

Efecto en el ciclo celular de líneas de adenocarcinoma pulmonar por cumarina y 7-hidroxicumarina*

José Sullivan López-González ‡
Heriberto Prado García ‡
Dolores Aguilar Cázares ‡
Juan A. Molina Guarneros §
Juan José Mandoki §
Frumencio Medina Morales II

Palabras clave: Ciclo celular, líneas de adenocarcinoma, cumarina, 7-hidroxicumarina, arresto en G0/G1, citometría de flujo.
Key words: Cell cycle, adenocarcinoma cell lines, coumarin, 7-hydroxicoumarin, G0/G1 arrest, flow cytometry.

RESUMEN

Introducción: Las cumarinas son compuestos ampliamente distribuidos en la naturaleza. En el humano el principal metabolito de la cumarina es la 7-hidroxicumarina. Estos compuestos presentan actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo*. Previamente reportamos que la cumarina y la 7-hidroxicumarina ejercen actividad citostática en líneas de adenocarcinoma; sin embargo, se desconocen los aspectos relacionados a la fase del ciclo celular en la que estos compuestos pueden actuar.

Objetivo: Determinar el efecto de la cumarina y la 7-hidroxicumarina en la transición del ciclo celular en líneas de adenocarcinoma pulmonar.

Material y métodos: Tres líneas de adenocarcinoma pulmonar (SK-LU-1, 1.3.15 y 3A5A) y células mononucleares de individuos sanos estimuladas con fitohemaglutinina, se incubaron por 24h y 40h respectivamente, con 100 µg/mL de cumarina o 7-hidroxicumarina. Las perturbaciones en el ciclo celular se evaluaron por medio de la determinación de contenido de DNA por citometría de flujo.

Resultados: Posterior al tratamiento, las líneas celulares presentaron acumulación significativa de células en la fase G0/G1, disminuyendo proporcionalmente la población de células en la fase S. En cambio, las células mononucleares no presentaron cambios significativos después del tratamiento.

Conclusiones: Estos resultados demuestran que los compuestos cumarínicos causan un arresto de las células tumorales en la fase G0/G1. El conocimiento de las perturbaciones en el ciclo celular, inducidas por estos productos, puede facilitar la elaboración de esquemas de tratamiento mediante combinaciones con otros fármacos que arresten en distinta(s) fase(s) del ciclo. Además, esta metodología permite evaluar la susceptibilidad de las células tumorales a los agentes quimioterapéuticos.

* Este trabajo fue realizado con apoyos de CONACYT F643-M9406 y PUIS 8687-297-5-V-99.

‡ Departamento de Enfermedades Crónico-Degenerativas, Unidad de Investigación, INER.

§ Departamento de Farmacología Celular, Facultad de Medicina. UNAM.

II Jefe del Servicio Clínico No.3, INER.

Correspondencia:

Dr. José Sullivan López-González
Unidad de Investigación. Departamento de Enfermedades Crónico-Degenerativas.
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.
Tlalpan 4502, colonia Sección XVI. México, D.F., 14080

Trabajo recibido: 1-XII-2000; Aceptado: 14-XII-2000

ABSTRACT

Introduction: Coumarins are compounds widely distributed in nature. In humans, the main metabolite of coumarin is 7-hydroxicoumarin. These compounds show antitumoral activity *in vivo* and *in vitro*. We previously reported that coumarin and 7-hydroxicoumarin have cytostatic activity in adenocarcinoma cell lines; however, no reports are available concerning the cell cycle phase in which these compounds may act.

Objective: To determine the effect of coumarin and 7-hydroxicoumarin on the cell cycle transition in lung adenocarcinoma cell lines.

Material and methods. Three adenocarcinoma cell lines (SK-LU-1, 1.3.15, 3A5A) and healthy donor mononuclear cells stimulated with phytohemagglutinin were incubated for 24h and 40h respectively with 100 µg/mL of coumarin or 7-hydroxicoumarin. Cell cycle disturbances were evaluated by flow cytometry using DNA content analysis.

Results: After treatment, the cell lines showed statistically significant accumulation of the G0/G1 cell cycle phase, accompanied by a proportional depletion of the S-phase. Nevertheless, no significant changes were observed in mononuclear cells after treatment.

