

UNIVERSIDAD DE GRANADA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA



TESIS DOCTORAL

**EFFECTO ANTITUMORAL DE EXTRACTOS
FUNCIONALES PROCEDENTES DE SEMILLAS
DE *EUPHORBIA LATHYRIS* EN CANCER DE
COLON**

Memoria presentada por **Dña. Cristina Mesas Hernández**
para optar al grado de Doctora por la Universidad de Granada

Granada, 4 de marzo de 2021

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Cristina Mesas Hernández
ISBN: 978-84-1117-578-4
URI: <https://hdl.handle.net/10481/77698>

Índice

ÍNDICE	16
RESUMEN	22
SUMMARY.....	27
1. INTRODUCCIÓN	33
1.1 El cáncer. Generalidades y principales características	35
1.2 Cáncer de colon.....	42
1.2.1 Carcinogénesis del CCR.....	44
1.2.2 Factores de riesgo	46
1.2.3 Clasificación del cáncer colorrectal	48
1.2.4 Manifestación clínica y pruebas diagnósticas del CCR ..	54
1.2.5 Tratamientos del CCR.....	56
1.3 Extractos vegetales como fuente de compuestos antitumorales	58
1.4 Los polifenoles y su acción frente al cáncer.....	60
1.5 La especie <i>Euphorbia lathyris</i> como fuente de compuestos bioactivos.....	66
2. OBJETIVOS.....	73
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	78
3.1 Material vegetal	80
3.2 Obtención del extracto etanólico rico en polifenoles	81
3.3 Evaluación del contenido total de polifenoles.....	84

3.4	Capacidad antioxidante	85
3.5	Estudios cromatográficos	86
3.6	Cultivos celulares	87
3.7	Viabilidad celular	89
3.8	Western blot.....	90
3.9	Ensayo de migración.....	92
3.10	Ciclo celular.....	93
3.11	Ensayo de Alpha tubulina por inmunofluorescencia	95
3.12	Angiogénesis.....	96
3.13	RT-PCR.....	97
3.14	Lysotracker	100
3.15	Estudios estadísticos	101
4.	RESULTADOS.....	104
4.1	Efecto antitumoral del extracto etanólico de semillas de <i>Euphorbia lathyris</i> en cáncer de colon	106
4.1.1	Análisis de rendimiento y actividad antioxidante	106
4.1.2	Análisis por cromatografía de masas de compuestos bioactivos de los extractos etanólicos de <i>Euphorbia lathyris</i> ..	108
4.1.2.1	Análisis cromatográfico del extracto etanólico de semilla sin desengrasar de <i>Euphorbia lathyris</i>	108
4.1.2.2	Análisis cromatográfico del extracto etanólico de semilla desengrasada de <i>Euphorbia lathyris</i>	111

4.1.3	Efecto del extracto etanólico de <i>Euphorbia lathyris</i> sobre la viabilidad celular	114
4.1.4	Efecto del extracto etanólico de <i>Euphorbia lathyris</i> sobre el ciclo celular	117
4.1.5	Análisis de la migración celular	119
4.1.6	Modulación de la angiogénesis por el extracto etanólico de <i>Euphorbia lathyris</i>	121
4.1.7	Análisis de la modulación de la expresión de marcadores de células madre de cáncer de colon.	123
4.1.8	Análisis molecular de la inducción de la muerte celular por el extracto etanólico de <i>Euphorbia lathyris</i>	125
5.	DISCUSIÓN	129
6.	CONCLUSIONES	144
7.	BIBLIOGRAFÍA	150
8.	ANEXO 1. PUBLICACIONES	180

RESUMEN

El cáncer de colon es considerado un problema de salud pública a nivel mundial, siendo el tercer cáncer más prevalente actualmente. Su tratamiento está basado en cirugía, radioterapia y quimioterapia en los estadios más precoces y quimioterapia y anticuerpos monoclonales en los más avanzados de la enfermedad. A pesar de los grandes avances en detección precoz y nuevos tratamientos, la mortalidad continúa siendo elevada y son necesarias nuevas estrategias de búsqueda de agentes antitumorales más eficaces.

Los vegetales en general y sus extractos en particular poseen grandes aplicaciones en la salud debido al alto contenido en compuestos polifenólicos que presentan. Estos compuestos, además de la gran variabilidad estructural que los caracteriza, presentan una gran diversidad de acciones biológicas, entre ellas la antitumoral. En los últimos 20 años, más del 25% de los medicamentos proceden de plantas, mientras que otro 25% se deriva de productos naturales modificados. Este hecho indica la importancia, que en la actualidad existe, de la búsqueda de nuevos medicamentos a partir de especies vegetales.

El género *Euphorbia*, uno de los géneros más grande de plantas con flores, ha sido de gran interés desde la antigüedad debido a que el desarrollo de extractos a partir del látex, hojas, raíces y semillas de

especies de este género presentaban compuestos bioactivos con diferentes actividades, entre ellas la antitumoral.

Hasta el momento los extractos realizados emplean disolventes orgánicos altamente tóxicos y/o procesos de extracción de gran complejidad y duración tras los que se obtienen extractos con una gran variedad de componentes (flavonoides, cumarinas y terpenoides) que pueden aumentar la toxicidad de dichos extractos. Debido a esto, nuestra investigación ha desarrollado un extracto que presenta bioactividad favorable y puede obtenerse utilizando procesos de extracción sencillos, de corta duración y utilizando solventes no tóxicos, al tiempo que permite unos rendimientos de extracción adecuados. Esta metodología permite obtener extractos funcionales que presentan además una composición más específica de sustancias activas y de baja toxicidad como son los polifenoles de *Euphorbia lathyris*.

El objetivo de la presente tesis doctoral se centra en el estudio del poder antitumoral de extractos funcionales a partir de semillas, desengrasadas y sin desengrasar, de *Euphorbia lathyris* en líneas celulares de cáncer de colon, así como dilucidar los mecanismos de acción por los que los extractos funcionales inducen muerte celular.

Con objeto de caracterizar los extractos funcionales se llevaron a cabo análisis cromatográficos para identificar los compuestos bioactivos presentes en los extractos. Asimismo, se analizó la actividad

antioxidante que presentaban, así como la actividad antitumoral. Para ello, se realizaron cultivos celulares *in vitro* de las líneas T84, HCT-15 y CCD-18 en los cuales se testó el extracto etanólico de la semilla desengrasada y sin desengrasar de *Euphorbia lathyris*. Se llevaron a cabo estudios de proliferación celular con sulforrodamina B, así como ensayos más específicos para determinar los mecanismos moleculares por los que actúan los extractos funcionales, como el ensayo del ciclo celular mediante la técnica de tinción con yoduro de propidio, estudios de Western Blott para determinar apoptosis mediante la activación de las caspasas, estudios de autofagia mediante el ensayo de lysotracker, estudios de RT-qPCR para determinar marcadores específicos de células madre tumorales (CSCs), estudios de migración celular para determinar si los extractos funcionales actúan sobre la invasividad celular, así como ensayo de angiogénesis e inmunofluorescencia para alfa tubulina.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la enorme capacidad antitumoral del extracto etanólico a partir de semillas, desengrasadas y sin desengrasar, de *Euphorbia lathyris* en las líneas celulares de cáncer de colon mencionadas. Entre los mecanismos de acción antitumoral destaca la activación de la autofagia celular y en menor medida la apoptosis por la vía intrínseca de las caspasas. Asimismo, el extracto etanólico a partir de semilla desengrasada de *Euphorbia lathyris* reduce la migración celular y modula la

angiogénesis tumoral *in vitro*, mostrando así misma actividad frente a las células madre tumorales.

Como conclusión, cabe destacar la patente actividad antitumoral de los extractos funcionales obtenidos a partir de semilla, desengrasada y sin desengrasar, de *Euphorbia lathyris* siendo de gran interés plantear futuros ensayos *in vivo* de los mismos, tanto mediante la administración intravenosa de los extractos etanólicos.

SUMMARY

Colon cancer is considered a public health problem worldwide, being the third most prevalent cancer today. Its treatment is based on surgery, radiotherapy and chemotherapy in the earliest stages and chemotherapy and monoclonal antibodies in the most advanced stages of the disease. Despite the great advances in early detection and new treatments, mortality continues to be high and new search strategies for more effective antitumor agents are necessary.

Vegetables in general and their extracts in particular have great applications in medicine due to the presence of polyphenolic compounds. These compounds, in addition to the great structural variability that characterizes them, have a great diversity of biological actions, including antitumor. In the last 20 years, more than 25% of medicines come from plants, while another 25% are derived from modified natural products. This highlights the importance of the search for new drugs from plant species.

Colon cancer is considered a public health problem worldwide, being the third most prevalent cancer today. Its treatment is based on surgery, radiotherapy and chemotherapy in the earliest stages and chemotherapy and monoclonal antibodies in the most advanced stages of the disease. Despite the great advances in early detection and new treatments, mortality continues to be high and new search strategies for more effective antitumor agents are necessary.

The genus *Euphorbia*, one of the largest genera of flowering plants, has been of great interest since ancient times because the development of extracts from latex, leaves, roots and seeds of species of this genus presented bioactive compounds with different activities, including antitumor.

Up to now, the extracts made use highly toxic organic solvents and / or extraction processes of great complexity and duration, after which extracts are obtained with a wide variety of components (flavonoids, coumarins and terpenoids) that can increase the toxicity of said extracts. Because of this, our research has developed an extract that exhibits favorable bioactivity and can be obtained using simple, short-term extraction processes and using non-toxic solvents, while allowing adequate extraction yields. This methodology makes it possible to obtain functional extracts that also present a more specific composition

of active substances with low toxicity, such as the polyphenols of *Euphorbia lathyris*.

The objective of this doctoral thesis is to study the antitumor power of functional extracts from seeds, degreased and without degreasing, of *Euphorbia lathyris* in colon cancer cell lines, as well as to elucidate the mechanisms of action by which the extracts functional cells induce cell death.

To characterize the functional extracts, chromatographic analyzes were carried out to identify the bioactive compounds present in the extracts. Likewise, the antioxidant activity they presented was analyzed as well as the antitumor activity. For this, in vitro cell cultures of the T84, HCT-15 and CCD-18 lines were carried out in which the ethanolic extract of the defatted and non-defatted seed of *Euphorbia lathyris*. Cell proliferation studies were carried out with sulforhodamine B, as well as more specific tests to determine the molecular mechanisms by which functional extracts act, such as the cell cycle test using the propidium iodide staining technique, Western Blott studies to determine apoptosis through the activation of caspases, autophagy studies through the lysotracker assay, RT-qPCR studies to determine specific markers of CSCs, cell migration studies to determine if functional extracts act on cell invasiveness, as well as an angiogenesis and immunofluorescence assay for alpha tubulin. Likewise, in vitro

digestibility tests have been carried out on the protein hydrolyzate to determine if the peptide matrix protects the bioactive polyphenolic compounds and these, after a digestion process, maintain their properties and have the potential to be dialyzed into blood.

The results obtained show the enormous antitumor capacity of the ethanolic extract and the protein hydrolyzate from seeds, defatted and without defatting, of *Euphorbia lathyris* in the colon cancer cell lines mentioned. Among the antitumor action mechanisms, the activation of cellular autophagy and, to a lesser extent, apoptosis by the intrinsic caspase pathway stands out. Likewise, the ethanolic extract from the defatted seed of *Euphorbia lathyris* reduces cell migration and modulates tumor angiogenesis in vitro, as well as acting as a target against tumor stem cells.

In conclusion, it is worth highlighting the patent antitumor activity of the functional extracts obtained from seed, defatted and without degreasing, of *Euphorbia lathyris*, and it is of great interest to propose future in vivo tests of them, both as intravenous administration with ethanolic extracts.

1. Introducción

1.1 El cáncer. Generalidades y principales características

Siendo una de las patologías con mayor incidencia a nivel mundial, el cáncer se define como un conjunto de enfermedades relacionadas que se caracterizan por presentar diversas alteraciones a nivel celular que conllevan un exceso de proliferación y supervivencia de las células malignas (American Cancer Society, 2021).

Las células se caracterizan por presentar un mecanismo de muerte celular programada o apoptosis en la que una vez que crecen y se dividen, acaban muriendo cuando estas presentan un daño celular o simplemente envejecen. Sin embargo, cuando este proceso se ve truncado, principalmente por alteraciones en el material genético, las células proliferan sin interrupción, generando una descendencia con la misma mutación (clones) y transformándose en células cancerígenas pudiendo originar un cáncer en cualquier parte del organismo. Este proceso de transformación de una célula normal a una célula cancerosa se denomina carcinogénesis (Peters y Gonzalez, 2018; Zhang y Weinberg, 2018).

Según el origen y la estructura de los tumores podemos distinguir entre tumores sólidos o tumores líquidos. Los tumores sólidos son aquellos en las que las células tumorales forman una masa, mientras

que los tumores líquidos se originan en las células sanguíneas como serían las leucemias y linfomas.

Un tumor se encuentra definido por varias particularidades. Además de caracterizarse por una proliferación celular descontrolada, los tumores son capaces de crear un microambiente tumoral con el que llevan a cabo interacciones celulares para promover su propio crecimiento. Este microambiente, el cual interfiere en la respuesta terapéutica, está formado principalmente por células tumorales en progresión, estroma tumoral, vasos sanguíneos que irrigan y nutren al tumor, células inflamatorias infiltrantes y una gran variedad de células asociadas. (Arneth, 2019; Wu y Dai, 2017).

