

Original

Inhibición del crecimiento de la línea de melanoma murino B16F10 por diferentes compuestos polifenólicos

C. Martínez¹, J. Yáñez¹, J. Rodríguez¹, M. Canteras³, M. Alcaraz² y V. Vicente¹

Departamentos de ¹Anatomía Patológica, ²Radiología y Medicina Física y ³Bioestadística, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia.

SUMMARY

Introduction: The response of the cell line B16F10 to treatment with six vegetable polyphenols was studied and compared with the response to treatment with melphalan. Material and methods: Tests for cytotoxicity (at 24 h) and antiproliferation (at 72 h) were carried out for the polyphenols, and cell viability was quantified using the MTT test. Results: There was a small degree of cell viability with tangeretin and futeolin (at 24 h) at the maximum assayed concentrations (25 and 50 μ M) while melphalan showed a dose-response curve. The culture growth was inhibited at the maximum concentration (50 μ M) with 7,3'-dimethyl hesperetin at 72 h, while tangeretin showed clear antiproliferative action on a dose-response curve. Conclusions: These results suggest that the presence of at least three adjacent methoxylated groups, as occurs in tangeretin, reinforces the antiproliferative effect, while the absence of a double C2-G3 bond in hydroxylated polyphenols leads to a substantial loss in activity, Rev Esp Patol 2001; 34(4): 317-324.

Key words: Polyphenolic - Melanoma - B16F10 - Antiproliferative - Tangeretin

RESUMEN

Introducción: Estudiamos la respuesta de la línea B16F10 al tratamiento con seis polifenoles vegetales comparándola con la del meltalán. Material y métodos: Se han realizado pruebas de citotoxicidad (24 horas) y antiproliferación (72 horas) de los polifenoles y la cuantificación de la viabilidad celular con el test de MTT. Resultados: Observamos una pequeña inhibición con tangeretina y luteonina (24 h) a la máxima concentración ensayada (25 y 50 μ M) mientras que el meltalán mostró una curva dosis-respuesta. A las 72 horas, los cultivos presentaron una inhibición del crecimiento a la máxima concentración (50 μ M) con 7,3'-dimetilhesperetina, mientras que la tangeretina mostró una acción antiproliferante efectiva con una curva dosis-respuesta evidente. Conclusiones: Estos resultados sugieren que la presencia de al menos tres grupos metoxilados adyacentes, como ocurre en la tangeretina, potencia el efecto antiproliferante y la ausencia del doble enlace C2-C3 en los polifenoles hidroxilados con lleva una pérdida importante de actividad. Rev Esp Patol 2001; 34(4): 317-324.

Palabras clave: Polifenoles - Melanoma - B16F10 - Antiproliferante - Tangeretina

INTRODUCCIÓN

El melanoma es una de las ocho enfermedades más frecuentemente diagnosticadas en Estados Unidos (1), con una incidencia creciente en todo el mundo y una tasa de crecimiento del 5% anual (2). Muestra una de las peores tasas de respuesta a la quimioterapia (3) y, en casos de diagnóstico tardío y con metástasis, la dacarbazina y los agentes alquilantes presentan efectos secundarios importantes que han llevado a la búsqueda de nuevos agentes con menores efectos secundarios (4).

Algunos compuestos polifenólicos han sido señalados como agentes dietéticos potencialmente quimioprotectores frente al cáncer (5-7) e incluso con acción antitumoral (8-10), pues parecen ser capaces de actuar en todas las etapas del proceso carcinogénico, inhibir los daños en el DNA y en las enzimas implicadas en la traducción de señales (quinasas, fosfolipasas, fosfodiesterasas) (11-13), regular enzimas críticas para el crecimiento celular, e incluso algunos parecen tener actividad agonista/antagonista estrogénica (14). Otros mecanismos propuestos incluyen la inhibición de tirosinproteinkinasa (15, 16), de las DNA topoisomerasas (17, 18), de la actividad ribosomal S6 kinasa (19), o la disminución del fosfatidilinositol (20). Asimismo, han mostrado efectos antiproliferantes en varias líneas celulares neoplásicas: leucemia mieloide y linfoide (21), carcinoma de células escamosas (4), cáncer gástrico (22), de ovario (23), próstata (24), tiroideas (25), adenocarcinoma de colon (26) y de mama, y neuroblastoma humano (27). Aunque todavía se han realizado pocos estudios con el melanoma, varios ensayos con compuestos polifenólicos (especialmente apigenina y quercetina) han sido pioneros en la inhibición de las metástasis pulmonares inducidas por inyección intravenosa de células de melanoma B 16F10 en ratones (28, 29).

