

Evaluación de cinco compuestos esteroidales en la línea celular MCF-7 y en Larvas de Artemia salina

Carlos Maldonado Mute¹
Eduardo Palomino²
Ma. Teresa Reguero¹

RESUMEN

En Colombia, el cáncer del seno es una enfermedad que en grado de morbi/mortalidad ocupa el tercer lugar después del cáncer de cérvix y de estómago.

En promedio, las células tumorales del cáncer del seno presentan receptores estrogénicos del orden del 60% al 75% en mujeres premenopáusicas y del 80% al 85% en postmenopáusicas. Es por tanto de vital importancia nuestra participación en el desarrollo de nuevos medicamentos con actividad antitumoral.

Actualmente el tratamiento del cáncer de seno involucra quimioterapia, radioterapia, cirugía y terapia antihormonal. A nivel de esta última se cuenta con el tamoxifén, único antiestrógeno disponible a nivel clínico que actúa compitiendo por los receptores del estradiol a nivel intracelular.

El presente trabajo describe la actividad de los siguientes compuestos de origen esteroide: 4-nitro-3,17-epidihidroestratrieno (1); 3-metoxi-4-nitro estradiol (2); 3, 11 α , 17 β -estratriol (3); 3,11 β , 17 β estratriol (4) y 3,17-epidihidroxyestratrien-11-ona (5).

La actividad de estos compuestos fué valorada inicialmente a través de su toxicidad en larvas de *Artemia salina* y posteriormente midiendo sus efectos en la línea tumoral de cáncer del seno MCF-7. Esta línea es la más utilizada en estudios "in vitro" porque conserva la mayoría de las características de una célula epitelial de origen tumoral.

En ambos bioensayos el único compuesto que presentó actividad ($p < 0.05$) fué el compuesto 4. En la línea celular MCF-7 el compuesto 4 produjo estimulación del crecimiento pero fué altamente tóxico para las larvas de *Artemia salina*.

Existe un sincronismo entre los dos ensayos. Mientras la evaluación de la *Artemia salina* permite valorar el grado de toxicidad del compuesto en prueba, el experimento en la línea celular "in vitro" establece más detalladas características de su actividad.

SUMMARY

In Colombia breast cancer is an illness that in degree of mobility / mortality occupies third position after cervix and gastric cancers.

On average, breast cancer cells display estrogenic receptors of the order of 60-75% in premenopausal women, and 80-85% in postmenopausal women respectively. For this reason, our participation in the development of new antitumor drugs is of vital importance.

Breast cancer treatment includes chemotherapy radiotherapy, surgery and antihormonal therapy. Tamoxifen, the only antiestrogen that is currently used in clinical treatment, competes for the estrogen receptor at the intracellular level.

This paper describes the activity of the following compounds: 4-nitro-3,17-epidihydroestratriene (1); 3-methoxy-4-nitro estradiol (2); 3, 11 α , 17 β -estratriol (3); 3,11 β , 17 β estratriol (4) and 3, 17-epidihydroxyestratrien-11-one (5)

The activity of the above compounds was initially evaluated through the toxicity assay using the shrimp *Artemia salina* and further by measuring their effects on the breast cancer cell line MCF-7. This line is the most widely used because it preserves the majority of features of an epithelial cell of tumor origin.

In both assays compound 4 was the only one that have activity ($p < 0.05$). In the breast cancer cell line MCF-7 this

¹ Departamento de Farmacia. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Apdo Aéreo 14490. Santafé de Bogotá. Colombia

² Walker Cancer Institute. Detroit, Michigan. USA.

compound (4) show growth stimulation and in the brine shrimp assay was very toxic.

There exists a sincronism between the two assays. While the test with *Artemia salina* is useful for determination of overall toxicity level of a given compound, the "in vitro" assay a closer approximation of its activity.

INTRODUCCION

En Colombia y en otros países occidentales la incidencia de cáncer de seno ocupa uno de los primeros lugares en las tablas de morbi/mortalidad (1, 2, 3, 4). La incidencia está aumentando de una manera incontrolable (2, 3, 4, 5), estimándose que una de cada nueve mujeres desarrollará esta enfermedad y que a pesar del diagnóstico temprano, de los medicamentos y nuevos procedimientos para su tratamiento, la mortalidad debida a esta enfermedad es inaceptablemente alta (6). Cuando el cáncer de seno se presenta en pacientes jóvenes la sobrevida es mucho mas corta (7)

La presencia o ausencia de metástasis es un punto de gran importancia, pues la sobrevida a los 10 años en pacientes que no presentan compromiso de nódulos axilares, es de un 75%, mientras que las pacientes que los presentan tienen una tasa de sobrevida, en este mismo período, de sólo 30%. Igual porcentaje se presenta cuando el tamaño del tumor es mayor de 10 cm y/o no hay presencia de receptores estrogénicos y de progesterona (8, 9).