Conclusions: Results show that coumarin and 7-hydroxicoumarin arrest tumoral cells at the G0/G1 phase. Understanding the cell cycle disturbances induced by these compounds will help in the design of treatment schedules by combination with other drugs that arrest the cell cycle at other phases. Furthermore, this methodology can be used to test tumor cell susceptibility against chemotherapeutic agents.

INTRODUCCIÓN

Las células llevan a cabo la división celular mediante duplicación de sus cromosomas para segregar una copia del material genético, así como de los organelos esenciales a cada célula hija¹. La regulación de la división celular es un evento crítico para el desarrollo normal de los organismos multicelulares y se ha demostrado que su alteración se asocia al desarrollo del cáncer. Los tumores malignos pueden llevar a cabo la invasión del estroma circundante, degradar membranas basales y establecerse en sitios distantes, aún antes de que el tumor primario alcance un tamaño clínicamente detectable, por lo que una forma de tratamiento de los cánceres es el empleo de la quimioterapia. En este tipo de tratamiento, deben considerarse los efectos terapéuticos y tóxicos de los distintos agentes empleados, así como la resistencia bioquímica y específica de algunos tipos de células cancerosas².

El cáncer pulmonar, por su alta mortalidad, es un problema de salud pública a escala mundial. El grupo clasificado como cáncer pulmonar de células no pequeñas comprende del 75 al 80% de todos los casos de cáncer pulmonar y, por su capacidad metastásica temprana,

presenta baja tasa de supervivencia³. Los tratamientos quimioterapéuticos empleados en la actualidad no muestran un incremento importante en la supervivencia de estos pacientes, lo que enfatiza la necesidad de buscar nuevas y mejores opciones de tratamiento^{2,4}.

Por otro lado, las cumarinas pertenecen al grupo de compuestos conocidos como benzopironas, consistentes de un anillo benceno unido a una pirona —un anillo heterocíclico de seis miembros que contiene un átomo de oxígeno y cinco carbonos sp²—. Estos compuestos se encuentran distribuidos en una gran variedad de plantas, su amplia distribución parece correlacionar con la capacidad que poseen de inhibir el crecimiento de diversos patógenos para las plantas⁵.

La administración de la cumarina en modelos animales y en el humano indica que es completa y rápidamente absorbida en el tracto gastrointestinal, y se metaboliza principalmente en el hígado por efecto del primer paso. A diferencia de otros organismos, en el humano la vía más importante es la 7-hidroxicumación, catalizada por la enzima CYP2A6, específica del citocromo P450. El tiempo de vida media de la cumarina en la circulación sistémica es aproximadamente una hora y es independiente de la vía de administración. Además, el metabolito 7-hidroxicumado es excretado en la orina como glucurónido⁵.

Existen diversos reportes del uso de las cumarinas así como de sus derivados en la prevención y el tratamiento de diversos carcinomas. Se ha empleado en el tratamiento de cáncer de mama, próstata, riñón, melanoma, etcétera, así como agente protector contra carcinógenos⁶⁻¹². Se desconocen los posibles mecanismos mediante los cuales estos compuestos puedan ejercer su acción. Algunas investigaciones indican que es a través de la estimulación del sistema inmunitario, mientras que otras consideran un efecto directo sobre las células tumorales¹³⁻¹⁶.

En relación con esto último, varios grupos de investigadores han evaluado los efectos antiproliferativos directos de las cumarinas sobre las células malignas, encontrando que la cumarina y la 7-hidroxicumación inducen, *in vitro*, inhibición de la proliferación en diversas líneas celulares malignas de distinto tipo histológico, incluyendo líneas de cáncer pulmonar¹⁶⁻¹⁹.

En el ámbito mundial se ha iniciado una serie de estudios tendientes a estudiar la fase del ciclo celular en la cual actúan los distintos agentes quimioterapéuticos. Nuestro grupo ha reportado previamente que las cumarinas causan inhibición de la proliferación de líneas de cáncer pulmonar¹⁹, por lo que es importante conocer las fases del ciclo celular en la que actúan estos compuestos, con la finalidad de emplear combinaciones de agentes que ofrezcan una mejor esperanza de tratamiento en pacientes con cáncer pulmonar.