En el presente trabajo, hemos estudiado los efectos *in vitro* de varias flavononas, flavonas y flavonoles vegetales sobre el crecimiento y la proliferación de la línea B 16F10, comparándolos con un agente alquilante bien conocido, el melfalán, y la posible relación entre las propiedades antiproliferantes, las actividades biológicas y la estructura química de dichos polifenoles.

MATERIAL Y MÉTODOS

Línea celular

Utilizamos la línea B 16F10 (melanoma cutáneo de ratón C57BL/6J), proporcionada por el Instituto Nacional de Salud (Bethesda, EE.UU.).

El cultivo, libre de *Mycoplasma* sp., se realizó con medio mínimo esencial de Eagle (EMEM) (Gibco, EE.UU.) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (SBF) (Gibco, EE.UU.), estreptomycin y penicilina (100 µg/ml y 100 u/ml, respectivamente) (Gibco, EE.UU.). Todos los procedimientos se llevaron a cabo en una cabina de flujo laminar vertical equipada con filtro de carbono (Culter S.L., Madrid). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C. una humedad del 98% y atmósfera con un 5% de CO₂ (Forma Scientific, Ohio), cambiando del medio de cultivo cada 48 horas.

Reactivos y productos químicos

Hesperetina, eriodictiol, luteonina, quercetina y 7,3'-dimetilhesperetina (Furfural Español, Murcia). Tangeretina (Extrasintesis Genay, Francia). Melfalán, piruvato sódico, estreptomycin, penicilina, PBS y MTT (Sigma, Madrid). Etanol y dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck, Madrid). EMEM, SBF y aminoácidos de Gibco (EE.UU.).

Tratamientos

Se realizaron dos tipos de experimentos diferentes:

a) Para evaluar la citotoxicidad, sembramos 2500 células por pocillo en microplacas de 96 pocillos, mantenidas en medio fresco suplementado durante 24 horas. Posteriormente, se trataron con hesperetina, 7,3'-dimetilhesperetina, eriodictiol, luteonina, quercetina y tangeretina, respectivamente, durante otras 24 horas. Se utilizó el melfalán como sustancia de referencia. Después se cambió el medio y los cultivos se mantuvieron durante otras 24 horas antes del ensayo con MTT.

b) Para evaluar el posible efecto antiproliferante de los polifenoles, sembramos 100 células por pocillo en microplacas de 96 pocillos. Tras 24 horas de adaptación de los cultivos, se cambió el medio, añadiendo los agentes polifenólicos mencionados, y se incubaron las placas en las condiciones normales durante 72 horas. Las pla-

cas se centrifugaron (240 g, 10 minutos), y se reemplazó el medio para mantener los cultivos otras 24 horas antes de realizar el ensayo con MTT.

Cuantificación de la viabilidad celular (test de MTT)

Hemos adaptado los métodos de Carmichael y cols. (30, 31) y Alley y cols. (32) a nuestras condiciones de cultivo, para lo cual incubamos las placas con 200 μ l de medio fresco suplementado y 50 μ l de MTT (8 mg/ml) por pocillo durante cuatro horas a 37 °C y 5% de CO₂. Tras centrifugar (240 g, 10 minutos) se retiró el medio y el MTT no metabolizado y se añadieron 100 μ l de DMSO a cada pocillo para solubilizar el MTT formazán producido. Tras agitar durante 30 minutos, se leyeron a 570 nm de longitud de onda y 690 nm como referencia en un lector automatizado de placas (Multiskan MCC! 340P).

Análisis estadístico

Se ha realizado un análisis de varianza de medidas repetidas de acuerdo con un diseño factorial jerarquizado para comparar los porcentajes de supervivencia celular en los cultivos con diferentes concentraciones de los compuestos. En los gráficos, cada punto corresponde a la media de 4-6 medidas para cada concentración de los tratamientos y las barras se han calculado a partir del error estándar de la media. Todos los experimentos se han realizado por triplicado y se han considerado significativos los valores de *p* inferiores a 0,05.

RESULTADOS

Efectos de citotoxicidad

Con el melfalán, observamos una clara dependencia dosis-respuesta: a la máxima concentración (75 μ M) encontramos un 4% de supervivencia celular respecto a los controles no tratados, mientras que a la mínima concentración (0,58 μ M) sobrevivían el 70% de las células.

De los seis polifenoles utilizados (Fig. 1), sólo la tangeretina presentó una relación dosis-respuesta, con un 60% de supervivencia celular a la máxima concentra-

ción (50 μ M) y un aumento de la supervivencia conforme disminuía la concentración (Fig. 2a).

