



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ESTUDIO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE LOS EFECTOS
ESTROGÉNICOS DE ESCULETINA Y DAFNETINA”**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA
ANA ALEJANDRA ROMÁN ROSALES**



MÉXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente:	Prof. Alicia Beatriz Cervantes Peredo.
Vocal:	Prof. Marta Alicia Menjivar Iraheta.
Secretario:	Prof. Fausto Alejandro Jiménez Orozco.
Primer suplente:	Prof. María Elena Ibarra Rubio.
Segundo suplente:	Prof. María Benita Leonor Fernández Salgado.

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

Asesor del tema

Dr. FAUSTO ALEJANDRO JIMÉNEZ OROZCO

Supervisor técnico

MARÍA JUANA GARCÍA MONDRAGÓN

Sustentante

ANA ALEJANDRA ROMÁN ROSALES

AGRADECIMIENTOS PROFESIONALES

Dr. Alejandro Jiménez Orozco.

Me da gusto que haya sido mi asesor de tesis, porque durante este periodo de mi vida aprendí muchas cosas, no solo en el lado profesional, sino también en el lado personal. Agradezco la gran confianza que tuvo en mí para la realización de este trabajo y de otros más. Agradezco su paciencia. Mil gracias.

Q.F.B. María Juana García Mondragón

Por todo ese enorme apoyo que me brindo como supervisor técnico. Y por sus compañía siempre agradable. Muchas gracias.

Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina.

Al Dr. Nicandro Mendoza por su apoyo a los proyectos que se emprenden en este departamento

A la Dra. Cristina Lemini por sus valiosos comentarios y aportaciones a este trabajo.

Agradezco a los miembros del Laboratorio de Farmacología Celular:

Al Dr. Mandoki, por darme la oportunidad de pertenecer a este grupo de trabajo.

A Amelia y a Estelita que con sus pláticas cotidianas siempre hicieron más agradable mi estancia.

A Violeta por estar presente al inicio de mi aprendizaje en el laboratorio, con su amistad y con su apoyo siempre incondicional.

A los ex-compañeros de este laboratorio, que siempre hicieron mas amena mi estancia aqui: Gaby, Mario, Diana, Ana y Bety.

A Manuel, Eunice, Elizabeth e Itzel. Aunque nuestro tiempo de convivencia fue relativamente corto, hubo momentos en que depositaron su confianza en mí y momentos en los que me ayudaron mucho.

De manera general a todo el Departamento de Farmacología, ya que siempre tuvieron un saludo o una sonrisa para mi. Este lugar de trabajo es muy agradable. Gracias.

Facultad de Química, UNAM.

Agradezco a todos y cada uno de los maestros que participaron en mi formación profesional y que hicieron que mi cariño por esta carrera y por esta escuela fuera cada vez mayor.

Universidad Nacional Autónoma de México

Me gustaría agradecer a esta gran institución por la oportunidad que da a los jóvenes de estudiar y de prepararse para su futuro profesional. Además de permitir el desarrollo integral de todas y cada una de las personas que tenemos el orgullo de pertenecer a ella. Arriba la UNAM !!!

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi familia

Principalmente a mis papás, Anita y Javier. Siempre con su apoyo incondicional en mi proyecto de vida y en el de mi hermano. Quiero que sepan que los quiero mucho y que gracias a su consejo y a su amor pude concluir esta importante etapa de mi vida. Espero poder contar con ustedes en todos mis logros profesionales y también personales. LOS QUIERO Y MIL GRACIAS, DE TODO CORAZÓN.

A mi hermanito Edgar: muchas gracias por tu apoyo y por tu amistad, porque considero que nuestra relación realmente es de amistad. La convivencia contigo es agradable aunque haya peleas, que de cualquier manera siempre resolvemos.

A mis abuelitos, Ana, Gil, Rosa y Antonio porque sin ustedes todo esto ni siquiera hubiera empezado.

A TODA mi familia porque siempre han confiado en mi capacidad y siempre me han brindado su cariño y su consejo. A mis tíos y a mis primos que han hecho que crea en la familia.

A mis amigos

Todos y cada uno de ustedes han aportado un granito de arena para que yo sea como soy, bueno o malo ehh!

Laurita, Rosa y Marco: como no recordar los momentos del CCH, Sur por supuesto, sin que estén presentes. Y a muchos más, a los que siempre recordaré con cariño.

A la bandota de Química, claro que si!!!, porque siempre estuvieron ahí, en los buenos y malos momentos de mi paso por esta facultad:

Paquito, José, la Doña (Ale), Omar, "Sonrics" (Iroel), "Lobezno" (Román), "John" (César), Carlos, Edna, Jerry, "España" (Antonio), Mariana.

A mis compañeros de secundaria y primaria, que aún frecuento, y que me da mucho gusto saber que cuento con su apoyo, y claro que ustedes cuentan con el mío. Quién diría que después de tanto tiempo, seguiríamos en contacto.

Además de muchos otros amigos y compañeros que estuvieron presentes en este largo trayecto, difícil en ocasiones, pero bastante divertido en otras.

1. INTRODUCCIÓN

1.1	Antecedentes	1
1.2	Datos epidemiológicos y la prevención del cáncer de mama	2
1.3	Receptor de estrógenos (RE)	4
1.3.1	Mecanismo de estrógenos a través de RE	5
1.3.2	Acciones de estrógenos iniciadas desde la membrana	8
1.3.3	Acciones en el ciclo celular	8
1.4	Fitoestrógenos	10
1.4.1	Clasificación	11
1.4.2	Efectos sobre la proliferación celular	12
1.4.3	Efectos sobre la metástasis	13
1.5	Compuestos cumarínicos	14
1.5.1	Esculetina	15
1.5.2	Dafnetina	16

2. JUSTIFICACIÓN

2.1 HIPÓTESIS

2.2 OBJETIVOS GENERALES

2.2.1 OBJETIVOS PARTICULARES

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1	Materiales	
3.1.1	Reactivos y medios	23
3.1.2	Línea celular	23
3.2	Métodos	
3.2.1	Condiciones experimentales <i>in vitro</i>	24
3.2.2	Efectos sobre la proliferación celular	24
3.2.3	Antagonismo con tamoxifeno	25
3.2.4	Microensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio).	25
3.2.5	Condiciones experimentales de la evaluación	

estrogénica <i>in vivo</i>	26
4. RESULTADOS	
4.1 Efectos estrogénicos <i>in vitro</i>	29
4.2 Antagonismo con tamoxifeno	
4.2.1 Estradiol	31
4.2.2 Esculetina	32
4.2.3 Dafnetina	33
4.3 Efectos estrogénicos <i>in vivo</i>	34
5. DISCUSIÓN	36
6. CONCLUSIONES	39
7. PERSPECTIVAS FUTURAS DE ESTE TRABAJO	40
8. REFERENCIAS	41

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<i>Figura 1.</i> Número de publicaciones acerca de fitoestrógenos.	1
<i>Figura 2.</i> Homología entre los dominios funcionales de los receptores de RE.	5
<i>Figura 3.</i> Mecanismo clásico de activación de RE.	6
<i>Figura 4.</i> Estructura de los fitoestrógenos.	8
<i>Figura 5.</i> Estructura química de la cumarina.	14
<i>Figura 6.</i> Estructura de la esculetina.	16
<i>Figura 7.</i> Estructura de la dafnetina.	17
<i>Figura 8.</i> Efecto antiproliferativo, en 4 líneas celulares, de exposición a la concentración de 400 μ M de esculetina y dafnetina por 48 horas	20
<i>Figura 9.</i> Reacción del MTT.	26
<i>Figura 10.</i> Clave del laboratorio para identificación de ratones.	27
<i>Figura 11.</i> Efectos proliferativos de E ₂ , esculetina y dafnetina en la línea celular de adenocarcinoma mamario humano MCF-7.	29
<i>Figura 12.</i> Antagonismo de tamoxifeno sobre la respuesta proliferativa inducida por E ₂ en células MCF-7.	31
<i>Figura 13.</i> Antagonismo de tamoxifeno sobre la respuesta proliferativa inducida por esculetina en células MCF-7.	32
<i>Figura 14.</i> Antagonismo de tamoxifeno sobre la respuesta proliferativa inducida por dafnetina en células MCF-7.	33
<i>Figura 15.</i> Gráfica de resultados de estudios <i>in vivo</i> .	35

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
<i>Tabla 1.</i> Algunos fitoestrógenos y sus fuentes naturales.	11
<i>Tabla 2.</i> Efectos <i>in vitro</i> de los fitoestrógenos en la proliferación de distintas líneas celulares de adenocarcinoma mamario.	12
<i>Tabla 3.</i> Fuentes vegetales de obtención de esculetina.	15
<i>Tabla 4.</i> Resultados <i>in vivo</i> de la evaluación estrogénica de esculetina y dafnetina.	34

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Existen productos naturales de consumo humano, como plantas, frutos, semillas y especias que contienen varios tipos de principios activos que son útiles en la prevención y tratamiento de diversas enfermedades relacionadas con los estrógenos. Estos compuestos naturales han sido denominados como fitoestrógenos (ver inciso 1.4). En los últimos años, el creciente número de publicaciones sobre fitoestrógenos (Figura 1), indica que existe un gran interés por el estudio de estos compuestos. (Takeshi, 2006).

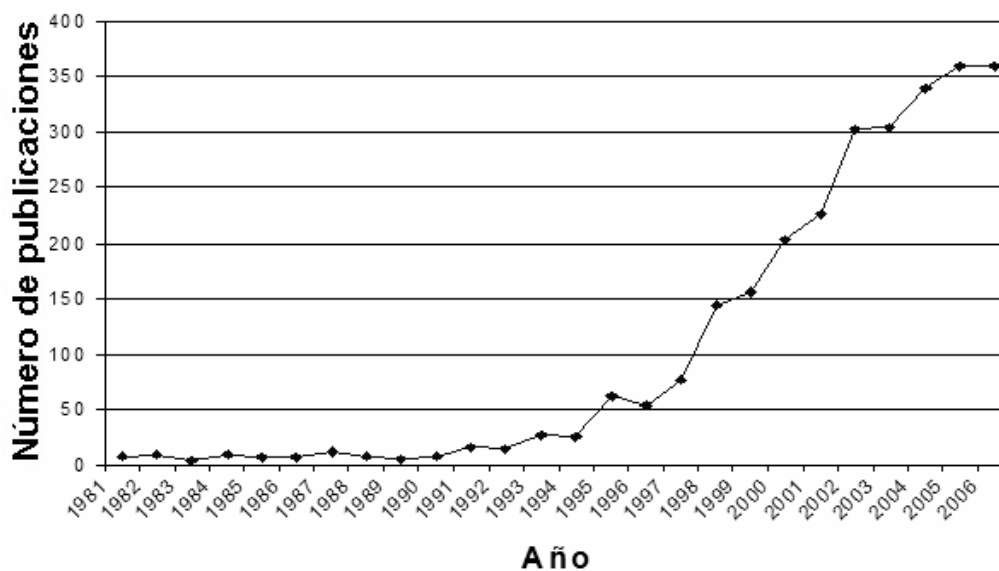


Figura 1. Número de publicaciones acerca de fitoestrógenos.

La genisteína es la isoflavona más abundante en la soya, y por lo tanto, ha sido la más estudiada por diversos grupos de investigación (Lamartiniere *et.al.*, 1998; Li *et.al.*, 1999; Murrill *et.al.*, 1996; Rowland *et.al.*, 2000; Wiseman *et.al.*, 2000).

1.2 Datos epidemiológicos y la prevención del cáncer de mama.

Estudios epidemiológicos indican que las poblaciones occidentales, en comparación con las asiáticas, presentan una incidencia mayor de enfermedades como: obesidad, diabetes, Alzheimer, osteoporosis, síntomas posmenopáusicos, y varios tipos de cáncer, incluyendo al cáncer de mama (Takeshi, 2006). Las diferencias entre estas dos poblaciones son determinadas por diversos factores, entre los que destacan los factores nutricionales. La soya es la base de la alimentación asiática y por lo tanto, estas poblaciones tienen una elevada exposición a los fitoestrógenos presentes en este alimento (Tham *et.al.*, 1998).

La teoría de que los fitoestrógenos pudieran tener un efecto protector contra el cáncer, por su analogía estructural con los estrógenos, fue postulada por primera vez por Schectell & Adlercreutz (1988).

Key y colaboradores (1990) observaron que, las mujeres asiáticas tienen un nivel de estrógenos en suero aproximadamente 40% menor que las mujeres que viven en occidente. Esto es consecuencia de que los fitoestrógenos reducen el nivel de estrógenos a través de mecanismos distintos. Uno de estos mecanismos es a través de la inhibición de las sulfoniltransferasas que sulfatan, tanto a esteroides estrogénicos como a procarcinógenos de la dieta. Otro mecanismo es la inhibición de otras enzimas involucradas en la biosíntesis y metabolismo de los estrógenos, como la aromatasa, la 17 β - y la 3 β - hidroxisteroide deshidrogenada (Adlercreutz *et.al.*, 1993; Le Bail *et.al.*, 2000; Kirk *et.al.*, 2001). Además, estos compuestos estimulan la producción en el hígado de la globulina de unión a hormonas sexuales (Adlercreutz *et.al.*, 1987).

Las isoflavonas obtenidas por el consumo de soya son detectables en la leche materna (Franke *et.al.*, 1998) y pueden ser transmitidas a los niños desde el nacimiento. Diversos estudios sugieren que la exposición temprana a

fitoestrógenos es extremadamente importante para ganar efectos protectores contra el cáncer (Shu *et.al.*, 2001).

La protección conferida en mujeres asiáticas por el consumo de soya se pierde, al paso de pocas generaciones, debido a la inmigración a occidente y la adaptación a este nuevo estilo de vida. Esto se confirma en estudios de migración donde se indica que la incidencia de cáncer de mama en la primera generación de estos inmigrantes es baja, pero que se incrementa a partir de las generaciones consecutivas (Shimizu *et.al.*, 1991; Ziegler *et.al.*, 1993).

Algunos estudios sugieren que la exposición a fitoestrógenos en mujeres adultas, puede prevenir el cáncer de mama (Yuan *et.al.*, 1995). Sin embargo, otros estudios epidemiológicos indican que los fitoestrógenos carecen de dicho efecto protector (Nomura *et.al.*, 1978; Hirohata *et.al.*, 1985; Lee *et.al.*, 1991; Hirose *et.al.*, 1995; Yuan *et.al.*, 1995; Wu *et.al.*, 1996; Witte *et.al.*, 1997; Key *et.al.*, 1999; Dai *et.al.*, 2001; Horn-Ross *et.al.*, 2001; Shu *et.al.*, 2001). De estos estudios se concluye que las dietas con alto contenido de soya consumidas en edades adultas no son suficientes para ejercer un efecto quimioprotector contra el cáncer de mama (Adlercreutz, 2002).

Kurzer (2003) reportó que en ciertas situaciones, el consumo de suplementos que contienen cantidades no controladas de fitoestrógenos, puede tener efectos adversos. Pueden provocar efectos procarcinogénicos en mujeres que toman suplementos para aminorar los síntomas menopáusicos. También pueden tener efectos antiestrogénicos en la reproducción, y efectos negativos en el desarrollo pre y postnatal (un ejemplo de esto, son las fórmulas infantiles basadas en soya; Whitten *et.al.*, 1995).

La mayoría de la información clínica y epidemiológica sobre el consumo de fitoestrógenos y el riesgo de cáncer de mama aún es contradictoria. Aunque su

papel en la prevención de carcinogénesis ya ha sido documentado, el uso de fitoestrógenos en el tratamiento de cáncer mamario no es claro.

1.3 Receptor de estrógenos (RE)

Los receptores de estrógenos tienen una afinidad alta a los estrógenos como el estradiol (E_2) y se localizan en el citoplasma de las células de los tejidos blanco (McDonnell D, 2000).