Este microambiente, una vez establecido, se convierte en una barrera eficaz con el que es capaz de evadir el sistema inmunitario. (Whiteside, 2008) Normalmente, las células tumorales pueden ser eliminadas por el sistema inmune mediante la inmunovigilancia tumoral, pero cuando estas son capaces de evadirlo es cuando se desarrolla una neoplasia (Binnewies y cols., 2018). Esto se debe a que las células tumorales secretan citoquinas, quimiocinas y otros factores que les permite modular el microambiente tumoral mediante la reprogramación de las células circundantes. En el estroma tumoral, la presencia de células inmunitarias tanto pertenecientes a la respuesta inmune innata (macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células

linfoides innatas, células supresoras derivadas de mieloides y células natural killer) como a la respuesta inmune adaptativa (células T y células B) están implicadas en el crecimiento tumoral cuando se encuentran en el microambiente tumoral (TME), debido a la comunicación cruzada existente entre las células cancerosas y las células inmunes proximales, dando como resultado un entorno favorable para el crecimiento y la metástasis del tumor (Hinshaw y Shevde, 2019).

Para obtener los nutrientes necesarios para su crecimiento, las células tumorales son capaces de ejercer efecto sobre el microambiente que les rodea, favoreciendo la formación de nuevos vasos sanguíneos que irrigen al tumor obteniendo el aporte nutricional necesario para seguir creciendo e invadiendo, proceso conocido como angiogénesis. Existen moléculas anti- y pro-angiogénicas que regulan estrictamente la angiogénesis en tejidos normales. Sin embargo, en los tumores, este balance se encuentra truncado favoreciendo el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir de células endoteliales próximas debido a los altos niveles de factores pro-angiogénicos que liberan las células tumorales (Viallard y Larrivé, 2017). Esta formación vascular presenta características anormales ya que forman una vasculatura muy variable en forma, tamaño y sin organización jerárquica como ocurriría en un tejido normal. Además, ciertas peculiaridades del tumor, como la hipoxia, pH bajo, una matriz extracelular desorganizada, tensiones

mecánicas así como mediadores liberados por las células tumorales, entre otros, estimulan la producción de citoquinas angiogénicas tales como VEGF, factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), así como otros mecanismo que favorecen una angiogénesis muy elevada (Li y cols., 2018; Zanutelli y Reinhart-King, 2018).

Un aspecto a destacar es el hecho de que el tumor no está constituido por una población homogénea celular. Se caracteriza principalmente por estar formado por una población heterogénea de células con características diferentes. Una de las poblaciones celulares dentro del tumor más importantes son las células madre tumorales (CSCs). Estas son las encargadas de la autorrenovación de la población celular tumoral y son las principales células encargadas de la propagación e invasividad tumoral. Las CSCs presentan marcadores de superficie celular propios con las que se les identifican (CD44, CD24 y CD133). Estas células, además, son resistentes a los tratamientos convencionales de quimioterapia y radioterapia, provocando la recidiva de los tumores y la aparición de metástasis, ya que son capaces de migrar hacia otras partes del cuerpo mediante la invasión del sistema circulatorio o linfático, llegando a zonas lejanas. Por tanto, actualmente la investigación se está focalizando en la búsqueda de nuevos fármacos

que tengan como objetivo eliminar las CSCs (Barbato y cols., 2019; Nassar y Blanpain, 2016; Yu y cols., 2012).

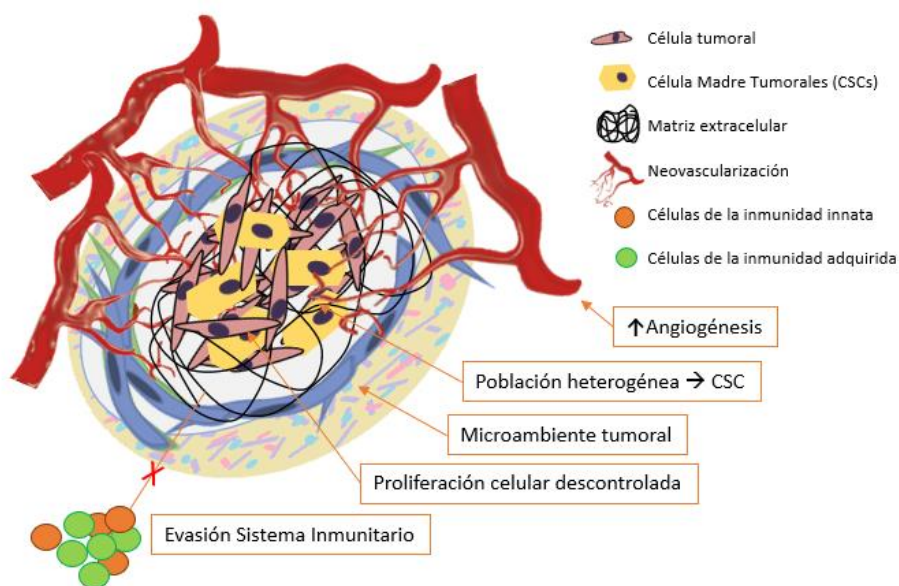
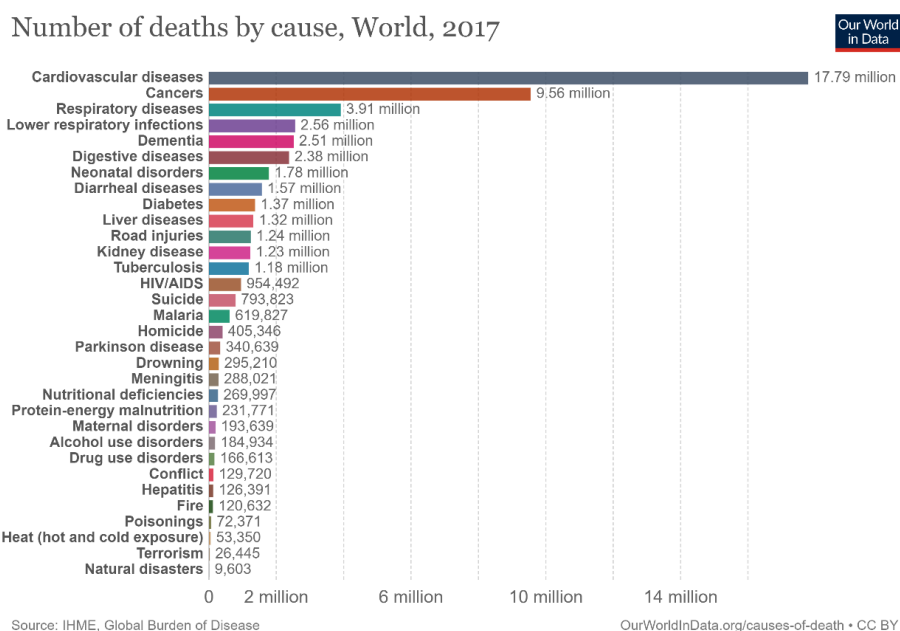


Figura 1. Representación esquemática de las principales características que presenta un tumor, destacando una proliferación celular descontrolada, el aumento de la angiogénesis, estar constituidos por una población celular heterogénea entre la que destacan las CSCs, la presencia de un microambiente tumoral y la capacidad de evadir el sistema inmunitario.

A pesar de los grandes avances científicos en detección precoz y tratamientos avanzados empleados, el cáncer sigue siendo la principal causa de muerte a nivel mundial. Según los datos proporcionados por la

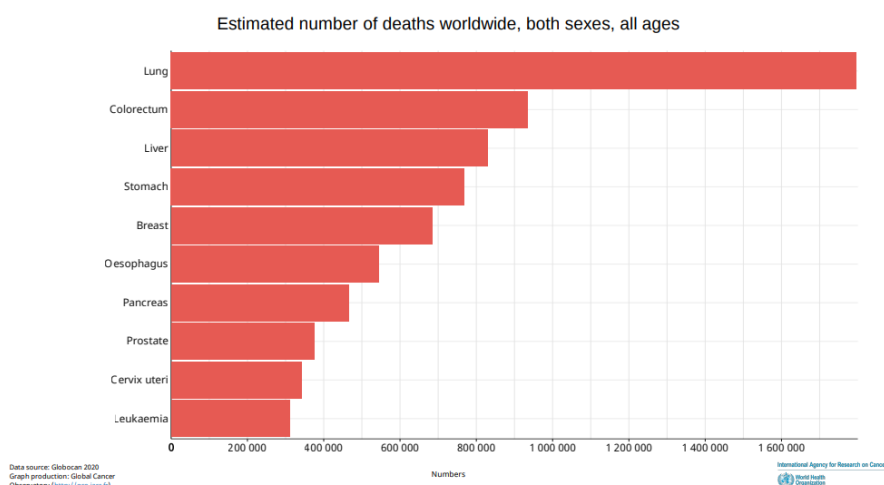
Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer fue la segunda causa de muerte en el mundo con 8,8 millones de defunciones en 2017 (Cancer Today, 2021).



Gráfica 1. Representación de las principales causas de muertes en el mundo registrados en el año 2017. Tomado de: <https://gco.iarc.fr/today/>

Actualmente, según los datos de la OMS del 2020, de todos los tipos de cáncer que existen, los cinco que provocan un mayor número de defunciones anuales son el cáncer de pulmón (1,79 millones), seguido

del cáncer colorrectal (935.173), cáncer hepático (830.180), cáncer gástrico (768.793) y cáncer de mama (684.996) (Cancer Today, 2021).



Gráfica 2. Representación del número estimado de muertes a nivel mundial, sin exclusión por sexo ni edad, a causa de los diferentes tipos de cáncer. Globocan 2020. Tomado de: <https://gco.iarc.fr/today/>

De los 19,3 millones de nuevos casos que se detectaron en 2020, se estima que, en 2040, esta cifra incrementará alcanzando los 30,2 millones de nuevos casos de cáncer (Cancer today, 2021).

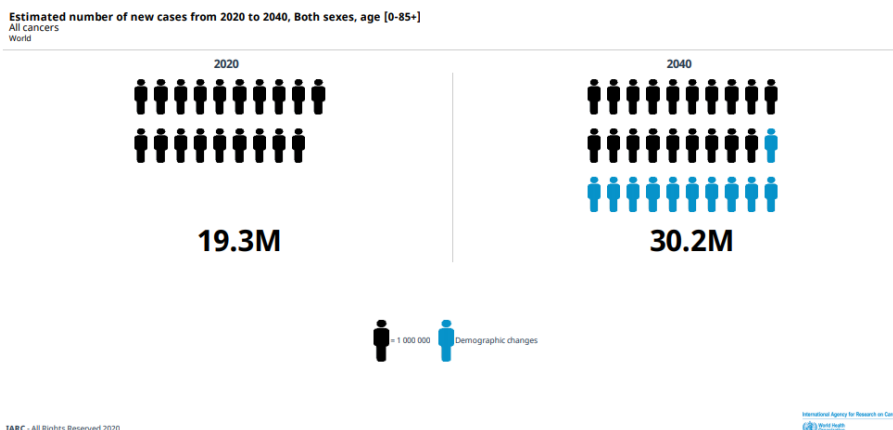


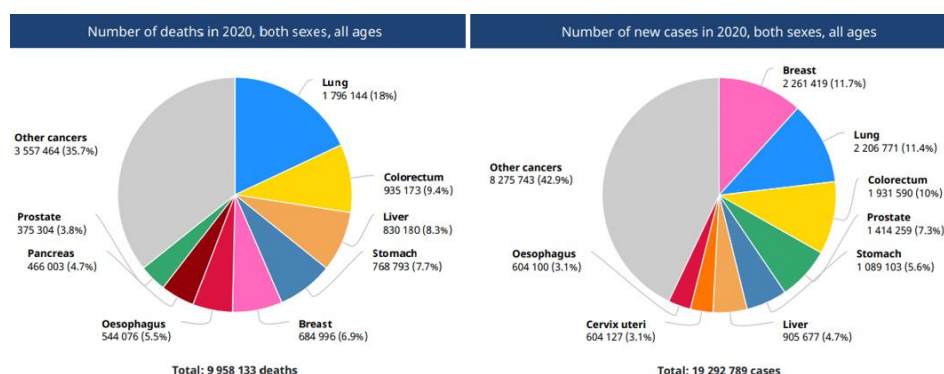
Figura 2. Representación del número estimado de nuevos casos desde el año 2020 hasta el 2040, incluyendo ambos sexos y todas las edades. Tomado de: <https://gco.iarc.fr/today/>

1.2 Cáncer de colon

El cáncer colorrectal (CCR) es considerado un auténtico problema de salud pública a nivel mundial debido a su incidencia y a la falta de tratamientos efectivos en estadios avanzados (SEOM, 2019).

Según datos de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) a nivel mundial, el CCR es el tercer cáncer más común y la segunda causa de muerte por cáncer, representando entre uno y dos millones de nuevos casos cada año. En España, el CCR es el tumor más frecuentemente diagnosticado en ambos sexos, siendo el segundo en frecuencia tanto en varones como en mujeres. En relación a su

mortalidad y de acuerdo al Instituto Nacional de Estadística, a fecha de diciembre de 2020, el CCR representaba el segundo cáncer en importancia en cuanto al número de muertes en ambos sexos. Esta mortalidad posee una clara tendencia de crecimiento que se ha demostrado está relacionada con el estilo de vida y con la dieta (SEOM, 2020).



Gráfica 3. A) Representación gráfica del número de muertes por tipo de tumor en 2020 incluyendo ambos sexos y todas las edades. B) Representación gráfica sobre el número de nuevos casos en diferentes tipos de tumores en el año 2020 incluyendo ambos sexos y sin limitación por edad. Tomado de: <https://gco.iarc.fr/today/>

1.2.1 Carcinogénesis del CCR

El CCR se puede originar a partir de células de la mucosa colónica, a partir de pólipos precancerosos, clasificados como adenomas tubulares tradicionales o pólipos serrados. En el colon, debido a la pérdida continua de células superficiales de la mucosa intestinal, se requiere una renovación celular constante. Esta renovación ocurre con la proliferación celular que se lleva a cabo en la base de las criptas. Cuando se origina una célula tumoral, al avanzar hacia la luz del colon, se forma un pólipo adenomatoso discreto. Con el tiempo estos pólipos aumentan de tamaño, desarrollan características displásicas y generan un tumor que puede adquirir potencial invasivo (Nguyen y cols., 2020).