Los tratamientos de los cultivos B16F10 con quercetina y luteonina mostraron la inhibición del crecimiento a las máximas concentraciones (25 y 50 μ M), pero las diferencias respecto a los controles desaparecían conforme disminuían las concentraciones (Fig. 2a). La inhibición producida con la administración a las máximas concentraciones era mayor en los cultivos con luteonina que en los cultivos tratados con quercetina (Fig. 2a); mientras que los cultivos tratados con hesperetina, eriodictiol y 7,3'-dimetilhesperetina durante 24 horas, no mostraron diferencias significativas con ninguna de las concentraciones utilizadas (Fig. 2b). No obstante, en todos los cultivos tratados con polifenoles existían diferencias significativamente menores respecto a los cultivos tratados con melfalán (*p*<0,05).

Efectos antiproliferantes

El tratamiento durante 72 horas con melfalán (Fig. 3a) presentó una relación dosis-respuesta, produciendo a concentraciones superiores o iguales de 3,75 μ M una viabilidad celular del 0%, expresada como porcentaje de células respecto al control. Sin embargo, los tratamientos con los diferentes polifenoles ensayados mostraron resultados muy variables, siendo el más eficaz el tratamiento antiproliferante con tangeretina (72 horas), que presentó los mejores resultados de todos los polifenoles ensayados respecto a la inhibición del crecimiento celular, con un rango que osciló entre el 14% y el 77% en función de la dosis, y un LD50 próximo a una concentración de 10 μ M, no obstante, el LD50 del melfalán era diez veces menor—. Además, el tratamiento con tangeretina mostró diferencias significativas con quercetina y luteonina a todas las dosis administradas (*p*<0,01) (Fig. 3b).

Con quercetina y luteonina observamos una relación dosis-respuesta, con una inhibición del crecimiento celular a la mayor concentración (50 μ M) del 33,4% y el 21,5%, respectivamente, que se reducía a medida que disminuía la concentración (Fig. 3b).

Entre las flavononas (hesperetina, eriodictiol y 7,3'-dimetilhesperetina), sólo la 7,3'-dimetilhesperetina a la mayor dosis ensayada (50 μ M) originaba una disminución significativa del crecimiento celular (*p*<0,05) respecto al control (40% de viabilidad celular) (Fig. 3c). No

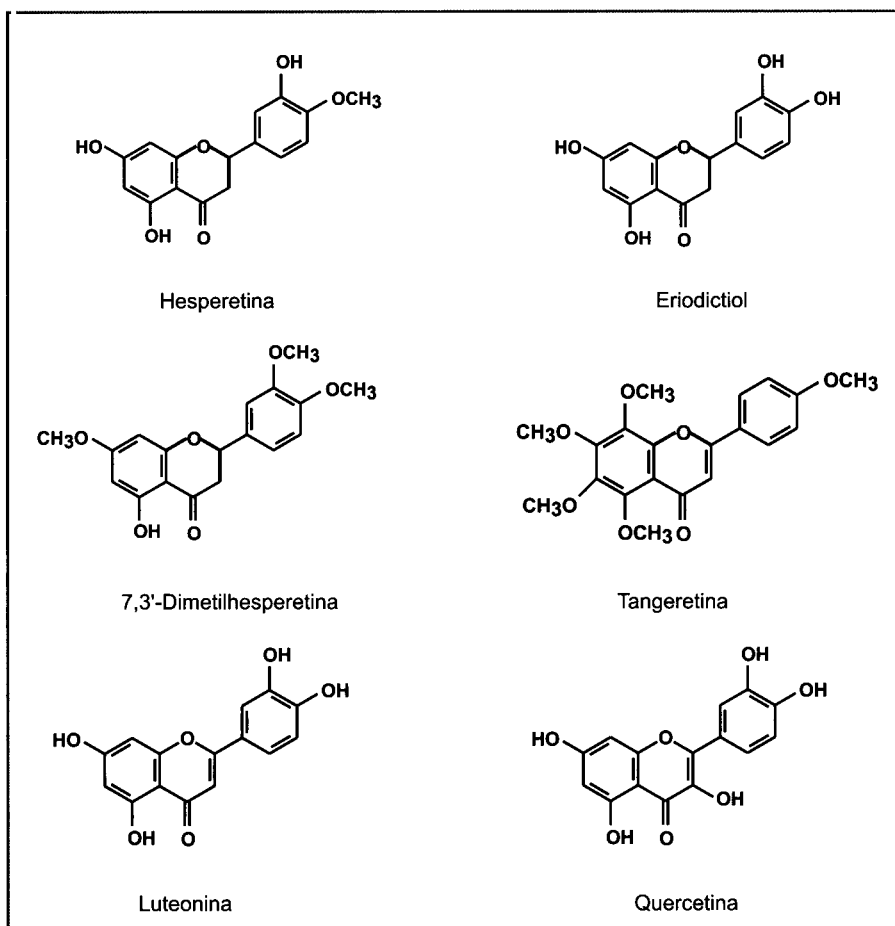


Figura 1. Estructura química de los flavonoides utilizados en este trabajo: hesperetina, eriodictiol, 7,3'-dimetilhesperetina, tangeretina, luteonina, y quercetina.

hemos utilizado concentraciones de 7,3'-dimetilhesperetina mayores de $50 \mu\text{M}$, ya que, por las características estructurales de esta molécula, se produciría una insolubilización espontánea con su inactivación en el medio de cultivo, originando cristales apreciables al microscopio de contraste de fases.