MATERIAL Y MÉTODOS

Líneas celulares

Se emplearon tres líneas tumorales de origen pulmonar de la estirpe histológica adenocarcinoma. La línea SK-LU-1 obtenida del *American Type Culture Collection* (ATCC)

Rockville, MD, USA, así como dos líneas designadas 1.3.15 y 3A5A, obtenidas y establecidas a partir del derrame pleural de dos pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar y libres de tratamiento. Estas líneas ya han sido previamente caracterizadas¹⁹.

Todas las líneas celulares empleadas muestran características de adhesión durante su crecimiento, se mantuvieron en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina G sódica y 100 µg/mL de estreptomina, reactivos obtenidos de *Sigma Chemical Co* (St. Louis, MO, USA). Las células se incubaron en atmósfera húmeda con 5% de CO₂, a temperatura de 37°C. Al llegar a confluencia, las células se trataron con una mezcla tripsina-verseno y agitación mecánica para su desprendimiento. La viabilidad de las células siempre fue superior al 94%, determinada por exclusión con azul de tripano.

Reactivos

Los compuestos cumarina y 7-hidroxicumarina se obtuvieron de *Aldrich Chemical Co* (Milwaukee, WI, USA) con una pureza del 99%. Los reactivos, yoduro de propidio y RNAasa libre de DNAasa se obtuvieron de *Sigma Chemical Co* (St. Louis, MO, USA). El etanol absoluto fue adquirido de Merck (Darmstadt, Germany). El equipo conteniendo núcleos de eritrocitos de pollo y timocitos de ternera (controles internos para análisis del DNA por citometría de flujo), así como la solución salina para citómetro fueron adquiridas de Becton-Dickinson (San José, CA, USA).

Preparación de los compuestos cumarínicos

Se prepararon disoluciones stock de cumarina y 7-hidroxicumarina a concentración de 2.5 mg/mL en una mezcla de 37.5% (v/v) de etanol absoluto con medio RPMI-1640 libre de suero fetal bovino. Estas disoluciones se mantuvieron en condiciones de esterilidad como se reportó previamente¹⁹.

A partir de las disoluciones stock de los compuestos cumarínicos, se hicieron diluciones a 100 µg/mL para emplearse en los ensayos. Como control de diluyente se utilizó una mezcla etanol-medio RPMI-1640 a una concentración final de 1.5% (v/v).

Efecto de cumarina y 7-hidroxicumarina sobre el ciclo celular de células de carcinoma pulmonar

Se adicionaron 2 x 10⁵ células de las líneas SKLU-1 y 3A5A, así como 3.5 x 10⁵ células de la línea 1.3.15 a pozos de placas de 24 pozos para obtener subconfluencia del 90%. En cada caso, las células se resuspendieron en 1.2 mL de: 1) medio de cultivo, 2) diluyente, 3) 100 µg/mL de cumarina, y 4) 100 µg/mL de 7-hidroxicumarina. Los cultivos se incubaron por 24h a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. Cada experimento se realizó al menos dos veces y cada ensayo fue por triplicado.

Al finalizar el cultivo, las células se recolectaron por tripsinización y se fijaron con etanol frío al 70% (v/v), conservándose a -20°C por lo menos durante 24h. Posteriormente, se lavaron con PBS, cada botón celular se resuspendió en PBS conteniendo 10 µg/mL de yoduro de

propidio y 5 unidades Kunitz de RNAasa libre de DNAasa. Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente para, posteriormente, analizar las muestras por medio de un citómetro FACScalibur. Los resultados se indican como histogramas donde se representa el número de eventos *versus* el contenido de DNA, representado por la intensidad de fluorescencia al analizar 10,000 eventos.

Evaluación del efecto sobre el ciclo celular de células mononucleares por la cumarina y la 7-hidroxicumarina

A partir de sangre periférica heparinizada de dos voluntarios sanos, se purificaron las células mononucleares (CMN) empleando un gradiente de Ficoll-Hypaque obtenido de *Nycomed Pharma* (Oslo, Norway). Las CMN se ajustaron a una concentración de 1 x 10⁶ cel/mL.