La carcinogénesis colorrectal es debida la acumulación gradual de cambios moleculares complejos que incluyen entre otros: i) mutaciones genéticas (mutaciones en el gen APC), ii) cambios epigenéticos (metilación del ADN) y iii) factores ambientales. Estos cambios moleculares provocan una proliferación descontrolada de determinadas células y como consecuencia la generación de un tumor (Keum y Giovannucci, 2019).

De las posibles mutaciones genéticas implicadas en la carcinogénesis del CCR destacamos las mutaciones de los genes APC, KRAS, TGFBR2 y TP53, principales impulsores del desarrollo y progresión maligna del CCR. De estas mutaciones, destaca por su

importancia y por ser uno de los primeros mecanismos genéticos que impulsan el proceso neoplásico, las del gen APC. El 80% de las mutaciones se encuentran en este gen supresor tumoral, provocando la pérdida de su función y como consecuencia una proliferación celular descontrolada (Nakayama y Oshima, 2019; Zhang y Shay, 2017).

Además de mutaciones en genes específicos, cabe destacar la inestabilidad de microsatélites. Se trata de mutaciones localizadas en regiones codificadas o promotoras en las secuencias microsatélites, las cuales derivan la alteración del sistema de reparación de errores de emparejamiento durante la replicación del ADN, controlado por los genes de la familia MMR, como MLH1 y MSH2 (Keum y Giovannucci, 2019).

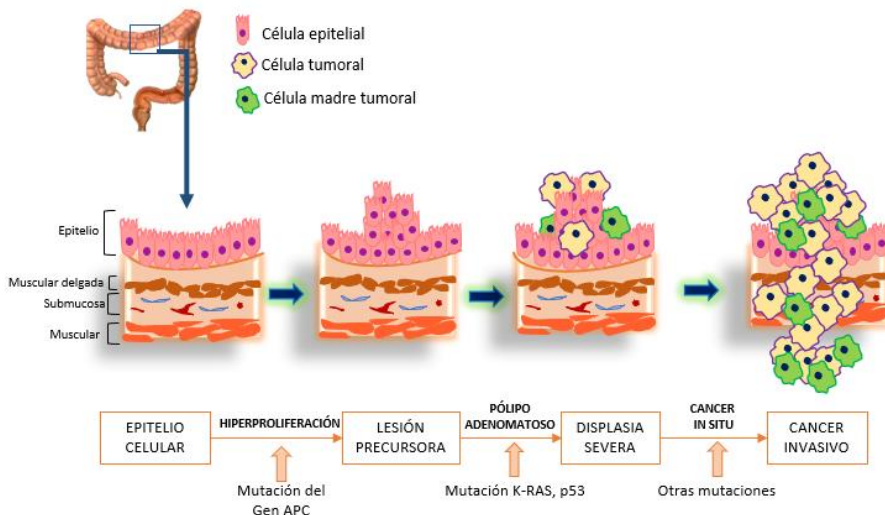


Figura 2. Representación de la carcinogénesis del cáncer de colon en sus diferentes etapas, así como las principales mutaciones que promueven su formación.

En segundo lugar, las alteraciones epigenéticas también juegan un papel crucial en la generación del CCR. La metilación del ADN, la modificación de las histonas, la remodelación de los nucleosomas y la focalización mediada por el ARN regulan muchos procesos biológicos que son fundamentales para la génesis del cáncer. Los cambios epigenéticos más frecuentes son las alteraciones en la metilación (hipermetilación) de las islas CpG de los promotores génicos asociadas a inestabilidad de los microsatélites y mutaciones en BRAF. Sin embargo, también se han podido detectar alteraciones en la metilación del ADN asociadas a mutaciones del gen KRAS pero no a la inestabilidad de los microsatélites. (Dawson y Kouzarides, 2012; Kanwal y cols., 2015; Nebbioso y cols., 2018).

1.2.2 Factores de riesgo

Los estudios epidemiológicos indican que los factores genéticos y los ambientales son los principales factores de riesgo para el desarrollo del CCR.

En relación a los factores genéticos, representan más del 20% del total de casos de CCR, considerándose de alto riesgo las personas que han sufrido un CCR previo, personas con antecedentes familiares (factores genéticos o familiares) ya que en el 25% de los casos existe un antecedente familiar y en el 10% existe un componente hereditario y, personas con enfermedades predisponentes, especialmente por presencia de pólipos intestinales o con enfermedad intestinal inflamatoria (Kuipers y cols., 2015; Lin, 2009).

Entre los factores ambientales, la edad es el principal factor que influye en este tipo de patología, diagnosticándose en personas mayores de 50 años en el 90% de los casos sin otras patologías previas, clínicas ni enfermedades predisponentes. Además, cabe destacar que el consumo excesivo de alcohol, el sobrepeso y obesidad, el tabaquismo, la vida sedentaria y ciertos tipos de alimentos (factores dietéticos) como carne procesada, han sido relacionados con esta patología (Park y cols., 2007; Roslan y cols., 2019). Una dieta equilibrada y ejercicio físico son fundamentales para una prevención primaria. Se ha demostrado que una dieta baja en fibra y rica en grasas o hidratos de carbono refinados incrementan el riesgo de cáncer de colon (Howard y cols., 2008; Thanikachalam y Khan, 2019)

1.2.3 Clasificación del cáncer colorrectal

Según la clasificación histológica del CCR, el 90-95% de los casos diagnosticados se corresponden con el adenocarcinoma que puede ser de dos tipos: adenocarcinoma coloide o mucinoso y el adenocarcinoma de células en anillo de sello. Entre el resto de tipos histológicos de CCR, con una incidencia muy inferior encontramos el carcinoma escamoso y adenoescamoso, tumores carcinoides, tumores neuroendocrinos, linfomas con una incidencia inferior al 1% y finalmente a los sarcomas con una incidencia del 0,1% (Tamas y cols., 2015).

La estadificación del CCR se basa en el sistema TNM. En esta clasificación, los especialistas utilizan los resultados de las pruebas diagnósticas para describir la localización del cáncer, la posible diseminación y si está afectando a otras partes del cuerpo (Freeman, 2013; NIH, 2011). De esta manera, las siglas TNM junto a una numeración nos proporciona la información específica para clasificar correctamente el tumor:

- **Tumor (T):** Localización, número de tumores y desarrollo del mismo.
 - **TX:** Tumor primario no evaluable.
 - **To:** Sin evidencia de cáncer en colon o recto.
 - **Tis:** Referido al cáncer in situ. Las células tumorales se localizan en el epitelio o lámina propia, es decir, en las

- capas superiores que recubren el interior del colon o el recto.
- **T1:** El tumor primario invade la submucosa.
 - **T2:** El tumor primario invade la capa muscular propia.
 - **T3:** El tumor primario invade la capa muscular propia alcanzando tejidos pericólorrectales.
 - **T4a:** El tumor primario invade la superficie del peritoneo visceral, lo que significa que ha atravesado todas las capas del colon.
 - **T4b:** El tumor primario invade o se adhiere a otros órganos o estructuras.
- **Nodo (N):** Presencia de diseminación a ganglios linfáticos regionales (cerca del colon y recto), localización y número de afectados.
- **NX:** Ganglios linfáticos regionales no evaluables.
 - **No:** No invasión de ganglios linfáticos regionales.
 - **N1a:** 1 ganglio linfático regional invadido por células tumorales.
 - **N1b:** 2 o 3 ganglios linfáticos regionales invadidos por células tumorales.

- **N1c:** Presencia de nódulos formados por células tumorales localizados cercanos al colon, pero no se relacionan con ganglios linfáticos.
- **N2a:** De 4 a 6 ganglios linfáticos regionales invadidos por células tumorales.
- **N2b:** 7 o más ganglios linfáticos regionales invadidos por células tumorales.

- **Metástasis (M):** Hace referencia a la diseminación del tumor a otras partes del cuerpo, metástasis a distancia.
 - **M0:** no existen metástasis.
 - **M1a:** metástasis en un órgano distinto al colon o recto.
 - **M1b:** metástasis en más de un órgano distinto al colon o recto.
 - **M1c:** metástasis en la superficie peritoneal.

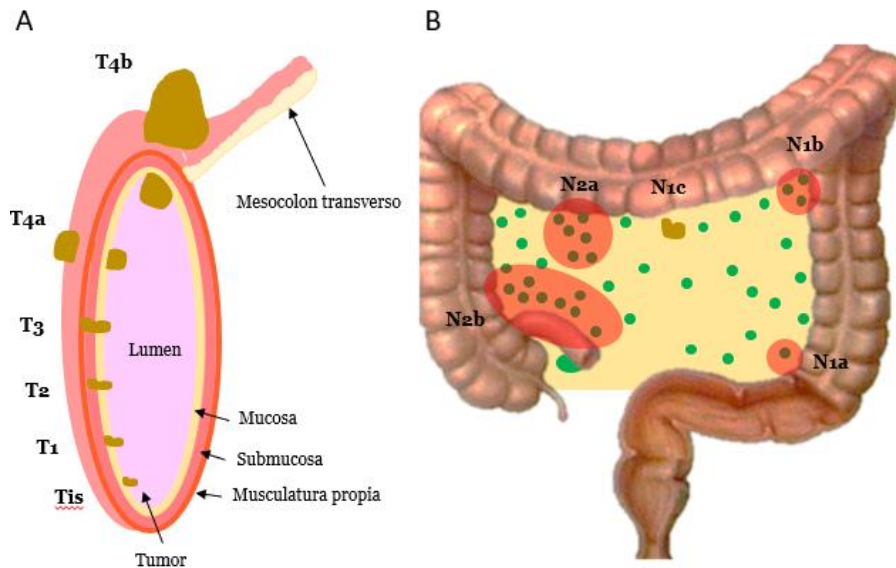


Figura 3. Representación del a estadificación del CCR basada en el sistema TNM. A) Clasificación según la localización y desarrollo del tumor. B) Clasificación según la diseminación a ganglios linfático regionales.

En combinación con la clasificación TNM, existe una clasificación por etapas:

- **Estadio 0:** se trata del cáncer in situ. El tumor se localiza en la mucosa o revestimiento interno del colon o recto
 - **Tis, No, Mo**
- **Estadio I:** el tumor ha invadido la capa muscular sin diseminarse a ganglios linfáticos regionales ni órganos.

- **T1, No, Mo**
- **T2, No, Mo**
- **Estadio IIA:** el tumor ha invadido la pared del colon o recto sin diseminación a ganglios linfáticos ni metástasis.
 - **T3, No, Mo**
- **Estadio IIB:** el tumor ha invadido el peritoneo visceral sin diseminación a ganglios linfáticos regionales ni metástasis.
 - **T4a, No, Mo**
- **Estadio IIC:** el tumor ha invadido la pared del colon y ha crecido hacia estructuras cercanas sin diseminación a ganglios linfáticos regionales ni metástasis
 - **T4b, No, Mo**
- **Estadio IIIA:** el tumor ha invadido el revestimiento interno o hacia capas musculares del intestino, se ha diseminado a 1 a 3 ganglios linfáticos regionales, pero no hay metástasis.
 - **T1, N1, Mo / T1, N1c, Mo**
 - **T2, N1, Mo / T2, N1c, Mo**
 - **T1, N2a, Mo**
- **Estadio IIIB:** el tumor ha invadido la pared intestinal o hacia órganos cercanos con diseminación hacia 1 a 3 ganglios linfáticos regionales o nódulos tumorales no ganglionares, sin metástasis.
 - **T3, N1, Mo / T3, N1c, Mo**

- **T4a, N1, Mo / T4a, N1c, Mo**
- **T2, N2a, Mo**
- **T3, N2a, Mo**
- **T1, N2b, Mo**
- **T2, N2b, Mo**
- **Estadio IVA:** existencia de metástasis en un solo órgano del cuerpo.
 - **Cualquier T, cualquier N, M1a**
- **Estadio IVB:** existencia de metástasis en varios órganos del cuerpo.
 - **Cualquier T, cualquier N, M1b**
- **Estadio IVC:** tumor diseminado al peritoneo con posibilidad de metástasis a otros órganos.
 - **Cualquier T, cualquier N, M1c**

Finalmente, hablamos de tumor **recurrente** cuando después del tratamiento hay una recidiva, ya sea en el origen del tumor primario como en otros órganos.

1.2.4 Manifestación clínica y pruebas diagnósticas del CCR

El CCR no presenta sintomatología apreciable hasta estadios avanzados de la enfermedad, en la que la clínica se manifiesta de forma diferente dependiendo de su localización y estadio. De forma general, como ocurre en otros tipos de tumores, puede presentar un síndrome constitucional formado por astenia, fiebre o pérdida de peso (Colon Cancer, 2018).

Cuando el tumor se localiza en el colon izquierdo suele manifestar un cuadro clínico caracterizado por rectorragias frecuentes, seguido de posibles alteraciones en el tránsito intestinal (estreñimiento, diarrea) y finalmente en la obstrucción intestinal, caracterizado por la distensión abdominal, vómitos y dolor (Rahimi y cols., 2020).

Por el contrario, si se localiza en el colon derecho suele manifestarse mediante la presencia de sangre oculta en heces, lo que conlleva una anemia crónica (Hamilton y cols., 2005). Mediante un examen rectal, principalmente en estadios avanzados de la enfermedad, se puede llegar a palpar el tumor.

Un aspecto destacable para una detección precoz son los programas de cribado, siendo esta una de las principales herramientas para reducir su morbilidad (Nee y cols., 2020).

Ante un paciente con sintomatología o clínica típica lo primero que se lleva a cabo es la realización de una historia clínica para conocer sus antecedentes y los factores de riesgo que pueden estar asociados a la formación de un posible CCR, así como una exploración física completa incluyendo el tacto rectal. Posteriormente, se realizan pruebas diagnósticas más específicas (Aarons y cols., 2014). Estas pruebas diagnósticas se basan, principalmente, en la colonoscopia. En ella se muestra la imagen real de la lesión y además permite la realización de biopsias. Actualmente, también se llevan a cabo colonoscopias virtuales e incluso endoscopia capsular, ofreciendo nuevas técnicas mejoradas. En la colonoscopia virtual se emplea una tomografía computarizada para adquirir imágenes bidimensionales o tridimensionales, mientras que la endoscopia capsular emplea una cámara inalámbrica para adquirir imágenes del tracto intestinal (Hosoe y cols., 2019; Lasisi y Rex, 2011; Patel y Chang, 2016). Tras confirmar la aparición de un CCR, se llevará a cabo un estudio más amplio para conocer la extensión del tumor y así establecer el estadio al que pertenece. Para ello se emplea la tomografía computarizada (TC) y ecografías o resonancia magnética nuclear (RMN) (Fernandez y cols., 2019; Maffione y cols., 2020).