DISCUSIÓN

Los estudios con flavonoides sobre melanoma son excepcionales. La mayoría de los estudios utilizaron líneas celulares glandulares o con diana estrogénica –tiroides (25), mama (33-37), cuello del útero (37), colangiocarcinoma (38)– y con flavonoides tales como luteonina, apigenina (25), flavonoides cítricos (34), 7-metoxiflavonona y 7,8-dihydroxiflavona (35), camferol, genisteína y

quercetina (39), que producen una inhibición del crecimiento en el rango $0,1-30 \mu\text{M}$, resultados que nosotros no hemos observado con luteonina o hesperetina en esta línea celular.

No hemos encontrado ningún estudio del melanoma *in vitro* con tangeretina, el flavonoide más efectivo de los seis ensayados en nuestro trabajo, que mostraba valores de LD_{50} comparables con los publicados con otros flavonoides en otros tipos de líneas celulares: tiroides (25), mama (33-37) y carcinomas de pulmón (38, 40). En nuestro estudio, la tangeretina mostró una actividad inhibitoria significativa sobre los cultivos de B16F10, aumentando la inhibición de modo dependiente de la dosis.

En los tratamientos con 7,3'-dimetilhesperetina, la inhibición no fue dependiente de la dosis, ya que sólo se observó a la máxima concentración utilizada ($50 \mu\text{M}$), lo que pudiera estar relacionado con un posible efecto anti-