El cáncer de seno presenta una fuerte dependencia de las hormonas esteroidales (10, 11, 12) especialmente de los estrógenos, para los cuales se encuentran receptores en la mayoría de las células tumorales (13, 14, 15, 16, 17, 18, 19)

El porcentaje de receptores encontrados en tumores de seno de mujeres premenopáusicas, ha llegado a ser de un 60% y en mujeres postmenopáusicas de un 80% (7, 20), por lo tanto la presencia de estos receptores hace más sensibles a las pacientes a los efectos proliferativos de los estrógenos o a los efectos antiproliferativos de los antiestrógenos (21)

Actualmente el tratamiento del cáncer de seno se realiza por medio de cirugía, radioterapia, quimioterapia y terapia hormonal, dependiendo del cuadro clínico patológico de cada paciente. A nivel de la terapia hormonal el antiestrógeno de elección es el tamoxifen, el cual bloquea la acción mitogénica de los estrógenos compitiendo por el receptor estrogénico y aunque el período de sobrevida de las pacientes mejora y la presencia de efectos secundarios no es tan frecuente, las pacientes terminan haciendo resistencia (22, 23), por lo tanto, a nivel de la terapia antiestrogénica todavía hay mucho camino por recorrer para hallar otros compuestos antiestrogénicos más adecuados.

Los antihormonales teóricamente pueden actuar en los pasos que ocurren para que se active el material genético (13, 24, 25, 26) o bloqueando las proteínas producidas por las células tumorales, las cuales podrían actuar como estimuladoras del crecimiento.

Varios compuestos antiestrogénicos están siendo evaluados en la clínica, pero casi todos los antiestrógenos presentan una débil actividad como agonistas estrogénicos (27, 28) lo cual desencadena fracasos en el tratamiento a mediano y largo plazo (29, 30, 31)

El antiestrógeno actualmente utilizado como terapia de elección en el cáncer de seno es el tamoxifen (32, 33, 34) el cual prolonga la vida de las pacientes que lo reciben (35). La acción de este compuesto se hace por competencia directa con el estrógeno por el receptor y por la acción de su metabolito, el 4-hidroxitamoxifen, el cual presenta mayor actividad que el tamoxifen (11)

El tamoxifen sufre un extenso metabolismo (36) en el organismo que incluye reacciones de desmetilación, hidroxilación, isomerización, desaminación y desalquilación. Algunos de sus metabolitos actúan como antiestrógenos (N-desmetil tamoxifen, trans hidroxi tamoxifen) mientras que otros presentan actividad estrogénica como es el caso del cis hidroxitamoxifen y el bifenol (28, 33).

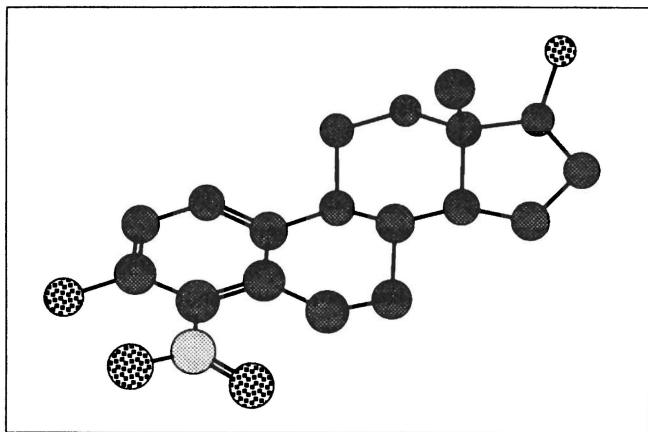
Entre los efectos indeseables de los antiestrógenos, incluido el tamoxifen, se han encontrado: estimulación en el desarrollo del carcinoma endometrial (37, 38, 39); aumento de la esteroidogenesis en mujeres premenopáusicas, luego de un tratamiento prolongado (40, 41); náuseas, vómito, oleadas de calor, cefalea, retención de líquidos, disminución en la actividad de algunas células del sistema inmune (35, 42, 43, 44, 45). En un grupo de 600 pacientes que habían recibido dosis bajas de tamoxifen, todas presentaron toxicidad ocular expresada en la disminución de la agudeza visual y edema macular bilateral (46). Algunos autores consideran que el efecto protector contra problemas coronarios de los esteroides se pierde, aumentando el riesgo con el uso de antiestrógenos. También se presenta disminución de la antitrombina III, lo cual expone al paciente a presentar problemas trombóticos.