1.2.5 Tratamientos del CCR

Según el estadio en el que se encuentre el tumor, el abordaje de los tratamientos será diferente. Los principales tratamientos de elección según el estadio tumoral son (Dienstmann y cols., 2015):

- **Estadio 0:** tratamiento quirúrgico mediante la resección del pólipo. Se puede realizar colectomía parcial si fuese necesario.
- **Estadio I:** resección del tumor si este limita con un pólipo con márgenes libres. En caso de un tamaño mayor del tumor puede requerir de colectomía parcial con posible escisión de ganglios linfáticos regionales.
- **Estadio II:** variable, desde una cirugía simple con colectomía hasta requerir de quimioterapia adyuvante.
- **Estadio III:** resección del segmento neoplásico acompañado de la eliminación del tejido circundante (4-5 cm) siempre que presente márgenes libres de tumor. Además, se requiere de una linfadenectomía regional y quimioterapia adyuvante. En caso de no poder llevar a cabo la cirugía, se pauta quimioterapia o radioterapia.
- **Estadio IV:** resección del tumor más quimioterapia. También se puede optar por quimioterapia junto con una cirugía paliativa para mejorar la calidad de vida del paciente.

A pesar de los grandes avances en los últimos años, el tratamiento del CCR no ha conseguido resultados satisfactorios en términos de curación o de reducción de la incidencia, especialmente en estadios avanzados de la enfermedad en la que se produce una expansión metastásica del tumor (especialmente hepáticas) influyendo de forma drástica en la supervivencia de los pacientes. Tal y como se ha presentado anteriormente, la cirugía (si el tumor es resecable) y la quimioterapia son los principales tratamientos del CCR. La quimioterapia que se emplea actualmente está basada en diferentes citotóxicos, ya sea en monoterapia o en combinación (oxaliplatino, irinotecan, 5-fluorouracilo (5-Fu), capecitabina, TAS-102, raltitrexed) (Wu, 2018). En los últimos años se han desarrollado fármacos biológicos activos para CCR avanzado, entre los que se encuentran los anticuerpos monoclonales cetuximab, panitumumab, bevacizumab y una proteína de fusión recombinante (aflibercept) con indicaciones muy precisas (Bregni y cols., 2020; Loree y Kopetz, 2017; Nappi y cols., 2018). A pesar de ello, los resultados son muy limitados tal y como claramente indica la supervivencia media de estos pacientes (15 a 20.5 meses) (Berrino y cols., 2007). La mejora de su pronóstico, precisa pues, del desarrollo de nuevas estrategias que sumen la actividad terapéutica a la acción preventiva (Idrees y Tejani, 2019; Reglero y Reglero, 2019).

1.3 Extractos vegetales como fuente de compuestos antitumorales

El desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas abarca una gran cantidad de campos de investigación que se extienden desde la nanotecnología, al uso de sistemas que activan el sistema inmune o al de extractos de diferentes orígenes, entre otros, que pueden ayudar a mejorar la respuesta al tratamiento. En este contexto, actualmente la actividad de extractos o derivados vegetales sobre la viabilidad y supervivencia de células tumorales está cobrando un gran interés (Goyal y cols., 2017), aunque ya desde 1960 el National Cancer Institute (USA) comenzó a evaluar la actividad antitumoral y preventiva de diferentes extractos vegetales frente a diferentes carcinomas (Huang y cols., 2010). Los vegetales en general y sus extractos en particular poseen grandes aplicaciones en medicina como son: i) ser una fuente directa de agentes terapéuticos, ii) materia prima para la fabricación de medicamentos semisintéticos más complejos, iii) aportar una estructura química de sus principios activos que puede servir de modelo para la elaboración de drogas sintéticas, y iv) utilizar dichos principios como marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos. Estas posibles aplicaciones se deben a los fitoquímicos que presentan las plantas y sus extractos. Se han identificado más de 5000 fitoquímicos en semillas, frutas, raíces, tubérculos, hojas, etc, los cuales se clasifican como

compuestos fenólicos, carotenoides, vitaminas, alcaloides, compuestos nitrogenados y compuestos organosulfurados (Sen y Samanta, 2015; Thapliyal y cols., 2018).

En los últimos 20 años, más del 25% de los medicamentos proceden de plantas, mientras que otro 25% son derivados de productos naturales modificados (Amin y cols., 2009). Cabe mencionar que tan sólo entre el 5% y el 15% de las plantas de uso medicinal, han sido investigadas para la obtención de sus compuestos bioactivos. Esto destaca la importancia de la búsqueda de nuevos medicamentos a partir de especies vegetales (Wong y cols., 2019). De hecho, extractos vegetales o la purificación de compuestos concretos pueden ser formas alternativas y eficaces para controlar y tratar el CCR. Está demostrado que las plantas medicinales son potencialmente capaces de actuar como un agente antitumoral incluso en modelos *in vivo*, mediante la activación de diferentes mecanismos implicados en la muerte celular. Son capaces de aumentar la expresión de inhibidores del ciclo celular, de afectar a la transcripción e inducir apoptosis celular selectiva en células tumorales. Estas propiedades se atribuyen a la presencia de determinados fitoquímicos como los flavonoides, compuestos polifenólicos, saponinas, polisacáridos o triterpenoides (Aiello y cols., 2019).

1.4 Los polifenoles y su acción frente al cáncer

Los polifenoles están constituidos por un gran grupo de fitoquímicos bioactivos de origen vegetal que presentan al menos un anillo aromático y uno o más grupos funcionales hidroxilo unidos. Representan conjunto de metabolitos secundarios vegetales más numeroso, desde moléculas pequeñas hasta compuestos altamente polimerizados (Durazzo y cols., 2019; Singla y cols., 2019). Estos polifenoles están presentes mayoritariamente en alimentos y bebidas de origen vegetales como son la fruta, verdura, especias, vino, té, etc.

Estructuralmente, los polifenoles se pueden agrupar en polifenoles flavonoides y no flavonoides (Durazzo y cols., 2019; Kabera, 2014):

- **Flavonoides:** se basan en un esqueleto de 15 carbonos de un anillo de cromano unido a un segundo anillo aromático. Se subdividen las siguientes subclases: flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas, flavononas y antocianinas. Presentan una amplia variedad de actividades farmacológicas como capacidad antioxidante, antibacteriana, antiinflamatoria, hepatoprotectora y antihiperlipidémica (Abenavoli y cols., 2018; Belwal y cols., 2017; Farhadi y cols., 2019; Rees y cols., 2018).

Los flavonoides se absorben a nivel intestinal, principalmente en el intestino delgado, aunque una cantidad significativa ingresa en el intestino grueso, en la que la microbiota los degrada. Además, permanecen en el intestino grueso más tiempo que en el intestino delgado, por lo que la presencia de polifenoles y sus metabolitos afectan directamente a la salud del colon y su microbiota.(Fraga y cols., 2019).

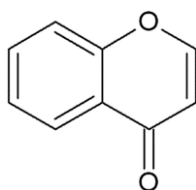


Figura 4. Estructura de un anillo de cromano.

- **No flavonoides.** En este grupo distinguimos los siguientes subgrupos:
 - Ácidos fenólicos: caracterizados por presentar un grupo carboxilo ligado al anillo de benceno.
 - Xantonas, estilbenos, lignanos y taninos: Se caracterizan por presentar estructuralmente al menos dos anillos aromáticos. Las xantonas con moléculas con una alta estabilidad. Es por ello, por lo que la industria farmacéutica está muy interesada en estos compuestos

(Gutierrez-Orozco y Failla, 2013). Los estilbenos, presentes en las uvas, almendras, arándanos, vino, moras y ciruela (Blaszczyk y cols., 2019; Shrikanta y cols., 2015), se han asociado con una reducción de la hipertensión, diabetes y obesidad, estando relacionado con una reducción de la mortalidad por cualquier causa (Tresserra-Rimbau y cols., 2014). Los lignanos son metabolitos secundarios de las plantas vasculares, con una presencia generalizada en el reino vegetal y a los que se les atribuye una amplia gama de propiedades fisiológicas, que influyen positivamente en la salud humana. Además, su ingesta está relacionada con sus posibles acciones quimiopreventivas frente al cáncer y en la prevención de enfermedades cardiovasculares (Anandhi Senthilkumar y cols., 2018; Xiao y cols., 2018). Los taninos, presentes principalmente en leguminosas también presentan actividad beneficiosa para la salud humana incluyendo al cáncer. Un estudio italiano demostró que el consumo de proantocianidinas se asoció inversamente con el riesgo de desarrollar cáncer de próstata (Praud y cols., 2018). Incluso se asocia su

consumo con una mejora de la función renal (Ivey y cols., 2013).

De las diferentes clases mencionadas, el 60% está representado por los flavonoides y un 30% por ácidos fenólicos (Yue Zhou y cols., 2016).

Los compuestos fenólicos han atraído el interés de la comunidad científica debido a su gran diversidad estructural, así como de su amplia bioactividad. Los compuestos fenólicos presentan funciones esenciales en la reproducción y crecimiento de las plantas y actúan como mecanismos de defensa contra patógenos, parásitos y depredadores, además de ser responsables del color de las plantas. No solo son beneficiosos para las plantas, sino que también juegan un papel importante en la salud humana, como antioxidantes, anticancerígenos, antibacterianos y antiinflamatorio (Bonta, 2020; Huang y cols., 2010).

La mayoría de los ingredientes naturales con eficacia anticancerígena contienen altos niveles de polifenoles (Oyenihi y Smith, 2019; Tariq y cols., 2017). Los polifenoles han demostrado eficacia quimiopreventiva contra tumores experimentales mediante acciones anti-iniciadoras, anti-promoción, anti-progresión y anti-angiogénesis,

así como modulando el sistema inmunológico (Erices y cols., 2018; Mileo y Miccadei, 2016; Xing y cols., 2019).

Debido a la boiactividad que presentan, existen numerosos medicamentos y patentes cuyos principales componentes son polifenoles. Es el caso de Neumentix, un suplemento patentado, obtenido por Kemin, (representada en España por Univar), en la que realiza un proceso de secado de la menta verde recolectada (gamas KI110 y KI42) previo a la extracción de polifenoles, entre los que destacan los ácidos rosmarínico, salvianólico y caftarico. Este suplemento rico en polifenoles demuestra, mediante estudios clínicos, beneficios en el rendimiento cognitivo. También muestra que los polifenoles que caracterizan este suplemento, actúan como agentes antioxidantes reduciendo el estrés oxidativo, promoviendo el crecimiento neuronal y protegiendo las células nerviosas del cerebro. Del mismo modo, polifenoles encontrados en la uva, arándanos y otras frutas y verduras se han estudiado para determinar su capacidad de disminuir el riesgo de desarrollar enfermedades neurodegenerativas. Además, se han utilizado como suplemento para minimizar los efectos de la edad, especialmente la pérdida de memoria como es el caso de la Curcumina Optimizada con Neurophenol™ (mezcla patentada de extractos de arándanos y uva), de Douglas Laboratories® También existen comercializados extractos polifenólicos patentados a partir de la

pepita de la uva (Vitaflavan®), del orujo de la uva tinta (Emitol®) y del vino tinto (Provinols®) que presentan propiedades antioxidantes.

Se ha demostrado que los polifenoles presentes en la fruta y verdura pueden ser potenciales compuestos tanto para la prevención como para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. Una dieta rica en polifenoles protege contra patologías crónicas modulando numerosos procesos fisiológicos, como el potencial redox celular, la actividad enzimática, la proliferación celular y las vías de transducción de señalización. Sin embargo, los polifenoles tienen una baja biodisponibilidad oral principalmente debido a una extensa biotransformación mediada por reacciones de fase I y fase II en los enterocitos y el hígado, pero también por la microbiota intestinal. A pesar de la baja biodisponibilidad oral, la mayoría de los polifenoles demostraron efectos biológicos significativos que llamaron la atención sobre la paradoja de baja biodisponibilidad / alta bioactividad. (Luca y cols., 2020)

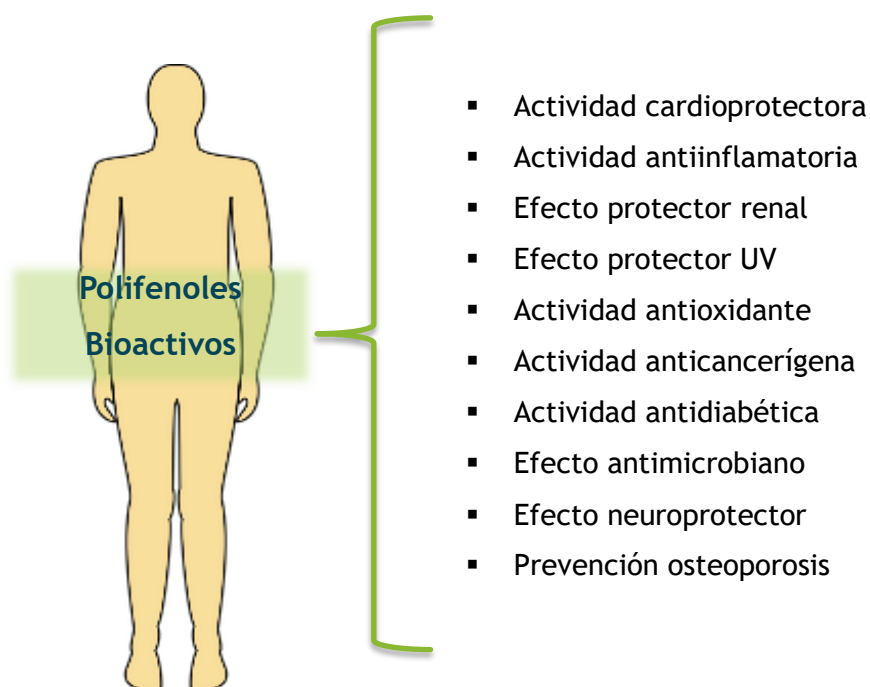


Figura 5. Principales efectos de los polifenoles beneficiosos para la salud humana.