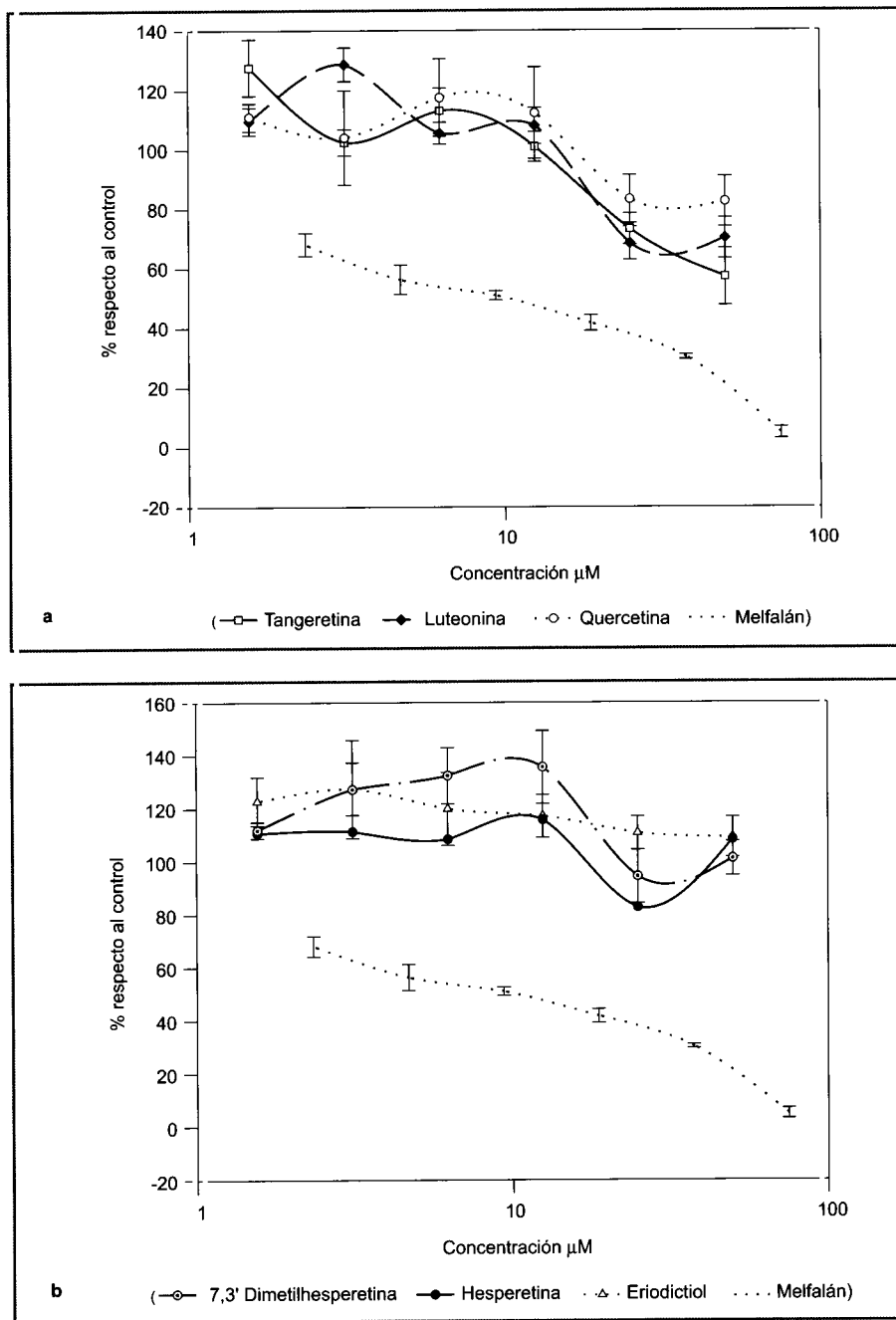


Figura 2. Viabilidad celular de los cultivos de B16F10 tras 24 horas de tratamiento. a) Tangeretina, luteonina, quercetina y melfalán, respecto de los cultivos controles. b) 7,3'-dimetilhesperetina, hesperetina, eriodictiol y melfalán, respecto de los cultivos controles. (Cada punto es la media de 4-6 ensayos distintos. Las barras de error corresponden al error estándar de la media).

proliferante, aunque son necesarias nuevas investigaciones para aclarar el comportamiento de esta flavonona.

La luteonina y la quercetina mostraban un efecto dependiente de la dosis sobre el crecimiento del cultivo, presentando a la mayor concentración (50 µM) el mayor grado de inhibición celular. Otros autores, con la línea

celular de melanoma SK-MEL-28 en tratamientos con quercetina durante seis días observaron una marcada inhibición (45%), aunque sólo a la máxima dosis usada (10 µM) y añadiéndose diariamente al medio (concentración final: 60 µM), mientras que el tratamiento de tres días no producía ninguna inhibición (40). Estos resulta-