El mayor problema con los antiestrógenos actuales es que presentan, con el curso del tiempo, resistencia (22, 23, 47, 48, 49). Este fenómeno es importante de considerar pues se está planteando la posibilidad de usar dosis bajas de tamoxifen como medida profiláctica en pacientes con alto riesgo de presentar cáncer de seno (50, 51).

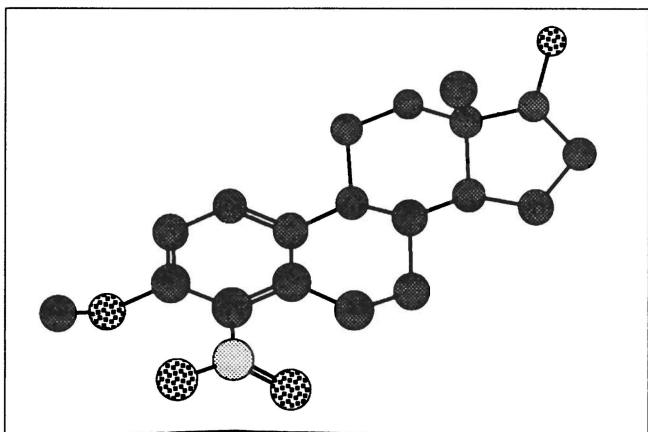
Con este panorama se puede apreciar la importancia que tiene el hallazgo o el diseño de nuevos antiestrógenos, que

permitan al paciente no solo una mayor sobrevida, sino también una mejor calidad de vida.

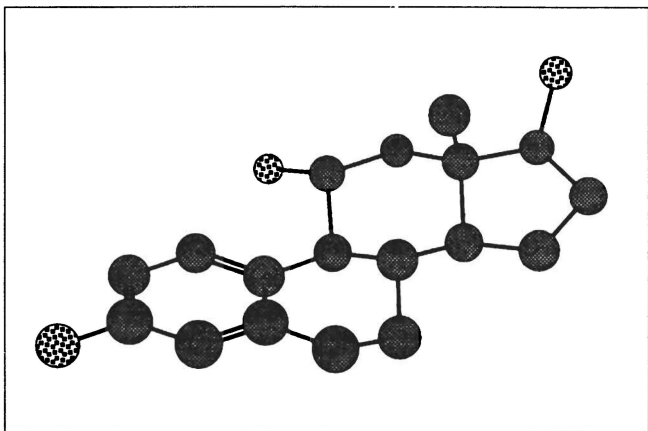
En el presente trabajo se valora la actividad "in vitro" de cinco compuestos de naturaleza esteroidea, cuyas estructuras se muestran a continuación.



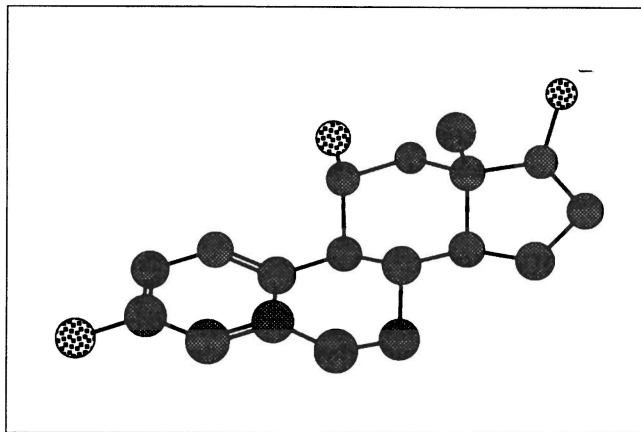
4-nitro-3,17-epidihidroxiestratrieno (1)



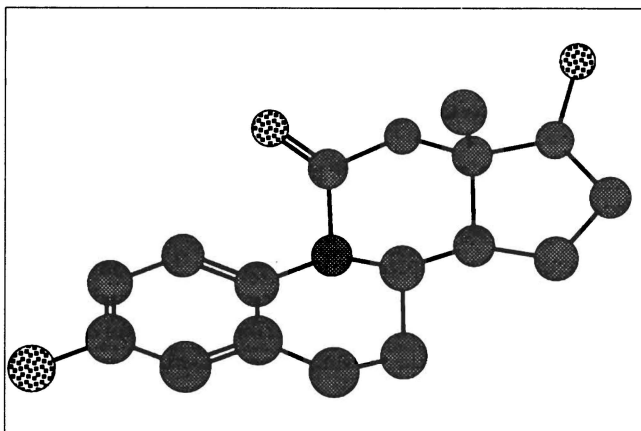
3-metoxi-4-nitro estradiol (2)



3,11 alfa, 17 beta-estratriol (3)



3,11 beta, 17 beta estratriol (4)



3,17-epidihidroxiestratrien-11-ona (5)

La actividad se valoró en la línea celular de cáncer de seno MCF-7 (52, 53, 54, 55, 56) y se compararán los resultados con los que se obtengan al probar, estos mismos compuestos, sobre las larvas de *Artemia salina* (57).