1.5 La especie *Euphorbia lathyris* como fuente de compuestos bioactivos

El género *Euphorbia* (familia Euphorbiaceae), el más grande de plantas con flores, ha sido de gran interés desde la antigüedad como demuestran las descripciones de la *E. helioscopia* L. (Ibn Waḥshīyah y Levey, 1966) y euphorbio (goma de *E. resinífera* Berg.) por Hipócrates,

Galeno y Dioscórides (Stannard, 1964) y la descripción de Carl Linnaeus sobre el género *Euphorbia* (Nambudiri y Nambudiri, 2013).

Hoy conocemos que la *Euphorbia esula* L. posee un diterpeno con actividad biológica pro-inflamatoria y antitumoral (Evans y Taylor, 1983; Kupchan y cols., 1976) y que el mebutato de ingenol (Picato®), diterpeno aislado de *Euphorbia peplus* L, es usado para el tratamiento tópico de la queratosis actínica y cáncer de piel no melanoma (Berman, 2012). Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados se han centrado en la presencia de productos naturales biológicamente activos en el látex (Shi y cols., 2008; Vasas y Hohmann, 2014), compuestos que por ser una fuente rica en diterpenos y triterpenos, se han relacionado con propiedades no sólo antitumorales y antiinflamatorias sino también anticonceptivas y fibrinolíticas.

El Euphol, un alcohol triterpeno tetracíclico presente en la savia de *Euphorbia*, ha demostrado ser el compuesto predominante en el látex de todas las especies de *Euphorbia* (Cruz y cols., 2018) y posee las propiedades descritas anteriormente (antiinflamatorio, anticonceptivo, etc). De hecho, Silva y col. (Silva y cols., 2018) han demostrado recientemente como este compuesto posee actividad antitumoral en 15 modelos *in vitro* con células tumorales en las que la dosis inhibitoria 50 (IC₅₀) se situó entre 2-30 µM.

Si bien es cierto, que los estudios más numerosos se han realizado con el latex, algunos estudios han analizado otras zonas de la planta. Así, las semillas de *Euphorbia lathyris*, una de las especies más conocidas de este género, se han usado tradicionalmente en medicina para tratar la hidropesía, la ascitis, el estreñimiento, la amenorrea y la sarna a partir de extractos etanólicos de semilla seca (Liao y cols., 2005). Las semillas de *Euphorbia* contienen una gran cantidad de diterpenoides naturales, entre los que destacan los llamados *Euphorbia* Factors L1-L28. Los compuestos extraídos de las semillas han demostrado una gran citotoxicidad frente a células cancerosas (Teng y cols., 2018), así como efectos moduladores de la resistencia a múltiples fármacos (MDR) y la P-glicoproteína (Wang y cols., 2018). Por tanto, la semilla de *Euphorbia*, de la que se han identificado y aislado muchos componentes bioquímicos, posee una extensa actividad farmacológica, pero todavía es necesario explorar nuevos compuestos químicos así como los mecanismos farmacológicos y toxicológicos exactos (Zhu y cols., 2018).

Autores como Zhang y cols. (2017) ya describen diferentes componentes del tipo ácidos fenólicos y flavonoides en la raíz, tallo y semilla de la *Euphorbia lathyris* que poseen capacidad antioxidante aunque realizan un método de extracción basado en la acetona altamente tóxica y no realizan estudios de capacidad antitumoral. Otros

autores como Nam y Lee (2000) realizaron ensayos de la capacidad antitumoral de extractos de la *Euphorbia lathyris* encontrando cierta actividad antiproliferativa. Sin embargo, los extractos son realizados con metanol, altamente tóxico y por tanto con poca utilidad para su aplicación *in vivo*. Además, la actividad es demostrada sólo en células de cáncer de pulmón *in vitro* no detectando actividad antitumoral para cáncer de colon. Por otra parte, Sdayria y cols. (2018) muestran, mediante estudios *in vitro* e *in vivo*, los efectos antioxidantes, antinociceptivos y antiinflamatorios que presentan los compuestos polifenólicos (ácido gálico, epicatequina, ácido cumárico, apigenina, naringenina, rutina, quercetina y kaempferol) presentes en los extractos obtenidos mediante procesamiento con metanol (extractos metanólicos) a partir de las hojas de *Euphorbia retusa*, considerando este extracto metanólico un agente efectivo para el tratamiento de dolor y la inflamación ya que inhibe algunos mediadores de la inflamación como son MDA y COX-2 e incrementa la actividad de SODm CAT y GPx en el hígado. (Sdayria y cols., 2018)

Componentes presentes en *Euphorbia lathyris* y que podrían estar relacionados con una actividad antiproliferativa, han sido analizados por algunos autores. Así, Lee y cols. (2016) ensayaron la esculetina, un derivado de la cumarina, en células derivadas de cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de colon, evidenciando un

efecto antitumoral. De forma similar, Wang y cols. (2002) estudiaron el efecto de esta molécula frente a células de leucemia (HL-60) observando un incremento de apoptosis. Sin embargo, ninguno de estos autores empleó extractos de *Euphorbia lathyris* en sus estudios que se centran en la exposición de las células tumorales a la molécula descrita adquirida de forma comercial y por tanto sin interacción con otras moléculas.

2. Objetivos

El **objetivo general** de este trabajo es avanzar en el desarrollo de extractos funcionales derivados de semillas de *Euphorbia lathyris* y valorar su actividad en la prevención y/o tratamiento del cáncer de colon.

Como **objetivos específicos** nos planteamos:

- 1) Desarrollar extractos funcionales ricos en polifenoles a partir de semillas maduras de *Euphorbia lathyris*.
- 2) Valorar la actividad antioxidante y polifenoles totales de los extractos funcionales obtenidos.
- 3) Determinar la actividad antitumoral frente a diferentes líneas celulares de cáncer de colon que presentan los extractos funcionales obtenidos.
- 4) Conocer los mecanismos de acción implicados en la muerte celular promovidos por los extractos funcionales sobre las células de cáncer de colon.

- 5) Determinar si los extractos funcionales modulan “in vitro” factores relacionados con la progresión y recidivas del cáncer de colon.

3. Materiales y Métodos

3.1 Material vegetal

Las semillas maduras de *Euphorbia lathyris* han sido cedidas por la empresa de fitomejoramiento Agrountec Solution S.L, perteneciente al Grupo Empresarial Cellbitech.

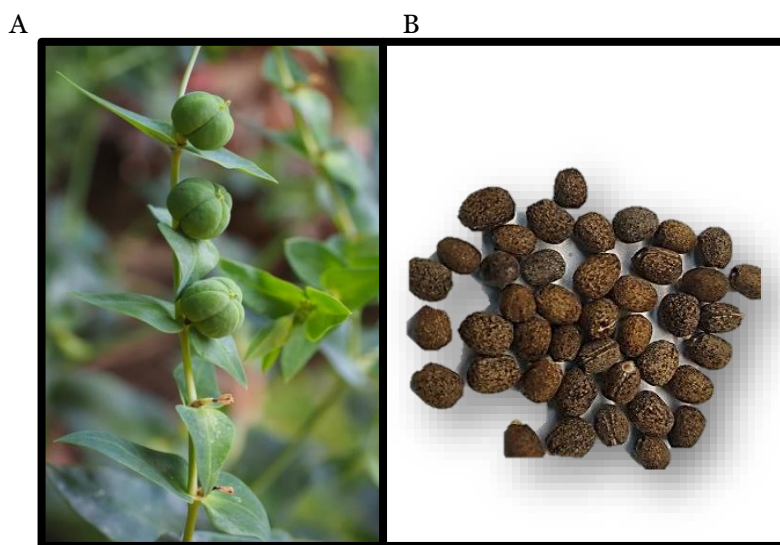


Figura 6. Imágenes representativas de la especie *Euphorbia lathyris*, A) planta B) semillas maduras.

Asimismo, Agrountec Solution S.L proporcionó harina desengrasada de las semillas maduras mediante el desarrollo de un proceso de desengrasado que separa la parte oleaginosa de la semilla madura mediante una prensa de extracción de aceite de semilla en frío

(KOMET, IBG Monforts, GER). El desengrasado no excedió la temperatura de 40°C y se caracterizó por una velocidad de trabajo promedio de 2-3 kg de semilla / hora y un rendimiento de conversión de semilla a aceite que varió entre 15-25%. Como resultado de este proceso se obtuvo harina desengrasada con un tamaño de partícula entre 100 µm y 150 µm y se almacenó en ausencia de luz a -20°C hasta su uso.

3.2 Obtención del extracto etanólico rico en polifenoles

Para poder llevar a cabo el proceso de obtención del extracto etanólico, las semillas maduras fueron molidas hasta obtener harina con un tamaño de partícula de entre 100 µm y 150 µm. En el caso de la semilla desengrasada, la empresa Agointec Solution S.L proporcionó directamente la harina desengrasada de semilla madura, por tanto, en este caso no se llevó a cabo ningún procedimiento previo.

El proceso de extracción etanólica se desarrolló mezclando 5 gramos de harina con 15ml de solución hidroalcohólica (Etanol: agua tipo I: HCl 12N; 50: 50: 0.2) a pH 2 y 4°C en atmósfera reductora (con nitrógeno) durante 30 minutos en un agitador magnético. Después de 30 minutos de agitación, el extracto se centrifugó a 3.000 rpm durante 5 minutos. Se almacenó el sobrenadante y se recuperó el pellet para

repetir el proceso añadiendo 10ml de solución hidroalcohólica. Finalmente, todos los sobrenadantes (extracto etanólico) se mezclaron y almacenaron a -20°C (Figura 7). Todo el proceso se realizó por triplicado obteniendo tres extractos etanólicos independientes.

Una vez llevado a cabo el proceso de extracción de polifenoles, todo el extracto etanólico se alicuotó en eppendorf (1 ml) para posteriormente evaporar el etanol usando un evaporador de vacío (Savant DNA120 SpeedVac Concentrator, ThermoSci) (Eppendorf Concentrator 5301) durante una hora. De esta manera, se obtuvo un extracto acuoso rico en polifenoles y libre de etanol, fundamental para poder ensayarlo en cultivos celulares *in vitro* ya que el etanol es tóxico para las células.

Para determinar el rendimiento del extracto etanólico y la concentración del mismo, tres de los eppendorf, una vez evaporados, fueron congelados en nitrógeno líquido y liofilizados (liofilizador TELSTAR Cryodos-50) durante 24 h. A continuación, se calculó el peso seco del extracto restando el peso del eppendorf vacío que contiene cada alícuota y referido a un volumen de 1 mL de extracto inicial, al volumen total de extracto obtenido, y, finalmente, a los gramos de harina.

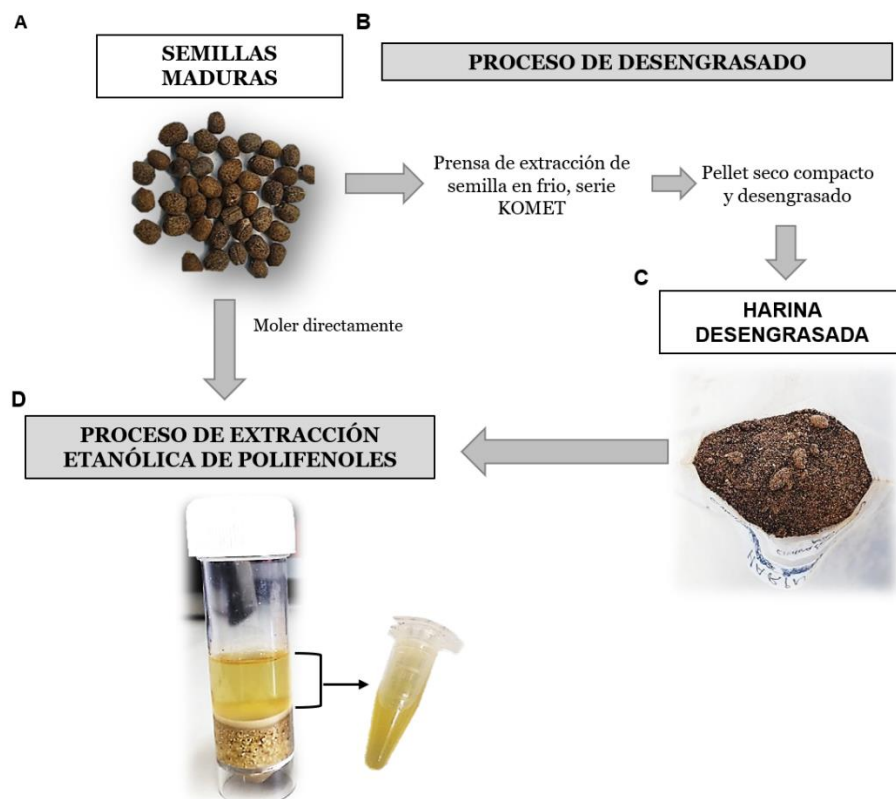


Figura 7. Representación de los distintos procesos llevados a cabo para desarrollar el extracto etanólico. A) Imagen de las semillas maduras de *Euphorbia lathyris*. B) Proceso de desengrasado. C) Imagen de la harina obtenida tras el proceso de desengrasado. D) Imagen representativa del extracto etanólico obtenido tras llevar a cabo el proceso de extracción.