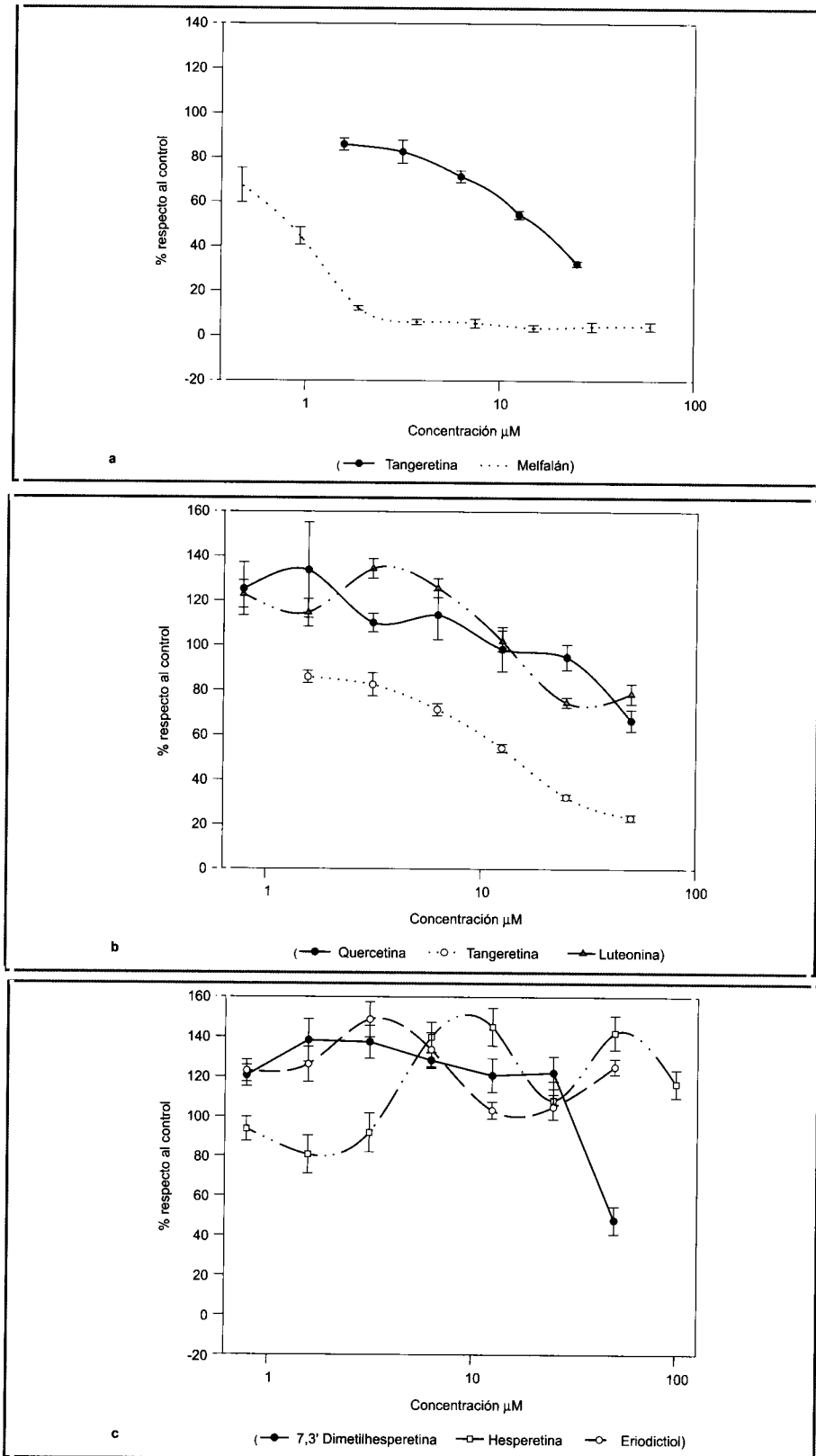


Figura 3. Actividad antiproliferante en B16F10 tras 72 horas de tratamiento. a) Melfalán y tangeretina, respecto de los cultivos controles. b) Tangeretina, luteonina y quercetina, respecto de los cultivos controles. c) 7,3'-Dimetilhesperetina, hesperetina y eriodictiol, respecto de los cultivos controles. (Cada punto es la media de 4-6 ensayos distintos. Las barras de error corresponden al error estándar de la media.)

dos parecen estar de acuerdo con los escasos resultados obtenidos para la quercetina en nuestro trabajo. Cuando se estudia este aspecto en líneas celulares diferentes a las de melanoma, HT29 y UC-T1, suelen describirse mayores respuestas y mejores resultados, con LD₅₀ de 15 y 65 μ M, respectivamente (26, 39).

Los ensayos con MTT muestran la ausencia de acción de las flavononas (hesperetina y eriodictiol) sobre el crecimiento y la viabilidad celulares a todas las concentraciones ensayadas. El porcentaje de células viables no difiere del observado en las condiciones establecidas como controles.

Nuestros resultados en la línea celular de melanoma murino muestran que no hay correlación entre la efectividad de los flavonoides empleados y su actividad antioxidante o captadora de radicales libres. El grupo antioxidante más potente del flavonoide, la estructura catecol del anillo B, que observamos en el eriodictiol, la luteonina y la quercetina, es insuficiente para inhibir la proliferación celular de B 16F 10, y la presencia de varios grupos metoxi en el esqueleto del flavonoide, que reduce significativamente su acción antioxidante y captadora de radicales libres (7, 41), aumenta la acción antiproliferante sobre B16F10 (tangeretina y 7,3'-dimetilhesperetina).

Respecto a la relación entre estructura química y actividad, nuestros resultados muestran que flavonoides polimetoxilados u O-dimetoxilados (tangeretina y 7,3'-dimetilhesperetina) disminuyen significativamente la proliferación celular. Parece que la presencia de tres grupos metoxi adyacentes tienen un efecto antiproliferante más potente. Las flavonas y flavonoles O-dihidroxisilados (luteonina y quercetina) muestran sólo un débil efecto, y ni siquiera la 3-hidroxisilación en los núcleos de flavona confiere un efecto inhibitorio más fuerte.

Por otra parte, las flavononas monohidroxisiladas y O-dihidroxisiladas (hesperetina y eriodictiol) son completamente inactivas, lo que sugiere que la ausencia del doble enlace C2-C3 en flavonoides hidroxisilados puede conllevar una pérdida de su actividad inhibitoria en el crecimiento celular. Sin embargo, las principales características estructurales que pueden variar estas propiedades antiproliferantes son el número y la posición de grupos metoxilados en los anillos A y B del esqueleto flavona y flavonona.