MATERIALES Y METODOS

Los compuestos fueron sintetizados en la Walker Research Institute por el Dr. Eduardo Palomino y la línea celular MCF-7 fué aportada por el Dr. Eduardo Palomino, investigador del Walker Cancer Institute, Detroit, Michigan. Las células se crecieron en monocapa, en frascos de cultivo de 75 mL en incubadora a una temperatura de 37°C y 5% de CO₂.

Se utilizó el medio de cultivo RPMI 1640 90% y 10 % del volumen restante era suero de caballo (50%) y suero de becerro (50%), solución de Hank, tripsina EDTA, L-glutamina, soluciones con antibióticos que contenía 100 000 UI de penicilina G por mL y 10 mg de estreptomycin por mL.

Las larvas de *Artemia salina*, se obtuvieron en el laboratorio de acuerdo con la metodología informada en la literatura (59).

En primer lugar se valoró el crecimiento de la línea celular MCF-7 y de la *Artemia salina*, bajo las condiciones existentes en el laboratorio. Así mismo se evaluó la incidencia de la adición de antibiótico y dimetilsulfóxido (DMSO) sobre la línea celular MCF-7 y la *Artemia salina*.

La preparación del medio RPMI-1640 se efectuó de la siguiente manera:

A. Preparación de la solución. Se miden 55 L de agua destilada, que corresponde al volumen en que se debe disolver el medio que viene en polvo, agregar al medio en polvo a el 90% del volumen total de agua destilada y agitar suavemente. Se agregan 2 g. de bicarbonato de sodio por cada litro de medio, se completa el volumen final, agregando agua destilada, asegurarse de que todo el medio está bien disuelto. Ajustar el pH de la solución a 7.1 con ácido clorhídrico 1N o hidróxido de sodio 1N. El pH aumenta de 0.1 a 0.3 unidades durante el proceso de filtración, en el cual se pierde CO_2 . Esterilizar la solución en una campana de filtración, con filtro que posee poros de 2 μm de diámetro. El procedimiento se hace bajo presión positiva. Recolectar 440 ml de medio filtrado en botellas de vidrio transparente de una capacidad de 500mL. Se almacenan las botellas a 4°C.

B. Adecuación de la solución anterior para ser utilizada como medio de cultivo. Se toman 440 mL de la solución anterior y se calientan a 37°C por 15 minutos. Se agregan 50 mL de suero, el cual contiene un 50% de suero de becerro y un 50% de suero de caballo, previamente calentados a 37°C por 15 minutos. Se adicionan 5mL de la solución de antibiótico con penicilina/estreptomina, obteniéndose un volumen total de 500 mL.

La preparación de la solución balanceada de Hank se realizó de la siguiente manera: se pesan 9.5 g por litro de agua destilada a preparar. Se agregan al 90% del volumen de agua destilada a preparar, la cual debe preferiblemente estar a una temperatura entre 15-20°C y se agita suavemente. Agregar 0.35 g. de bicarbonato de sodio por litro de solución y agitar suavemente hasta que se disuelva completamente. Ajustar el pH de la solución a 7.0 utilizando HCl 1N o NaOH 1N. Esterilizar la solución con un filtro que tiene una membrana con unos poros de 2 μm . Tomar 2 ml de la solución estéril y ponerlos en un frasco de cultivo a incubar por 24 horas para valorar la posible contaminación bacteriana. Almacenar la solución a 4°C

Para la preparación de la glutamina se toman 5,844 g de L-glutamina y se colocan en un matraz de 250 mL. Se agregan 150 mL de agua destilada. Se disuelve agitando suavemente y se mantiene un pH de 7.0 utilizando NaOH 0.5 M. Se completa el volumen a 200 mL con agua destilada. Se determina

nuevamente el pH y se ajusta a 7.2 con NaOH 0.5N. La solución se filtra por medio de una unidad desechable que contiene una membrana con poros de 2 μm de diámetro. Se almacena la solución a 4°C.