3.3 Evaluación del contenido total de polifenoles

El contenido total de polifenoles se determinó en extractos etanólicos de la harina (desengrasada y sin desengrasar) utilizando el método de Folin-Ciocalteu (Kapravelou y cols., 2015). Se utilizaron diferentes concentraciones de ácido gálico (entre 0 y 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$) como recta patrón. Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico (GA) (μg ácido gálico / mg de extracto etanólico).

Para llevar a cabo esta determinación, 125 μl de muestra (incluyendo el blanco) fueron mezcladas con 500 μl de agua tipo I junto a 125 μl de reactivo Folin-Ciocalteu. Se realizó una incubación de 6 minutos a temperatura ambiente en oscuridad para posteriormente añadir 1,25 ml de 10% Na_2CO_3 /1M NaOH . Finalmente se añadió 1 ml de agua tipo I (obteniendo un volumen final de 3 ml) y se llevó a cabo una incubación de 90 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación, se llevó a cabo una centrifugación (2500rpm durante 1 minuto) y se determinó las absorbancias mediante espectrofotometría (MultiskanTM FC Microplate Photometer, Thermo Ficher Scientific. Shanghai, China) a una longitud de onda de 760 nm.

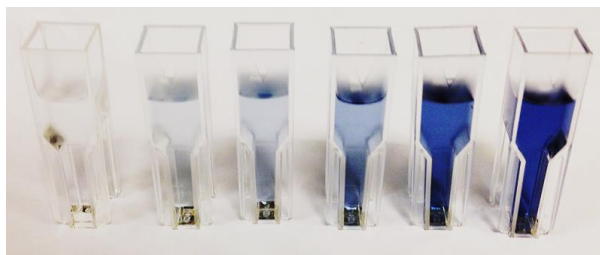


Imagen 9. Imagen representativa de la curva patrón empleada para la determinación de polifenoles totales.

3.4 Capacidad antioxidante

La capacidad reductora de Fe^{3+} a Fe^{2+} por los diferentes extractos se midió espectrofotométricamente mediante la técnica de Duh y cols. (1999) según lo descrito por Kapravelou y cols. (2015). En el análisis se utilizó una curva estándar de concentraciones de GA que variaban de 0 a 80 $\mu\text{g} / \text{ml}$.

Para determinar la capacidad reductora de las muestras de interés, 0,5 ml de la muestra fueron mezclados con 1,25 ml de tampón fosfato 0,2M pH 6,6 junto a 1,25 ml de ferrocianuro potásico al 1%. Tras una incubación de 30 minutos a 50°C, se añadió 1,25 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10%. Se llevó a cabo una centrifugación a 3.000 rpm durante 10 minutos y se recogieron 2 ml del sobrenadante para posteriormente añadirle 2 ml de agua tipo I junto a 0,4 ml de FeCl_3 al 0,1%. Finalmente se analizaron las absorbancias mediante

espectrofotetría (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Fischer Scientific. Shanghai, China) leyendo a una longitud de onda de 700 nm.



Imagen 10. Imagen representativa de la cura patrón empleada para el proceso de determinación de la capacidad antioxidante.

3.5 Estudios cromatográficos

Los compuestos bioactivos presentes en los extractos funcionales se analizaron mediante cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC) acoplada con un espectrómetro de masas con analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF) (Synap G2, Waters, Milford, MA, EE. UU.). Para ello, los polifenoles se separaron analíticamente mediante una columna analítica Acquity HSS T33 (100 mm × 2,1 mm de diámetro interno, 1,8 µm; Waters, Milford, MA, EE. UU.). La fase móvil de la columna constaba de un gradiente formado por la combinación del disolvente A (agua desionizada con ácido acético al 0,5%) y el disolvente B (acetonitrilo con ácido acético al 0,5%). El caudal de la fase móvil fue de 0,4 ml / min. El análisis de espectrometría de masas de alta

resolución se llevó a cabo en ionización por electropulverización negativa (ESI-ve) y los espectros se registraron en un rango de 50-1200 masa / carga (m/z). Los cromatogramas obtenidos se analizaron manualmente mediante el software MassLynx V4.1.

La presencia de los compuestos se validó comparando al menos 3 subfragmentos obtenidos de la base de datos de Chemspider.

En el caso de determinados compuestos bioactivos de gran interés, la presencia de estos compuestos específicos fueron corroborados y cuantificados utilizando los siguientes estándares: esculetina (68923, Sigma-Aldrich, Madrid, España), euforbetina (35897-99-5, Cymit Química, SL Barcelona, España), gaulterina (490-67-5, Cymit Química, SL Barcelona, España), y kaempferol-3-rutinósido (17650-84-9, Cymit Química, SL Barcelona, España).

Para ello, se llevó a cabo una recta patrón con cada compuesto estándar de forma independiente y se analizó mediante cromatografía siguiendo la metodología descrita anteriormente, pudiendo así cuantificar dicho compuesto en la muestra de interés.

3.6 Cultivos celulares

Las líneas celulares de adenocarcinoma de colon humano T84 (sensible a la quimioterapia) y HCT-15 (resistente a la quimioterapia) se

adquirieron de la American Type Culture Collection (Rockville, MD, EE. UU.). La línea celular de colon no tumoral CCD-18 (línea celular epitelial de colon humano) se usó como control. Las líneas celulares de glioblastoma humano (SF-268, SK-N-SH, A-172, LN-229), adenocarcinoma de páncreas humano (PANC-1) y cáncer de mama humano (MCF-7) fueron proporcionadas por el Centro de Instrumentación Científica (CIC, Universidad de Granada, España). Tanto las células SF-268 como las SK-N-SH mostraron resistencia a la temozolomida (TMZ) a través de la expresión de O-6-Metilguanina-ADN Metiltransferasa (MGMT). Todas las líneas celulares fueron cultivadas en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) suplementado con suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor al 10% (Gibco, Madrid, España) y antibióticos (gentamicina / anfotericina-B + penicilina / estreptomicina) (Sigma Aldrich, Madrid, España) al 1%, y mantenidas en incubadora a 37°C y atmósfera humidificada con CO₂ al 5%.

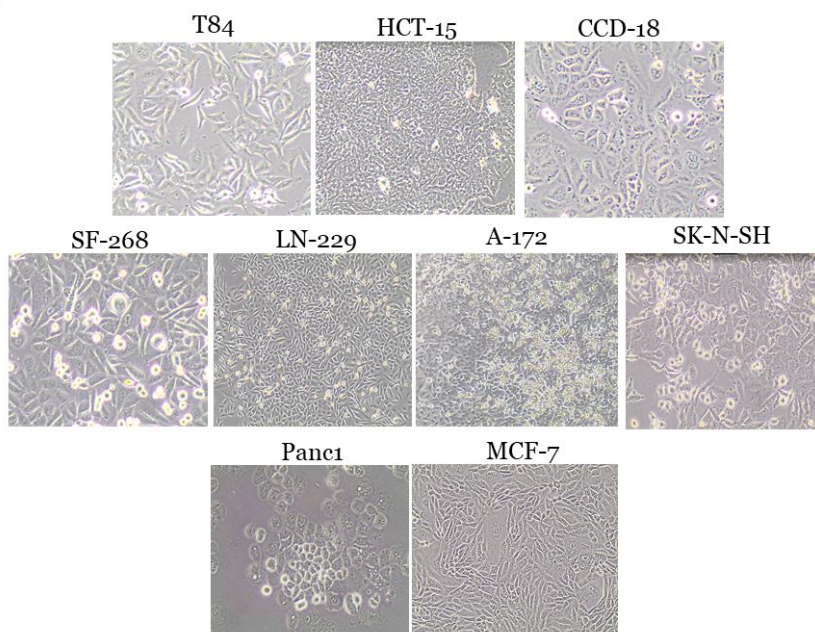


Figura 11. Imágenes obtenidas mediante microscopía óptica de las diferentes líneas celulares empleadas en la determinación de la capacidad antitumoral de los distintos extractos funcionales.

3.7 Viabilidad celular

Las células se sembraron en placas de 48 pocillos con DMEM (300 μ l) a una densidad de 4×10^3 células / pocillo en CCD-18 y MCF-7; 5×10^3 células / pocillo en T84, HCT-15, SF-268, A-172 y SK-NSH; y 8×10^3 células / pocillo en las líneas celulares PANC-1 y LN-226, respectivamente. Después de 24 h de incubación, los cultivos celulares se expusieron al extracto etanólico, al que previamente se evaporó el

etanol con objeto de evitar la toxicidad del mismo. A continuación, los cultivos celulares se expusieron a concentraciones crecientes del extracto etanólico evaporado obtenido a partir de harina (desengrasada o sin desengrasar) durante 72 h. Después del tiempo de incubación, las células se fijaron con ácido tricloroacético (TCA) al 10% durante 20 min a 4 ° C. Una vez secas, las placas se tiñeron con sulforrodamina B (SRB) al 0,4% en ácido acético al 1% (20 min, en agitación). Después de tres lavados con ácido acético al 1%, se solubilizó SRB con Trizma® (10 mM, pH 10,5). Finalmente, se midió la densidad óptica (DO) a 492 nm en un espectrofotómetro EX-Thermo Multiskan. La supervivencia celular (%) se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Cell survival (\%)} = \frac{\text{Treated cells OD} - \text{blank}}{\text{Control OD} - \text{blank}} \times 100$$

Además, se calculó la CI₅₀ (GraphPad Prism 6 Software, La Jolla, CA, EE. UU.).

3.8 Western blot

Se realizó un análisis de Western blot utilizando proteínas obtenidas de células T84 expuestas durante 12 y 24h a concentraciones equivalentes a la IC₅₀ y el doble del valor IC₅₀ (2x IC₅₀) del extracto etanólico obtenido a partir de la harina desengrasada de semillas de

Euphorbia lathyris. Primero, se recolectaron las células, se centrifugaron y se extrajeron las proteínas totales con tampón de lisis RIPA (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) Para determinar la concentración de proteínas se empleó el ensayo de cuantificación por Bradford. Para la electroforesis, 40 µg de proteína de cada muestra se calentaron a 95°C durante 5 min y se separaron en gel SDS-PAGE al 10% en una cubeta Mini Protean II (Bio-Rad, Hercules, CA). Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 45 µm (200 V a temperatura ambiente (TA) durante 1 h) (Millipore) y se trataron con solución de bloqueo (PBS-Tween-20 al 0,1% + leche al 5% (p / v) polvo) durante 1h. Después de lavar tres veces con PBS-0.1% Tween-20, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4 ° C (IgG policlonal de conejo anti-caspasa-3 (sc-271759), dilución 1: 500; anti-caspasa-8 (sc -166320), dilución 1: 1000; y anti-caspasa-9 (sc-133109), dilución 1: 1000) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Después de tres lavados, las membranas se incubaron durante 1 hora a TA con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (dilución 1: 5000) (IgG-HRP de cabra anti-ratón, Santa Cruz Biothechnology, CA). Además, se utilizó IgG anti-β-actina (A3854, Sigma Aldrich, Madrid, España) (dilución 1: 10000) como control interno. Las señales se detectaron mediante un reactivo de detección de transferencia Western ECLTM

(quimioluminiscencia mejorada; Bonnus, Amersham, Little Chalfont, Reino Unido) (Ortiz et al., 2009). Una vez realizado el Western Blot, las bandas obtenidas en los geles se analizaron utilizando el software analítico Quantity One (Bio-Rad, Hercules, CA).

3.9 Ensayo de migración

Para determinar la capacidad de migración de las células tumorales de las líneas celulares y, por tanto, su invasividad y capacidad de generar metástasis, se realizó un ensayo de migración *in vitro*. Se sembraron 30×10^4 células / pocillo de la línea celular T84 en placas de 12 pocillos consiguiendo una confluencia del 100% en condiciones de cultivo estándar. Tras 24 horas de incubación y una vez cerciorados de que se alcanzó la confluencia, se realizó una “herida” manualmente con una punta estéril siguiendo el protocolo descrito por Grada et al. (Grada y cols., 2017). Para detener el crecimiento celular, el medio se sustituyó por DMEM sin suero. Inmediatamente, las células fueron expuestas a concentraciones no citotóxicas (IC₅) del extracto etanólico obtenido a partir de semillas maduras desengrasadas durante 72 h. Se obtuvieron imágenes en diferentes tiempos (0, 8, 24, 48 y 72 h) para observar la migración celular en comparación con el control (células sin tratamiento). Para evaluar el efecto del extracto etanólico, se calculó el porcentaje de migración midiendo el área libre de células tumorales en diferentes momentos (software Image J) (<https://imagej.nih.gov/>).

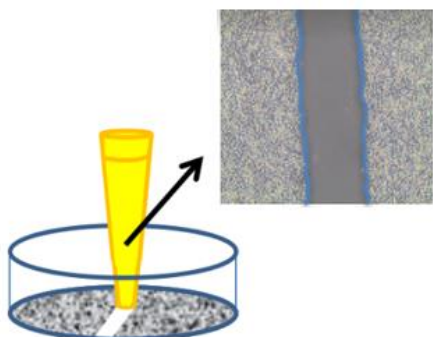


Figura 13. ESquema explicativo sobre la metodología empleada para llevar a cabo la “herida” manualmente con una punta estéril, así como una imagen del resultado obtenido tras llevar a cabo el procedimiento.

3.10 Ciclo celular

Para llevar a cabo el estudio del ciclo celular y poder dilucidar si el extracto etanólico a partir de semillas maduras ejerce una acción sobre el ciclo celular, las células T84 y HCT-15 fueron sembradas en placas de 6 pocillos a una densidad de 30×10^4 células / pocillo. Después de 24 h, se retiró el medio de cultivo y se añadió un medio de cultivo sin suero para detener el ciclo celular. A continuación, el medio de cultivo se reemplazó por DMEM con suero y se incubaron los cultivos celulares con concentraciones de extracto equivalentes a la IC₂₅ y la IC₅₀. Tras 48 h de incubación se procedió a realizar el protocolo para la

determinación del ciclo y apoptosis por citometría de flujo mediante la tinción del ADN con Yoduro de Propidio (PI).