Estudios previos sugieren que la posición, el número y la sustitución de los grupos hidroxilos en los anillos A y B, así como la saturación en el enlace C2-C3, pueden

ser factores importantes que aumentan las actividades citotóxicas o antiproliferantes de los flavonoides. Así, la miricetina (3', 4', 5'-trihidroxisilavona) es un inhibidor más potente de a-fosfatidilinositol-3-quinasa que la luteonina y la apigenina (42), y la actividad inhibitoria de la baicaleina es mayor que la de la wogonina sobre células de músculo liso (43). Ello indica que la presencia de tres grupos hidroxilos, en posición 5, 6 y 7 (anillo A), parece necesaria para inhibir la proliferación celular. Todos estos resultados sugieren que los efectos de los flavonoides sobre el crecimiento de células malignas son diferentes y siguen patrones específicos para cada línea celular.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los Dres. Antonia Bemabeu y José Muñoz y a Dña. Juana García, del Servicio de Cultivos Celulares (SACE) de la Universidad de Murcia su ayuda en el trabajo realizado en el citado servicio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Boring CC, Swuires TS, Tong T. *Cancer Statistics*. Cancer J clin 1992; 42: 19-38.
2. Morton DL, Barth A. *Vaccine therapy for malignant melanoma*. Cancer J Clin 1996; 46: 225-244.
3. Schadeandorf D, Worm M, Algermissen B, Kohlms CM, Czametzki BM. *Chemosensitivity testing of human malignant melanoma. A retrospective analysis of clinical response and in vitro drug sensitivity*. Cancer 1994; 73: 103-108.
4. Runkle GP, Zalomik AJ. *Malignant melanoma*. Am Fam Phys 1994; 49: 91-98.
5. Hertog MGL, Feskeems EJM, Hollman CH, Katan MB, Kromhout D. *Dietary antioxidants flavonoids and risk of coronary heart disease*. Lancet 1993; 342: 1007-1011.
6. Miller AB, Berrino F, Hill M, Pietimen P, Riboli E, Wahrendorf J. *Diet and the aetiology of cancer: a review*. Eur J Cancer 1994; 30A: 207-220.
7. Benavente-García O, Castillo J, Marín FR, Ortuño A., Del Río JA. *Uses and properties of citrus flavonoids*. J Agric Food Chem 1997; 45: 4505-4515.
8. Kamdaswami C, Perkins E, Soloniuk DS, Dyzewiecki G, Middelton E. *Antiproliferative effects of citrus flavonoids on a human squamous cell carcinoma in vitro*. Cancer Lett 1991; 56: 147-152.
9. Hiram T, Gotoh M, Oka K. *Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemia HL-60 cells*. Life Sci 1994; 55: 1061-1069.
10. Elangovan V, Seka V, Govindasamy S. *Chemopreventive potential of dietary bioflavonoids against 20-methylcholanthrene-induced tumorigenesis*. Cancer Lett 1994; 87: 107-113.