Preparación de la tripsina. Se toman 4 mL de la preparación comercial Tripsina-EDTA(10X). Se agregan 36 mL de solución de Hank. Se almacena a una temperatura comprendida entre -5°C y -20°C.

Pasaje de las células en monocapa. Tomar la botella del medio de cultivo y la tripsina de la nevera y colocarlas a 37°C en baño de Maria por 30 minutos. Remover las células de la incubadora, las cuales se encuentran a una temperatura de 37°C y una concentración de CO_2 del 5%. Llevar reactivo biológico, medio y material a la cámara de flujo laminar. Decantar el medio que está dentro de la botella de cultivo dentro de un recipiente estéril, utilizando una pipeta o vertiendo directamente el contenido. Agregar 5 o 10 mL de tripsina de acuerdo al tamaño del frasco (25 o 75 mL respectivamente). Llevar células a la incubadora y dejarlas por 3 minutos. Sacar células de la incubadora y observar que se hayan desprendido agitando la botella de cultivo. Agregar 5 o 10 mL del medio de cultivo para neutralizar la tripsina (la cantidad de medio colocada siempre debe ser igual a la cantidad de tripsina usada). La suspensión se remueve con una pipeta y se coloca en tubos para centrifuga de 15 mL. Se centrifuga a 4 °C a 1500 rpm. por 5 minutos. Se desecha el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 5 mL de medio. Se centrifuga nuevamente a 4°C, 1500 rpm. por 5 minutos. Se desecha el sobrenadante. Se resuspende nuevamente el sedimento en 5 mL. de medio de cultivo. En un tubo estéril de 50 mL. se coloca la suspensión, se homogenizó pipeteando varias veces. Se toman 0.5 mL de la suspensión homogeneizada para el conteo y la valoración de la viabilidad. Se toman 10 μL y se colocan en una de las ranuras de la cámara para conteo de células. Se toman 20 μL de la suspensión celular y se mezclan con 20 μL de azul tripano. De esta mezcla se toman 10 μL y se colocan en la otra ranura de la cámara para conteo de células. Utilizando la siguiente fórmula se podrá saber cuantas células hay por mililitro.

(Número de células contadas / Número de cuadrantes contados) x 104

Las células coloreadas con azul de tripan, se cuentan de la misma forma y además se considera el número de células que se colorearon (células muertas) y se expresa el % de muertas con relación al número total de células contadas. Este valor corresponde al % de viabilidad.

De la suspensión anterior se toma 1 mL y se completa con 4 mL de medio para frascos de 25 mL o 9 mL para frascos de 75 mL. Se incuban a 37°C y a una concentración de CO_2 del 5%

por 5 días, hasta que la monocapa sea confluyente. Cambiando de medio de cultivo cada tercer día. Para realizar el cambio del medio de cultivo, se sacan las botellas de cultivo de la incubadora, se desecha el medio en un recipiente estéril. Se agregan 5 o 10 mL de nuevo medio, el cual ha sido previamente calentado a 37°C. Se llevan las botellas de cultivo nuevamente a la incubadora a 37°C y CO₂.

Desprendimiento de las células de los pozos. Luego de sembrar las células en cada pozo de la placa y dejar que la sustancia problema actúe, es necesario desprender las células del fondo de cada pozo para hacer su conteo y valorar su viabilidad. Primero se retira el medio de cultivo por aspiración con un gotero plástico. Se agregan 0.5 mL de Tripsina a cada pozo y se deja actuar a esta, por 3 minutos, dentro de la incubadora a 37°C y a 5% de CO₂. Se retira placa de cultivo de la incubadora y se agregan 1.5 mL de medio. Se homogeniza la suspensión anterior y se toman 10 mL para el hemocitómetro y 10 mL para valorar la viabilidad.

Crecimiento de la línea celular MCF-7. Para conocer el comportamiento del crecimiento celular bajo las condiciones del experimento se procede de la siguiente manera: se siembran 16 pozos con 200.000 células en 2 mL de medio de cultivo. Cada 12, 24, 33 y 48 horas se toman 4 pozos y se desprenden las células, se cuentan y se les valora la viabilidad.

