SEER Stat Fact Sheets: Lung and Bronchus Cancer. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/lungb.html> Accesado mayo 2, 2017.
6. Hui D, Santos R, Chisholm G, Bruera E. Symptom expression in the last seven days of life among cáncer patients admitted to acute palliative care units. J Pain Sym Man 2014; 50: 488-494.
7. Brambilla E, Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y. The new World Health Organization classification of lung tumours. Eur Respir J. 2001;18(6):1059-68. Review.
8. Sup Shim H, Hye Lee D, Ju Park E, Hoon Kim S. Histopathologic Characteristics of Lung Adenocarcinomas with Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in the International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society Lung Adenocarcinoma Classification. Arch Pathol Lab Med. 2011; 135:1329-1334
9. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson A, Geisinger K, Yatabe Y, *et al.* International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. J Thorac Oncol. 2011; 6(2): 244–285
10. U.S. Food and Drug Administration (FDA): Search Orphan Drug Designations and Approvals. http://www.accessdata.fda.gov/scripts/opdlisting/oopd/OOPD_Results_2.cfm. Accesado mayo 2, 2017.
11. Asiri A.M. Synthesis and characterization of new coumarin derivatives as ultraviolet absorbers. Pigment & Resin Technology 2010; 32:5, 326-330.
12. Olomola TO, Klein R, Mautsa N, Sayed Y, Kaye PT. Synthesis and evaluation of coumarin derivatives as potential dual-action HIV-1 protease and reverse transcriptase inhibitors. Bioorg Med Chem. 2013; 21(7):1964-71. doi: 10.1016/j.bmc.2013.01.025
13. Marshall ME, Butler KM, Fried A. Phase I evaluation of coumarin (1,2 benzopyrone) and cimetidine in patients with advanced malignancies. Mol Biother 1991; 3(3):170-178.

14. Mohler JL, Gomella LG, Crawford D, Glode LM, Zippe CD, Fair WR, *et al* Phase II evaluation of coumarin (1-2 benzopyrone) in metastatic prostatic carcinoma. *Prostate* 1992; 20:123-131.
15. Lake BG. Coumarin Metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. *Food Chem Toxicol* 1999; 37: 423-453.
16. OSHA Occupational Safety and Health Administration:
https://www.osha.gov/dts/chemicalsampling/data/CH_229620.html. Acceso Abril 7,2017.
17. Hassanzadeh M, Vahdati N, Eghbal S, Jalali N. Inter-individual Variability of Coumarin 7-hydroxylation (CYP2A6 activity) in an Iranian Population. *Iran J Basic Med Sci.* 2013; 16(4): 610-4.
18. Elinos-Báez CM, Leon F, Santos E. Effects of coumarin and 7-OH-coumarin on bcl-2 and Bax expression in two human lung cancer cell lines *in vitro*. *Cell Biol Int* 2005; 29: 703-708.
19. Casley-Smith JR: Coumarin in the Treatment of Lymphoedema and Other High-Protein Oedemas. En: Casley-Smith JR. *Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action*. Chichester, John Wiley & Sons, 1997; 143-184.
20. Thornes RD, Lynch G, Seehan MV. Cimetidine and coumarin therapy of melanoma. *Lancet* 1982; 2: 328.
21. Cox D, O'Kennedy R, Thornes RD. The rarity of liver toxicity in patients treated with coumarin (1,2- benzopyrone). *Hum Toxicol* 1989; 8: 501-506
22. Dexeus FH, Logothetis CJ, Sella A, Fitz K, Amato R, Reuben JM, *et al*. Phase II study of coumarin and cimetidine in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 1990; 8: 325-329.
23. Lopez-Gonzalez JS, Prado-Garcia H, Aguilar-Cazares D, Molina-Guarneros JA, Morales-Fuentes J and Mandoki JJ. Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxycoumarin on human lung carcinoma cell lines. *Lung Cancer* 2004; 43: 275-283.
24. Alvarez-Delgado C, Reyes-Chilpa R, Estrada Muñiz E, Mendoza-Rodríguez A, Quintero-Ruiz A, Solano J, *et al*. Coumarin A/AA induces apoptosis-like cell death in HeLa cells mediated by the release of apoptosis-inducing factor. *J Biochem Mol Toxicol* 2009; 23: 263-272.
25. Shi-Ying Z, Yin L, Dong J, Jun Z, Jin-Feng G. Anticancer effect and apoptosis induction by quercetin in the human lung cancer line A-549. *Molecular Medicine Reports* 2012; 5: 822-826.
26. Zhang L, Jiang G, Yao F, He Y, Liang G, Zhang Y, *et al*. Growth inhibition and apoptosis induced by Osthole, a natural coumarin, in Hepatocellular carcinoma. *PloSONE* 2012; 7(5): e37865.

27. Goel A, Chhabra R, Ahmad S, Prasad AK, Parmar VS, Ghosh B, *et al.* DAMTC regulates cytoskeletal reorganization and cell motility in human lung adenocarcinoma cell line: An integrated proteomics and transcriptomics approach. *Cell Death Dis* 2012; 3: e402
28. Nasr T, Bondock S, Youns M. Anticancer activity of new coumarin substituted hydrazide-hidrazone derivatives. *Eur J Med Chem.* 2014; 76: 539-548.
29. Bröker L, Kruyt F, Giaccone G. Cell death independent of Caspases: A review. *Clin Cancer Res* 2005; 11(9):3155-3162
30. Evan G, Vousden K. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001; 411: 342-348.
31. Schulze-Bergkamen H, Kramer PH. Apoptosis in Cancer-Implications for Therapy. *Sem in Oncol* 2004; 31 (1): 90-119.
32. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang T, Zhou T, Liu B, *et al.* Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *World J Gastroenterol.* 2012; 45: 487-498.
33. Nakagawa T, Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families: activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 2000; 150:887–894
34. Moserova I, Kralova J. Role of ER stress response in photodynamic therapy: ROS generated in different subcellular compartments trigger diverse cell death pathways. *PLoS One.* 2012; 7(3): e32972. doi: 10.1371/journal.pone.0032972.
35. Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, Tohyama M. Activation of Caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem.* 2001; 276:13935–13940
36. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000; 1: 11–21.
37. Martinez JA, Zhang Z, Svetlov SI, Hayes RL, Wang KK, Larner SF. Calpain and caspase processing of caspase-12 contribute to the ER stress-induced cell death pathway in differentiated PC12 cells. *Apoptosis* 2010; 15:1480–1493
38. Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome *c*-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem.* 2002; 277:34287–34294
39. Rao RV, Castro-Obregon S, Frankowski H, Schuler M, Stoka V, del Rio G, Bredesen DE, Ellerby HM. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. *J Biol Chem* 2002; 277:21836–21842
40. Jing-Yuan C, Yung-Feng H, Hsu-Feng L, Heng-Chen H, Jai-Sing Y, Te-Mao L, Nai-Wen C, Jing-Gung C. Coumarin induces cell cycle arrest and apoptosis in human cervical cancer HeLa

cells through a mitochondria-and caspase-3 dependent mechanism and NF- κ B down-regulation. *In vivo* 2007; 21: 1003-1010.