El primer gen del RE fue clonado del ADN complementario (cADN) de útero de rata, y se encontró una gran homología con el cADN de los genes clonados para los receptores de ratón, de pollo y de humano (Koike *et.al.*, 1987). Más tarde, Kuiper y colaboradores (1996) clonaron otro gen de RE a partir del cADN de próstata de rata, que correspondía a un receptor con menor secuencia de aminoácidos. Debido a estas observaciones se sugirió el nombre de RE β para distinguirlo del RE clonado previamente (denominado posteriormente RE α). Estos dos receptores tienen gran homología en la secuencia de aminoácidos de los dominios de unión a ADN (97%), pero poca homología en el dominio de unión a ligando (59%) (Shao y Brown, 2003).

Ambos receptores tienen distribución distinta en ciertos tejidos. En humanos, los receptores α y β de estrógenos han sido detectados en algunos tejidos comunes como útero, glándulas mamarias, hígado, huesos, tracto urogenital, sistema nervioso central (SNC) y sistema cardiovascular (SC). Por sus efectos sobre el SC y el SNC se sugieren como cardio y neuroprotectores. Sin embargo, el RE β también se ha encontrado en otros tejidos, como pulmones, riñones, colon y sistema inmune (Brandenberger *et.al.*, 1997; Hanstein, 2004). Algunos de los efectos de los estrógenos en la mujer, incluyen el desarrollo del aparato reproductor y el mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios. Así mismo participan en el control del ciclo menstrual – ovulatorio y en la modulación de

algunos aspectos metabólicos de minerales, lípidos, carbohidratos, proteínas y del sistema óseo. En el hombre los estrógenos participan en la espermatogénesis, en la conducta y también en la formación ósea (Loose y Stancel, 2006).

En la figura 2 se muestran los 6 dominios funcionales de los receptores $ER\alpha$ y $ER\beta$ y el análisis de su homología. Dentro de los dominios B y E se ubican dos secuencias de aminoácidos básicos denominadas AF-1 y AF-2 (por sus siglas en inglés, *Activating Function*). Ambos dominios proteicos son esenciales para el funcionamiento de los receptores (Tora L *et.al.*, 1989).

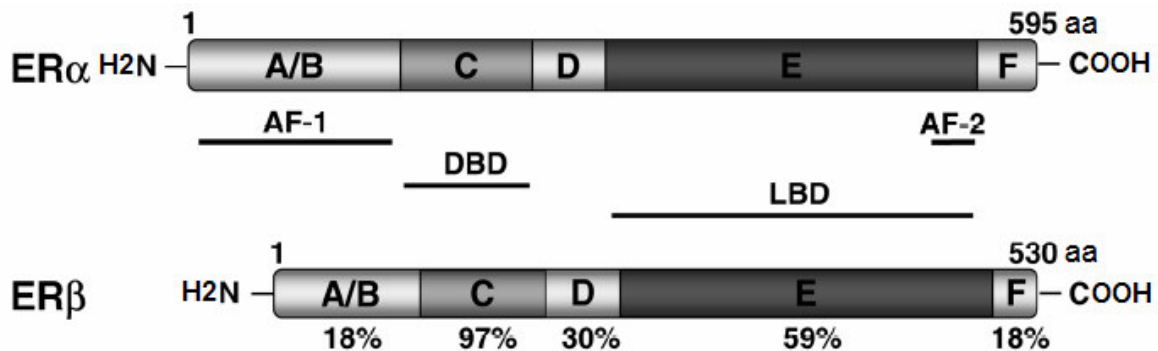


Figura 2. Homología entre los dominios funcionales de los receptores de estrógenos (Shao y Brown, 2003).

Los dominios A/B presentan alta variabilidad y le confiere especificidad al receptor; estos dominios contienen una secuencia AF-1. El dominio C permite la unión del receptor al ADN (DBD por sus siglas en inglés, *DNA Binding Domain*). El dominio D se conoce como región bisagra. El dominio E permite la unión al ligando y se denomina LBD (por sus siglas en inglés *Ligand Binding Domain*) y contiene a AF-2. Del dominio F aún no se ha reportado una función definida.

1.3.1 Mecanismo de estrógenos a través de RE.

Los receptores de hormonas esteroideas, incluyendo los RE, son **factores de transcripción inducibles por ligando**. Es decir, el complejo ligando – receptor unido al ADN, regulan positiva o negativamente la transcripción de genes, modificando la actividad de la enzima ARN polimerasa II (ARN pol II). Esta enzima

sintetiza la cadena de ARN correspondiente a la secuencia de la hebra molde o líder del ADN. Sin embargo, la ARN pol II no interactúa directamente con el ADN. **Los factores generales de la transcripción** son componentes básicos de la maquinaria de transcripción y sus niveles de expresión no varían en las células. Dichos factores forman un complejo que sirve de andamiaje entre el ADN y la ARN pol II (Mc Donnell, 2000).

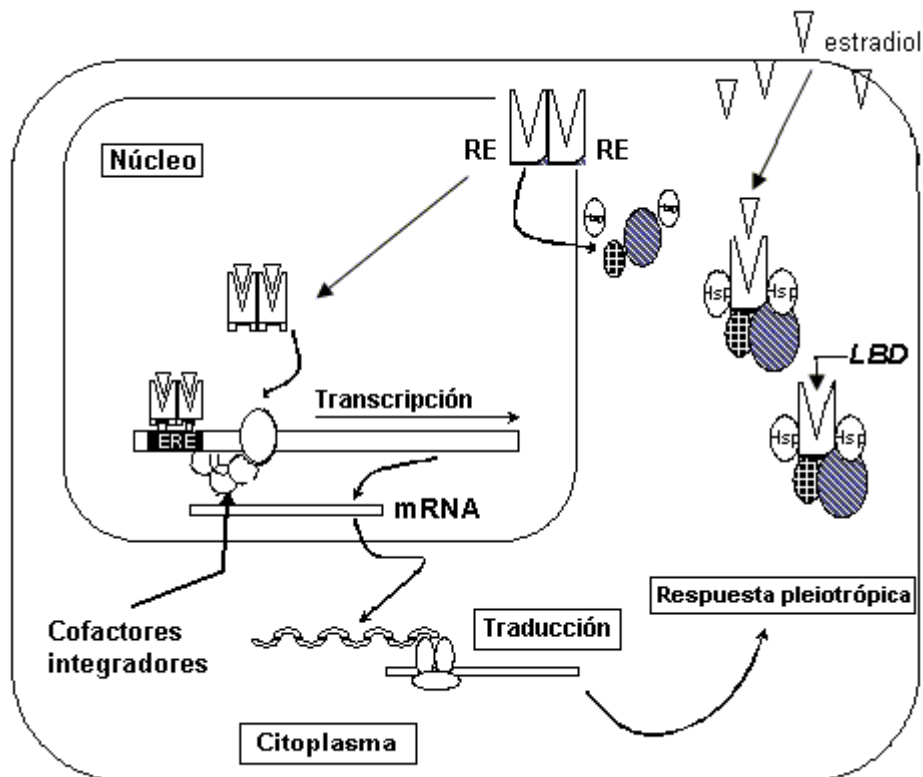


Figura 3. Mecanismo clásico de activación de RE. Modificada de <http://www.andrology.be/life98/technical.php>

Como se puede observar en la figura 3, en ausencia de ligando, estos receptores se encuentran en una conformación inactiva por su asociación a proteínas de choque térmico (Hsp). Cuando el ligando se une, estos receptores experimentan un cambio conformacional que promueve su disociación de las Hsp. Esta disociación permite que los RE se activen y formen dímeros que se translocan al núcleo donde se unen a secuencias específicas del ADN, denominados elementos de respuesta a estrógenos (ERE) (Pettersson y Gustaffson, 2001).

Los ERE son secuencias palindrómicas de 13 pares de bases localizadas en la región reguladora de los genes blanco (ten Heggeler-Bordier *et.al.*, 1987). La unión de los RE a sus ERE incrementa o disminuye la transcripción basal de los genes específicos (Nilsson *et.al.*, 2001). Este mecanismo general de activación mediado por RE se ha denominado mecanismo clásico (Wang *et.al.*, 2004). Basados en la homología estructural de los RE, se puede decir que ambos receptores reconocen los mismos ERE en los genes correspondientes. La expresión relativa de los dos receptores de RE es determinante en la respuesta celular (Liu *et.al.*, 2002). En células que expresan ambos RE, se observa que a bajas concentraciones de E₂, REβ funciona como un inhibidor de la actividad transcripcional a través de la formación de heterodímeros REα-REβ. Sin embargo, el REβ requiere mayores niveles de E₂ que el REα para unirse a los ERE (Hall y McDonnell 1999; Pettersson *et.al.*, 2000).

Por otra parte, existe otra clase de proteínas conocidas como coactivadores o correpresores, que carecen de dominios de unión al ADN y que no forman parte de la maquinaria general de transcripción (Rosenfeld *et.al.*, 2006). Su función es regular la transcripción mediante interacciones entre los RE y las proteínas del complejo general de transcripción. Los niveles de expresión de estos cofactores varía entre distintas estirpes celulares y estas diferencias pueden tener una gran influencia en la respuesta farmacológica de los ligandos de los RE (Xu *et.al.* 1999; Bevan y Parker, 1999; Glass y Rosenfeld, 2000). Esto puede explicar como los estrógenos regulan genes en los cuales no se han encontrado ERE (Björnström y Sjöberg, 2002)

Los estrógenos regulan a ciertos genes blanco que codifican respectivamente para las proteínas FOS, MYC, Catepsina D y el receptor de progesterona (van der Burg *et.al.*, 1989). A su vez, algunas de estas proteínas son factores de transcripción que regulan a un amplio número de genes, lo que puede explicar los efectos pleiotrópicos de los estrógenos. Diversos estímulos extracelulares incluyendo los estrógenos inducen la transcripción del gen *FOS*. Este gen codifica para una

proteína nuclear que se dimeriza con JUN para formar el complejo AP-1, responsable de la inducción de múltiples genes por lo que es conocido como un gen maestro. La proteína FOS juega un papel importante en la regulación de la proliferación de las células, a través de la inducción de la expresión de la ciclina D1 (ver inciso 1.3.3) y en su proceso de transformación (Weisz y Rosales, 1990; Kushner *et.al.*, 2000).

1.3.2 Acciones de estrógenos iniciada desde la membrana.

En los últimos años se ha documentado que los estrógenos se pueden unir a proteínas de membrana e inducir diversas cascadas de señalización, como las mediadas por la proteína cinasa dependiente de cAMP (PKA), la proteína cinasa dependiente de calcio (PKC) y de cinasa de fosfatidilinositol trifosfato (PI3K) (Vasudevan y Pfaff 2007). Se ha sugerido que existen receptores acoplados a proteínas Gq que son activados por estrógenos y producen respuestas mediadas por PKC (Qui *et.al.* 2003). La mayor parte de estos resultados se han estudiado en el sistema nervioso central, pero también se ha observado que en las células MCF-7 los estrógenos inducen en forma rápida la activación de la vía de la cinasa de receptores extracelulares (ERK) y su interacción con proteínas cinasas de activación mitogénica (MAPK) (Song *et.al.*, 2002). La activación de dichos mecanismos aún no se ha sido completamente elucidado y existen controversias, pero la evidencia indica que la activación de vías de señalización desde la membrana pueden potenciar las acciones de los estrógenos a través de la activación de genes blanco (Vasudevan *et.al.*, 2001).

1.3.3 Acciones en el ciclo celular

El ciclo celular es un proceso que permite la proliferación celular. En éste, el ADN es duplicado con fidelidad y se asegura la distribución de una copia fiel del genoma a cada una de las dos células hijas. El ciclo celular se divide en cuatro

fases (G_1 , S, G_2 y M) y cada fase involucra varios eventos que ocurren en forma ordenada (Martínez *et.al.*, 2001).

La ciclina D1 es una proteína esencial para el inicio del ciclo celular que activa a las cinasas específicas como CDK4 y CDK6, las cuales fosforilan sustratos específicos con la consiguiente progresión del ciclo celular. El gen *CCND1* que codifica para esta proteína es inducido por diversos estímulos proliferativos. La región promotora de este gen contiene elementos de respuesta a AP-1, MYC/MAX, STAT5, NF- κ B, E2F, OCT-1, SP1, EGR, ETS, CRE Y TCF/LEF (Allan *et.al.*, 2001). Se ha observado que los niveles, tanto de ARN mensajero como de proteína, se incrementan en respuesta al E_2 (Foster *et.al.*, 2001). Sin embargo, aunque la transcripción del gen *CCND1* pareciera ser inducida directamente por E_2 , no existen ERE en su región promotora (Amanatullah *et.al.*, 2001).

Varios estudios indican que los incrementos de ciclina D1 observados por exposiciones a E_2 , son el resultado de la actividad AP-1 inducida por estrógenos y por la activación de vías de señalización (Kushner, 2000; Foster *et.al.*, 2001; Vadasudevan and Pfaff 2007).

Por otra parte, la ciclina D1 se une al receptor de estrógenos en el dominio E en ausencia de ligando e incrementa la actividad transcripcional del receptor a través de su unión a las secuencias de ERE (Zwijssen *et.al.*, 1997). La ciclina D1 se sobre expresa en el 40 – 50 % de los carcinomas mamarios invasivos y se ha asociado con la presencia de RE (Michalides *et.al.*, 1996). Estos datos sugieren que además de su papel clásico como activador de CDK y regulador del ciclo celular, la ciclina D1 también puede funcionar como un activador de este receptor (Wang *et.al.*, 2004).

1.4 Fitoestrógenos

Los fitoestrógenos son metabolitos secundarios producidos por una amplia variedad de plantas. En su estructura se encuentran grupos fenólicos que tienen analogía con el principal estrógeno endógeno, E₂ (Figura 4), característica común requerida para la unión de estos compuestos con RE (Tamir *et.al.*, 2000). La posición de grupos hidroxilo en el anillo aromático, parece determinar su capacidad de unión a RE, así como la activación transcripcional modulada por este receptor (Rosenberg *et.al.*, 2000; Tamir *et.al.*, 2000).

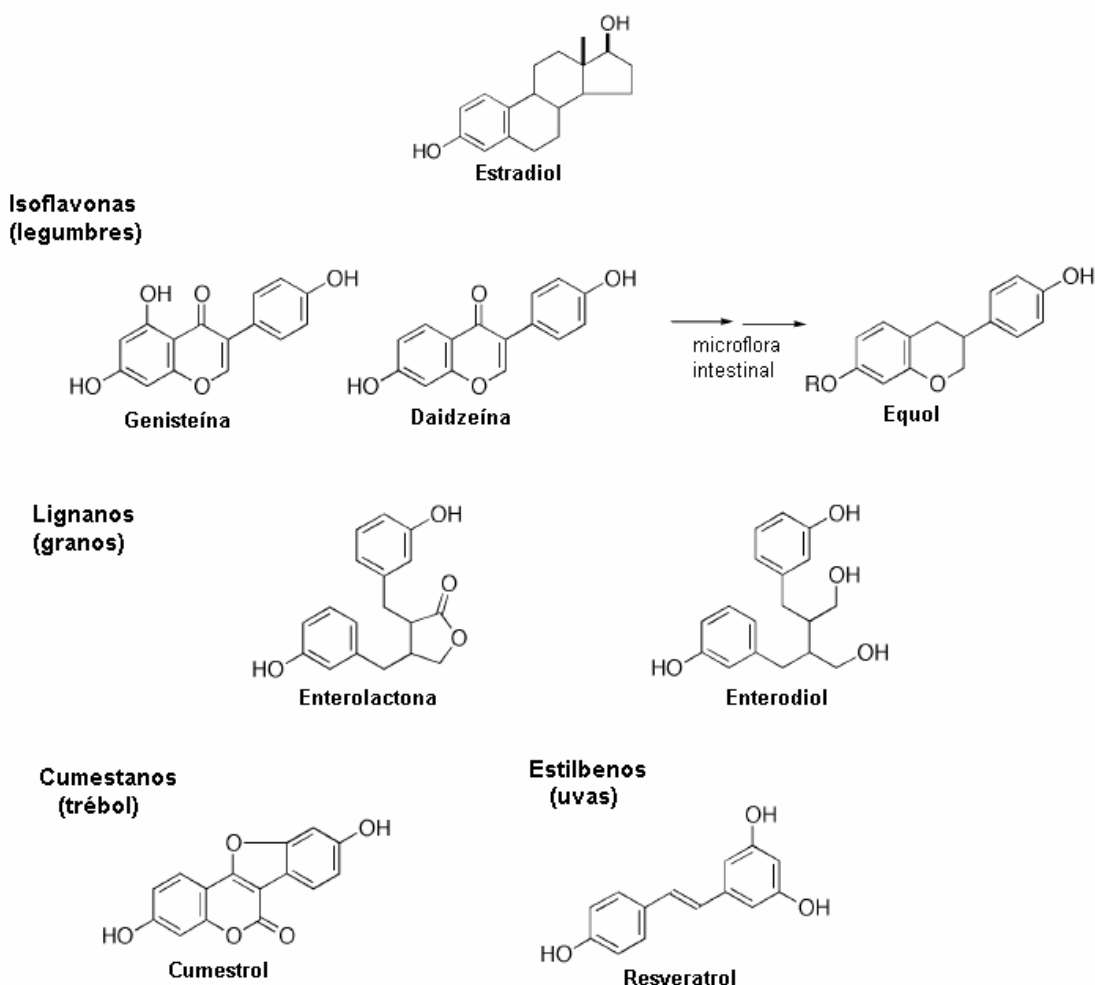


Figura 4. Estructura de los fitoestrógenos. (Modificada de Katzellenbogen y Muthyala, 2003)

La mayoría de los fitoestrógenos que se encuentran en las plantas, están glucosilados y son inactivos estrogénicamente (Miksicek, 1995). Después de ser consumidos, son hidrolizados por enzimas humanas de la función mixta oxidasa y por la microflora intestinal para formar los compuestos activos (Rowland *et.al.*, 2003).