Las CMN provenientes de 1.2 mL se resuspendieron, como se indicó en las líneas tumorales, en los compuestos cumarínicos y sus correspondientes controles. Además, cada tratamiento contenía fitohemaglutinina (PHA) a una dilución 1:200 (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA). Los cultivos se incubaron durante 40h a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. Las células se recolectaron mediante agitación mecánica y se fijaron con etanol frío (-20°C) al 70% (v/v), posteriormente se realizó la determinación de contenido de DNA mediante la técnica de yoduro de propidio, antes descrita.

Análisis estadístico

El perfil del ciclo celular se analizó mediante el programa *Modfit* versión 2.0. Para cada tratamiento se comparó el porcentaje de células distribuidas en las diferentes fases del ciclo celular. A fin de determinar diferencias significativas entre las distribuciones de las fases del ciclo celular causada por las diferentes exposiciones, a los resultados experimentales se les realizó un análisis de varianza y posteriormente la prueba de Tukey. Ambas pruebas fueron realizadas con el programa de cómputo *SigmaStat V 2.0* (*Jandel Scientific*).

RESULTADOS

El cultivo de las líneas tumorales a la densidad y periodo empleados permitió determinar el perfil de las fases del ciclo celular característico de cada línea, empleando la determinación de contenido de DNA por citometría de flujo (Figura 1). El intervalo de porcentajes obtenido para las tres líneas osciló de 50 - 70% para la fase G0/G1, 15-32% para la fase S y 12-15% para la fase G2/M (Tabla I), lo cual hizo factible la detección de posibles alteraciones atribuibles a los compuestos por estudiar.

Las células expuestas a los compuestos cumarínicos a la concentración de 100 µg/mL mostraron variaciones en la distribución de las fases del ciclo celular. La Figura 1, muestra el perfil del ciclo celular para cada una de las líneas ensayadas en presencia de los diferentes tratamientos. En la Tabla I se indican los porcentajes de células distribuidas en las fases del ciclo celular para cada exposición.

Las células de la línea SK-LU-1 no mostraron cambios significativos en las fases del ciclo celular cuando se