41. Lavrik I, Golks A, Krammer P. Caspases: pharmacological manipulation of cell death 2005; 115: 2665-2672.
42. Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013; 5:1–24
43. Thornberry NA, Lazebnik Y. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1997; 272:17907-17911.
44. Nicholson DW, Thornberry A. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem. Sci.* 1997; 22: 299-306
45. Porter AG, JaÈnicke RU. Roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Diff.* 1999; 6: 99-104
46. Zacharski LR, Henderson WG, Rickles FR, Forman WB, Cornell CJ, Jackson R, *et al.* Effect of warfarin on survival in small cell carcinoma of the lung. *JAMA* 1981; 245 (8): 831-835.
47. Marshall ME, Mohler JL, Edmonds K, Williams B, Butler K, Ryles M, *et al.* An updated review of the clinical development of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin. *J Cancer Res Clin Oncol* 1994; 120 (Suppl): S39-S42.
48. Kawaii S, Tomono Y, Ogawa K, Sugiura M, Yano M, Yoshizawa Y. The antiproliferative effect of coumarins on several cancer cell lines. *Anticancer Res* 2001; 21: 917-924.
49. Jiménez-Orozco FA, López –González JS, Nieto-Rodríguez A, Velasco-Velázquez MA, Molina-Guarneros JA, Mandoki JJ, *et al.* Decrease of cyclin D1 in the human lung adenocarcinoma cell line A-427 by 7-hydroxycoumarin. *Lung Cancer* 2001; 34: 185-194
50. Musa MA, Badisa VL, Latinwo LM, Patterson TA and Owens MA: Coumarin-based benzopyranone derivatives induced apoptosis in human lung (A549) cancer cells. *Anticancer Res* 2012; 32: 4271-4276.
51. Kim AD, Maduma Hegwage SR, Piao MJ, Kang KA, Cho SJ, Hyun JW. Esculetin induces apoptosis in human colon cancer cells by inducing endoplasmic reticulum stress. *Cell Biochem Funct.* 2015; 33(7): 487-494.
52. Chang HT, Chou CT, Lin YS, Shie P, Kuo DH, Jan CR, *et al.* Esculetin, a natural coumarin compound, evokes Ca (2+) movement and activation of Ca (2+)-associated mitochondrial apoptotic pathways that involved cell cycle arrest in ZR-75-1 human breast cancer cells. *Tumour Biol.* 2016; 37(4): 4665-4678
53. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Applications to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.

54. Eun-Kyung K, Kang-Beom K, Byung-Cheul S, Eun-A S, Young-Rae L, Jong-Suk K, *et al.* Scopoletin induces apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by activations of nuclear factor kappaB and caspase-3. *Life Sci.* 2005; 77(7):824-36
55. Chuang JY, Huang YF, Lu HF, Ho HC, Yang JS, Li TM, *et al.* Coumarin induces cell cycle arrest and apoptosis in human cervical cancer HeLa cells through a mitochondria- and caspase-3 dependent mechanism and NF-kappaB down-regulation. *In vivo* 2007; 21: 1003-1009.
56. Chu CY, Tsai YY, Wang CJ, Lin WL, Tseng TH. *Eur J Pharmacol* 2001; 416: 25-32.
57. Yang JY, Della-Fera MA, Baile CA. Esculetin induces mitochondria-mediated apoptosis in 3T3-L1 adipocytes. *Apoptosis* 2006; 11: 1371-1378.
58. Zheng SY, Li Y, Jiang D, Zhao J, Ge JF. Anticancer effect and apoptosis induction by quercetin in the human lung cancer line A-549. *Mol Med Rep* 2012; 5: 822-826.
59. Zlabinger GJ, Nöhammer C, Böhmig GA, Menzel JE. Mode of action of coumarin in immune cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 1994; 120 (Suppl): S17-S18.
60. Shokoohinia Y, Hosseinzadeh L, Alipour M, Mostafaie A, Mohammadi-Motlagh HR. Comparative evaluation of cytotoxic and apoptogenic effects of several coumarins on human cancer cell lines: Osthole induces apoptosis in p53-deficient H1299 cells. *Adv Pharmacol Sci* 2014; 2014: 847574.
61. Jain PK. Coumarin: Chemical and pharmacological profile. *J App Pharm Sci* 2012; 2: 236-240.
62. Wittgen HG, van den Heuvel JJ, van den Broek PH, Siissalo S, Groothuis GM, de Graaf IA, *et al.* Transport of the coumarin metabolite 7-hydroxycoumarin glucuronide is mediated via multidrug resistance-associated proteins 3 and 4. *Drug Metab Dispos* 2012; 40: 1076-1079.

ANEXO

ARTÍCULO

Soto-Núñez M, Díaz-Morales KA, Cuautle-Rodríguez P, Torres-Flores V, López-González JS, Mandoki-Weitzner JJ, Molina-Guarneros JA. Single-cell microinjection assay indicates that 7-hydroxycoumarin induces rapid activation of caspase-3 in A549 cancer cells. *Exp Ther Med*. 2015 NOV;10(5):1789-1795.

Single-cell microinjection assay indicates that 7-hydroxycoumarin induces rapid activation of caspase-3 in A549 cancer cells

MARIBEL SOTO-NUÑEZ¹, KAREN AZUCENA DÍAZ-MORALES¹, PATRICIA CUAUTLE-RODRÍGUEZ²,
VÍCTOR TORRES-FLORES¹, JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ-GONZÁLEZ³,
JUAN JOSÉ MANDOKI-WEITZNER¹ and JUAN ARCADIO MOLINA-GUARNEROS¹

¹Department of Pharmacology, School of Medicine; ²Research Division, School of Medicine, National University of Mexico, Mexico City 04510; ³Department of Chronic-Degenerative Diseases, National Institute of Respiratory Diseases 'Ismael Cosío Villegas', Mexican Ministry of Health, Mexico City 14080, Mexico

Received May 9, 2015; Accepted September 1, 2015

DOI: 10.3892/etm.2015.2765

Abstract. Coumarins have attracted intense interest in recent years due to their apoptogenic effects. The aim of the present study was to determine whether 7-hydroxycoumarin (7-HC) induces changes in caspase-3 (C-3) activity in A549 human lung carcinoma cells. A range of analytical techniques, including colorimetric and fluorometric assays, western blotting, single-cell microinjection, fluorescence microscopy and image analysis were conducted to elucidate the effects of 7-HC. A 24-h exposure to 1.85 mM 7-HC induced a 65% increase in C-3 activity, and a notable conversion of procaspase-3 to C-3, in addition to poly(ADP-ribose)polymerase cleavage. Furthermore, morphological changes associated with apoptosis were observed. Exposure of the cells to 7-HC for 3 or 6 h increased calcium conductance by 27%. By performing the single-cell microinjection of a specific fluorescent substrate of C-3 into previously 7-HC-exposed cells, a typical enzymatic kinetic profile of C-3 activation was identified a number of hours prior to the morphological and biochemical changes associated with apoptosis being observed. These results suggest that the rapid *in vivo* activation of C-3 is induced by 7-HC, the most relevant biotransformation product of coumarin in humans.