1.4.1 Clasificación

Una sola planta frecuentemente contiene más de una clase de fitoestrógenos. Existen cuatro clases principales de fitoestrógenos: i) flavonas e isoflavonas; ii) lignanos; iii) cumestanos y; iv) estilbenos (Limer y Speirs, 2004; Magee y Rowland, 2004; Harris *et.al.*, 2005; Takeshi, 2006).

Tabla 1. Algunos fitoestrógenos y sus fuentes naturales. (Modificada de Harris *et.al.*, 2005)

Clasificación	Fuentes naturales	Nombre común	Nombre químico	Referencia
Isoflavona	Soya y sus productos.	Genisteína	5,7,4' – trihidroxiisoflavona	Franke <i>et.al.</i> , 1998. Setchell <i>et.al.</i> , 1997.
	Frijoles negros	Daidzeína	7,4' – dihidroxiisoflavona	
	Metabolito de la daidzeína	Equol	7,4' – isoflavandiol	
Lignano	Semillas de lino. Semillas de sésamo. Frutillas.	Enterolactona Enterodiol	dihidroxilignano-9,9'-lactona	Meagher <i>et.al.</i> , 1999.
Cumestano	Alfalfa. Brócoli. Trébol rojo. Col de Bruselas.	Cumestrol	7,12 - dihidroxicumestano	de Kleijn <i>et.al.</i> , 2001.
Estilbeno	Cacahuete. Uva y vino tinto.	Resveratrol	Trans 3,4' – trihidroxiestilbeno	Burns <i>et.al.</i> , 2002.

1.4.2 Efectos sobre la proliferación celular

Numerosos trabajos han evaluado el efecto de distintos fitoestrógenos en la proliferación de varias líneas celulares de adenocarcinoma mamario (Tabla 2). Dichos estudios se realizaron tanto en líneas celulares que expresan receptores de estrógenos (RE+), como MCF-7 y T47D; como en líneas celulares que no expresan estos receptores (RE-), por ejemplo MDA-468 y MDA-MB-231.

Tabla 2. Efectos *in vitro* de los fitoestrógenos en la proliferación de distintas líneas celulares de adenocarcinoma mamario (Modificada de Magee y Rowland, 2004).

Fitoestrógeno evaluado	Concentración	Línea celular	Efecto en la proliferación celular	Referencia
Daidzeína y equol	10^{-8} – 10^{-5} M	MCF-7	↑	Sathyamoorthy y Wang (1997)
Genisteína	10^{-8} – 10^{-7} M	MCF-7	↑	Hsieh et al (1998)
Enterolactona	10^{-6} – 10^{-5} M	MCF-7, T47D	↑	Welshons et al (1987)
Equol	10^{-7} – 10^{-6} M	MCF-7, T47D	↑	Welshons et al (1987); Schmitt et al (2001)
Daidzeína, equol y O-DMA	10^{-8} – 10^{-6} M	MCF-7	↑	
Enterolactona	0.5 – 2 (10^{-6}) M > 10^{-5} M	MCF-7	↑ ↓	Mousavi y Adlercreutz (1992)
Genisteína	10^{-9} – 10^{-5} M	MCF-7	↑	Zava y Duwe (1997)
	> 10^{-5} M	MCF-7	↓	
	10^{-8} – 10^{-5} M	T47D	↑	
	2 (10^{-5}) M	T47D	↓	
	10^{-8} M – 10^{-6} M	MDA-468	Poco o nulo efecto	
	> 10^{-6} M	MDA-468	↓	
Genisteína y cumestrol, biochanina A y enterolactona	10^{-7} – 10^{-5} M 10^{-5} – 10^{-4} M	MCF-7 MDA-MB-231 MCF-7	↑ ↓ ↓	Wang y Kurzer (1997)
Genisteína, daidzeína, biochanina A	IC ₅₀ 6.5 – 12 µg/ml IC ₅₀ 20 -34 µg/ml	MCF-7 MCF-7-D-40, MDA-468	↓	Peterson y Barnes (1991)
Genisteína	IC ₅₀ 7-37 (10^{-6}) M	MCF-7/WT, MCF-7/ADR ^R , MDA-231	↓	Monti y Sinha (1994)
Genisteína	IC ₅₀ 40 (10^{-6}) M	MCF-7	↓	Pagliacci et al (1994)

↑, Aumento de la proliferación; ↓, Disminución de la proliferación;

Los resultados indican que los efectos de estos compuestos son bifásicos y que corresponden a mecanismos de acción distintos dependientes de la concentración. A bajas concentraciones (10^{-8} a 10^{-5} M) los fitoestrógenos sólo promueven la proliferación celular de líneas celulares RE+, probablemente a través de su unión al receptor. A concentraciones mayores, estos compuestos inhiben tanto la proliferación de líneas celulares RE+ como RE-, además de inducir apoptosis o diferenciación celular. Estas observaciones indican que a altas concentraciones, los fitoestrógenos actúan por un mecanismo independiente de su unión a RE (Magee y Rowland, 2004).

Uno de los mecanismos propuestos del efecto antiproliferativo, es la inhibición de la topoisomerasa II que es la enzima nuclear responsable de la replicación, transcripción y reparación del ADN (Markovits *et.al.*, 1989). Otro mecanismo propuesto para el efecto antiproliferativo de los fitoestrógenos es inhibir la actividad de las cinasas de tirosina que dependen del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) (Akiyama *et.al.*, 1987). Aproximadamente 50% de los oncogenes identificados codifican para receptores con actividad cinasa de tirosina, que incrementan las señales proliferativas en varios tipos de cáncer (Polkowski y Mazurek, 2000).

Debido a que los efectos antiproliferativos de los fitoestrógenos se observan a altas concentraciones, es difícil de correlacionar estos resultados *in vitro* con estudios en humanos *in vivo*. Las concentraciones *in vitro*, requeridas para observar estas acciones, raramente se alcanzarán *in vivo* (Magee y Rowland, 2004).

1.4.3 Efectos sobre la metástasis

Los fitoestrógenos también pueden disminuir la invasividad celular del cáncer de mama. En células del endotelio vascular, la genisteína inhibe la angiogénesis *in*

vitro a concentraciones de 200 μM (Fotsis *et.al.*, 1995), e *in vivo* a dosis de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal (Shao *et.al.*, 1998b).

Además, la genisteína regula negativamente a la metaloproteinasa de la matriz (MMP-9) y positivamente a la metaloproteinasa 1, conocida como inhibidor de tejido (Shao *et.al.*, 1998b; 1998c). Se han encontrado grandes diferencias en la expresión y liberación de MMP en líneas celulares de cáncer de mama con alta invasividad en comparación con células de poca invasividad (Balduyck *et.al.*, 2000).

1.5 Compuestos cumarínicos

La cumarina (1, 2 – benzopirona) está formada por un anillo bencénico y un anillo heterocíclico tipo lactona. Este compuesto es un producto natural ampliamente distribuido en el reino vegetal (Murray *et.al.*, 1982; Reyes-Chilpa *et.al.*, 2004).

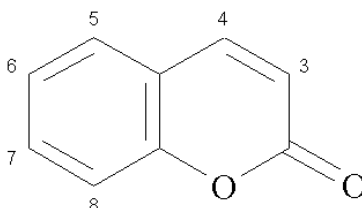


Figura 5. Estructura química de la cumarina

La cumarina ha sido empleada en la preparación de algunas bebidas alcohólicas, como agente fijador de perfumes y para aromatizar el tabaco (Opdyke, 1974). En humanos, la exposición diaria total a cumarina proveniente de fuentes alimenticias, así como el uso de fragancias y productos cosméticos, se ha estimado en 60 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ (Lake, 1999). En humanos, la cumarina tiene baja toxicidad (Cox *et.al.*, 1989; Lake, 1999); su vida media es corta (1 – 1.5 h) y el 75% de ésta es convertido en 7-hidroxycumarina (7-HC) (Shilling *et.al.*, 1969). Se ha sugerido que la cumarina puede ser un pro-fármaco y que la 7-HC es la forma activa de éste. El producto de biotransformación es conjugado con ácido glucurónico y excretado

por secreción tubular activa (Egan *et.al.*, 1990). Otras cumarina hidroxiladas han sido detectadas como metabolitos de menor proporción tanto *in vivo* como *in vitro* (van Iersel *et.al.*, 1994; Lake, 1999).

En estudios multicéntricos se ha observado que la cumarina inhibe el desarrollo, tanto de carcinoma renal (Dexeus *et.al.*, 1990), como prostático (Marshall *et.al.*, 1990), y previene la recurrencia de melanoma (Thornes *et.al.*, 1994).

In vitro, la cumarina y sus derivados monosustituidos tienen un efecto antiproliferativo, en concentraciones milimolares en varias líneas celulares de tumores (Jiménez-Orozco *et.al.*, 1999, 2001; Kawase *et.al.*, 2003). En contraste los compuestos bisustituidos son activos a concentraciones micromolares (Kolodziej *et.al.*, 1997; Finn *et.al.*, 2001, Kawaii *et.al.*, 2001).

1.5.1 Esculetina

Tabla 3. Fuentes vegetales de obtención de esculetina.

Planta	Referencia
<i>Bidens pilosa</i> L.*	Sarg <i>et.al.</i> , 1991
<i>Artemisia mongolica</i>	Hu <i>et.al.</i> , 1996
<i>Fraxinus bungeana</i> DC *	Chang <i>et.al.</i> , 1996
<i>Alchemilla speciosa</i> BUSER *	Schimmer y Eschelbach, 1997
<i>Aralia fargesii</i> *	Rao <i>et.al.</i> , 1996
<i>Cichorium intybus</i> *	Gilani <i>et.al.</i> , 1998
<i>Bougainvillea spectabilis</i>	Gilani <i>et.al.</i> , 1998
<i>Artemisia montana</i>	Kim NM <i>et.al.</i> , 2000
<i>Lonicera bournei</i> Hemsl *	Xiang <i>et.al.</i> , 2001
<i>Cimicifuga foetida</i> L. *	Zhao <i>et.al.</i> , 2002
<i>Fraxinus sieboldiana</i> var. <i>angustata</i> *	Kim HJ <i>et.al.</i> , 2002
<i>Artemisia scoparia</i> *	Pan <i>et.al.</i> , 2003
<i>Euphorbia lathyris</i> L. *	Masamoto <i>et.al.</i> , 2003
<i>Glossostemon bruguieri</i>	El-Sayed <i>et.al.</i> , 2004
<i>Cortex fraxin</i>	Li C <i>et.al.</i> , 2005
<i>Nicotina tobaccum</i> L.	Gu <i>et.al.</i> , 2005

* Empleadas con fines medicinales.

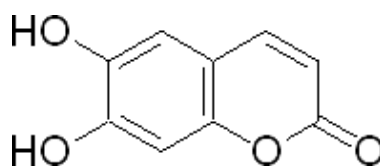


Figura 6. Estructura de la esculetina.

La esculetina tiene propiedades antioxidantes (Paya *et.al.*, 1992) e inhibe: (i) la actividad de la xantina oxidasa (Chang *et.al.*, 1995), (ii) la actividad de la 5-lipoxigenasa (Sekiya *et.al.*, 1982; Neichi *et.al.*, 1983; Panossian, 1984), (iii) la agregación plaquetaria (Okada *et.al.*, 1995); y iv) la carcinogénesis inducida por N-metil-N-nitrosourea en rata (Matsunaga *et.al.*, 1998).

La actividad antiproliferativa de esculetina ha sido estudiada ampliamente y se ha observado que este compuesto es más activo en las líneas celulares de leucemia (Kawaii *et.al.*, 2001; Hoffmanova *et.al.*, 2002) que en las líneas celulares derivadas de tumores epiteliales (Kolodziej *et.al.*, 1997; Finn *et.al.*, 2001).

En células de leucemia promielocítica humana (HL60), la esculetina induce apoptosis (Chu *et.al.*, 2001). En dichas células se ha observado que este compuesto detiene el ciclo celular en la fase G1, debido al incremento de los niveles de p27 y a la reducción de los niveles de ciclina D1 y de CDK4. Esto produce un incremento en la forma hipofosforilada de la proteína del retinoblastoma (pRB) (Wang *et.al.*, 2002). La esculetina también produce diferenciación en las células HL60 (Wang *et.al.*, 2002), y este efecto es potenciado por el ácido retinóico (Hofmanova *et.al.*, 1998).

1.5.2 Dafnetina

La dafnetina (7,8, dihidroxicumarina) es un metabolito secundario que se encuentra en varias plantas empleadas en la medicina popular, como las de la familia de la Thymelaeaceae: *Daphne odora*, la *Daphne gnidium L*, y *Daphne*

oleoides, usadas en el tratamiento de dolor reumático y como antipirético (Yesilada *et.al.*, 2001; Zhang *et.al.*, 2005). Por otra parte, el uso de la *Daphne koreane Nakai*, ha sido referido para el tratamiento de desórdenes de la coagulación (Su XL *et.al.*, 2003; Liu J *et.al.*, 2004). La dafnetina también ha sido aislado de plantas que pertenecen a otras familias, como la *Cruciata taurica* (De Rosa S *et.al.*, 2002).

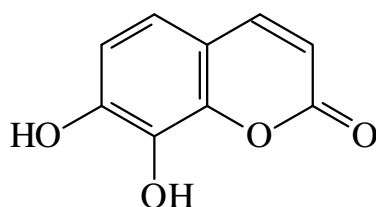


Figura 7. Estructura de la dafnetina.

La dafnetina también tiene propiedades antioxidantes (Fylaktakidou KC *et.al.*, 2004), pero a diferencia de la esculetina, la dafnetina disminuye la actividad cinasa de varias proteínas (Yang *et.al.*, 1999) y la biosíntesis tanto de TNF- α como de IL-1 (Yesilada *et.al.*, 2001).

Este compuesto es la cumarina dihidroxilada más activa, que inhibe la proliferación de varias líneas celulares de tumores derivados de epitelios (Finn *et.al.*, 2001, 2002, 2004). Se ha descrito que a bajas concentraciones, este compuesto activa a la proteína p38 e induce la diferenciación en células de carcinoma renal, produciendo arrestos en la fase S del ciclo celular. En contraste, a altas concentraciones y exposición prolongada, la dafnetina inhibe la fosforilación de ERK1 y ERK2 y produce sólo un pequeño arresto en la fase G₁. Otra característica que podría hacer de la dafnetina, un agente antineoplásico promisorio, es que detiene la síntesis de ADN sin causar daño al genoma (Finn *et.al.*, 2002), además de que no es sustrato para la glicoproteína P (Finn *et.al.*, 2004).