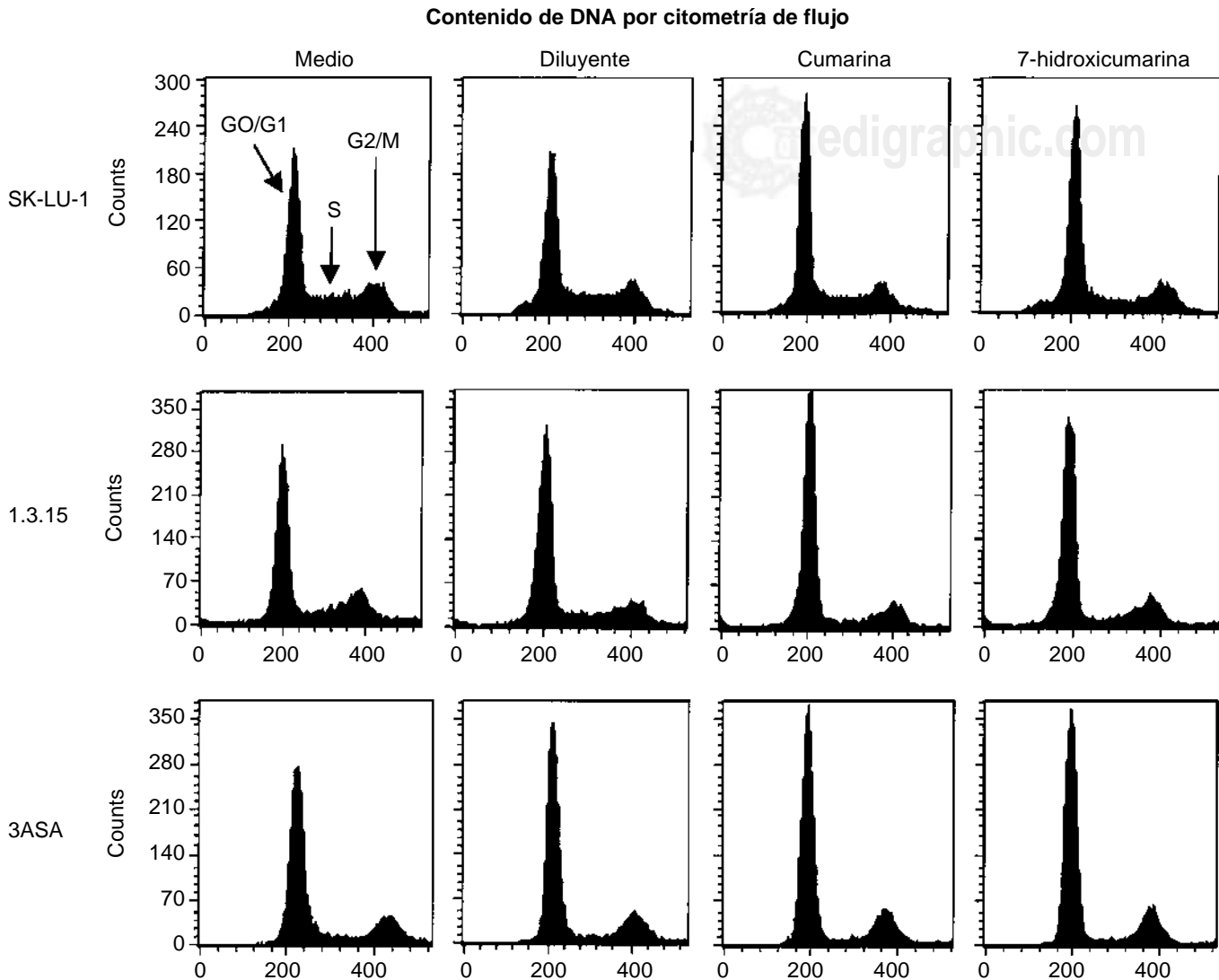


Figura 1. Se muestra la distribución de células en cada fase del ciclo celular obtenida mediante la determinación del contenido de DNA por incorporación de yoduro de propidio. Los histogramas resultantes de cada tratamiento representan el análisis de 10,000 eventos por citometría de flujo.

Tabla I. Distribución de las fases del ciclo celular de líneas de adenocarcinoma.

Tratamiento	Porcentaje de células tumorales								
	G0/G1	S	G2/M	G0/G1	S	G2/M	G0/G1	S	G2/M
	SK-LU-1			1.3.15			3A5A		
Medio	53.2 ± 0.9	32.0 ± 1.1	14.8 ± 1.4	66.4 ± 1.6	22.0 ± 0.3	11.6 ± 1.4	71.0 ± 0.9	14.9 ± 0.9	14.1 ± 0.9
Diluyente	53.5 ± 0.8	33.7 ± 0.8	12.8 ± 0.2	70.9 ± 0.2*	20.4 ± 0.6*	8.7 ± 0.7	74.3 ± 1.3*	10.7 ± 1.4*	15.0 ± 0.3
Cumarina	63.4 ± 2.1*	27.0 ± 2.2*	9.6 ± 0.4*	77.2 ± 0.6*	12.9 ± 0.2*	9.9 ± 0.5	78.5 ± 1.4*	5.3 ± 1.5*	16.2 ± 1.8
7-hidroxicumarina	65.8 ± 3.4*	23.9 ± 2.4*	10.3 ± 1.3*	76.2 ± 0.9*	12.1 ± 0.6*	11.7 ± 0.3	77.9 ± 1.0*	4.9 ± 1.1*	17.2 ± 1.3

La distribución de las fases del ciclo celular se determinó por citometría de flujo. Los cultivos de las líneas de adenocarcinoma se incubaron por 24h y se trataron como se describe en Material y métodos. La proporción de células en cada fase se determinó empleando el programa *Modfit*. Los resultados representan el promedio de tres experimentos.

* Diferencias significativas con respecto al medio y al diluyente ($p < 0.05$, prueba de Tukey).

Tabla II. Distribución de las fases del ciclo celular en células mononucleares.