Introduction

Lung cancer is a global public health issue. In the USA, cancer of the lung and bronchus represents 13.5% of all new cancer cases. The estimated number of new cases for 2014 in the USA is 224,210 and the estimated number of patients that will succumb to these diseases is 159,260 (1). The US National Cancer Institute defines targeted cancer therapies as drugs or other substances that interfere with specific molecules associated with cancer cell growth and survival. Targeted cancer therapies that have been approved for use include agents that prevent cell growth signaling, interfere with the development of tumor-supplying blood vessels, induce cancer cell death, stimulate the immune-mediated destruction of cancer cells and/or deliver toxic drugs to cancer cells. These therapies are frequently cytostatic, blocking tumor cell proliferation. At present, targeted therapies are the focus of copious anticancer drug development research efforts, which aim to identify of targets that are crucial to cancer cell growth and survival (2).

The US Food and Drug Administration (FDA) approved coumarin as an orphan drug for the treatment of renal cell carcinoma on December 22, 1994 (3). The name coumarin is derived from the word coumarou, an alternative name for the tonka bean (*Dipteryx odorata* Willd., Fabaceae). Chemically, coumarins have a benzopyrone structure. Umbelliferone, esculetin and scopoletin are the most widespread coumarins in nature (4). Coumarins have been investigated as potential treatments for various clinical conditions, such as high protein edema (5), chronic infections (6,7) and cancer (8-10). The apoptogenic properties of coumarins have attracted intense interest in recent years. The induction of apoptosis by natural (11-18) and synthetic (19-21) coumarins has been reported in human leukemia cells, lung carcinoma cell lines, adipocytes, HeLa cells, hepatocellular carcinoma, human neuroblastoma cell lines and human prostate cancer cell lines. The induction of apoptosis occurs via mitochondrial pathways, including the modulation of the NF- κ B, mitogen-activated protein kinase (MAPK) and p53 pathways, which subsequently activate caspase-3 (C-3)-dependent mechanisms. The downregulation of Rho GTPases (RhoGDI α) by a coumarin derivative

Correspondence to: Dr Juan Arcadio Molina-Guarneros, Department of Pharmacology, School of Medicine, National University of Mexico, Building 'D', First floor, Circuito escolar s/n, Ciudad Universitaria, Av. Universidad 3000, Colonia Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico
E-mail: molina_ja2007@yahoo.com.mx

Key words: apoptosis, caspase-3, 7-hydroxycoumarin, microinjection, A549 cells

through transcriptomic and proteomic mechanisms (22) has been described. A previous study (12) observed that the A427 lung carcinoma cell line exhibited increases in the proportion of Annexin-V-positive cells of 50 and 83% compared with solvent-treated cells (estimated using flow cytometry), when exposed to 100 $\mu\text{g/ml}$ coumarin and 7-hydroxycoumarin (7-HC), respectively, for 4 h.

The aim of the present study was to determine whether changes in C-3 activity are induced in a single live A549 human lung carcinoma cell by treatment with 7-HC, the primary human biotransformation product of coumarin (23), by performing the single-cell microinjection of a C-3 substrate.

Materials and methods

Reagents. A549 lung carcinoma cells (CRM-CCL-185) were obtained from American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). Ionomycin and RPMI-1640 medium were purchased from Gibco Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). Fetal bovine serum (FBS) was obtained from GE Healthcare Life Sciences (Logan, UT, USA). MTT, 5-bromo-4-chloro-3'-indolyl phosphate/nitro-blue tetrazolium chloride (BCIP/NBT), ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) tetrasodium salt and a caspase-3 colorimetric assay kit were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Monoclonal anti-caspase 3 clone 4-1-18 (#MA1-16843) and monoclonal anti-poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) clone 123 antibodies (#43600) were obtained from Zymed Laboratories, Inc. (San Francisco, CA, USA). Rhodamine 110, bis-(N-CBZ-L-aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L-aspartic acid amide) (Z-DEVD-R110) was purchased from Invitrogen Life Technologies (Camarillo, CA, USA). Borosilicate glass capillaries (1B100F-4) were obtained from World Precision Instruments, Ltd. (Sarasota, FL, USA). Dextran-Texas Red [3,000 molecular weight (MW)], dextran-fluorescein isothiocyanate (FITC) (3,000 MW) and Fura-2AM dyes were purchased from Molecular Probes Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). Tissue culture flasks (80 cm^2) and 6-well multidishes were obtained from Nunc A/S (Roskilde, Denmark). A 35x10-mm polystyrene dish was purchased from Corning, Inc. (New York, NY, USA).

Cell culture. A549 human lung carcinoma cells were cultured at 37°C in 5% CO_2 using RPMI-1640 medium, supplemented with a 10% heat-inactivated FBS. Cells were sub-cultured through trypsinization, seeded at 2×10^5 cells/well in 6-well boxes or Petri dishes, and left to affix for 24 h prior to exposure to ethanol or a solution of 7-HC in ethanol. In each case the final solvent concentration was 3%.

Cell viability assay. The viability of the cell line was determined using an MTT assay (24). Cells were seeded at a density of 5×10^3 cells/100 μl RPMI-1640 in a 96-well microplate. Cells were treated with ethanol (control) or a solution of 7-HC in ethanol (1.85 mM) for 24 h. The final concentration of ethanol was 3% (v/v). The number of viable cells was estimated by treatment with 20 μl /well MTT (5 mg/ml) for 4 h, enabling the mitochondrial succinate dehydrogenase in viable cells to reduce MTT to purple formazan crystals. The medium was aspirated and 100 μl dimethyl sulfoxide (DMSO)/well was

added. Crystals were dissolved in DMSO and the absorbance at 570 nm was measured using an ELx800 microplate reader (Biotek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). The percentage inhibition of cell viability (%IC) was measured using the following formula: %IC = [(1 - absorbance of cells treated with 7-HC in ethanol/absorbance of cells in ethanol) x 100].

Colorimetric assay to determine the time course and concentration response of C-3 activity. To evaluate the concentration response, A549 cells were exposed to ethanolic solutions of 7-HC (0.61, 1.23 or 1.85 mM) for 24-h with three replicates per concentration. In order to determine the time course, A549 cells were exposed to a 1.85-mM ethanolic solution of 7-HC for 6, 12 or 24 h. Cell lysates were obtained (as described below) and an endpoint colorimetric method based on peptide hydrolysis (Ac-DEVD-pNA) was employed (Novex Caspase-3 Colorimetric Protease Assay Kit; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and the absorbance at 405 nm was measured using an ELx800 microplate reader. The mean value of the solvent-treated cell absorbance was calculated for use as a basal reference. Response-increase percentages of the different drug exposures were determined and plotted as the C-3 enzymatic activity index: Ratio of C-3 activity = [optical density (OD) treatment/OD control treatment] x 100.