Nuestro grupo de trabajo ha observado que a concentraciones elevadas (200 μM) la dafnetina disminuye la expresión y niveles de ciclina D1 en células MCF-7, así como la forma hiperfosforilada de pRB (Larios, 2006).

2. JUSTIFICACIÓN

Los fitoestrógenos son compuestos que se encuentran en productos naturales de consumo humano y tienen la capacidad de unirse a los receptores de estrógenos (RE). Se han estudiado sus propiedades biológicas, tanto en la prevención, como en el tratamiento de varias enfermedades. En el cáncer de mama, se ha reportado que los fitoestrógenos como la genisteína, que se encuentra en la soya, tienen efectos bifásicos dependientes de la concentración: i) a bajas concentraciones aumentan la proliferación en células que expresan RE y ii) a altas concentraciones inhiben la proliferación celular, tanto de células que expresan RE, como de las que no expresan. Sin embargo, en pacientes con cáncer de mama su uso terapéutico es muy cuestionado.

Las cumarinas son metabolitos secundarios de plantas; algunas de ellas son empleadas en la medicina tradicional. La esculetina y la dafnetina, tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y son inductoras de la diferenciación celular. Por su efecto antiproliferativo *in vitro*, algunas cumarinas han sido propuestas como agentes antineoplásicos por varios grupos de investigación. Dichos efectos se observan en diversos tipos de líneas celulares tumorales a concentraciones micromolares. Sin embargo, las acciones de estos compuestos no han sido estudiadas a concentraciones menores.

En un trabajo previo se observó que la exposición a esculetina por 48 horas a la concentración de 400 μM , sólo inhibió la proliferación de las líneas celulares A-427 (adenocarcinoma pulmonar humano) y B16 (melanoma murino), aunque también se evaluaron otras líneas celulares, como CALU-1 (carcinoma epidermoide humano) y MCF-7 (adenocarcinoma mamario humano). Por el contrario la dafnetina presentó efecto antiproliferativo en todas las líneas celulares estudiadas bajo las mismas condiciones (García SA, 2003).

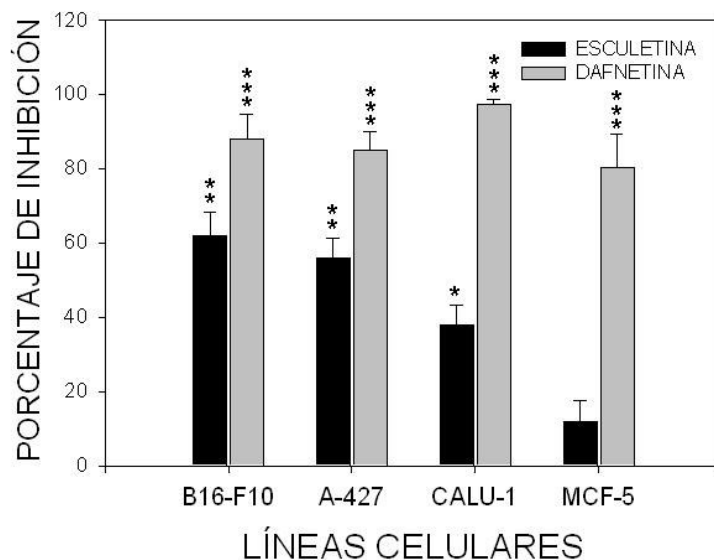


Figura 8. Efecto antiproliferativo, en 4 líneas celulares, de exposición a la concentración de 400 μM de esculetina y dafnetina por 48 horas. Significado estadístico con respecto a cero; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (García SA, 2003)

En otro trabajo reciente se observó que la esculetina en las células MCF-7, por el mismo tiempo de exposición a concentraciones de 50 y 100 μM , incrementó la expresión de ciclina D1 y sus niveles. Por el contrario, solo a concentraciones más elevadas (200 μM), este compuesto disminuyó el nivel de esta proteína. Con esto se propone que la esculetina tiene diferentes efectos dependientes de la concentración. Por el contrario en este mismo ensayo, la dafnetina disminuyó los niveles de ciclina D1 desde la concentración de 50 μM (Larios SV, 2006).

La línea celular MCF-7, debido a que expresa el $\text{RE}\alpha$, ha sido empleada frecuentemente para la evaluación *in vitro* de los efectos estrogénicos de distintos compuestos. De igual manera, la evaluación del peso uterino de ratón hembra prepúber ha sido un modelo frecuentemente usado en la evaluación *in vivo* de estos efectos.

2.1 HIPÓTESIS

La esculetina tiene efectos bifásicos dependientes de la concentración, en células MCF-7 (efectos estrogénicos a bajas concentraciones y efectos antiproliferativos a altas concentraciones). De igual manera, estos efectos bifásicos se observan *in vivo*. Por el contrario, la dafnetina solo inhibe la proliferación celular.

2.2 OBJETIVOS GENERALES

- Evaluar *in vitro*, los posibles efectos estrogénicos de esculetina y dafnetina a bajas concentraciones.
- Corroborar *in vivo* los posibles efectos estrogénicos de esculetina y dafnetina.
- Determinar si no obstante la analogía estructural entre esculetina y dafnetina, ambas moléculas poseen efectos distintos.

2.2.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Seleccionar clonas de células MCF-7 con mejor respuesta a 17β -estradiol (E_2).
- 2) Determinar las condiciones experimentales necesarias para realizar los ensayos de proliferación con células MCF-7.
- 3) Evaluar *in vitro* los posibles efectos estrogénicos de esculetina y dafnetina a través de la proliferación de células MCF-7, utilizando E_2 como control positivo del sistema.
- 4) Evaluar *in vitro* el antagonismo competitivo por RE de tamoxifeno con esculetina y dafnetina, con E_2 como control positivo.
- 5) Evaluar los pesos uterinos y los frotis vaginales de ratones hembra después del tratamiento con esculetina y dafnetina, empleando E_2 como control positivo del sistema.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Reactivos y medios

Los siguientes materiales y reactivos fueron obtenidos comercialmente de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO): 17β -estradiol (E_2), dafnetina (7,8-dihidroxicumarina), esculetina (6,7-dihidroxicumarina), tamoxifeno, medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) alto en glucosa, sin rojo de fenol, MTT (bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) y el dimetil sulfóxido (DMSO). El suero de ternera fue obtenido comercialmente de *In Vitro* y el medio DMEM con rojo de fenol alto en glucosa, de Gibco.

3.1.2 Línea celular

La línea de adenocarcinoma mamario humano MCF-7 fue obtenida de American Type Culture Collection (ATCC Número HTB-22). Las células MCF-7 mantienen varias características de epitelio mamario diferenciado, incluyendo la capacidad de respuesta a $RE\alpha$ (Brooks *et.al.*, 1973; van Dijk *et.al.*, 1997). Las células expresan el oncogen WNT7B (Huguet *et.al.*, 1994) y su crecimiento es inhibido por el factor de necrosis tumoral (TNF α), (Sgagias *et.al.*, 1991). Esta línea celular sobreexpresa la ciclina D1 por un defecto en la proteólisis de esta proteína (Russell *et.al.*, 1999).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Condiciones experimentales in vitro

Las células se cultivaron en botellas de 25 cm² de área de cultivo (NUNC), a una temperatura de 37°C, en atmósfera humidificada y con inyección de CO₂ al 5%. Para seleccionar clonas de células que tuvieran una mejor respuesta a E₂, las células fueron cultivadas por dos semanas en **condiciones restrictivas**: *medio DMEM alto en glucosa y sin rojo fenol, suplementado con 5 % de suero de ternera (DC₅) con E₂ a una concentración final de 10⁻⁹ M*, de acuerdo a la técnica de Gierthy y colaboradores (1997). Las células que sobrevivieron en esta condición, fueron tripsinizadas, y cultivadas durante cinco días en **condiciones no restrictivas**: *medio DMEM con rojo fenol, suplementado al 10% con suero fetal bovino con complemento inactivado por calor*. Al término de este periodo, las células fueron empleadas para los ensayos de proliferación.

3.2.2 Efectos sobre la proliferación

Las células seleccionadas de acuerdo al inciso 3.2.1, fueron tripsinizadas y sembradas en microplacas de cultivo de 96 pozos (3000 células/pozo) en un volumen de 200 µL de medio DC₅ y se incubaron por 18 horas. Al término de este periodo se agregó cada concentración de compuesto a los pozos correspondientes. Se evaluaron 5 concentraciones de cada compuesto por sextuplicado.

El E₂ fue empleado como control positivo en los siguientes rangos de concentración: 10⁻¹⁵, 10⁻¹³, 10⁻¹¹, 10⁻⁹, 10⁻⁷ M.

La esculetina y la dafnetina fueron evaluados en los siguientes rangos de concentración: 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ M.

El etanol fue empleado como disolvente de los compuestos y la concentración final en los pozos fue de 0.001% (v/v). Como controles absolutos se emplearon células que no recibieron ningún tratamiento y como control de disolvente, células que sólo fueron tratadas con la concentración final de etanol. El crecimiento de las células del control absoluto no presentó diferencias con respecto a las células del control de disolvente. A los días tres y cinco, se realizaron cambios de medio y se agregó de nuevo a cada pozo la concentración de compuesto correspondiente al tratamiento. La proliferación celular se evaluó al día siete de exposición, por medio de microensayo con MTT (ver inciso 3.2.4).

3.2.3 Antagonismo con tamoxifeno

Las células fueron tripsinizadas y sembradas en microplacas de 96 pozos (3000 células/pozo) en un volumen de 200 μ L de medio DC₅. Se realizó una preincubación de 18 horas con las siguientes concentraciones de tamoxifeno: 10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-5} M. Después de este periodo, se adicionaron las concentraciones correspondientes de E₂ (como control positivo), de esculetina y de dafnetina en las mismas concentraciones y condiciones empleadas para la evaluación del efecto proliferativo (ver inciso 3.2.2).

3.2.4 Microensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio)

Los ensayos con MTT se basan en la capacidad que presentan las células vivas de reducir la sal de MTT a formazán de MTT (1-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 3,3,5-difenilformazan), que es un compuesto hidrofóbico de color púrpura. La absorbancia del formazán de MTT es proporcional al número de células vivas.

Se preparó una solución madre de MTT, con concentración de 5 mg/ml; a cada pozo con 100 μ l de medio, se le adicionaron 10 μ l de esta solución, quedando una concentración final en cada pozo de 0.05mg/100 μ l. Las células fueron incubadas con una concentración final de MTT 10% v/v, por dos horas a 37°C en oscuridad y al término de este tiempo, se retiró el sobrenadante. Los cristales de formazán se disolvieron en 100 μ l de dimetil sulfóxido (DMSO) y se midió la absorbancia de éstos en un lector de microplacas Biotek EK11 a una longitud de onda de 570 nm.

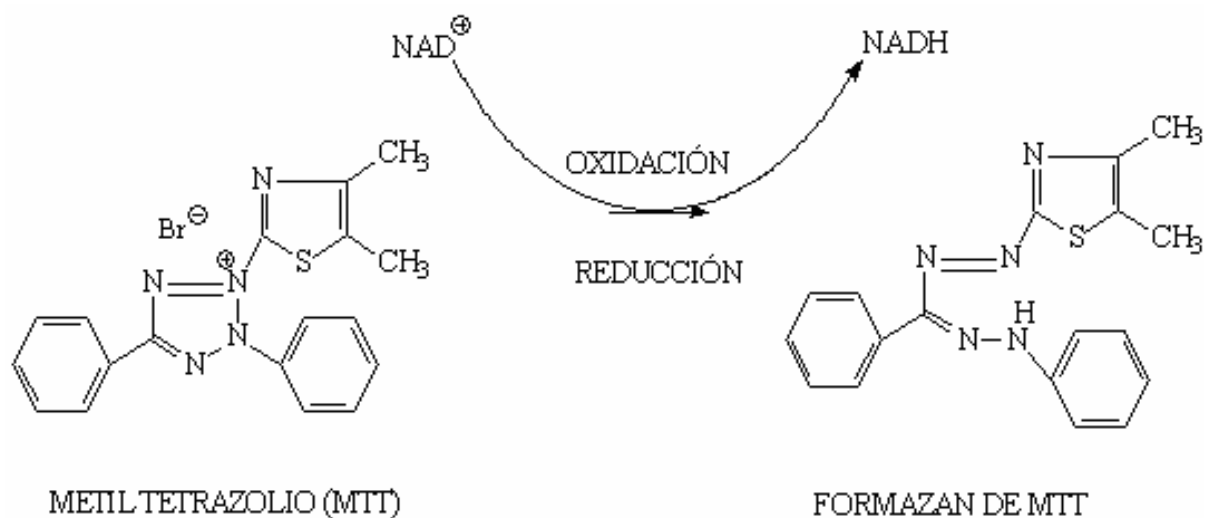
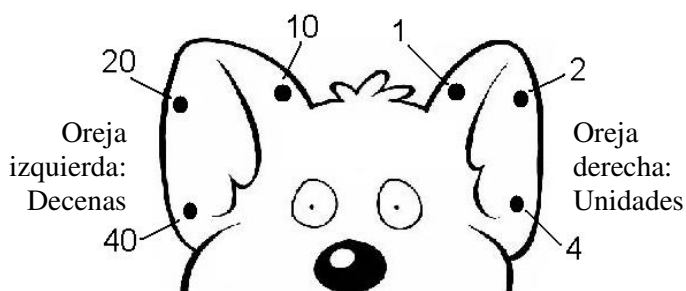


Figura 9. Reacción del MTT.

2.2.5 Condiciones experimentales de la evaluación estrogénica in vivo

Se utilizaron ratones hembra de la cepa CD1, destetadas 3 días antes de iniciar el tratamiento y con un peso de 10 a 15 g. Para su identificación, los animales fueron marcados individualmente con pequeñas muescas en el borde de sus orejas, de acuerdo a la clave empleada en el laboratorio (Figura 10). Fueron distribuidos en base a sus pesos corporales de manera balanceada.

Los compuestos fueron administrados en forma subcutánea por 3 días y al cuarto día se evaluó la presencia de células cornificadas en los frotis vaginales teñidos por el método de Harris. Después se evaluaron los pesos de los cuernos uterinos húmedos.



Numeración para la identificación de los ratones de laboratorio:

- Las unidades se colocan en la oreja derecha (viendo de frente).
- Las decenas se colocan en la oreja izquierda (viendo de frente).
- La numeración carece de todos los números cuya unidad sea 8 o 9.

El ratón 0 no presenta muescas en sus orejas, el ratón 3 se identifica con la suma de las muescas 1 y 2, el ratón 5 con la suma de las muescas 4 y 1, el ratón 6 con la suma de 4 y 2, el ratón 7 con la presencia de todas las muescas, y así sucesivamente.

Figura 10. Clave del laboratorio para identificación ratones.

Las dosis empleadas fueron las siguientes:

Control negativo (vehículo): Aceite de maíz 5 ml/kg de peso corporal.

Control positivo: E₂ 10 µg/kg de peso corporal.

Esculetina: 17.5, 35, 70 y 140 mg/kg de peso corporal.

Dafnetina: 17.5, 35, 70 y 140 mg/kg de peso corporal.

Frotis vaginal. El frotis vaginal fue obtenido al introducir solución salina, con una pipeta Pasteur, en el orificio vaginal del ratón. Una gota de esta muestra fue depositada sobre un portaobjetos y se dejó secar para proceder a la tinción de Harris. Los frotis se observaron al microscopio, realizando un barrido del portaobjetos en forma “s” para evaluar la presencia de células cornificadas presentes en la muestra.

Técnica de tinción de Harris. La muestra fue tratada de la siguiente manera:

El portaobjetos fue, 1) sumergido en alcohol de 96º durante 10 minutos; 2) lavado con agua destilada; 3) teñido con solución de hematoxilina durante 8 minutos; 4) lavado abundantemente con agua destilada; 5) pasado por alcohol ácido; 6) lavado con agua destilada nuevamente; 7) sumergido en agua amoniacal hasta que la preparación viró a color azul; 8) teñido con eosina alcohólica de 30 a 60 segundos; 9) sumergido en alcohol de 96º durante 10 segundos; 10) lavado en alcohol absoluto por aproximadamente 10 segundos; 11) secado al aire. La muestra fue observada al microscopio a 40X y evaluada.