Tratamiento	Porcentaje de células mononucleares		
	G0/G1	S	G2/M
Medio	70.2 ± 2.0	22.8 ± 0.9	7.0 ± 1.0
Diluyente	63.3 ± 2.6	26.4 ± 1.6	10.3 ± 4.3
Cumarina	71.3 ± 4.2*	23.5 ± 3.4	5.2 ± 0.8
7-hidroxicumarina	74.4 ± 3.9*	21.9 ± 3.5	3.7 ± 0.3*

La distribución de las fases del ciclo celular se determinó por citometría de flujo. Las células mononucleares obtenidas de un voluntario sano se incubaron por 40h y se trataron como se describe en Material y métodos. La proporción de células en cada fase se determinó empleando el programa *Modfit*. Los resultados representan el promedio de tres experimentos.

* **Diferencias significativas con respecto al diluyente ($p < 0.05$, prueba de Tukey).**

expusieron al diluyente, comparado con las que se mantuvieron en medio de cultivo (53%). Con respecto a las células tratadas con cumarina y 7-hidroxicumarina, el porcentaje de células en la fase G0/G1 se incrementó a 63 y 65% respectivamente, mostrando diferencias significativas con respecto al medio y diluyente ($p < 0.05$). Con relación a la fase S, ambos compuestos causaron decremento significativo en el porcentaje de células. Este mismo comportamiento se observó para las células en la fase G2/M. Estos resultados indican un arresto de las células en la fase G0/G1, con la consecuente disminución en la proporción de células en la fase S y G2/M.

En la línea 1.3.15, el diluyente modificó significativamente la distribución de células en las fases G0/G1 y S del ciclo celular, lo que se observó como una acumulación de células en G0/G1. Los compuestos probados causaron un arresto de las células en G0/G1 con la concomitante disminución de la población en la fase S ($p < 0.05$). Sin embargo, no hubo diferencias significativas de la población celular en G2/M con respecto al medio y diluyente.

La línea 3A5A mostró aumento en la proporción de células en la fase G0/G1 en presencia del diluyente o de los compuestos cumarínicos ($p < 0.05$), este incremento se vio reflejado en una disminución proporcional de las células en fase S ($p < 0.05$). En cambio, la fase G2/M no se alteró bajo ninguna de las exposiciones.

La Tabla II muestra los porcentajes de las fases del ciclo celular en las CMN de un voluntario sano, posterior a una incubación de 40h. Bajo nuestras condiciones experimentales, el diluyente modificó ligeramente el perfil del ciclo celular; sin embargo, estas variaciones no fueron significativas. La cumarina y su derivado no causaron diferencias significativas en la distribución de las células al compararse con el medio de cultivo.

Un comportamiento similar se observó con células mononucleares de otro voluntario (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

Previamente reportamos que la cumarina y su principal metabolito, la 7-hidroxicumarina, presentan actividad citostática en líneas de adenocarcinoma pulmonar¹⁹. Se ha sugerido que cambios en la distribución de las células tumorales, con relación a las fases del ciclo celular, pueden asociarse a su susceptibilidad al tratamiento con un agente citostático^{20,21}. Por lo que determinar si estos compuestos actúan de manera específica, causando arresto en alguna de las fases del ciclo celular en las células tumorales, nos permitirá sugerir su posible empleo en el tratamiento del adenocarcinoma pulmonar.

En relación con nuestros resultados, el etanol empleado como diluyente de los compuestos a la concentración de 1.5% (v/v), no afecta a la línea SK-LU-1; sin embargo, indujo un arresto en la fase G0/G1 para las líneas 1.3.15 y 3A5A. Un comportamiento similar ha sido reportado por diversos autores. Cook y cols y Higgins^{22,23} reportan una acumulación de células en G0/G1, dependiente de dosis, en líneas de tumores hepáticos de origen murino, mientras que Guo y cols²⁴, describen un efecto semejante en células epiteliales humanas.

Las diferencias observadas en nuestros resultados con respecto a las líneas celulares indican que, las líneas 1.3.15 y 3A5A muestran un mayor grado de susceptibilidad a la concentración de etanol empleada. Pese a que el diluyente modificó ligeramente el perfil del ciclo celular en estas dos líneas, los cambios no interfirieron de manera importante en nuestro estudio.