Protein isolation and quantitation. Following each cell treatment, cell lysates were obtained using a lysis buffer containing 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM NaOH, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 1 mM EGTA and 1% Triton X-100. The protein concentration was estimated using a Micro BCA Protein assay kit (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL USA).

Concentration-response assays. In 6-well multidishes 1.5×10^6 A549 cells were let to affix in three RPMI-1640 replicates, then exposed to 0.3, 0.6, 0.92 or 1.85 mM 7-HC or ethanol for 24 h.

Time course assays. Next, 1.5×10^6 A549 cells were triplicated, then exposed to either ethanol or 1.85 mM ethanol-dissolved 7-HC for 6, 12, 18 or 24 h. In each case the final solvent concentration was 3%. The procedure was completed as described in the protein isolation and quantitation section.

Western blot analysis. Protein expression was determined by conducting electrophoresis using a polyacrylamide gel (SDS-PAGE) at 15%. Proteins were then transferred at 25 V/300 mA to polyvinylidene fluoride membranes. Procaspase-3, C-3 and PARP expression levels were determined by incubating the membranes with primary antibodies (1.5 $\mu\text{g/ml}$) against caspase-3 (1:250) and PARP (1:1,000) overnight at 5°C. Membranes were then stir-washed three times for 10 min in phosphate-buffered saline (PBS). Subsequently, goat anti-mouse IgG-biotin secondary antibodies (1:10,000; Sigma-Aldrich) for 1 h at 37°C. ExtrAvidin-Alkaline Phosphatase (0.15 $\mu\text{g/ml}$; Sigma-Aldrich) with BCIP/NBT solution (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) was used to visualize the membranes. Western blot assays were conducted in triplicate and analyzed using densitometry (Molecular Imager Gel Doc and ChemiDoc systems) using Quantity One

1-D analysis software, version 4.6.9 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

Observation of morphological changes indicating apoptosis. A549 cells were exposed to an 1.85 mM solution of 7-HC in ethanol or 3% ethanol for 6, 12 or 24 h with three replicates. Phase contrast images were captured using an Eclipse TS100 inverted microscope and a DXM1200c camera (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) at a magnification of x400.

Calcium influx measurement. In order to determine calcium influx, 3×10^6 A549 cells were exposed in three replicates to an ethanolic solution of 7-HC (0.9 or 1.85 mM 7-HC) for 3, 6 and 12 h (data for 12 h not shown as the results were not significantly different). Cells were loaded for 40 min at 37°C with 4 μ M Fura-2 AM. The cells were subsequently centrifuged at 300 x g for 5 min in 5 ml PBS. The pellet (100 μ l) was immediately added to a heated cuvette (37°C) containing 2.5 ml PBS, which was constantly stirred with a magnetic bar. Ionomycin was used as positive control. Next, 6 mM EGTA was used to chelate the calcium. The fluorescence was detected at 488 nm using an optical filter (Andover Corporation, Salem, NH, USA), alternately exciting Fura-2 AM at 340/380 nm using a monochromator purchased from Photon Technology International (PTI; Monmouth Junction, NJ, USA). Data were acquired and digitized at 0.83 Hz using the PTI interface.

Single-cell microinjection. Cell microinjection (25) was performed using the Nikon Eclipse TS100 inverted microscope (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) equipped with a programmable IM-300 microinjector and an MHW-3 hydraulic micromanipulator (Narishige International, Ltd., London, UK). Microinjection needles were crafted using borosilicate glass capillaries using a P-87 device (Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA). Microinjection needles were loaded using Eppendorf microloaders (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Microinjection time and pressure parameters were determined using 0.1% dextran-FITC (3,000 MW) microinjection solution. The optimal injection time was determined as being between 200 and 400 msec, while the optimal microinjection pressure was 6.5 psi. In order to determine the basal activity of C-3, the specific substrate Z-DEVD-R110 was microinjected at a concentration of 1.3 mg/ml into single cells. Images were captured using a DXM-1200C camera (Nikon Corporation).

For each assay, A549 cells were incubated for 3, 6, 12, 18 and 24 h with a 1.85 mM solution of 7-HC in ethanol or 3% ethanol (data for 18 h not shown as the results were not significantly different). Then, culture medium was withdrawn from the Petri dish and the cells were washed twice with 1 ml PBS. Finally, the cells were resuspended in 1 ml PBS and the microinjection of Z-DEVD-R110 into single cells was performed.

Image analysis. Prior to microinjection, images were captured at x400 magnification in phase contrast and green fluorescence (520 nm) to act as the negative control. Following the microinjection of the substrate, images were captured using a red filter at 615 nm. Immediately after this, fluorescence images were captured every 20 sec for 10 min. This method was standardized by determining the fluorescence intensity changes in each

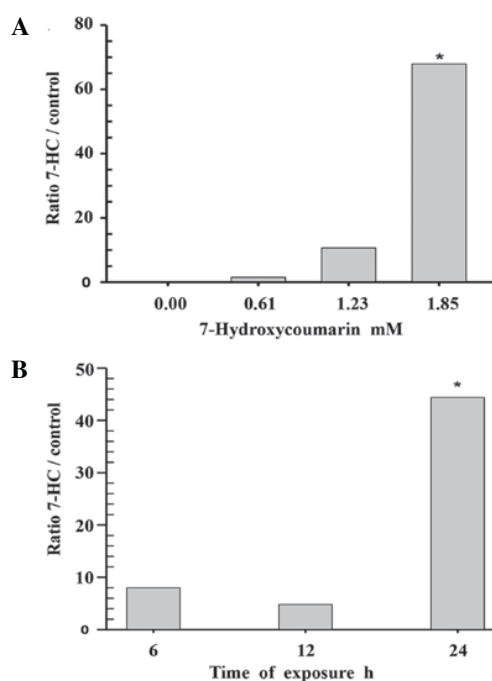


Figure 1. Colorimetric assays based on peptide (Ac-DEVD-pNA) hydrolysis were conducted to estimate caspase-3 activity in cell lysates from A549 cells exposed to 7-HC. Results shown are the percentage increase relative to the control group. (A) Concentration-response curve after 24 h ($P < 0.01$ vs. control). (B) Time course of 1.85 mM exposure ($P < 0.05$ vs. control). 7-HC, 7-hydroxycoumarin.

image. Digital images were obtained using NIS-Elements AR software, version 3 (Nikon Corporation), which was calibrated for use with a x40 lens. The C-3 activation dynamic was then analyzed in the various cell exposure groups.

Statistical analysis. Plots were generated and statistical analysis was performed using SigmaPlot for Windows, version 11.0 and SigmaStat, version 3.5 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA). Analysis of variance tests were performed, and if a statistically significant difference was identified to isolate the group or groups that differ from the others then a multiple comparison versus control group (Dunnett's method) test was used. $P < 0.05$ was considered to indicate a statistically significant result.