Extracción de útero. Después del tratamiento, el animal fue sacrificado por dislocación cervical, y se realizó una incisión longitudinal en el abdomen para la disección de los cuernos uterinos. El útero fue colocado en una caja Petri con solución salina para eliminar la grasa. Posteriormente el órgano fue secado con un papel absorbente y la ayuda de una espátula eliminando el líquido intraluminal. El útero húmedo fue pesado en una caja Petri. El peso del útero se calculó por la resta de la caja Petri con y sin útero.

4. RESULTADOS

4.1 Efectos estrogénicos *in vitro*

En la figura 11 se muestran los efectos inducidos por diferentes concentraciones de E₂, esculetina y dafnetina, sobre la proliferación celular de las células MCF-7.

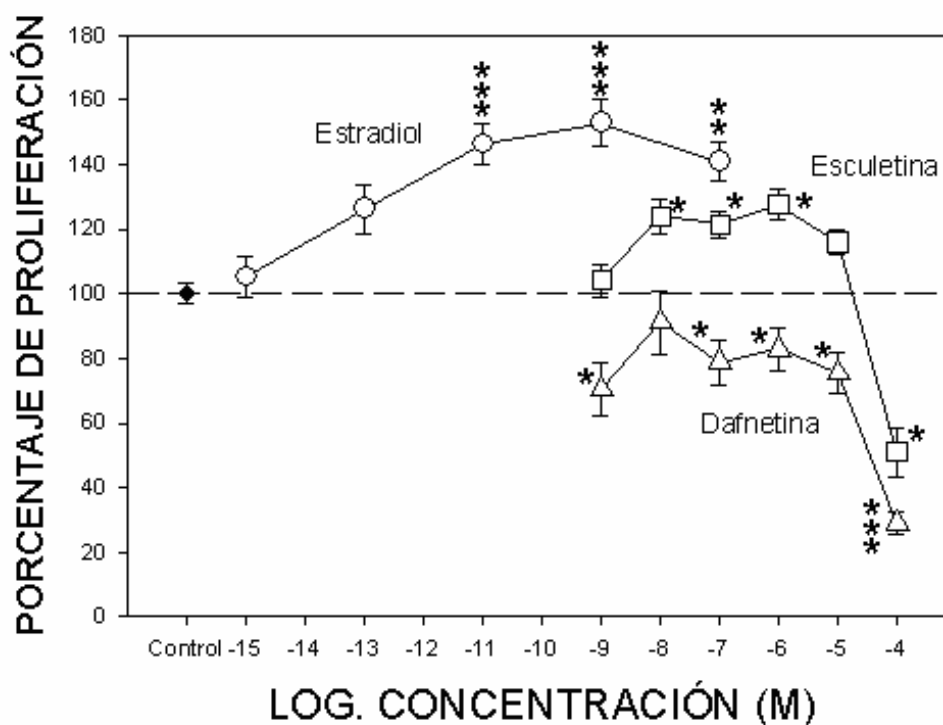


Figura 11. Efectos proliferativos de E₂, esculetina y dafnetina en la línea celular de adenocarcinoma mamario humano MCF-7. Cada punto representa el valor promedio y el error estándar de tres ensayos independientes (n=18). Significado estadístico con respecto al control, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

El E₂ produjo incrementos de la proliferación celular dependientes de la concentración. Las diferencias entre los valores obtenidos del control y las células tratadas con E₂ sólo fueron significativas a las concentraciones de 10⁻¹¹, 10⁻⁹ y 10⁻⁷ M. La mayor respuesta producida por E₂ se alcanzó a la concentración de 10⁻⁹ M,

con un incremento de la proliferación del 50 % ($p < 0.001$); con la concentración de 10^{-7} , el incremento fue menor (40 %) pero también fue significativo ($p < 0.01$).

La esculetina produjo un efecto proliferativo semejante al del E_2 pero de menor magnitud, entre las concentraciones de 10^{-8} a 10^{-6} M, con incrementos en los porcentajes de respuesta del 20 al 25 %. A concentraciones mayores, 10^{-4} M, este compuesto inhibió la proliferación celular en un 50 % ($p < 0.05$).

La dafnetina, inhibió la proliferación de células MCF-7 a todas las concentraciones, aunque a la concentración de 10^{-8} M, no tuvo significado estadístico. La mayor magnitud de esta respuesta antiproliferativa se produjo a la mayor concentración (10^{-4} M), con un significado estadística de $p < 0.001$.

4.2 Antagonismo con tamoxifeno

4.2.1 Estradiol

En la figura 12 se observa que, la respuesta proliferativa de las células MCF-7 inducida por E₂, fue antagonizada por tamoxifeno en forma dependiente de la concentración. Lo cual se observa con el desplazamiento de las curvas a las diferentes concentraciones de tamoxifeno.

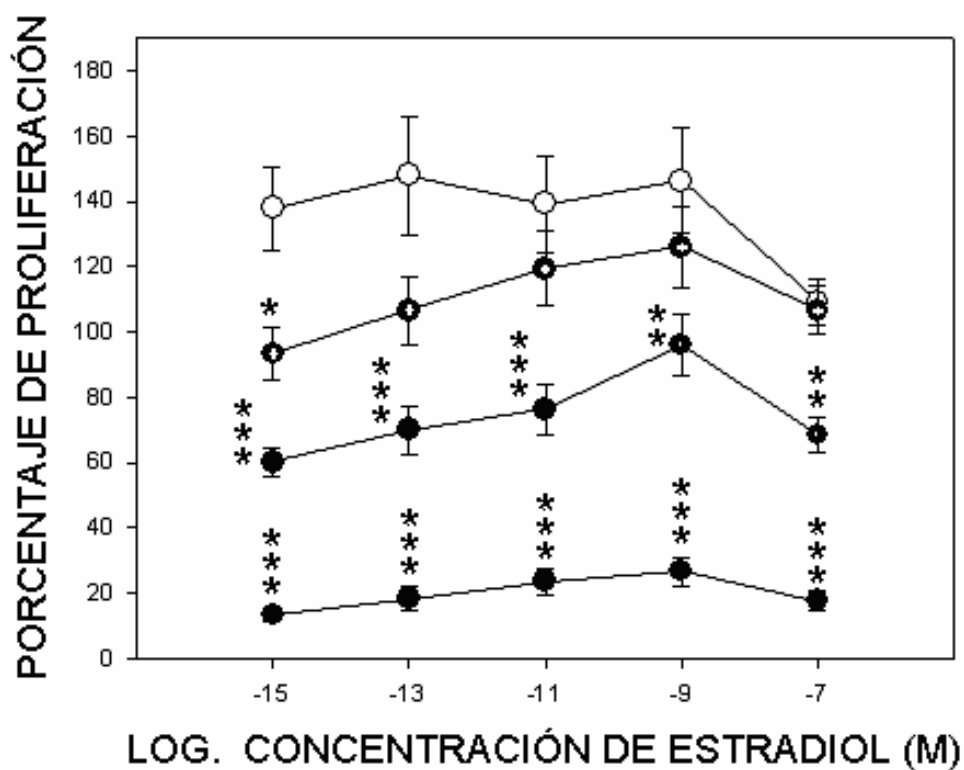


Figura 12. Antagonismo de tamoxifeno sobre la respuesta proliferativa inducida por E₂ en células de adenocarcinoma mamario humano MCF-7. Cada punto representa el valor promedio y el error estándar de tres ensayos independientes (n=18). Significado estadístico con respecto al control, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

○ Estradiol ◐ Estradiol + tamoxifeno 10⁻⁷ M ● Estradiol + tamoxifeno 10⁻⁶ M ◑ Estradiol + tamoxifeno 10⁻⁵ M

Aunque la concentración más baja de tamoxifeno (10⁻⁷ M) disminuyó la respuesta del E₂, solo en la concentración 10⁻¹⁵ M de estradiol se observó significado

estadístico ($p < 0.05$). La mayor inhibición de la respuesta de E_2 por tamoxifeno, se produjo a la concentración más alta de éste, 10^{-5} M, con un elevado significado estadístico ($p < 0.001$).

4.2.2 Esculetina

En la figura 13 se observan los resultados de antagonismo del tamoxifeno sobre esculetina, que de igual manera se observan como desplazamientos de las curvas a diferentes concentraciones de tamoxifeno.

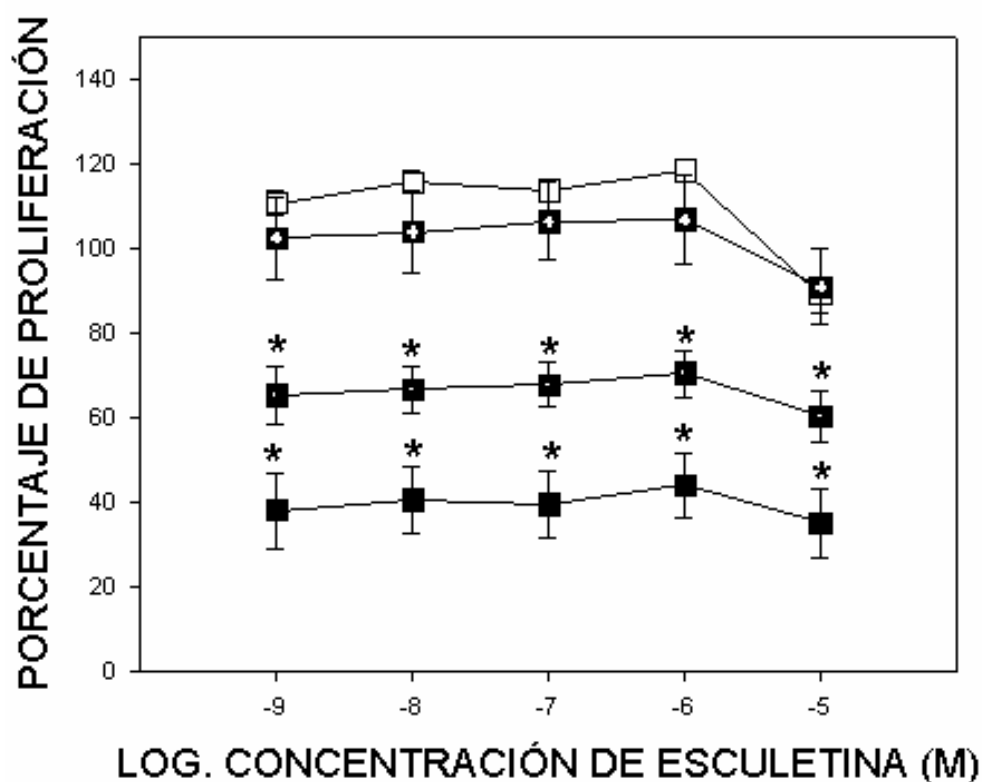


Figura 13. Antagonismo de tamoxifeno sobre la respuesta proliferativa inducida por esculetina en células de adenocarcinoma mamario humano MCF-7. Cada punto representa el valor promedio y el error estándar de tres ensayos independientes ($n=18$). Significado estadístico con respecto al control, * $p < 0.05$.

□ Esculetina ◻ Esculetina + tamoxifeno 10^{-7} M ◼ Esculetina + tamoxifeno 10^{-6} M ■ Esculetina + tamoxifeno 10^{-5} M

La respuesta de la esculetina, también fue antagonizada significativamente por el tamoxifeno a las concentraciones de 10^{-6} y 10^{-5} M. La inhibición de la respuesta fue de aproximadamente 40 y 60 % respectivamente ($p < 0.05$).

4.2.3 Dafnetina

En la figura 14 se observa la respuesta del antagonismo de tamoxifeno sobre dafnetina en las células MCF-7.

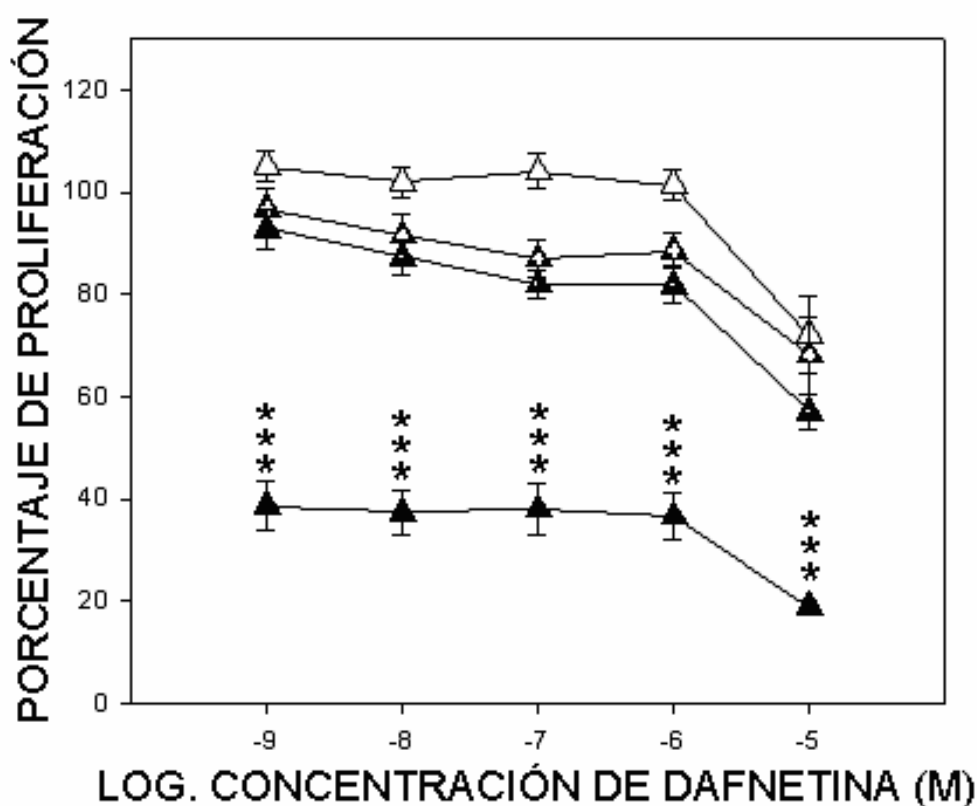


Figura 14. Antagonismo de tamoxifeno sobre la respuesta proliferativa inducida por dafnetina en células de adenocarcinoma mamario humano MCF-7. Cada punto representa el valor promedio y el error estándar de tres ensayos independientes (n=18). Significado estadístico con respecto al control, *** $p < 0.01$.

△ Dafnetina ▴ Dafnetina + tamoxifeno 10^{-7} M ▣ Dafnetina + tamoxifeno 10^{-6} M ▴ Dafnetina + tamoxifeno 10^{-5} M

Las concentraciones de 10^{-7} y 10^{-6} M de tamoxifeno produjeron un modesto efecto inhibitorio de la proliferación celular con respecto a las células expuestas sólo a dafnetina. Sólo la concentración más alta de tamoxifeno (10^{-5} M) inhibió

significativamente la proliferación de todas las concentraciones de dafnetina, observándose una mayor inhibición a la concentración de 10^{-4} M, con un 40 % ($p < 0.001$).

4.3 Efectos estrogénicos *in vivo*

En la tabla 4 se muestran los datos y resultados del efecto uterotrópico *in vivo*. El cálculo del efecto y la potencia se realizaron de acuerdo a las fórmulas descritas por Lemini y colaboradores (2004).

Tabla 4. Resultados *in vivo* de la evaluación estrogénica de esculetina y dafnetina.