Cultivo de las larvas de *Artemia salina*. Colocar los huevos dentro de un recipiente plástico de 11.3 cm de alto, 9.5 cm de largo y 10.5 cm de ancho. Agregar una solución de agua de mar preparada en el laboratorio con 37g de sal de mar y un litro de agua destilada. Cubrir el recipiente con una tapa que tiene en el centro un orificio de un diámetro de 4 cm. El agua debe llegar hasta este orificio. Se coloca aireación a el recipiente utilizando una de las salidas de aire en el laboratorio, a la cual se le conecta un tubo plástico y su extremo se une a un filtro poroso que se coloca dentro del recipiente para cultivo de las larvas. Se toma un frasco plástico cilíndrico de 7.5 cm de alto, 4.7 cm de diámetro, de color transparente y con tapa plástica que tiene un orificio en el centro de 0.5 cm, el cual contiene agua de mar y se coloca invertido dentro del orificio de la tapa del recipiente donde se colocaron los huevos de *Artemia salina*; 48 horas después se inicia la recolección de las larvas, utilizando una pipeta Pasteur 5 3/4 pulgadas se toman larvas del recipiente de recolección y se colocan en un acuario (tubo de vidrio tapa rosca de 8 mL de capacidad, 6 cm de alto y con un diámetro de 1.2 cm) que contiene 5 mL de agua de mar. Se colocan 10 mL de la solución de el compuesto a probar y se hace lectura a las 24 horas. La temperatura a la que se desarrollaron fue a 72° F

Evaluación del efecto del antibiótico presente en el medio de cultivo sobre el crecimiento de la línea celular MCF-7. Se

siembran 16 pozos con 200.000 células en 2 mL de medio de cultivo para valorar la actividad del antibiótico. 4 pozos tienen medio de cultivo y antibiótico y los 12 restantes están libres de antibiótico. A las 12, 24, 33, y 48 horas se hace conteo de las células y la viabilidad en cada uno de los 4 pozos seleccionados para cada uno de los tiempos establecidos.

Evaluación del efecto del dimetil sulfoxido sobre el crecimiento de la línea celular MCF-7. Se siembran 16 pozos con 200.000 células cada uno en 2 mL de medio de cultivo. En 4 pozos seleccionados al azar se colocan las células en 2 mL de RPMI sin agregarles DMSO, mientras que en los restantes se agrega a cada uno DMSO a la concentración utilizada cuando se prueban los compuestos en estudio. Se toman 4 pozos en cada uno de los siguientes intervalos de tiempo: 12, 24, 33 y 48 horas y se cuentan las células para valorar multiplicación celular y viabilidad de las mismas.

Evaluación de la actividad de los compuestos. Para valorar la actividad inhibitoria se toman las concentraciones 10⁻²M, 10⁻³M, 10⁻⁴M Y 10⁻⁵M y para valorar la actividad estimuladora se toman concentraciones 10⁻⁶M, 10⁻⁸M, 10⁻¹⁰M y 10⁻¹²M de cada uno de los compuestos. En cada pozo se siembran 200.000 células, las cuales están suspendidas en 2 mL de medio de cultivo. 12 horas mas tarde se agregan a cada pozo 20 mL de el compuesto a probar, disuelto en dimetilsulfoxido (DMSO). 12 horas después de haber colocado el compuesto a probar se procede a la lectura del número de células y a valorar la viabilidad en cada uno de los pozos. El experimento se hace por duplicado y se repite en tres tiempos diferentes.

Todas las pruebas se hacen por duplicado y se repiten en tres momentos diferentes. El análisis estadístico se hizo utilizando el test de Duncan con una p < 0.05 y un grado de confianza del 95%.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Evaluación del efecto del DMSO sobre la línea celular MCF-7. En las condiciones experimentales del laboratorio no se observó una diferencia estadísticamente significativa (p < 0.05) del crecimiento celular al adicionar el DMSO a las concentraciones utilizadas en el ensayo.

Evaluación del efecto de los antibióticos presentes en el medio de cultivo sobre el crecimiento de la población celular MCF-7. En las condiciones del experimento no se presentan diferencias estadísticamente significativas (p < 0.05) entre el crecimiento de la población celular en presencia de antibiótico o en ausencia del mismo, aunque al analizar los resultados, con respecto a tiempo se observa una diferencia en el crecimiento a las doce horas, con respecto a los otros tiempos, lo cual se podía explicar por las condiciones locales del experimento.

Inhibición del crecimiento de la línea celular MCF-7 por la adición de los compuestos de prueba. Analizando los resultados de cada uno de los compuestos y utilizando un diseño de bloques al azar se aplicó un test de estadística no paramétrica con una $p < 0.05$ y un grado de confianza del 95% y se obtuvieron los siguientes resultados: al considerar el efecto de la variable concentración únicamente se observa que la concentración $10^{-2}M$ presenta un posible efecto inhibitorio en todos los compuestos, mientras que las otras concentraciones no se diferencian entre sí significativamente, con respecto a la población celular. Estudiando únicamente el efecto de la variable compuesto se observa la formación de un grupo constituido por los compuestos (2) y (4) los cuales, presentan un probable efecto de crecimiento sobre la población celular, mientras el otro grupo está conformado por los compuestos (1), (3), (5), y tamoxifen grupo que no presenta una acción inhibitoria o estimulante del crecimiento celular que sea estadísticamente significativa.