Results

Treatment with 7-HC reduces cell viability and increases C-3 activity in a time-dependent manner. A549 cells were incubated with 7-HC and MTT assays were performed to determine the cell viability. A 10% reduction in cell viability was observed following a 3-h exposure to 1.85 mM 7-HC; the cell viability further decreased by 30% after 12 h and ~40% after 24 h (data not shown).

The concentration-response of C-3 to 7-HC was obtained using endpoint colorimetric assays of the cell lysates. A statistically significant increase ($P = 0.009$, Dunnett's method) in enzymatic activity (65%) was observed compared with the control group when the cells were incubated with 1.85 mM 7-HC for 24 h. The time course of treatment with 1.85 mM

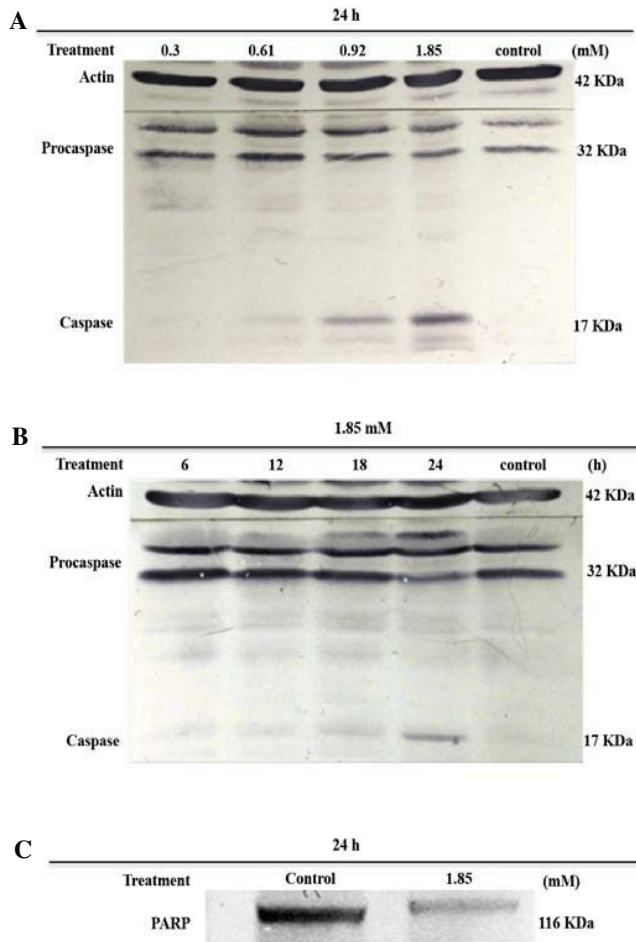


Figure 2. Representative western blots showing changes in the protein levels of A549 cell lysates following 7-HC treatment. The A549 cells ($1.5 \times 10^6/\text{ml}$) were treated with 0.3, 0.6, 0.9 and 1.85 mM 7-HC or ethanol for 24 h. Lysates were prepared and determined as described in Materials and methods. Representative western blots for procaspase-3 and caspase-3 (A) for cells treated with different concentrations of 7-HC for 24 h and (B) following exposure of the cells to 1.85 mM 7-HC for various treatment times. (C) PARP degradation was observed after 24 h of exposure to 1.85 mM 7-HC. PARP, poly (ADP-ribose) polymerase; 7-HC, 7-hydroxycoumarin.

7-HC was evaluated, with measurements taken after 6, 12 and 24 h of exposure. The cells exposed to 1.85 mM 7-HC for 24 h exhibited a statistically significant difference in C-3 activity compared with the control ($P < 0.05$, Dunnett's method; Fig. 1).

7-HC increases the cleavage of procaspase-3 to C-3 in a time-dependent manner. After 24 h of exposure to various concentrations of 7-HC, lysates were obtained and subjected to gel electrophoresis in denaturing conditions. Subsequently, the levels of procaspase-3, C-3 and PARP were evaluated using western blot analysis. Bands for procaspase-3 and cleavage product C-3 were immunodetected in the cells that were treated with 0.92 and 1.85 mM 7-HC, but C-3 bands were not detected for the control (ethanol-treated) cells (Fig. 2A).

Treatment with 1.85 mM 7-HC did not induce the conversion of procaspase-3 into C-3 until the cells had been subjected to 24 h of exposure (Fig. 2B). Furthermore, the

cells exposed to 1.85 mM 7-HC exhibited the characteristic activity of C-3 in the cleavage of PARP (Fig. 2C).

Furthermore, only 12 h of exposure to 1.85 mM 7-HC induced characteristic apoptotic changes in the cells, such as blebbing and shrinking, which were not observed in the control or RPMI-1640 (untreated) cells (Fig. 3).

7-HC exposure increases calcium conductance in A549 cells. The effects of 7-HC on calcium conductance in A549 cells were investigated. It was observed that a 3-h exposure to 0.9 mM 7-HC significantly increased calcium conductance by 17%, while exposure to 1.85 mM 7-HC for the same time period increased conductance by 27% ($P < 0.05$) compared with that in the control group (Fig. 4A). Similarly, a 6-h exposure to 0.9 mM 7-HC increased conductance by 12%, while exposure to 1.85 mM 7-HC for the same time period increased conductance by 27% ($P < 0.05$) compared with that in the control group (Fig. 4B).

7-HC exposure increases the activity of caspase-3 in single cells. Finally, single-cell microinjection assays were performed on cells that had been exposed to ethanol or 1.85 mM 7-HC for 3, 6, 12, 18 and 24 h and time course curves were prepared. The process was documented by capturing digital images every 5 sec over a 10-min period (Fig. 5A and B). Following the analysis of similar areas in each cell by measuring the intensity/pixel ratio using green fluorescence, the mean values were plotted (Fig. 5C). In each curve a phase of exponential increase was evident, followed by a plateau and an exponential phase of fluorescence reduction. Comparisons of the initial velocities through linear regression indicated that the real regression corresponds to 7-HC (slope > 0), while the control had no slope > 0 . Thus, the results indicated the presence of typical first order enzymatic kinetics corresponding to C-3.