Los compuestos probados, cumarina y 7-hidroxicumarina, causaron un arresto en la fase G0/G1 de las tres líneas de adenocarcinoma utilizadas. El arresto en este punto conlleva a que las células no progresen hacia la fase S, observándose una disminución de la misma. En el caso de la línea SK-LU-1, este efecto repercute aún en la fase G2/M, en la que se observó una ligera disminución. Este comportamiento puede estar asociado al tiempo de duplicación más corto que presenta esta última línea celular. Finalmente, el efecto citostático observado para estos compuestos puede atribuirse a un bloqueo en la transición G1/S.

Con relación a las células mononucleares, se determinó que la incubación con PHA durante 40h permitía una distribución de las células a lo largo del ciclo celular. A este tiempo se observaron estadios tempranos de proliferación. Nuestros resultados concuerdan con los reportados previamente por Kubbies y cols²⁵.

Las fases del ciclo celular de las CMN no fueron afectadas por el diluyente, ni por la cumarina y la 7-hidroxicumarina a la concentración empleada. Esto correlaciona con observaciones previas en las que no encontramos un efecto inhibitorio importante¹⁸. Por lo tanto, nuestros resultados indican que las CMN no son susceptibles, comparadas con las células tumorales, al efecto citostático de la cumarina y la 7-hidroxicumarina.

En otro aspecto, se ha reportado en líneas celulares que gran parte de los fármacos quimioterapéuticos empleados en la actualidad, causan perturbaciones en diferentes fases del ciclo celular^{20,21,26}. Este conocimiento, aunado al estudio

de nuevos compuestos con actividad antitumoral, permitirá una mejor combinación de agentes quimioterapéuticos que actúen en diferentes fases del ciclo celular, con el fin de eliminar a un mayor número de células tumorales.

CONCLUSIONES

La cumarina y la 7-hidroxicumarina ejercen inhibición de la proliferación mediante el arresto en la transición G1/S del ciclo celular en líneas de adenocarcinoma pulmonar. Las células mononucleares no son afectadas por estos compuestos a la concentración empleada, demostrándose que hay mayor sensibilidad de las líneas tumorales hacia los compuestos cumarínicos. Cabe señalar que, son necesarios más estudios para determinar si la sensibilidad de las células de adenocarcinoma a los compuestos observada *in vitro*, puede presentarse *in vivo*.

Además, esta metodología representa una opción atractiva en el monitoreo de la sensibilidad o resistencia de las células tumorales al tratamiento quimioterapéutico, así como el planteamiento de un tratamiento antitumoral sustentado en una base biológica más sólida.