Grupo	Dosis (mg/kg)	Dosis (μ mol/Kg)	N	Peso corporal (g \pm ESM)	Peso uterino (mg \pm ESM)	Peso uterino (mg/100 g \pm ESM)	Δ %	RUEE ₂	RUPE ₂
Aceite	5mL		95	14.3 \pm 0.3	16.0 \pm 0.7	118.2 \pm 25.4	-	-	-
Estradiol	10 μ g	0.037	95	14.9 \pm 0.5	53.4 \pm 1.5	368.1 \pm 21.2	234.30	100	100
Esculetina	17.5 mg	98	18	15.3 \pm 0.5	14.3 \pm 1.7	200.6 \pm 25.6	-10.40	-4.439	-0.850
	35 mg	197	18	14.5 \pm 0.5	12.9 \pm 1.2	90.0 \pm 24.7	-19.17	-8.183	-0.230
	70 mg	393	18	14.5 \pm 0.5	36.1 \pm 3.3	261.4 \pm 30.6	126.19	53.859	0.017
	140 mg	787	18	15.5 \pm 0.4	11.9 \pm 0.8	79.8 \pm 6.3	-25.44	-10.857	-0.043
Dafnetina	70 mg	393	18	13.9 \pm 0.6	14.0 \pm 0.7	103.9 \pm 6.3	-12.28	-5.241	-0.180
	140 mg	787	18	13.9 \pm 0.7	9.9 \pm 0.8	73.9 \pm 6.1	-37.97	-16.206	-0.029

Para cada dosis se presentan los pesos corporales y los pesos uterinos, además de los siguientes cálculos: el peso uterino por 100 g de peso corporal, la diferencia porcentual con respecto al grupo control ($\Delta\%$), el efecto uterotrópico relativo del E₂ (RUEE₂) y la potencia uterotrópica relativa de E₂ (RUPE₂). El cálculo de $\Delta\%$ se realizó con la siguiente fórmula; $\Delta\% = [U_w(100)/U_wV]-100$, donde, U_w es el peso uterino húmedo de cada tratamiento y U_wV es el peso uterino húmedo del grupo control. Para RUEE₂, la fórmula fue: $RUEE_2 = [U_wCum - U_wV] \times 100 / (U_wE_2 - U_wV)$, donde U_wCum es el peso uterino húmedo del grupo tratado con cumarina, U_wV ya fue definido y U_wE₂ es el peso uterino húmedo del grupo tratado con E₂. En el caso de RUPE₂ el cálculo se realizó con la siguiente fórmula: $RUPE_2 = DE_2 (U_wE_2 - U_wV) \times 100 / DCum (U_wCum - U_wV)$, donde DE₂ es la dosis administrada de E₂ expresada en μ mol/kg, DCum es la dosis administrada de cumarina expresada en μ mol/kg, y los otros valores ya han sido definidos.

En la figura 15 se observa que solo la esculetina a la concentración de 70 mg/kg de peso corporal y el control positivo (E₂) tuvieron un efecto estrogénico significativo *in vivo* comparados con el control que sólo recibió el vehículo. A la concentración de 140 mg/kg de peso corporal, tanto la esculetina y dafnetina disminuyeron el peso uterino en 26 y 40 % respectivamente al comparar con el control.

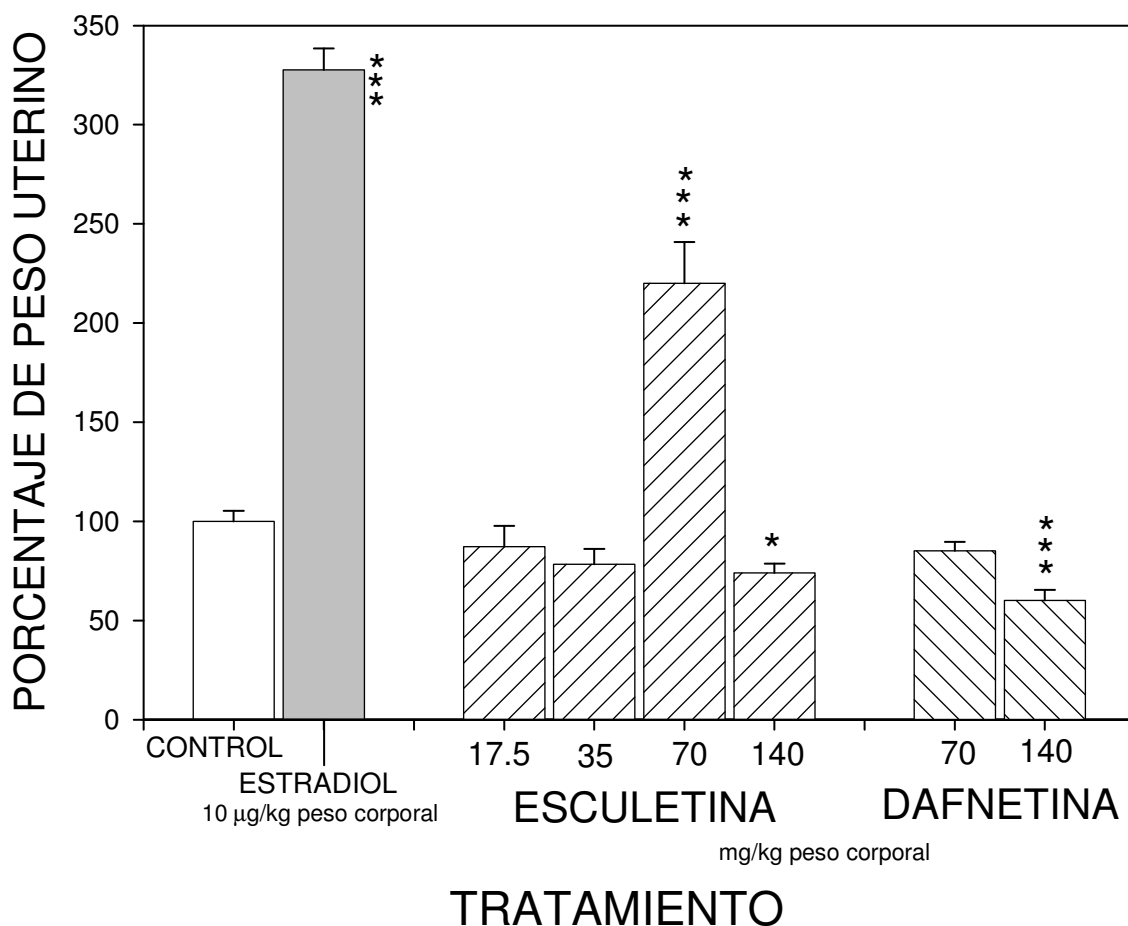


Figura 15. Gráfica de resultados de estudios *in vivo*. Cada barra del control y de estradiol representa el valor promedio y el error estándar de 95 datos. Para los tratamientos, cada barra representa tres ensayos independientes (n=18). Diferencias estadísticas con respecto al control, ***p<0.001, *p<0.05.

5. DISCUSIÓN

En los resultados obtenidos en este trabajo observamos que, aunque la esculetina y la dafnetina tienen semejanzas estructurales importantes, los efectos que produjeron sobre la proliferación celular presentan diferencias claras. En la línea celular MCF-7, la esculetina, produjo efectos bifásicos dependientes de la concentración. En contraste con la dafnetina, que sólo produjo efectos antiproliferativos.

En las células MCF-7, a bajas concentraciones de esculetina (de 10^{-8} a 10^{-6} M) la proliferación celular se incrementó significativamente. Dicho efecto fue antagonizado por concentraciones 10^{-6} y 10^{-5} M de tamoxifeno, lo que concuerda con la hipótesis planteada. Los resultados *in vitro* fueron confirmados por ensayos de estrogenicidad *in vivo*, donde se observó efecto uterotrópico a la dosis de 70 mg/kg de peso corporal.

Kirkiacharian *et.al.*, (1999) estudiaron la acción antiproliferativa de derivados cumarínicos e isoflavonas en células MCF-7 con una concentración de 10^{-6} M y no observaron diferencias con respecto al control. En este estudio también se evaluó la afinidad de los compuestos por RE. Observaron que, la adición de un grupo hidroxilo en la posición 7 del anillo bencénico de la 3-arilcumarina, fue la única modificación que incrementó la afinidad de unión a este receptor. Los resultados antiproliferativos son consistentes con nuestras observaciones realizadas con esculetina y los ensayos de unión a ligando apoyan nuestra hipótesis de trabajo.

Aunque la estructura de la esculetina no está dentro de la clasificación de fitoestrógenos, es obtenida de plantas y presenta actividad estrogénica tanto *in vitro* como *in vivo*.

Los efectos estrogénicos de la esculetina que observamos en este estudio son consistentes con reportes previos sobre la actividad biológica de la genisteína (Wang y Kurzer, 1998; Hsieh *et.al.*, 1998). En estos trabajos se observa que la genisteína estimula el crecimiento de células MCF-7 en rangos de concentración entre 10^{-8} M y 10^{-6} M e inhibe el crecimiento a concentraciones por arriba de 10^{-5} M. El efecto estrogénico de la genisteína también es antagonizado por tamoxifeno, lo que ha sido demostrado con ensayos de unión de RE a ligando. Esto indica que el aumento de la proliferación celular por genisteína es mediado por RE (Zava *et.al.*, 1997; Schwartz *et.al.*, 1998)

Se ha reportado que los compuestos estrogénicos presentan efectos bifásicos que dependen de la concentración que se utiliza (Calabrese, 2001, Limer y Speirs, 2004; Magee y Rowland, 2004; Harris *et.al.*, 2005; Takeshi, 2006). Los compuestos que presentan este patrón de respuesta son menos seguros para el tratamiento de cáncer asociado a estrógenos.

Los efectos antiproliferativos de la esculetina que se observaron a la mayor concentración (10^{-4}) son consistentes con reportes previos (Kawaii *et.al.*, 2001; Chu *et.al.*, 2001; Kawase *et.al.*, 2003). Aunque en líneas celulares de leucemia, la actividad de la esculetina se observa desde las 24 horas, en líneas tumorales derivadas de epitelios, se requieren altas concentraciones y exposiciones prolongadas para observar la inhibición de la proliferación (Finn *et.al.*, 2001; Hoffmanova *et.al.*, 2002).

En contraste con la esculetina, la dafnetina tiene mayor potencia que la esculetina e inhibe la proliferación de diversas líneas de tumores epiteliales desde las 48 horas de exposición (Finn *et.al.*, 2002, 2004; García, 2003). Además, la dafnetina solo produjo efectos inhibitorios que concuerdan con la disminución de la expresión de ciclina D1 observada previamente en este laboratorio (Larios, 2006). En el presente estudio, se observó que el antagonismo de tamoxifeno a la concentración de 10^{-5} M se incrementó al adicionar la misma concentración de

dafnetina. Esto podría deberse a que la dafnetina inhibe señales inducidas desde la membrana como la actividad de PKA, PKC y otras. La interacción entre el tamoxifeno y la dafnetina también podría ser el resultado de acciones sinérgicas directas sobre el RE. Sin embargo se requieren otro tipo de ensayos para esclarecer dicho mecanismo de esta acción.

Nuestros resultados indican que la dafnetina podría ser un agente mas seguro en el tratamiento del cáncer mamario. Además, este compuesto es un agente inductor de diferenciación celular a través de la activación de la cinasa (Finn *et.al.*, 2004).

El tratamiento de tumores malignos a través de la inducción de diferenciación celular ha sido un concepto atractivo (Leszczyniecka *et.al.*, 2001). Aunque esta terapia ha tenido un desarrollo en la clínica para el tratamiento de algunas leucemias, en el tratamiento de tumores sólidos ha sido poco exitosa. Algunos agentes inductores de diferenciación celular administrados a pacientes con tumores sólidos han tenido poca eficacia comparada a la obtenida con los agentes antineoplásicos convencionales (Kawamata *et. al.*, 2006). Sin embargo, los agentes inductores de diferenciación podrían potenciar el efecto de agentes quimioterapéuticos convencionales o de la terapia de radiación.

Por último, durante la estandarización de la metodología *in vitro*, se observaron bajos porcentajes de respuesta con el método de sulforodamina B (datos no mostrados), que tradicionalmente se ha empleado para determinar la estrogenicidad de diversos xenoestrógenos (Gierthy, 1997). Con el microensayo de MTT, se obtuvieron respuesta de proliferación entre 20 y 60 % con respecto a las células control, por lo que el trabajo se realizó con este último método.

6. CONCLUSIONES

Las bajas concentraciones probadas en este trabajo, son más cercanas a las concentraciones fisiológicas que se pueden alcanzar en el plasma y que tienen efecto sobre los organismos vivos. En estas condiciones, los efectos de esculetina y dafnetina sobre las células MCF-7 permiten una mejor comprensión del comportamiento de estos compuestos.

Pese a su similitud estructural, la esculetina y la dafnetina tienen efectos diferentes sobre la proliferación de la línea celular MCF-7.

En células MCF-7, la esculetina tuvo efectos proliferativos similares al E₂, pero de menor potencia, implicando un posible efecto estrogénico que fue corroborado *in vivo*. Los efectos bifásicos de la esculetina son comunes en la mayoría de los fitoestrógenos, por lo que éste compuesto podría ser empleado como alternativa en la terapia de reemplazo hormonal.

Por el contrario, la dafnetina solo tiene efectos antiproliferativos que podrían ser el resultado de las acciones iniciadas en la membrana y por interacciones directas sobre el ER.

La mayor actividad antiproliferativa de la dafnetina, indican que este compuesto podría ser un agente adyuvante más seguro que la esculetina para incrementar la eficacia de los tratamientos antineoplásicos del cáncer de mama.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS DE ESTE TRABAJO

En el laboratorio de farmacología celular se han evaluado el efecto *in vitro* de las asociaciones de dafnetina con otros agentes antineoplásicos convencionales (cisplatino, etopósido y paclitaxel). Sin embargo, de los resultados del presente estudio se observa la importancia de realizar investigaciones sobre la asociación entre dafnetina y agentes antiestrogénicos.

También es importante evaluar la actividad antitumoral *in vivo* de la dafnetina, así como la de sus potenciales asociaciones con otros agentes antineoplásicos convencionales.

Ya que la estructura de las cumarinas no está dentro de la clasificación de fitoestrógenos, es necesario realizar estudios más detallados sobre estructura-actividad para establecer o no su inclusión dentro de dicho grupo.

8. REFERENCIAS

- Adlercreutz H, Hockerstedt K, Bannwart C, Bloigu S, Hamalainen E, Fotsis T, Ollus A. Effect of dietary components, including lignans and phytoestrogens, on enterohepatic circulation and liver metabolism of estrogens and on sex hormone binding globulin (SHBG). *J Steroid Biochem.* 27(4-6):1135-44, 1987.
- Adlercreutz H, Bannwart C, Wahala K, Makela T, Brunow G, Hase T, Arosemena PJ, Kellis JT Jr, Vickery LE. Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 44(2):147-53, 1993.
- Adlercreutz H. Phytoestrogens and breast cancer. *Lancet Oncol.* 3(6):364-73, 2002.
- Akiyama SO Tetsu, Ishida ST Junko, Nakagawa S Suguru, Ogawara ISI Hiroshi, Watanabe h un-ichi, Itoh Noriki , Shibuya SS Masabumi, y Fukami Yasuo. Genistein, a Specific Inhibitor of Tyrosine-specific Protein Kinases. *J Biol Chem.* 262 (12): 5592-95, 1987.
- Allan Alison L, Albanese Chris, Pestell Richard G y LaMarre Jonathan. Activating Transcription Factor 3 Induces DNA Synthesis and Expression of Cyclin D1 in Hepatocytes. *J Biol Chem.* 276 (29): 27272–80, 2001.
- Amanatullah DF, Zafonte BT, Albanese C, Fu M, Messiers C, Hassell J, Pestell RG. Ras regulation of cyclin D1 promoter. *Methods Enzymol.* 333:116-27, 2001.
- Balduyck M, Zerimech F, Gouyer V, Lemaire R, Hemon B, Grard G, Thiebaut C, Lemaire V, Dacquembronne E, Duhem T, Lebrun A, Dejonghe MJ, Huet G. Specific expression of matrix metalloproteinases 1, 3, 9 and 13 associated with invasiveness of breast cancer cells *in vitro*. *Clin Exp Metastasis.* 18(2):171-8, 2000.
- Bevan C, Parker M. Review: The Role of Coactivators in Steroid Hormone Action. *Exp Cell Res.* 253: 349–56, 1999.
- Björnström L, Sjöberg M. Mutations in the Estrogen Receptor DNA-binding Domain Discriminate between the Classical Mechanism of Action and Cross-talk with Stat5b and Activating Protein 1 (AP-1). *J Biol Chem.* 277 (50): 48479–83, 2002.
- Bortner DM y Rosenberg MP. Induction of Mammary Gland Hyperplasia and Carcinomas in Transgenic Mice Expressing Human Cyclin E. *Molecular and cellular biology.* 17 (1): 453–59, 1997.
- Brooks S, Locke E, Soule H. Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. *J Biol Chem.* 248 (17): 6251-53, 1973.
- Brandenbergen AW, Tee MK, Lee JY, Chao V, Jaffe RB. Tissue distribution of estrogen receptors alpha (ER- α) and beta (ER- β) mRNA in the midgestational human fetus. *J Clin Endocrinol Metab.* 82 (10): 3509 – 12, 1997.
- Burns J, Yokota T, Ashihara H, Lean ME, Crozier A. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J Agric Food Chem.* 50(11): 3337 - 40, 2002.
- van der Burg B, van Selm-Miltenburg AJ, de Laat SW, van Zoelen EJ. Direct effects of estrogen on c-fos and c-myc protooncogene expression and cellular proliferation in human breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol.* 64(2):223 - 8, 1990.