Discussion

In a previous study, it was demonstrated using flow cytometry that the exposure of A427 human lung adenocarcinoma cells to 0.98 mM 7-HC for 4-6 h, produced an 83% increase of Annexin-V-positive cells (12). In the present study, the inductive effect of 7-HC on C-3 activity in cellular lysates was demonstrated to occur in a concentration-dependent manner, and the optimal exposure time to obtain the maximum enzymatic activity was identified. Furthermore, the results of western blot analysis demonstrated the expression of procaspase-3 in the cells and its conversion into C-3 in a concentration- and time-dependent manner, in addition to the proteolytic cleavage of PARP by C-3, as described by Yang *et al.* (13). Morphological changes associated with apoptosis were identified, such as blebbing and shrinking, comparable to the apoptotic bodies reported by Chuang *et al.* (14) and Elinos-Báez *et al.* (26). Chuang *et al.* (14) reported a significant increase in calcium flux in HeLa cells treated for 24 h with 25-100 μM coumarin, using flow cytometry. Through fluorescence spectrometry, in the present study this effect was detected at a higher (millimolar) concentrations of 7-HC in cells exposed for 3 h. Furthermore, in the present study, experiments were conducted to determine how rapidly the exposure of A549 cells to 7-HC induced the activation of

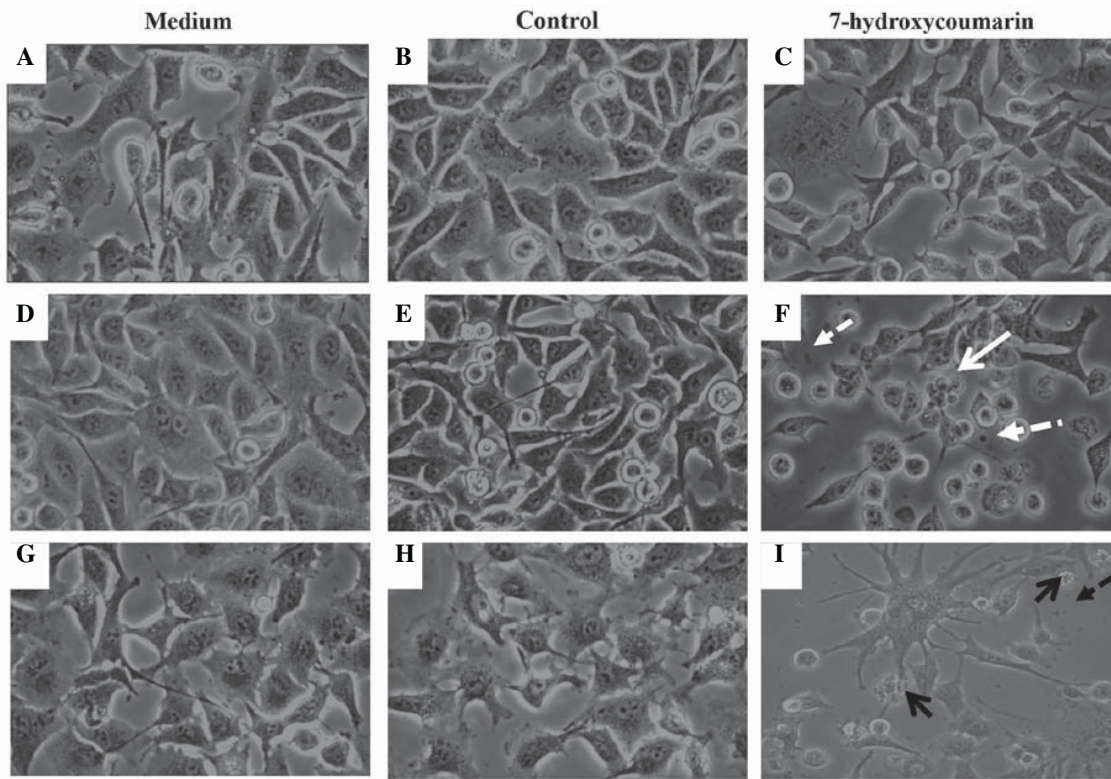


Figure 3. Phase contrast microscopy images (magnification, $\times 400$) showing differences in A549 cell morphology following treatment with RPMI-1640 (medium), 3% ethanol (control) and a 1.85 mM solution of 7-hydroxycoumarin in ethanol. Images of the cells were captured at (A-C) 6 , (D-F) 12 and (G-I) 24 h. Morphological changes associated with apoptosis included blebbing (indicated by continuous arrows) and apoptotic bodies (indicated by discontinuous arrows).

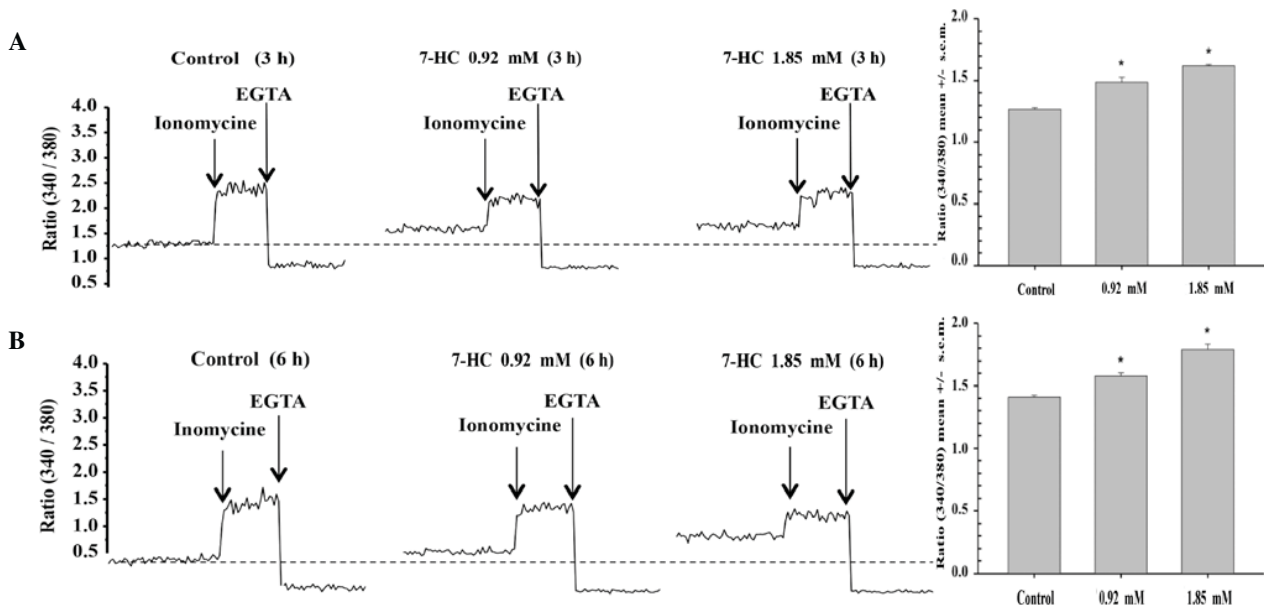


Figure 4. Calcium influx into A549 cells (3×10^6), induced by an 0.9 or 1.85 mM solution of 7-HC in ethanol or 3% ethanol. Cells were loaded with $4 \mu\text{M}$ Fura-2 AM. Fluorescence was detected at 488 nm, alternately exciting Fura-2 AM at 340/380 nm. Calcium influx in cells treated for (A) 3 and (B) 6 h. Significant differences were observed between the 7-HC-treated and control cells ($P < 0.05$). 7-HC, 7-hydroxycoumarin; EGTA, ethylene glycol bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid; s.e.m., standard error of the mean.

C-3. To the best of our knowledge, single-cell microinjection has not previously been employed by other researchers in this type of study. The results indicate that 7-HC rapidly induced

C-3 activation. The concentration that induced this rapid C-3 activation effect (1.85 mM) decreased cell viability by only 10% after 3 h of exposure.