Al analizar la variable compuesto-concentración frente a la población celular se observa que el compuesto (4) a la concentración $10^{-3}M$ presenta un efecto estimulador sobre el crecimiento de la población celular. Se observa que la actividad de los compuestos como inhibidores de la población de células MCF-7, no es estadísticamente significativa.

Estimulación del crecimiento en la línea celular MCF-7. Analizando la variable concentración cruzada con la variable compuesto se observa que el compuesto (2) a la concentración $10^{-6}M$ presenta una actividad estimuladora del crecimiento de la población celular que es significativamente diferente a los otros compuestos, seguida por el compuesto (4) a una concentración $10^{-12}M$.

Considerando únicamente la variable tratamiento, también se observa como los compuestos (2) y (4) se diferencian de manera significativa ($p < 0.05$) del resto de compuestos, presentando una acción estimulante del crecimiento de la población celular.

Evaluación de los compuestos en el bioensayo con Artemia salina. La variable considerada fue el porcentaje de mortalidad, observándose que los compuestos (4) y el tamoxifen (utilizado como control positivo) presentan una mortalidad estadísticamente significativamente sobre la *Artemia salina* a las concentraciones de $10^{-2}M$ para el primero y a las concentraciones $10^{-2}M$ y $10^{-3}M$ para el segundo ($p < 0.05$), mientras que el compuesto (3) no presenta ninguna actividad. Además los compuestos (2) y (3) a concentraciones de $10^{-5}M$ al parecer no presentan mortalidad significativa sobre la población de *Artemia salina*, mientras que a concentraciones de $10^{-2}M$ la mayoría de los compuestos reflejan algún grado de mortalidad, que no es estadísticamente significativa.

CONCLUSIONES

Los compuestos estudiados no presentaron una acción inhibitoria del crecimiento, estadísticamente significativa, sobre la línea celular MCF-7.

La actividad inhibitoria en la línea celular, de algunos compuestos, considerando sólo la variable concentración, se manifestó a concentraciones de $10^{-2}M$. Concentración considerada muy alta e indicadora probablemente de una respuesta muy inespecífica, pues probablemente para lograr estas concentraciones en animales o humanos se necesitarían cantidades de el compuesto supremamente grandes, lo cual aumentaría los efectos tóxicos del compuesto.

Los bioensayos con *Artemia salina* y con líneas celulares detectaron una probable actividad del compuesto 3, 11 beta, 17 beta estratriol (4), pero dando mas información la prueba con la línea celular, pues ésta permitió observar un probable efecto estimulador del compuesto a concentraciones que se esperaban fueran inhibitorias.

El bioensayo con "*Artemia salina*" al parecer detecta un amplio rango de actividades, sin precisar que clase de actividad, mientras que con la línea celular se detecta la actividad y además se puede caracterizar un poco mejor.

El compuesto 3, 11 beta, 17 beta estratriol (4) actuó como estimulador del crecimiento de la línea celular MCF-7 en concentraciones de $10^{-3}M$ hasta $10^{-12}M$.

En el bioensayo con *Artemia salina* los compuestos 3, 11 alfa, 17 beta estratriol (3), 4-nitro-3, 17-epidihidroestratrieno (1), 3-metoxi-4-nitro estratriol (2) y el 3, 17-epidihidroxi-estratrien-11-ona (5) no mostraron actividad estadísticamente significativa.

BIBLIOGRAFIA

1. Abaunza, H., "*Cáncer mamario*", Federación Latinoamericana de cirugía. F.E.L.A. Bogotá (1987) pág. 12
2. Newman, M., *J. Nat. Cáncer Inst.* 82 (15) 1239 (1990)
3. Shapiro, S., *J. Nat. Cáncer Inst.* 83 (21) 1522 (1991)
4. Frigber, N., et al., *Advances in Surgery*, 23, 119-194 (1990)
5. Edward, S. et al., *J. Nat. Cáncer Inst.* 83 (21) 745 (1991)
6. Taormina, Italy., *Breast Cáncer Res. Treat.* 22:163 (1991)
7. Mayzel, K., et al., *J. Nat. Cáncer Instit.* 84 (15):1143. (1992)