Para ello, en tubos de citometría, se recogió el medio de los pocillos, se tripsinizaron las células y se recogieron junto al medio que tenían. Los tubos se centrifugaron a 3500 rpm durante 3 minutos descartándose el sobrenadante, y posteriormente, se secó el pellet celular y se resuspendió en 100 µl de PBS. Se llevó a cabo la fijación de las células mediante la adición de 900 µl de etanol al 70% a 4°C mientras se agitaban las muestras. Se incubaron 1 hora a 4°C y se añadió 1ml de PBS. Para eliminar el etanol se centrifugó a 3500 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente. El pellet se resuspendió en 250 µl de PBS y se añadió 250 µl de solución de extracción de ADN, la cual estaba compuesta por Na₂HPO₄ 0,2M y ácido acético 0,1M en un pH de 7,8.

Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y se volvió a centrifugar (3500 rpm durante 3 minutos). Finalmente, el pellet se resuspendió en 250 µl de solución PI/RNASE Solution Kit (Inmunostep, España). Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y finalmente se cuantificó el contenido total de ADN celular por citometría de flujo FACScan (Becton Dickinson, San Jose, USA) usando el software FlowJo (Treestar, Ashland, OR), determinando la fase del ciclo celular predominante.

3.11 Ensayo de Alpha tubulina por inmunofluorescencia

Se sembraron células T84 en una cámara de 8 pocillos a una densidad de 20×10^3 células / pocillo. Tras 24 horas de incubación, las células se expusieron al extracto etanólico (IC25 e IC50) a partir de semilla madura desengrasadas. Después de 24 h, las células fueron fijadas con formaldehído al 4% en PBS-Tween al 0,1% durante 25 min a TA, permeabilizadas con Triton X-100 al 0,1% y se bloqueó con una solución de bloqueo con suero de cabra durante 60 min. Luego, las células se incubaron con el anticuerpo primario anti- α -tubulina 1: 250 (v / v) (Sigma Aldrich, Madrid, España) 1 h a TA, se lavaron (tres veces) con PBS-Tween al 0,1% y se incubaron con el anticuerpo secundario (anticuerpo secundario conjugado con Alexa-Fluor 488; Cell Signaling Technologies, España; dilución 1: 200) durante 60 min a TA en oscuridad. Se utilizó Hoechst (dilución 1: 2000) para teñir los núcleos. Las células se observaron mediante microscopía de fluorescencia (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

3.12 Angiogénesis

Los ensayos de angiogénesis se llevaron a cabo utilizando células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) que se adquirieron de la American Type Culture Collection (Rockville, MD, EE.UU.). Las HUVEC se cultivaron en pocillos recubiertos con agarosa al 0,1% en medio de crecimiento de células endoteliales 2 (EGM-2) (Lonza Bioscience, Barcelona, España) suplementado con EGMTM-2 Endothelial SingleQuotes™ Kit (Lonza Bioscience) que incluye FBS, factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento similar a la insulina R3-1 (R3-IGF-1), ácido ascórbico, hidrocortisona, factor de crecimiento de fibroblastos humano beta (hFGF- β), heparina y antibióticos (Sigma Aldrich) a 37°C en atmósfera humidificada con CO₂ al 5%. Se obtuvo medio condicionado de las células de cultivo T84 tratadas con el extracto etanólico a partir de semillas maduras desengrasadas a concentraciones de IC₂₅ y IC₅₀ durante 24 h. Después de 24 h de incubación, se retiró el medio que contenía el extracto etanólico, se lavaron los pocillos con PBS para cerciorarnos de que no quedaban restos de extracto etanólico, se reemplazó por medio nuevo (DMEM con suero bovino fetal) y se dejaron otras 48 horas más. De esta manera nuestro medio condicionado, el cual entraba en contacto con las HUVEC, no era el extracto etanólico, sino que estaba compuesto por los factores que liberaron las células

tumorales T84 cuando estas fueron expuestas durante 24 horas a dos concentraciones del extracto. Así, pudimos determinar si los extractos etanólicos ejercen efecto sobre la comunicación entre las células tumorales y las células endoteliales para la formación de nuevos vasos sanguíneos.

Una vez transcurridas las 48 horas de incubación con el medio libre de extracto etanólico, el medio se almacenó a -80°C hasta su uso.

Finalmente, las HUVEC se sembraron en placas de 96 pocillos (50×10^3 células / pocillo) previamente recubiertas con $50 \mu\text{l}$ de matrigel (Corning) y se cultivaron (12 h) en un medio sin FBS. Las HUVEC se expusieron al medio condicionado. Se añadió calceína a las células y se visualizó la formación de vasos sanguíneos bajo microscopía óptica y de fluorescencia a las 3 h y 7 h. Las imágenes se analizaron utilizando el software ImageJ para evaluar el grado de formación de la red microvascular.

3.13 RT-PCR

Para determinar la actividad antitumoral del extracto etanólico en CSCs de cáncer de colon, se expusieron células cultivadas de T84 al extracto etanólico (IC_{50}) a partir de semilla madura desengrasada. Después de 72 h, se eliminó el medio, las células se lavaron con PBS, se

tripsinizaron y tras centrifugar las células, los pellets celulares fueron incluidos en Trizol Reagent (RNeasy Mini Kit, Qiagen, MD, EE. UU.) y almacenadas a -80°C. Para llevar a cabo la extracción del ARN, además de estar las células en contacto con el Trizol, el cual lisa la membrana celular por digestión química e inactiva las ARNasas, se llevó a cabo una digestión mecánica de las muestras mediante la agitación de los eppendorf que contienen las muestras celulares y finalmente, para asegurarnos de que se disgregó todo correctamente, se pasaron las muestras por jeringas de insulina de 1 ml (0,5 x 16 mm) 10 veces.

Se añadió a las muestras 0,2 ml de cloroformo/ml de Trizol, se agitaron vigorosamente durante 15 segundos y se incubaron a temperatura ambiente 5 minutos. Tras centrifugar a 12000 g durante 5 minutos a 4°C y se van a distinguir tres fases claramente diferenciadas, recogiendo la primera fase, que se corresponde con el ARN, a la que se agregó el mismo volumen de etanol al 70%.

Finalmente, se llevaron a cabo lavados en columnas de ARN con diferentes tampones hasta que finalmente se eluyó el ARN con 50 µl de agua libre de ARNasa y se cuantificó con el NanoDrop 2000 (Thermo Fisher, Massachusetts, EE. UU.)

Se convirtió 1 µg de ARN en ADNc usando un kit de retro-transcriptasa (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. La PCR en tiempo real se llevó a cabo usando la SYBR Green (Taq Universal

SYBR Green Supermix) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Los cebadores de RT-PCR cuantitativos y las temperaturas de hibridación (T_m) utilizados se enumeran en la Tabla 1. Los genes analizados fueron CD24, CD44, SOX2, OCT4 y NANOG. Los datos de expresión génica se normalizaron con GAPDH. Todos los ensayos cuantitativos de RT-PCR se realizaron en un sistema ABI 7900 (ABI), y se aplicó el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para calcular los niveles de expresión relativos.

Tabla 1. Muestra los diferentes primers empleados, su secuencia y temperatura óptima

Nombre primer	Secuencia	T_m (°C)
CD24-F	CAG TAG TCT TGA TGA CCA AAG	56.4
CD24-R	ACA GCA TTC TGG AAT AAA GC	58.4
CD44-F	TTA TCA GGA GAC CAA GAC AC	58.6
CD44-R	ATC AGC CAT TCT GGA ATT TG	61.5
SOX-2-F	ATA ATA ACA ATC ATC GGC GG	61.1

SOX-2-R	AAA AAG AGA GAG GCA AAC TG	57.8
NANOG-F	CTA TCC ATC CTT GCA AAT GTC	60.9
NANOG-R	GTT CTG GTC TTC TGT TTC TTG	58
OCT-4-F	GAT CAC CCT GGG ATA TAC AC	58.1
OCT-4-R	GCT TTG CAT ATC TCC TGA AG	59.1
GAPDH-F	TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC	58.3
GAPDH-R	GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG	58.1

3.14 Lysotracker

Para determinar la presencia de vesículas de autofagia, se utilizó LysoTracker® Red DND-99 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Se trata de un marcador rojo fluorescente que se emplea para el marcaje y seguimiento de orgánulos ácidos. Para llevar a cabo este ensayo, se sembraron en placas de 8 pocillos 30 x 10³ células/ pocillo de la línea celular T84. Tras 24 horas de incubación, las células se expusieron al

extracto etanólico (IC₅₀) durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, los pocillos se lavaron con PBS y se incubaron con el marcador fluorescente a una concentración de 50nM durante 30 min a 37°C. Tras los 30 minutos de incubación, las células se lavaron de nuevo con PBS y se tiñeron con DAPI (1: 1000) para dilucidar los núcleos. Finalmente, las células se observaron bajo microscopía de fluorescencia.

3.15 Estudios estadísticos

Todos los análisis se realizaron por triplicado y los resultados se presentan como media $\pm$ desviación estándar (DS). El análisis estadístico se realizó utilizando pruebas t de Student con el software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) v.20 para Windows. Los datos con $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

4. Resultados

4.1 Efecto antitumoral del extracto etanólico de semillas de *Euphorbia lathyris* en cáncer de colon

4.1.1 Análisis de rendimiento y actividad antioxidante

El extracto etanólico de la harina desengrasada de semillas maduras de *Euphorbia lathyris* mostró un alto rendimiento de extracción ($117,5 \pm 9,22$ mg / g de harina), siendo este significativamente mayor que el obtenido a partir de semillas maduras sin desengrasar de *Euphorbia lathyris* ($42,9 \pm 1,47$ mg/g harina) (Tabla 1). Además, al igual que el rendimiento, los extractos etanólicos de harina desengrasada exhibieron un alto contenido de polifenoles totales ($33,5 \pm 5,79$ μ g equivalentes de GA / mg de extracto) y demostraron una actividad antioxidante significativamente superior respecto al extracto etanólico a partir de semillas sin desengrasar (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis de rendimiento y actividad antioxidante del extracto etanólico de la harina desengrasada y sin desengrasar de semillas maduras de *Euphorbia lathyris*.

<i>Euphorbia lathyris</i>	Rendimiento *	Polifenoles totales **	Actividad antioxidante **
Extracto etanólico de harina desengrasada de semillas maduras	117,5 ± 9,22	33,5 ± 5,79	23,0 ± 1,92
Extracto etanólico de harina de semillas maduras sin desengrasar	42,9 ± 1,47	15,85 ± 0,21	9,71 ± 0,28

*(mg / g de harina); ** (µg equivalentes de GA / mg de extracto). Los datos representan el valor medio ± SD del triplicado.

Asimismo, además de poder apreciar las diferencias en cuanto a los valores de rendimiento y actividad antioxidante, macroscópicamente se puso observar diferencias colorimétricas (Figura 14).



Figura 14. Imagen en la que se representa la variación colorimétrica del extracto etanólico a partir de semilla sin desengrasar de *Euphorbia*

lathyris (a) respecto al extracto etanólico a partir de semilla desengrasada de *Euphorbia lathyris* (b).

4.1.2 Análisis por cromatografía de masas de compuestos bioactivos de los extractos etanólicos de *Euphorbia lathyris*

Para determinar los compuestos bioactivos presentes en el extracto etanólico de la harina desengrasada y sin desengrasar de *Euphorbia lathyris* se llevó a cabo un análisis cromatográfico.

4.1.2.1 Análisis cromatográfico del extracto etanólico de semilla sin desengrasar de *Euphorbia lathyris*

Los estudios cromatográficos realizados han permitido determinar los compuestos presentes en el extracto etanólico de la harina de semillas maduras sin desengrasar de *Euphorbia lathyris*.

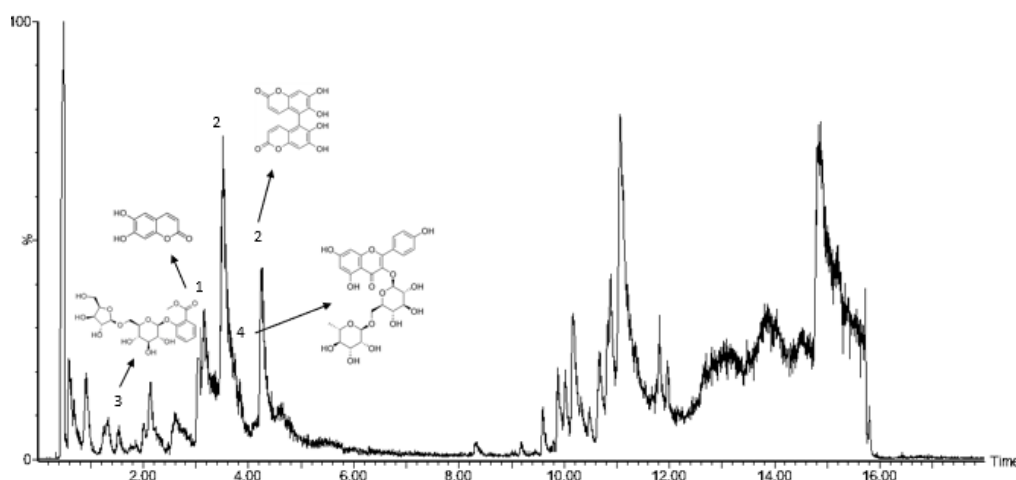


Figura 15. Cromatograma, obtenido mediante cromatografía líquida de alta resolución, de polifenoles obtenidos del extracto etanólico a partir de semilla sin desengrasar de *Euphorbia lathyris*. Asignación de pico: 1: Esculetina, 2: Euforbetina, 3: Gaulterina, 4: Kaempferol-3-rutinósido.

Los principales compuestos bioactivos presentes en el extracto etanólico de semilla sin desengrasar de *Euphorbia lathyris* se encuentran reflejados en la tabla detallada a continuación.

Tabla 3. Identificación de compuestos bioactivos en el extracto etanólico de la harina sin desengrasar de *Euphorbia lathyris*.