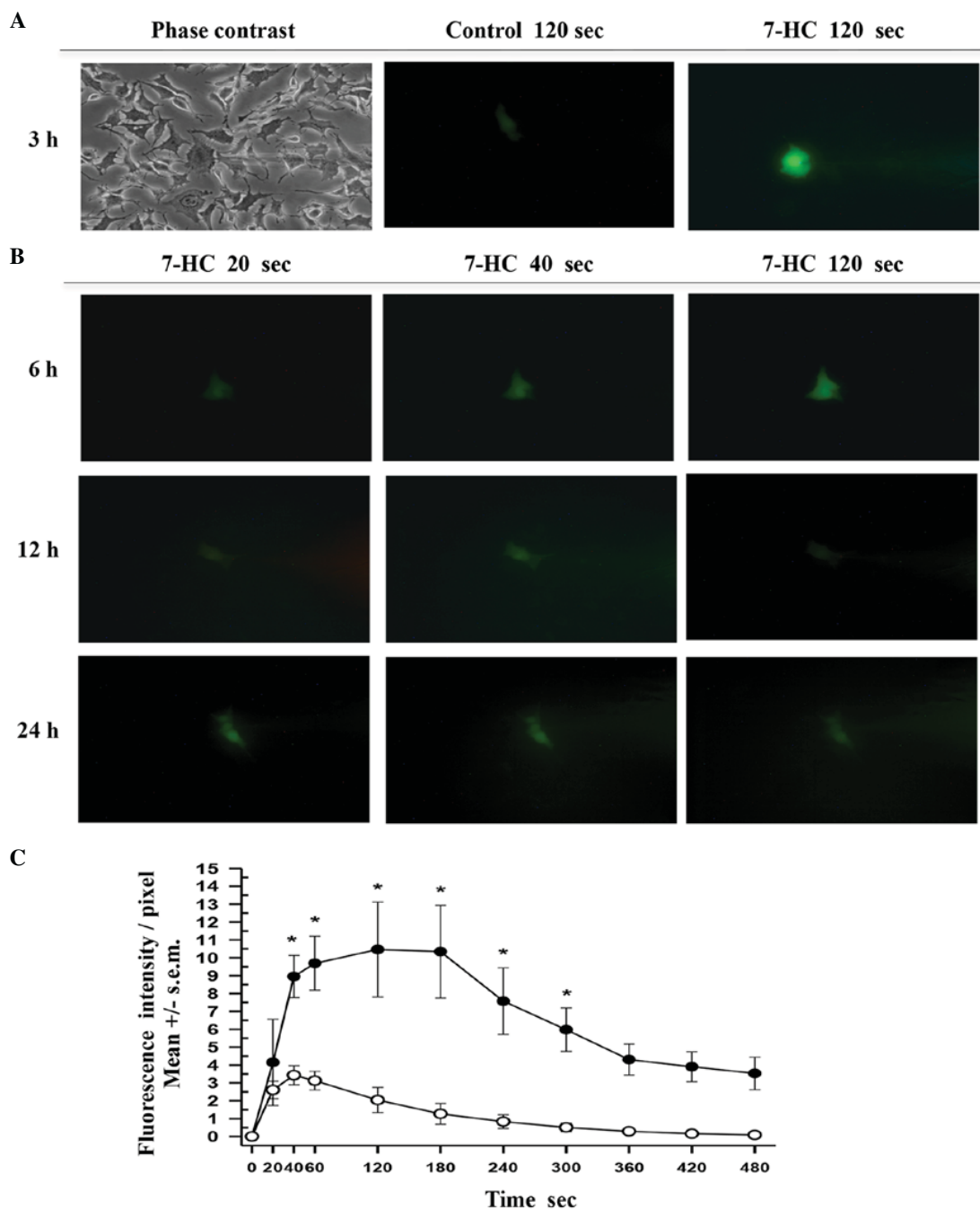


Figure 5. Single-cell microinjection of Z-DEVD-R110 substrate into cells treated with a 1.85 mM solution of 7-HC in ethanol or 3% ethanol (magnification, $\times 400$). (A) Representative images are shown for phase contrast imaging, and fluorescence at 520 nm for a control cell and a cell exposed to 7-HC for 3 h (captured at 120 sec; maximal intensity was registered). (B) Post-injection photographs of cells exposed to 7-HC for 6, 12 and 24 h, obtained at 20, 40 and 120 sec after microinjection. (C) Fluorescence intensity/pixel plot demonstrating the kinetic activity of caspase-3 in A549 cells treated with 7-HC for 3 h. Each point represents the mean \pm standard error of the mean (s.e.m.) of three experiments. * $P < 0.05$ between 7-HC-treated cells (filled circles) and the control group (empty circles). 7-HC, 7-hydroxycoumarin.

The majority of previous studies have employed a maximum simple coumarin concentration of 100 μM and reported the reduction of viability at 24 or 48 h (10-17). However, it was not clear whether this rapid C-3 activation effect was induced by the binding of 7-HC with particular intracellular ligands. Zlabinger *et al* (27) demonstrated that in human monocytes, coumarin binding sites appeared to be present in relatively high numbers ($7.5 \times 10^8/\text{cell}$); however, their affinity was low ($K_d \sim 2 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$). Furthermore, inhibition

experiments performed with 7-HC revealed that an ~ 4 -fold molar concentration of 7-HC was necessary to induce a 50% displacement of coumarin from its binding site (27). It may be hypothesized that the C-3 activation effect, observed at higher concentrations compared with those previously reported, may be due to A549 cells possessing these binding sites.

Cytotoxic and cytostatic activity, in addition to the mechanisms by which these effects are produced, have been reported for a number of naturally occurring coumarins,

such as esculetin (11,13) and osthole (16,18), in addition to and synthetic coumarins such as quercetin (17). However, the majority of these coumarins have not been subjected to testing beyond the pre-clinical phase, in contrast with the coumarins whose effects and pharmacokinetic properties in humans are widely known. The prompt conversion of coumarin into 7-HC, which has displayed the most relevant activity, as well as its rare toxicity among patients (7) is well documented. In 1994, Marshall *et al* (28) reported the testing of 7-HC in a phase I trial in which patients who received daily dosages of between 1,000 and 7,000 mg presented few collateral effects. It has also been reported that 7-HC is not transported by multidrug resistance-associated proteins (4-7,29). As 7-HC has been previously employed in a number of phase II clinical studies, and has already been designated an Orphan drug by the US FDA, there is a possibility of successfully conducting further studies using 7-HC combined with conventional therapy as a lung cancer treatment.

Acknowledgements

This study constitutes a partial fulfillment of the Graduate Program in Biological Sciences of the National Autonomous University of México. The authors thank Hiram Molina Espinosa for critically reading the final version of the manuscript and making valuable suggestions. Grants were obtained from the National Science and Technology Council (no. 98729) and the Research and Technological Innovation Support Program from the National University of Mexico (no. IN216812).