11. Middleton E, Kandaswami C. *The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer* En: Harborne JH. (Ed.). *The flavonoids: Advances in research since 1986*. New York 1993; 619-652.
12. Constantinou A, Huberman E. *Genistein as an inducer of tumor cell differentiation: Possible mechanisms of action*. Proc Soc Exp Biol Med 1995; 208: 109-115.
13. Peterson G. *Evaluation of the biochemical targets of genistein in tumor cells*. J Nutrition 1995; 125: 784S-789S.
14. Bames S, Peterson G, Grubbs C, Setchell K. *Potential role of dietary isoflavones in the prevention of cancer* En: Jacobs MM. (Ed.). *Diet and cancer: Markers, prevention and treatment*. Plenum Press, New York 1994; 135-147.
15. Kuriu A, Ikeda H, Kanakura Y y cols. *Proliferation of human myeloid leukemia cell line associated with the tyrosine-phosphorylation and activation of the pro-oncogene c-kit product*. Blood 1991; 78: 2834-2840.
16. Cunningham BDM, Threadgill MD, Groundwater PW, Dale II, Hickman JA. *Synthesis and biological evaluation of a series of flavones designed as inhibitors of protein tyrosine kinases*. Anticancer Drug 1992; 7: 365-384.
17. Okura A, Arakawa H, Oka H, Yoshinai T, Monden Y. *Effect of genistein on topoisomerase activity and on the growth of [val 121 Ha-Ras-transformed NIH 3T3 cells*. Biochem Biophys Res Commun 1988; 157: 183-189.
18. Markovits J, Linossier C, Fosse P y cols. *Inhibitory effects on the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II*. Cancer Res 1989; 49: 5111-5117.
19. Linossier C, Pierre M, Le Pecq JB, Pierre J. *Mechanism of action in NIH-3T3 cells of genistein, an inhibitor of EGF-receptor tyrosine kinase activity*. Biochem Pharmacol 1990; 39: 187-193.
20. Makishima M, Horma Y, Hozumi M y cols. *Effects of inhibitors of protein tyrosine kinase activity and/or phosphatidylinositol turnover on differentiation of some human myelomonocytic leukemia cells*. Leukemia Res 1991; 15: 701-708.
21. Larocca LM, Piantelli M, Leone G y cols. *Type II oestrogen binding sites in acute lymphoid and myeloid leukaemias: Growth inhibitory effect of oestrogen and flavonoids*. Br J Hematol 1990; 75: 489-495.
22. Yoshida M, Sakai T, Hosokawa N y cols. *The effect of quercetin on cell-cycle progression and growth of human gastric cancer cells*. FEBS Lett 1990; 260: 10-13.
23. Seambia G, Ranelletti FO, Benedetti-Panici P y cols. *Inhibitory effect of quercetin on OVCA 433 cells and presence of type II oestrogen binding sites in primary ovarian tumors and cultured cells*. Br J Cancer 1990; 62: 942-946.
24. Peterson G, Bames S. *Genistein and biochanin A inhibit the growth of human prostate cancer cells but not epidermal growth factor receptor tyrosine autophosphorylation*. Prostate 1993; 22: 335-345.
25. Yin F, Giuliano AE, Van Herle AJ. *Growth inhibitory effects of flavonoids in human thyroid cancer cell lines*. Thyroid 1999; 4: 369-376.
26. Agullo G, Gamet-Payrastré L, Fernández Y, Anciaux N, Demigné C, Révész C. *Comparative effects of flavonoids on the growth, viability and metabolism of a colonic adenocarcinoma cell line (HT29 cells)*. Cancer Lett 1996; 105: 61-70.
27. Fotais T, Pepper MS, Aktas E y cols. *Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis*. Cancer Research 1997; 57: 2916-2921.
28. Menon LG, Kuttan R, Kuttan G. *Imbibition of lung metastasis in mice induced by B16F10 melanoma cells by polyphenolic compounds*. Cancer Lett 1995; 95: 221-225.
29. Caltagirone S, Rossi C, Poggi A y cols. *Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth metastatic potential*. Int J Cancer 2000; 87: 595-600.
30. Canmichael J, DeGraff WG, Gazdar A, Minna JD, Mitchell JB. *Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing*. Cancer Res 1987; 47: 936-942.
31. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar A, Mirra JD, Mitchell JB. *Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: Assessment of radioresensitivity*. Cancer Res 1987; 47: 943-946.
32. Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL. *Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay*. Cancer Res 1988; 48: 589-601.
33. Wang C, Kurzer MS. *Phytoestrogen concentration determines effects on DNA synthesis in human breast cancer cells*. Nutr Cancer 1997; 28(3): 236-247.
34. Guthrie N, Carroll KK. *Inhibition of mammary cancer by citrus flavonoids*. Adv Exp Med Biol. 1998; 439: 227-236.
35. Le-Bail JC, Varnat F, Nicolas JC, Hahrioux G. *Estrogenic and anti-proliferative activities on MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids*. Cancer Lett 1998; 130: 209-216.
36. Zava DT, Duwe G. *Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer cells in vitro*. Nutr Cancer 1997; 27: 31-40.
37. Delarue F, Kedjoui B, Mesarge F, Bayard F, Faye JC, Poirot M. *Modification of benzylphenoxy ethanamine antiestrogen molecules: Influence on affinity for antiestrogen binding site (AEBS) and cell cytotoxicity*. Biochem Pharmacol 1999; 57: 657-661.
38. Kudo M, Naito Z, Yokoyama M, Asaro G. *Effects of quercetin and sunphenon on responses of cancer cells to heat shock damage*. Exp Mol Pathol 1999; 66: 66-75.
39. Caltagirone S, Ranelletti FO, Rinelli A y cols. *Interaction with type II estrogen binding sites and antiproliferative activity of tamoxifen and quercetin in human non-small-cell lung cancer*. Am J Respir Cell Mol Biol 1997; 17: 51-59.
40. Lama G, Argelucci C, Bruzzese N y cols. *Sensitivity of human melanoma cells to oestrogens, tamoxifen and quercetin: Is there any relationship with type I and II oestrogen binding site expression?*. Melanoma Res 1998; 8: 313-322.
41. Castillo J, Benavente-García O, Lorente J y cols. *Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced in vivo by x-rays of flavan-3-ols (procyanidins) from grape seeds (Vitis vinifera): comparative study versus other phenolic and organic compounds*. J Agric Food Chem. 2000; 48: 1738-1745.
42. Agullo G, Gamet-Payrastré L, Manenti S y cols. *Relationship between structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: A comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition*. Biochem Pharmacol 1997; 53: 1649-1657.
43. Huang HC, Wang HR, Hsieh LM. *Antiproliferative effect of baicalin, a flavonoid from a Chinese herb, on vascular smooth muscle cells*. Eur J Pharmacol 1994; 251: 91-93.