- Calabrese E. Estrogen and related compounds: Biphasic dose responses. *Crit Rev Toxicol.* 31 (4 & 5): 503 – 515, 2001.
- Cox D, O'Kennedy R, Thornes D. The rarity of liver toxicity in patients treated with coumarin (1,2-benzopyrone). *Human Toxicol.* 8: 501- 6. 1989.
- Chang WS, Chiang HC. Structure – activity relationship of coumarins in xanthine oxidase inhibition. *Anticancer Res.* 15 (5B): 1969-73, 1995.
- Chang WS, Lin CC, Chuang SC, Chiang HC. Superoxide anion scavenging effect of coumarins. *Am J Chin Med.* 24(1): 11 - 7, 1996.
- Chu CY, Tsai YY, Wang CJ, Lin WL, Tseng TH. Induction of apoptosis by esculetin in human leukemia cells. *Eur J Pharmacol.* 416(1-2): 25-32, 2001.
- Dai Q, Shu XO, Jin F, Potter JD, Kushi LH, Teas J, Gao YT, Zheng W. Population-based case-control study of soyfood intake and breast cancer risk in Shanghai. *Br J Cancer.* 85(3):372-8, 2001.
- De Rosa S, Mitova M, Handjieva N, Calis I. Coumarin glucosides from *Cruciata taurina*. *Phytochemistry.* 59 (4) : 447-50, 2002.
- Dexeus FH, Logothetis CJ, Sella A, Fitz K, Amato R, Reuben JM, Dozier N. Phase II Study of coumarin and cimetidine in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 8 (2): 325 – 29, 1990.
- van Dijk MA, Floore AN, Kloppenborg KI, van't Veer LJ. A functional assay in yeas for the human estrogen receptor displays wild-type and variant estrogen receptor messenger RNAs present in breast carcinoma. *Cancer Res.* 57: 3478 - 85, 1997.
- Egan D, O'Kenney PM, Wang M, Trushin N. The pharmacology, metabolism, analysis and applications of coumarin and coumarin-related compounds. *Drug Metab Rev.* 22: 503 - 29,1990.
- El-Sayed NH, Awaad AS, Mabry TJ. Phytochemical studies and effect on urine volume of *Glossostemon bruguieri* Desf. Constituents. *Indian J Exp Biol.* 42 (2) : 186 – 9, 2004.
- Finn GJ, Creaven B, Egan DA. Study of the *in vitro* cytotoxic potential of natural and synthetic coumarin derivatives using human normal and neoplastic skin cell lines. *Melanoma Res.* 11(5): 461-7, 2001.
- Finn GJ, Kenealy E, Creaven B, Egan DA. *In vitro* cytotoxic potential and mechanism of action of selected coumarins, using human renal cell lines. *Cancer Lett.* 183: 61 – 8, 2002.
- Finn GJ, Creaven B, Egan DA. Daphnetin induced differentiation of human renal carcinoma cells and its mediation by p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem Pharmacol.* 67: 1779 - 88. 2004.
- Foster JS, Henley DC, Ahamed S, Wimalasena J. Estrogens and cell-cycle regulation in breast cancer. *Trends Endocrinol Metab.* 12 (7): 320 – 7, 2001.
- Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, Hase T, Montesano R, Schweigerer L. Genistein, a Dietary Ingested Isoflavonoid, Inhibits Cell Proliferation and *In Vitro* Angiogenesis. *J Nutr.* 790S – 7S, 1995.
- Franke AA, Custer LJ, Tanaka Y. Isoflavones in human breast milk and other biological fluids. *AM J Clin Nutr. Suppl:* 1466S - 73S, 1998.

Fylaktakidou KC, Hadjipavlou-Litina DJ, Litinas KE, Nicolaidis DN. Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/ antioxidant activities. *Curr Pharm Des.* 10(30): 3813 - 33, 2004.

García SA. Relación estructura actividad citotóxica y citostática de derivados cumarínicos en cuatro líneas tumorales humanas. Facultad de Química UNAM. 63 páginas (tesis de licenciatura). 2003.

Gierthy JF, Arcaro KF, Floyd M. Assessment of PCB estrogenicity in human breast cancer cell line. *Chemosphere.* 34 (5-7): 1495-505, 1997.

Gilani AH, Janbaz KH, Shah BH. Esculetin prevents liver damage induced by paracetamol and CCL4. *Pharmacol Res.* 37(1): 31-5, 1998.

Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* 14: 121 - 41, 2000.

Gu X , Cai J, Zhu X, Su Q. Dynamic ultrasound-assisted extraction of polyphenols in tobacco. *J Sep Sci.* 28(18):2477-81, 2005.

Hall JM, McDonnell DP. The Estrogen Receptor β -Isoform (ER β) of the Human Estrogen Receptor Modulates ER α Transcriptional Activity and Is a Key Regulator of the Cellular Response to Estrogens and Antiestrogens. *Endocrinology.* 140 (12): 5566 – 78, 1999.

Harris DM, Besselink E, Henning SM, Go VLW, Heber D. Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta-Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells. 2005.

ten Heggeler-Bordier B, Hipskind R, Seiler-Tuyns A, Martinez E, Corthesy B, Wahli W. Electron microscopic visualization of protein-DNA interactions at the estrogen responsive element and in the first intron of the *Xenopus laevis* vitellogenin gene. *EMBO J.* 6 (6): 1715-20, 1987.

Hirohata T, Shigematsu T, Nomura AM, Nomura Y, Horie A, Hirohata I. Occurrence of breast cancer in relation to diet and reproductive history: a case-control study in Fukuoka, Japan. *Natl Cancer Inst Monogr.* 69:187 - 90, 1985.

Hirose K, Tajima K, Hamajima N, Inoue M, Takezaki T, Kuroishi T, Yoshida M, Tokudome S. A large-scale, hospital-based case-control study of risk factors of breast cancer according to menopausal status. *Jpn J Cancer Res.* 86(2): 146-54, 1995.

Hofmanova J, Soucek K, Pachernik M, Kovarikova M, Hoferova Z, Minksova K, Netikova J, Kozubik A. Lipoxigenase inhibitors induce arrest of tumor cells in S-phase of the cell cycle. *Neoplasma.* 49(6): 362-7, 2002.

Horn-Ross PL, John EM, Lee M, Stewart SL, Koo J, Sakoda LC, Shiao AC, Goldstein J, Davis P, Perez-Stable EL. Phytoestrogen consumption and breast cancer risk in a multiethnic population. *Am J Epidemiol.* 154: 434-41, 2001.

Hsieh Ching-Yi, Santoli Ross C, Haslam Sandra Z, Helferich William G. Estrogenic Effects of Genistein on the Growth of Estrogen Receptor-positive Human Breast Cancer (MCF-7) Cells *in Vitro* and *in Vivo*. *Cancer Res.* 58: 3833-38, 1998.

Hu J, Zhu Q, Bai S, Jia Z. New Eudesmane Sesquiterpene and Other Constituents from *Artemisia mongolica*. *Planta Med.* 62(5): 477-8, 1996.

Huguet EL, McMahon JA, McMahon AP, Bicknell R, Harris AL. Differential expression of human Wnt genes 2, 3, 4, and 7B in human breast cell lines and normal and disease states of human breast tissue. *Cancer Res.* 15;54(10):2615-21, 1994.

van Iersel ML, Henderson CJ, Walters DG, Price RJ, Wolf CR, Lake BG. Metabolism of [3-14C] coumarin by human liver microsomes. *Xenobiotica*. 24(8): 795 - 803, 1994.

Jiménez-Orozco FA. Cytostatic activity of coumarin metabolites and derivatives in the B16 F10 murine melanoma cell line. *Melanoma Res*. 9: 243 - 47, 1999.

Jiménez-Orozco FA, López JS, Molina J, Velasco MA, Mendoza N, Mandoki JJ. Decrease of cyclin D1 in the human lung adenocarcinoma cell line A-427 by 7-hydroxycoumarin. *Lung Cancer*. 34: 185-94, 2001.

Katzellenbogen JA y Muthyala R. Topic 1.12: Interactions of exogenous endocrine active substances with nuclear receptors. *Pure Appl. Chem*. 11–12: 1797–817, 2003.

Kawaii S, Tomono Y, Ogada K. The antiproliferative effect of coumarins on several cancer cell lines. *Anticancer Res*. 21:917-24. 2001.

Kawase M, Sakagami H, Hashimoto K, Tani S, Hauer H, Chatterjee SS. Structure-cytotoxic activity relationships of simple hydroxylated coumarins. *Anticancer Res*. 23(4): 3243-6. 2003.

Key TJ, Chen J, Wang DY, Pike MC, Boreham. Sex hormones in women in rural China and in Britain. *J. Br J Cancer*. 62(4): 631-6, 1990.

Key TJ, Sharp GB, Appleby PN, Beral V, Goodman MT, Soda M, Mabuchi K. Soya foods and breast cancer risk: a prospective study in Hiroshima and Nagasaki, Japan. *Br J Cancer*, 81: 1248-56, 1999.

Kim HJ, Yu YG, Park H, Lee YS. HIV gp41 binding phenolic components from *Fraxinus sieboldiana* var. *angustata*. *Planta Med*. 68(11):1034-6, 2002.

Kim NM, Kim J, Chung HY, Choi JS. Isolation of luteolin 7-O-rutinoside and esculetin with potential antioxidant activity from the aerial parts of *Artemisia Montana*. *Arch Pharm Res*. 23(3):237-9, 2000.

Kirk CJ, Harris RM, Wood DM, Waring RH, Hughes PJ. Do dietary phytoestrogens influence susceptibility to hormone-dependent cancer by disrupting the metabolism of endogenous oestrogens? *Biochem Soc Trans*. 29(Pt 2):209-16, 2001.

Kirkiacharian S, Chidiack H, Philibert D, Van De Velde P, Bouchoux F. Binding affinity to steroid hormone receptors and antiproliferative action on MCF-7 cells of coumarin derivatives and isoflavonoids. *Ann Pharm Fr*. 57(4):332-9, 1999.

de Kleijn MJ, van der Schouw YT, Wilson PW, Adlercreutz H, Mazur W, Grobbee E, Jacques PF. Intake of dietary phytoestrogens is low in postmenopausal women in the United States: the Framingham study(1-4). *J Nutr*. 131(6): 1826 - 32, 2001.

Koike S, Sakai M, Muramatsu M. Molecular cloning and characterization of rat estrogen receptor cDNA. *Nucleic Acids Res*. 15(6): 2499-513, 1987.

Kolodziej H, Kayser O, Woerdenbag HJ, van Uden W, Pras N. Structure-cytotoxicity relationships of a series of natural and semi-synthetic simple coumarins as assessed in two human tumour cell lines. *Z Naturforsch [C]*. 52(3-4): 240-4, 1997.

Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(12): 5925-30, 1996.

Kurzer MD. Dietary supplements use in women: Current status and future direction. *J Nutr*. 133: 1983S – 6S, 2003.

Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, Scanlan TS, Shiau AK, Uht RM, Webb P. Estrogen receptor pathways to AP-1. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 74: 311 – 7, 2000.

Lake BG. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. *Food Chem Toxicol.* 37(4): 423-53, 1999.

Lamartiniere CA, Zhang Jun-Xuan, Cotroneo M S. Genistein studies in rats: potential for breast cancer prevention and reproductive and developmental toxicity. *Am J Clin Nutr.* 68(suppl): 1400S–5S, 1998.

Larios SV. Estudio de los efectos de dafnetina en ciclo celular de la línea celular de adenocarcinoma mamario humano MCF-7. Facultad de Química, UNAM. 47 páginas. (tesis de licenciatura) 2006.

Le Bail J-C, Champavier Y, Chulia A-J, Habrioux G. Effects of phytoestrogens on aromatase, 3β and 17β -hydroxysteroid dehydrogenase activities and human breast cancer cells. *Life Sci.* 66: 1281-91, 2000.

Lee HP, Gourley L, Duffy SW, Esteve J, Lee J, Day NE. Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore. *Lancet.* 337(8751): 1197-200, 1991.

Lemini C, Jiménez R, Ávila ME, Franco Y, Larrea F, Lemus AE. *In vivo* and *in vitro* estrogen bioactivities of alkyl parabens. *Toxicol Ind Health.* 17: 32 – 51, 2004.

Leszczyniecka M, Roberts P, Dent P, Grant S, Fisher PB. Differentiation therapy of human cancer: basic science and clinical applications. *Pharmacol Ther.* 90: 105 – 56, 2001.

Li C, Chen A, Chen X, Ma X, Chen X, Hu Z. Non-aqueous capillary electrophoresis for separation and simultaneous determination of fraxin, esculin and esculetin in Cortex fraxini and its medicinal preparations. *Biomed Chromatogr.* 19(9): 696 - 702, 2005.

Li Y, Upadhyay S, Bhuiyan M, Sarkar FH. Induction of apoptosis in breast cancer cells MDA-MB-231 by genisteína. *Oncogene.* 18: 3166 – 72. 1999.

Limer JL, Speirs V. Phyto-oestrogens and breast cancer chemoprevention. *Breast Cancer Res.* 6: 119-127, 2004.

Liu J, Tian J, Li Y, Yao X, Hu Z, Chen X. Binding of the bioactive component daphnetin to human serum albumin demonstrated using tryptophan fluorescence quenching. *Macromol Biosci.* 4(5): 520–5, 2004.

Liu Meng-Min, Albanese C, Anderson CM, Hilty K, Webb P, Uht RM, Price RH Jr, Pestell RG, Kushner PJ. Opposing Action of Estrogen Receptors α and β on Cyclin D1 Gene Expression. *J Biol Chem.* 277 (27): 24353–60, 2002.

Loose DS y Stancel GM. Estrogens and progestins. En *The pharmacological basis of therapeutics Goodman & Gilman*. Burton L, Lazo JS, Parker KL, McGraw Hill, New York. 11^a edición, 2006. pp 1541 – 71.

Magee PJ, Rowland IR. Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. *Br J Nutr.* 91: 513–31, 2004.

Markovits J, Linassier C, Fossé P, Couprie J, Pierre J, Jacquemin-Sablon A, Saucier JM, Le Pecq JB, Larsen AK. Inhibitory Effects of the Tyrosine Kinase Inhibitor Genistein on Mammalian DNA Topoisomerase II. *Cancer Res.* 49: 5111-7, 1989.

Marshall ME, Kervin K, Benefield C, Umerani A, Albainy-Jenei S, Zhao Q, and Khazaeli MB. Growth-inhibitory effects of coumarin (1,2- benzopyrone and 7-dihydroxycoumarin on human malignant cell lines *in vitro*. J Cancer Res Clin Oncol 120 (Suppl): S2-S10, 1994.

Martínez, CM, Post JA, Verkleij AJ, Verrips CT, Boonstra J. The effect of hydrogen peroxide on the cyclin D expression in fibroblasts. Cell. Mol. Life Sci. 58: 990–6, 2001.