References

1. U.S. National Cancer Institute: Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. SEER Stat Fact Sheets: Lung and Bronchus Cancer. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/lungb.html>. Accessed April 14, 2015.
2. U.S. National Cancer Institute: Targeted Cancer Therapies. <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/targeted-therapies/targeted-therapies-fact-sheet>. Accessed April 12, 2015.
3. U.S. Food and Drug Administration (FDA): Search Orphan Drug Designations and Approvals. http://www.accessdata.fda.gov/scripts/opdlisting/ooop/OOPD_Results_2.cfm. Accessed April 14, 2015.
4. Jain PK: Coumarin: Chemical and pharmacological profile. *J App Pharm Sci* 2: 236-240, 2012.
5. Casley-Smith JR and Casley-Smith JR: The pathophysiology of lymphedema and the action of benzo-pyrone in reducing it. *Lymphology* 21: 190-194, 1988.
6. Thornes RD, Lynch G and Seehan MV: Cimetidine and coumarin therapy of melanoma. *Lancet* 2: 328, 1982.
7. Cox D, O'Kennedy R and Thornes RD: The rarity of liver toxicity in patients treated with coumarin (1,2-benzopyrone). *Hum Toxicol* 8: 501-506, 1989.
8. Thornes D, Daly L, Lynch G, Browne H, Tanner A, Keane F, O'Loughlin S, Corrigan T, Daly P and Edwards G; Irish Melanoma Group: Prevention of early recurrence of high risk malignant melanoma by coumarin. *Eur J Surg Oncol* 15: 431-435, 1989.
9. Dexeus FH, Logothetis CJ, Sella A, Fitz K, Amato R, Reuben JM and Dozier N: Phase II study of coumarin and cimetidine in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 8: 325-329, 1990.
10. Mohler JL, Gomella LG, Crawford D, Glode LM, Zippe CD, Fair WR and Marshall ME: Phase II evaluation of coumarin (1,2-benzopyrone) in metastatic prostatic carcinoma. *Prostate* 20: 123-131, 1992.
11. Chu CY, Tsai YY, Wang CJ, Lin WL and Tseng TH: Induction of apoptosis by esculetin in human leukemia cells. *Eur J Pharmacol* 416: 25-32, 2001.
12. Lopez-Gonzalez JS, Prado-Garcia H, Aguilar-Cazares D, Molina-Guarneros JA, Morales-Fuentes J and Mandoki JJ: Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxycoumarin on human lung carcinoma cell lines. *Lung Cancer* 43: 275-283, 2004.
13. Yang JY, Della-Fera MA and Baile CA: Esculetin induces mitochondria-mediated apoptosis in 3T3-L1 adipocytes. *Apoptosis* 11: 1371-1378, 2006.
14. Chuang JY, Huang YF, Lu HF, Ho HC, Yang JS, Li TM, Chang NW and Chung JG: Coumarin induces cell cycle arrest and apoptosis in human cervical cancer HeLa cells through a mitochondria- and caspase-3 dependent mechanism and NF-kappaB down-regulation. *In vivo* 21: 1003-1009, 2007.
15. Alvarez-Delgado C, Reyes-Chilpa R, Estrada Muñoz E, Mendoza-Rodríguez A, Quintero-Ruiz A, Solano J and Cerbón MA: Coumarin A/AA induces apoptosis-like cell death in HeLa cells mediated by the release of apoptosis-inducing factor. *J Biochem Mol Toxicol* 23: 263-272, 2009.
16. Zhang L, Jiang G, Yao F, He Y, Liang G, Zhang Y, Hu B, Wu Y, Li Y and Liu H: Growth inhibition and apoptosis induced by osthole, a natural coumarin, in hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 7: e37865, 2012.
17. Zheng SY, Li Y, Jiang D, Zhao J and Ge JF: Anticancer effect and apoptosis induction by quercetin in the human lung cancer line A-549. *Mol Med Rep* 5: 822-826, 2012.
18. Shokoohinia Y, Hosseinzadeh L, Alipour M, Mostafaei A and Mohammadi-Motlagh HR: Comparative evaluation of cytotoxic and apoptogenic effects of several coumarins on human cancer cell lines: Osthole induces apoptosis in p53-deficient H1299 cells. *Adv Pharmacol Sci* 2014: 847574, 2014.
19. Finn G, Creaven B and Egan D: Modulation of mitogen-activated protein kinases by 6-nitro-7-hydroxycoumarin mediated apoptosis in renal carcinoma cells. *Eur J Pharmacol* 481: 159-167, 2003.
20. Musa MA, Badisa VL, Latinwo LM, Patterson TA and Owens MA: Coumarin-based benzopyranone derivatives induced apoptosis in human lung (A549) cancer cells. *Anticancer Res* 32: 4271-4276, 2012.
21. Goel A, Prasad AK, Parmar VS, Ghosh B and Saini N: Apoptogenic effect of 7,8-diacetoxy-4-methylcoumarin and 7,8-diacetoxy-4-methylthiocoumarin in human lung adenocarcinoma cell line: Role of NF-kappa B, Akt, ROS and MAP kinase pathway. *Chem Biol Interact* 179: 363-374, 2009.
22. Goel A, Chhabra R, Ahmad S, Prasad AK, Parmar VS, Ghosh B and Saini N: DAMTC regulates cytoskeletal reorganization and cell motility in human lung adenocarcinoma cell line: An integrated proteomics and transcriptomics approach. *Cell Death Dis* 3: e402, 2012.
23. Schilling WH, Crampton RF and Longland RC: Metabolism of coumarin in man. *Nature* 221: 664-665, 1969.
24. Mossman T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Applications to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods* 65: 55-63, 1983.
25. Zhang Y: Single-cell microinjection technologies. In: *Single-cell Analysis: Methods and Protocols*. Lindström S and Andersson-Svahn H (eds.). Humana Press, Heidelberg, pp169-176, 2012.
26. Elinos-Báez CM, León F and Santos E: Effects of coumarin and 7-OH-coumarin on bcl-2 and Bax expression in two human lung cancer cell lines in vitro. *Cell Biol Int* 29: 703-708, 2005.
27. Zlabinger GJ, Nöhhammer C, Böhmig GA and Menzel JE: Mode of action of coumarin in immune cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 120 (Suppl): S17-S18, 1994.
28. Marshall ME, Mohler JL, Edmonds K, Williams B, Butler K, Ryles M, Weiss L, Urban D, Bueschen A and Markiewicz M: An updated review of the clinical development of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin. *J Cancer Res Clin Oncol* 120 (Suppl): S39-S42, 1994.
29. Wittgen HG, van den Heuvel JJ, van den Broek PH, Siissalo S, Groothuis GM, de Graaf IA, Koenderink JB and Russel FG: Transport of the coumarin metabolite 7-hydroxycoumarin glucuronide is mediated via multidrug resistance-associated proteins 3 and 4. *Drug Metab Dispos* 40: 1076-1079, 2012.