REFERENCIAS

- Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Darnell J. *Molecular cell biology*. 3rd ed. New York: Scientific American Books, 1995: 1201-1245.
- Rowinski E, Ettinger D. *Drug development and new drugs for lung cancer*. In: Pass H, Mitchell JB, Johnson DH, editors. *Lung cancer*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996: 793-810.
- Lazcano P, Tovar GV, Meneses GF, Rascón PRA, Hernández AM. *Trends of lung cancer mortality in Mexico*. Arch Med Res 1997; 28: 565-570.
- Natale RB. *Experience with new chemotherapeutic agents in non-small cell lung cancer*. Chest 1998; 113: 32S-39S.
- O'Kennedy R, Thornes RD. *Coumarins, biology, applications and mode of action*. England: John Wiley and Sons, 1997; 23-27, 67-75.
- Wattenberg LW, Lam LK, Fladmoe AV. *Inhibition of chemical carcinogen-induced neoplasia by coumarins and alpha-angelicalactone*. Cancer Res 1979; 39: 1651-1654.
- Cai Y, Kleiner H, Johnson D, Dubowski A, Bostic S, Ivie W et al. *Effect of naturally occurring coumarins on the formation of epidermal DNA adducts and skin tumors induced by benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in SENCAR mice*. Carcinogenesis 1997; 18: 1521-1527.
- Zacharski LR, Henderson WG, Rickles FR, Forman WB, Cornell CJ, Forcier RJ, et al. *Effect of warfarin on survival in small cell carcinoma of the lung. Veterans administration study No 75*. JAMA 1981; 245: 831-835.
- Thornes RD, Daly L, Lynch G, Breslin B, Browne H, Browne HY, et al. *Treatment with coumarin to prevent or delay recurrence of malignant melanoma*. J Cancer Res Clin Oncol 1994; 120(Suppl): 32S-34S.
- Marshall ME, Mendelsohn L, Butler K, Riley K, Cantrell J, Wiseman C, et al. *Treatment of metastatic renal cell carcinoma with coumarin (1,2-benzopyrone) and cimetidine: A pilot study*. J Clin Oncol 1987; 5: 862-866.
- Mohler JL, Williams BT, Thompson IM, Marshall ME. *Coumarin (1,2-benzopyrone) for the treatment of prostatic carcinoma*. J Cancer Res Clin Oncol 1994; 120 (Suppl): 35S-38S.
- Von Angerer E, Kager M, Maucher A. *Antitumor activity of coumarin in prostate and mammary cancer models*. J Cancer Res Clin Oncol 1994; 120(Suppl): 14S-16S.
- Roskopf F, Kraus J, Franz G. *Immunological and antitumor effects of coumarin and some derivatives*. Pharmazie 1992; 47: 139-142.
- Grigg GW. *Genetics effects of coumarins*. Mutation Res 1978; 47: 161-181.
- Seliger B, Petterson H. *7-Hydroxycoumarin inhibits oncogene-induced transformation of murine fibroblast*. J Cancer Res Clin Oncol 1994; 120(Suppl): 23S-27S.
- Marshall ME, Kervin K, Benefield C, Umerani A, Albainy-Jenei S, Zhao Q, et al. *Growth-inhibitory effects of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin on human malignant cell lines in vitro*. J Cancer Res Clin Oncol 1994; 120(Suppl): 3S-10S.
- Myers RB, Parker M, Grizzle WE. *The effects of coumarin and suramin on the growth of malignant renal and prostatic cell lines*. J Cancer Res Clin Oncol 1994; 120(Suppl): 11S-13S.
- García HV. *Efecto citostático de la cumarina y la 7-hidroxicumarina en distintas líneas celulares de cáncer de pulmón*. [Tesis] México: UNAM, Facultad de Química, 1999.
- López-González JS, García HV, Aguilar CD, Medina MF, Mendieta CI, Rosales R RS, et al. *Efecto citostático de la cumarina y la 7-hidroxicumarina en tres líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar humano*. Rev Inst Nal Enf Resp Mex 1998; 11: 261-267.
- Tolis C, Peters GJ, Ferreira CG, Pinedo HM, Giaccone G. *Cell cycle disturbances and apoptosis induced by topotecan and gemcitabine on human lung cancer cell lines*. Eur J Cancer 1999; 35: 796-807.
- Mastbergen SC, Duivenvoorden I, Versteegh RT, Geldof AA. *Cell cycle arrest and clonogenic tumor cell kill by divergent chemotherapeutic drugs*. Anticancer Res 2000; 20: 1833-1838.
- Higgins PJ. *Cell cycle phase-specific perturbation of hepatic tumor cell growth kinetics during short-term in vitro exposure to ethanol*. Alcohol Clin Exp Res 1987; 11: 550-555.
- Cook RT, Keiner J, Yen A, Fishbaugh J. *Ethanol induced growth adaptation in vitro. Cell cycle delay in late G1*. Alcohol 1990; 25: 33-43.
- Guo W, Baluda MA, Park NH. *Ethanol upregulates the expression of p2 WAF1/CIP1 and prolongs G1 transition via a p53-independent pathway in human epithelial cells*. Oncogene 1997; 15: 1143-1149.
- Kubbies M, Schindler D, Hoehn H, Rabinovith PS. *BrdU-Hoechts flow cytometry reveals regulation of human lymphocyte growth by donor-age-related growth fraction and transition rate*. J Cell Physiol 1985; 125: 229-234.
- Martin KJ, Winslow ER, Kaddurah-Daouk R. *Cell cycles studies of cyclocreatine, a new anticancer agent*. Cancer Res 1994; 54: 5160-5165.