Masamoto Y, Ando H, Murata Y, Shimoishi Y, Tada M, Takahata K. Mushroom tyrosinase inhibitory activity of esculletin isolated from seeds of *Euphorbia lathyris* L. Biosci Biotechnol Biochem. 67(3): 631-4, 2003.

Matsunaga K, Yoshimi N, Yamada Y, Shimizu M, Kawabata K, Ozawa y, Hara A, Mori H. Inhibitory effects of nabumetone, a cyclooxygenase – 2 inhibitor, and esculletin, a lipoxygenase inhibitor, on N-methyl-N-nitrosourea – induced mamary carcinogenesis in rats. Jpn J Cancer Res, 89 (5): 496-501, 1998.

McDonnell D. The machanism of action of steroid hormone receptors. En Principles of molecular regulation. Conn PM, Means AR. Humana Press, New Jersey. 2000. pp 351 – 61.

Meagher LP, Beecher GR, Flanagan VP, Li BW. Isolation and characterization of the lignans, isolariciresinol and pinoresinol, in flaxseed meal. J Agric Food Chem. 47(8): 3173-80, 1999.

Michalides R, Hageman P, van Tinteren H, Houben L, Wientjens E, Klompmaker R, Peterse J. Aclinicopathological study on overexpression of cyclin D1 and of p53 ina series of 248 patients with operable breast cancer. Br J Cancer. 73(6): 728-34, 1996.

Miksicek RJ. Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity. Proc Soc Exp Biol Med. 208(1): 44-50, 1995.

Monti E, Sinha BK. Antiproliferative effect of genistein and adriamycin against estrogen-dependent and -independent human breast carcinoma cell lines. Anticancer Res. 14(3A): 1221 - 6, 1994.

Mousavi Y, Adlercreutz H. Enterolactone and estradiol inhibit each other's proliferative effect on MCF-7 breast cancer cells in culture. J Steroid Biochem Mol Biol. 41(3-8): 615 - 9, 1992.

Murray RDH, Méndez J, Brown AS. The Natural Coumarins: occurrence. Chemistry and biochemistry. John Wiley, Chichester. 1982.

Murrill WB, Brown NM, Zhang Jun-Xuan, Manzollilo PA, Barnes S, Lamartiniere CA. Prepubertal genistein exposure suppresses mammary cancer and enhances gland differentiation in rats. Carcinogenesis. 17 (7): 1451-1457, 1996.

Neichi T, Koshihara Y, Murota S. Inhibitory effect of esculletin in 5-lipoxygenase and leukotrieno biosíntesis. Biochin Biophys Acta. 753 (1): 130-2, 1983.

Nilsson S, Kela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson GR, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson J-A. Mechanisms of Estrogen Action. Physiol Rev. 81 (4): 1535 - 65, 2001.

Nomura A, Henderson BE, Lee J. Breast cancer and diet among the Japanese in Hawaii. Am J Clin Nutr. 31(11): 2020-5, 1978.

Okada Y, Miyauchi N, Suzuki K, Kobayashi T, Tsutsui C, Mayuzumi K, Nishibe S, Okuyama T. Search for naturally occurring substances to prevent the complications of diabetes. II. Inhibitory effect of coumarin and flavonoid derivatives on bovine lens aldose reductase and rabbit platelet aggregation. Chem Pharm Bull (Tokyo). 43(8):1385-7, 1995.

Opdyke DL. Monographs on fragrance raw materials. Food Cosmet Toxicol. 12: 807S–1016S, 1974.

Pagliacci MC, Smacchia M, Migliorati G, Grignani F, Riccardi C, Nicoletti I. Growth-inhibitory effects of the natural phyto-oestrogen genistein in MCF-7 human breast cancer cells. Eur J Cancer. 30A(11): 1675 - 82, 1994.

Pan SL, Huang YW, Guh JH, Chang YL, Peng CY, Teng CM. Esculetin inhibits Ras-mediated cell proliferation and attenuates vascular restenosis following angioplasty in rats. Biochem Pharmacol. 65(11): 1897 - 905, 2003.

Panossian AG. Inhibition of arachidonic acid 5-lipoxygenase of human polymorphonuclear leukocytes by esculetina. Biomed Biochim Acta. 43(12): 1351 - 5, 1984.

Paya M, Halliwell B, Hoult JR. Interactions of a serie of coumarins with reactive oxygen species. Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. Biochem Pharmacol. 44(2): 205 - 14, 1992.

Peterson G, Barnes S. Genistein inhibition of the growth of human breast cancer cells: independence from estrogen receptors and the multi-drug resistance gene. Biochem Biophys Res Commun. 179(1): 661 - 7, 1991.

Pettersson K, Gustafsson JA. Role of estrogen receptor Beta in estrogen action. Annu Rev Physiol. 63: 165–92, 2001.

Pettersson K, Delaunay F, Gustafsson JA. Estrogen receptor b acts as a dominant regulator of estrogen signaling. Oncogene. 19: 4970 – 8, 2000.

Polkowski K, Mazurek AP. Biological properties of genistein. A review of *in vitro* and *in vivo* data. Acta Pol Pharm. 57(2): 135 - 55, 2000.

Qui J, Bosch MA, Tobias SC, Grandy DK, Scanlan TS, Ronnekleiv OK, Kelly MJ. Rapid signaling of estrogen in hypothalamic neurons involves a novel G-protein-coupled estrogen receptor that activates protein kinase. C. J Neurosci 23: 9529 – 40, 2003.

Rao G, Sun H, Liu Q. Chemical constituents of *Aralia fargesii* Franch. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 21(8): 482-3, 510-1, 1996.

Reyes-Chilpa R, Estrada-Muniz E, Apan TR, Amekraz B, Aumelas A, Jankowski CK, Vazquez-Torres M. Cytotoxic effects of mammae type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. Life Sci. 75(13): 1635 - 47, 2004.

Rosenberg Z, Jenkins DJA, Diamandis EP. Steroid hormone activity of flavonoids and related compounds. Breast Cancer Res Treat. 62 (1). 2000.

Rosenfeld MG, Lunyak VV, Glass CK. Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. Genes Dev. 20: 1405 - 28, 2006.

Rowland IR, Wiseman H, Sanders TA, Adlercreutz H, Bowey EA. Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora. Nutr Cancer. 36(1): 27 - 32, 2000.

Rowland I, Faughnan M, Hoey L, Wahala K, Williamson G, Cassidy A. Bioavailability of phyto-oestrogens. Br J Nutr. 89 Suppl 1: S45 - 58 ,2003.

- Russell A, Thompson MA, Hendley J, Trute L, Armes J, Germain D. Cyclin C1 and D3 associate with the SCF complex and are coordinately elevated in breast cancer. *Oncogene*. 18: 1983 - 91, 1999.
- Sarg TM, Ateya AM, Farrag NM, Abbas FA. Constituents and biological activity of *Bidens pilosa* L. grown in Egypt. *Acta Pharm Hung*. 61(6): 317-23, 1991.
- Sathyamoorthy N, Wang TT. Differential effects of dietary phyto-oestrogens daidzein and equol on human breast cancer MCF-7 cells. *Eur J Cancer*. 33(14): 2384 - 9, 1997.
- Schimmer O and Eschelbach H. Constituents and biological activity of *Bidens pilosa* L. grown in Egypt *Pharmazie*. 52(6): 476 - 8, 1997.
- Schmitt E, Dekant W, Stopper H. Assaying the estrogenicity of phytoestrogens in cells of different estrogen sensitive tissues. *Toxicol In vitro*. 15(4-5):433-9, 2001.
- Schwartz JA, Liu G, Brooks SC. Genistein-mediated attenuation of tamoxifen-induced antagonism from estrogen receptor-regulated genes. *Biochem Biophys Res Commun*. 253(1): 38 – 43, 1998.
- Setchell KDR, Adlercreutz H. Mammalian lignans and phyto-oestrogens. Recent studies on their formation, metabolism and biological role in health an disease. En *Role of the Gut Flora in Toxicity and Cancer*. Academic Press, London. 1988. pp 315 – 45.
- Setchell KD, Zimmer-Nechemias L, Cai J, Heubi JE. Exposure of infants to phyto-oestrogens from soy-based infant formula. *Lancet*. 5;350(9070): 23 - 7, 1997.
- Sekiya K, Okuda H, Arichi S. Selective inhibition of platelet lipoyxygenase by esculetin. *Biochim Biophys Acta*. 713(1): 68 - 72, 1982.
- Sgagias MK, Kasid A, Danforth DN Jr. Interleukin – 1 alpha and tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) inhibit growth an induce TNF messenger RNA in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol Endocrinol*. 5(11): 1740 - 7, 1991.
- Shao ZM, Wu J, Shen ZZ, Barsky SH. Genistein Exerts Multiple Suppressive Effects on Human Breast Carcinoma Cells. *Cancer Res*. 58: 4851 - 7, 1998a.
- Shao ZM, Wu J, Shen ZZ, Barsky SH. Genistein inhibits both constitutive and EGF-stimulated invasion in ER-negative human breast carcinoma cell lines. *Anticancer Res*. 18(3A): 1435-9, 1998b.
- Shao ZM, Alpaugh ML, Fontana JA, Barsky SH. Genistein inhibits proliferation similarly in estrogen receptor-positive and negative human breast carcinoma cell lines characterized by P21WAF1/CIP1 induction, G2/M arrest, and apoptosis. *J Cell Biochem*. 69(1) : 44 – 54, 1998c.
- Shao W, Brown M. Advances in estrogen receptor biology: prospects for improvements in targeted breast cancer therapy. *Breast Cancer Res*. 6: 39 – 52, 2004.
- Shilling WH, Crampton RF, Longland RC. Metabolism of coumarin in man. *Nature*. 221(5181): 664-5, 1969.
- Shimizu H, Ross RK, Bernstein L, Yatani R, Henderson BE, Mack TM. Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *Br J Cancer*. 63(6): 963-6, 1991.

Shu XO, Jin F, Dai Q, Wen W, Potter JD, Kushi LH, Ruan Z, Gao Y-T, Zheng W. Soyfood intake during adolescence and subsequent risk of breast cancer among Chinese women. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*, 10: 483-488, 2001.

Song RX, McPherson RA, Adam L, Bao Y, Shupnik M, Kumar R, Santen RJ. Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ER α -Shc association and Shc pathway activation. *Mol Endocrinol* 16: 116-127, 2002.

Su XL, Lin RC, Wong SK, Tsui SK, Kwan SY. Identification and characterisation of the chinese herb Langdu by LC-MS/MS analysis. *Phytochem Anal*. 14(1):40-7, 2003.

Takeshi USUI. Pharmaceutical Prospects of Phytoestrogens. *Endocr J*. 53 (1): 7 – 20, 2006.

Tamir S, Eizenberg M, Somjen D, Stern N, Shelach R, Kaye A, Vaya J. Estrogenic and antiproliferative properties from licorice in human breast cancer cells. *Cancer Res*. 60: 5704 - 9, 2000.

Tham DM, Gardner CD, Haskell WL. Clinical Review 97: Potential Health Benefits of Dietary Phytoestrogens: A Review of the Clinical, Epidemiological, and Mechanistic Evidence. *J Clin Endocr Metab*. 83 (7): 2223 – 35, 1998.

Thornes RD, Daly L, Lynch G, Breslin B, Browne H, Browne HY, Corrigan T, Daly P, Gaffney E. Treatment with coumarin to prevent or delay recurrence of malignant melanoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 120 Suppl:S32-4, 1994.

Tora L, White J, Brou C, Tasset D, Webster N, Scheer E, Chambon P. The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell*. 59(3): 477 - 87, 1989.

Vasudevan N, Kow LM, Ptuff DW. Early membrane estrogenic effects required for full expression of slower genomic actions in a nerve cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98: 12267 – 71, 2001.

Vasudevan N, Ptuff DW. Membrane-initiated actions of estrogens in neuroendocrinology: Emerging principles. *Endocr Rev*. 28 (1): 1 – 19, 2007.

Wang S, Kurzer MS. Effects of phytoestrogens on DNA synthesis in MCF-7 cells in the presence of estradiol or growth factors. *Nutr Cancer*. 31(2):90-100, 1998.

Wang CJ, Hsieh YJ, Chu CY, Lin YL, Tseg TH. Inhibition of cell cycle progression in human leukemias HL-60 cells by esculletin. *Cancer Lett*. 183 (2): 163-8, 2002.

Wang MM, Traystman RJ, Hurn PD, Liu T. Non-classical regulation of estrogen receptor- α by ICI182,780. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 92(1-2):51-62, 2004.

Welshons WV, Murphy CS, Koch R, Calaf G, Jordan VC. Stimulation of breast cancer cells *in vitro* by the environmental estrogen enterolactone and the phytoestrogen equol. *Breast Cancer Res Treat*. 10(2): 169 - 75. 1987.

Weisz A, Rosales R. Identification of an estrogen response element upstream of the human c-fos gene that binds the estrogen receptor and the AP-1 transcription factor. *Nucleic Acids Res*. 18 (17): 5097 – 106, 1990.

Whitten PL, Lewis C, Russell E, Naftolin F. Potential adverse effect of phytoestrogens. *J Nutr*. 125 (3 suppl): 771S – 6S, 1995.

Witte JS, Ursin G, Siemiatycki J, Thompson WD, Paganini-Hill A, Haile RW. Breast Cancer Res Treat. 42(3):243 – 51, 1997.

Wiseman H, O'Reilly JD, Adlercreutz H, Mallet AI, Bowey EA, Rowland IR, Sanders TAB. Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F2-isoprostane concentrations and increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. Am J Clin Nutr. 72: 395 – 400, 2000.

Wu AH, Ziegler RG, Horn-Ross PL, Nomura AMY, West DW, Kolonel LN, Rosenthal JF, Hoover RN, Pike MC. Tofu and Risk of Breast Cancer in Asian-Americans. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 5: 901 - 6, 1996.

Xiang T, Xiong QB, Ketut AI, Tezuka Y, Nagaoka T, Wu LJ, Kadota S. Studies on the hepatocyte protective activity and the structure-activity relationships of quinic acid and caffeic acid derivatives from the flower buds of *Lonicera bournei*. Planta Med. 67(4): 322 - 5, 2001.

Xu L, Glass CK, Rosenfeld MG. Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. Curr Opin Genes Dev. 9(2): 140 - 7, 1999.

Yang EB, Zhao YN, Zhang K, Mack P. Daphnetin, one of coumarin derivatives, is a protein kinase inhibitor. Biochem Biophys Res Commun. 260: 682 - 5, 1999.

Yasilada E, Taninaka H, Takaishi Y, Honda G, Sezik E, Momota H, Ohmoto Y, Taki T. *In vitro* inhibitory effects of *Daphne oleoides* ssp. *oleoides* on inflammatory cytokines and activity-guided isolation of active constituents. Cytokine. 13(6): 359 - 64, 2001.

Yuan JM, Wang QS, Ross RK, Henderson BE, Yu MC. Diet and breast cancer in Shanghai and Tianjin, China. Br J Cancer. 71(6): 1353 - 8, 1995.

Zava DT, Duwe G. Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer cells *in vitro*. Nutr Cancer. 27(1): 31 - 40, 1997.

Ziegler RG, Hoover RN, Pike MC, Hildesheim A, Nomura AM, West DW, Wu-Williams AH, Kolonel LN, Horn-Ross PL, Rosenthal JF, Hyer MB. Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. J Natl Cancer Inst. 85(22): 1819 - 27, 1993.

Zhang W, Zhang WD, Li TZ, Zhang C, Liu RH, Zhou Y, Su J. Studies on the chemical constituents in roots of *Daphne odora* var. *Atrocaulis*. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 7: 513 - 5. 2005.

Zhao XH, Chen DH, Si JY, Pan RL, Shen LG. Studies on the phenolic acid constituents from Chinese medicine "sheng-ma", rhizome of *Cimicifuga foetida* L. Yao Xue Xue Bao. 37(7): 535 - 8, 2002.

Zwijsen RM, Wientjens E, Klompaker R, van der Sman J, Bernards R & Michalides RJ. CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. Cell. 88: 405 – 15, 1997.