8. Leherer, S., et al., *Cancer*. 69:981 (1992.)
9. Williams, M., et al., *Br. J. Surg.* 73:752-755 (1986)
10. Dickson, R., et al., *Cancer Res.* 46: 1707 (1986)
11. Kingle, P., et al., *J. Steroid Biochem Molec. Biol.* 43 (4):249 (1992)
12. Dickson R., et al., *Endocrinol Rev.* 8:29 (1987)
13. Horwitz, K., et. al., *J. Biol Chem.* 253:8185 (1987)
14. Wilson, J. «William's Endocrinología». Editorial Médica Panamericana, séptima edición. México D.F. (1989) pág 56.
15. Osborne, C., et al., *Cáncer*. 46:2884 (1980)
16. Gilvarry, U., et al., *Cáncer Res.* 50:3390 (1990)
17. Graham, K., et al., *Cáncer Res.* 45:220 (1985)
18. Stryer, L., «Bioquímica». Ed. Reverté. Tercera edición. Tomo II, Barcelona. (1988.) pag. 1006.
19. Stack, G., et al., *Cáncer Treat. Research.* 40:185 (1988)
20. McGuire, W., et al., *Semin. Oncol.* b:428 (1978)
21. Lerner, L., et al., *Endocrinology.* 63:295 (1958)
22. Lippman, M., et al., *Breast Cancer Res. Treat.* 4:69 (1984)
23. Clarke, R., et al., *Proc Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 86:3649 (1989)
24. Gronemeyer, H., et al., *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 41 (3-8): 217 (1992)
25. Gronemeyer, H., et al., *A. Rev. Genenet.* 25:89 (1991)
26. Renoir, J., et al., *J. Biol. Chem.* 265:10740 (1990)
27. Jordan, V., et al., «Antiestrogen action in experimental breast cancer in endocrine treatment of breast cancer: A new approach. Recent results in cancer research». Vol 75 Henning Sen B, Linder F., Steichelec (Eds.): Spriger-Verlag. Berlin (1980) pág 30.
28. Jordan V., et al., *Endocri. Rev.* 11:578 (1990)
29. Jordan, V., et al., «Resistance to antiestrogen therapy. In drug resistance». Kessel D. et al. Ed. CRC Press. Boca ratón FL, (1988) pág 403.
30. Leclerq, G., et al., *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 41 (3-8):545 (1992)
31. Kiang, D., et al., *Cáncer Res.* 49:5312 (1989)
32. Farr B., et al., *Pharmacol Ther.* 25:127 -133 (1984)
33. Jordan, V., et al., *Cáncer Res.* 47:624 (1987)
34. Fisher, B., et al., *Ann Int. Med.* 106:649 (1987)
35. Early Breast Cancer Trials Collaborative Group. *N. Eng. J. Med.* 319:1681 (1988)
36. Hell, R., *Drugs*, 16, 1-24 (1978)
37. Gottardis, M., et al., *Cáncer Res.* 48:812 (1988).
38. Jordan, V., et al., *J. Endocrinol.* 65:151 (1975)
39. Jordan, V., et al., *Lancet* 11: 733 (1989)
40. Tannenbaum, G., et al., *Endocrinology*, 130:3395 (1992)
41. Groom, G., *J. Endocrinol.* 70:421 (1976)
42. Sheard, C., et al., *Br. J. Cáncer.* 54:705 (1986)
43. Rotstein, S. et al., *Breast Cancer Res. Treat.* 12 :75 (1988)
44. Berry, J. et al., *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 42:517 (1987)
45. Hee, I. R. et al., *Drugs*, 16:1 (1978)
46. Ron, I. et al., *Cáncer*, 69:1415 (1992)
47. Endicott, J. et al., *Annu. Rev. Biochem.* 58:137 (1989)
48. Pastan, I., et al., *N. Engl. J. Med.* 316:1388-1393 (1987)
49. Bradley, G., et al., *Cancer Res.* 49:2790 (1989)
50. Osborne, M., et al., *Cancer Research.* 52:1477 (1992)
51. Cuzik, J., et al., *Lancet*, 3:83 (1986)
52. Soule, H., et al., *J. Nat. Cancer Ins.* 51 :1409 (1973)

53. Soto, A., et al., *J. Steroid Biochem.* 23 :87 (1985)
54. Lippman, M., et al., *Recent. Prog. Horm. Res.* 45:383 (1989)
55. Lipman, M., et al., *J. Cell. Biochem.* 35:1 (1987)
56. Thorsen, T., et al., *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 41 (3-8):537 (1992)
57. Anderson, J.E., Goetz, C.M., McLaughlin, J.L., Suffness, M., *Phytochemical Analysis*, 2, 107-111 (1991).