Compuesto	MF	[M-H]-	TR	PPM	%Conf.
Esculetina	C ₉ H ₆ O ₄	177,0185	2,63	-1,7	90-100
		177,0188	2,60	0,0	
Euforbetina	C ₁₈ H ₁₀ O ₈	353,0293	3,14	-1,1	90-100
		353,0295	3,17	-0,6	
Gaulterina	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₂	445,1344	1,83	-0,4	90-100
		445,1353	1,82	1,6	
Carnosol	C ₂₀ H ₂₆ O ₄	329,1744	6,11	-2,7	90-100
		329,1758	6,13	1,5	
Kaempferol-3- rutínósido	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593,1512	3,81	1,0	90-100
		593,1495	3,82	-1,9	

TR: tiempo de retención; MF: fórmula molecular; PPM: error; MS: masa; % Conf: porcentaje de fiabilidad.

Para la cuantificación de los compuestos de interés se utilizaron patrones específicos de esculetina y kaempferol-3-rutinósido.

Tabla 4. Cuantificación de compuestos bioactivos del extracto etanólico de la harina sin desengrasar de *Euphorbia lathyris*.

	Esculetina	Kaempferol-3-rutinósido
ppm (mg/L)	111,45 ± 15.3	6,02± 1.07
mg compuesto/100 mg extracto	0.21 ± 0.05	0.02 ± 0.003

Los datos representan la media de tres réplicas ± DS.

4.1.2.2 Análisis cromatográfico del extracto etanólico de semilla desengrasada de *Euphorbia lathyris*

El estudio cromatográfico llevado a cabo dilucidó la presencia de una gran variedad de compuestos bioactivos de los cuales se seleccionaron algunos concretos debido a su bioactividad.

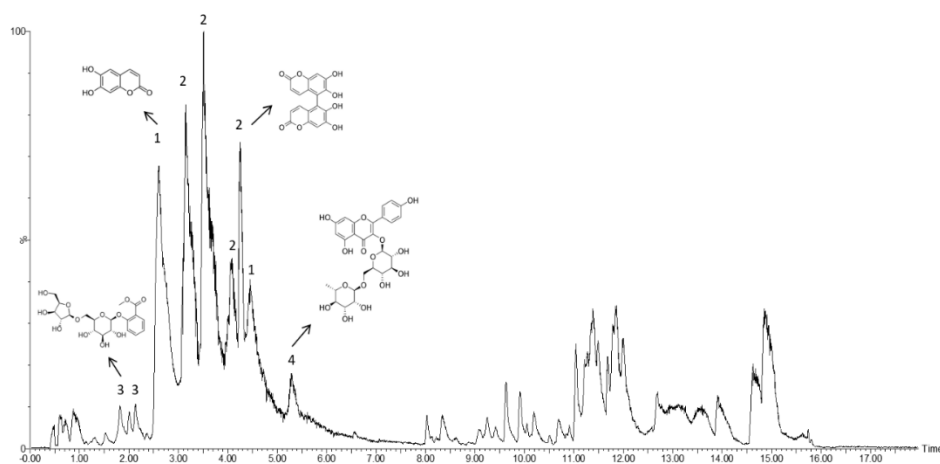


Figura 16. Cromatograma de cromatografía líquida de alta resolución de polifenoles obtenidos del extracto etanólico a partir de semilla desengrasada de *Euphorbia lathyris*. Asignación de pico: 1: Esculetina, 2: Euforbetina, 3: Gaulterina, 4: Kaempferol-3-rutinósido.

El análisis de los picos del cromatograma mostró un grupo relevante de compuestos bioactivos, esculetina, euforbetina, gaulterina y kaempferol-3-rutinósido (Tabla 2). Para confirmar y cuantificar los compuestos bioactivos más relevantes en el extracto, se emplearon patrones específicos, midiendo así la concentración de la esculetina, la euforbetina y el kaempferol-3-rutinósido. Como se muestra en la Tabla 6, el compuesto con mayor concentración en el extracto etanólico de la

harina desengrasada de *Euphorbia lathyris* fue la esculetina (267.68 ± 34.16 ppm).

Tabla 5. Identificación de compuestos bioactivos en el extracto etanólico de la harina desengrasada de *Euphorbia lathyris*.

Compuesto	MF	[M-H]-	RT	PPM	% Conf.
Esculetina	$C_9H_6O_4$	177.0181	2.62	-4.0	90-100
		177.0185	2.61	-1.7	
Euforbetina	$C_{18}H_{10}O_8$	353.0298	3.17	-0.6	90-100
		353.0301	3.14	1.1	
Gaulterina	$C_{19}H_{26}O_{12}$	445.1349	1.89	0.7	90-100
		445.1351	1.81	1.1	
Carnosol	$C_{20}H_{26}O_4$	329.1744	6.10	-2.7	90-100
		329.1750	6.11	-0.9	
Kaempferol-3-rutinósido	$C_{27}H_{30}O_{15}$	593.1510	3.86	0.7	90-100
		593.1520	3.87	2.4	

TR: tiempo de retención; MF: fórmula molecular; PPM: error; MS: masa; % Conf: porcentaje de fiabilidad.

Tabla 6. Cuantificación de compuestos bioactivos del extracto etanólico de la harina desengrasada de *Euphorbia lathyris*.

	Esculetina	Kaempferol-3-rutinósido
ppm (mg/L)	267.7 ± 34.2	25.8 ± 3.27
mg compuesto/100 mg extracto	0.41 ± 0.12	0.03 ± 0.002

Los datos representan la media de tres réplicas ± DS.

4.1.3 Efecto del extracto etanólico de *Euphorbia lathyris* sobre la viabilidad celular

Los extractos etanólicos de la harina desengrasada y sin desengrasar de *Euphorbia lathyris* se ensayaron en células de cáncer de colon con diferentes grados de quimiorresistencia para determinar su actividad antitumoral. Como se muestra en la Tabla 7, el extracto etanólico de semilla desengrasada mostró una IC₅₀ más baja en la línea celular de cáncer de colon T84 (16,3 ± 2,54 µg / ml) que en la línea de cáncer de colon quimiorresistente HCT-15 (IC₅₀ de 72,9 ± 1,27 µg / ml). En contraste, su efecto antiproliferativo sobre la línea celular de epitelio de colon CCD-18 fue bajo (IC₅₀ de 266,0 ± 18,5 µg / ml) en comparación con las células tumorales. El extracto etanólico de semillas sin

desengrasar presentó una mayor actividad antitumoral con valores de IC₅₀ bajos que el extracto desengrasado (tabla 7) y, al igual que este, mostró una gran selectividad tumoral con valores de IC₅₀ para la línea no tumoral CCD-18 significativamente superiores ($266.0 \pm 18.5 \mu\text{g} / \text{mL}$). En ambos estudios, se utilizó el 5-Fu como control positivo.

Tabla 7. Actividad de citotoxicidad (IC₅₀) de los extractos etanólicos de la harina desengrasada y sin desengrasar de *Euphorbia lathyris* en líneas celulares de cáncer de colon y colon no tumoral.

	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	T84	HCT-15	CCD-18
Extracto etanólico de semillas	$16.3 \pm$	$72.9 \pm$	$266.0 \pm$
desengrasadas	2.54	1.27	18.5
Extracto etanólico de semillas	$11,04 \pm$	$34,26 \pm$	$388,36 \pm$
sin desengrasar	1,63	1,1	30,14
5-Fu (μM)	$2.68 \pm$	$6.58 \pm$	$7.35 \pm$
	0.16	0.35	0.41

Los datos representan la media de tres réplicas $\pm$ DS.

En base a estos resultados, y teniendo en cuenta que el extracto etanólico de semillas desengrasadas presentó un mayor rendimiento así como mayor actividad antioxidante, este fue seleccionado para realizar estudios moleculares, dilucidar su mecanismo de acción y para testar su efecto en otras líneas tumorales (glioblastoma multiforme, cáncer de mama y adenocarcinoma pancreático). Como muestra en la Tabla 8, el extracto etanólico de la harina desengrasada de *Euphorbia lathyris* exhibió una notable actividad antitumoral en las líneas celulares de glioblastoma multiforme, siendo las células A-172 las que mostraron una menor IC₅₀ ($18.6 \pm 1.64 \mu\text{g} / \text{mL}$) en comparación con las otras líneas LN-229, SF-268 y SK-N-SK. Por otra parte, las líneas celulares de adenocarcinoma de páncreas y cáncer de mama mostraron mayores valores de IC₅₀ ($185,8 \pm 25,8 \mu\text{g} / \text{ml}$ y $89,6 \pm 6,29 \mu\text{g} / \text{ml}$, respectivamente).

Tabla 8. Actividad de citotoxicidad (IC₅₀) del extracto etanólico de la harina desengrasada de *Euphorbia lathyris* en líneas celulares de glioblastoma multiforme humano, adenocarcinoma pancreático y cáncer de mama.

	IC ₅₀ (µg/ml)					
	SF-268	SK-N-SH	A-172	LN-229	PANC-1	MCF-7
Extracto						
etanólico de	39.3 ±	71.4 ±	18.6 ±	70.5 ±	185.8 ±	89.6 ±
semilla	13.2	13.6	1.64	4.48	25.8	6.29
desengrasada						

Los datos representan la media de tres réplicas ± DS.

4.1.4 Efecto del extracto etanólico de *Euphorbia lathyris* sobre el ciclo celular

Para determinar el posible mecanismo de acción del extracto etanólico de la harina desengrasada de *Euphorbia lathyris*, se realizaron estudios del ciclo celular en células T84, HCT-15 y CCD-18 tratadas con el extracto. Las células HCT-15 tratadas con el extracto mostraron un aumento dependiente de la dosis en las fases G₂ / M y S (Figura 17 B). Por el contrario, se observó acumulación de fase G₀ / G₁ en células tumorales T84 (Figura 17A). Curiosamente, no se observaron modificaciones en el ciclo celular en células no tumorales CCD18 después de la exposición al extracto (Figura 17C).

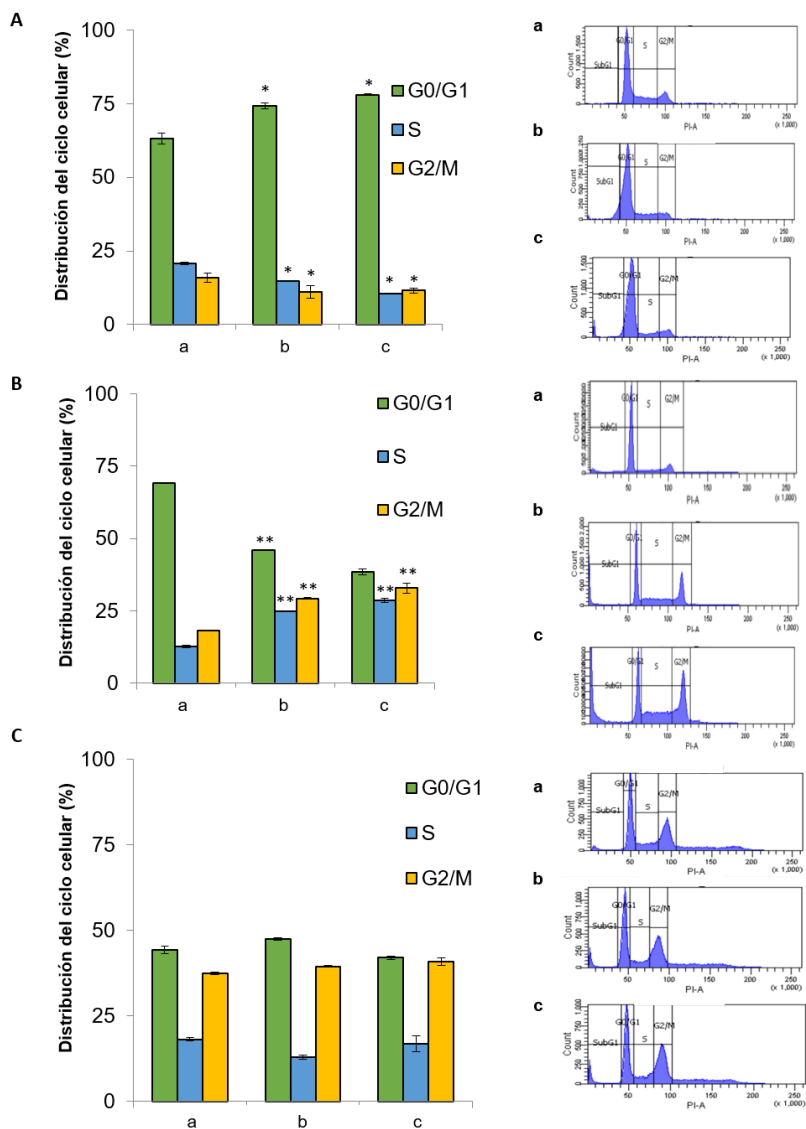


Figura 17. Modulación del ciclo celular por el extracto etanólico de semillas desengrasadas de *Euphorbia lathyris*. Las líneas celulares se trataron con dosis IC25 e IC50 del extracto. A) línea celular T84; B)

Línea celular HCT-15 y C) Línea celular CCD-18 (ciclo (a: control; b: IC₂₅; c: IC₅₀). Los resultados del análisis FACSscan se expresan como el porcentaje de células marcadas en cada fase del ciclo celular. Los datos representan la media de tres réplicas $\pm$ DS. * Datos con diferencias significativas entre células tratadas y no tratadas ($p < 0.05$). ** $p < 0.01$, vs. el grupo de control respectivo.

4.1.5 Análisis de la migración celular

Para evaluar los efectos del extracto etanólico sobre la capacidad de migración de las células tumorales, se realizó un ensayo de cierre de “heridas” en células T84. Dosis subcitotóxicas del extracto (IC₅) indujeron una disminución en la migración de las células tumorales frente a las células de control (no tratadas). De hecho, la modulación de la migración pudo detectarse a las 8 h después de la inducción de la “herida”, aunque los cambios más significativos fueron detectados al final del experimento (72 h), con una disminución del 18,68% en la migración de las células expuestas al extracto en comparación con las células de control (Figura 17A y B).

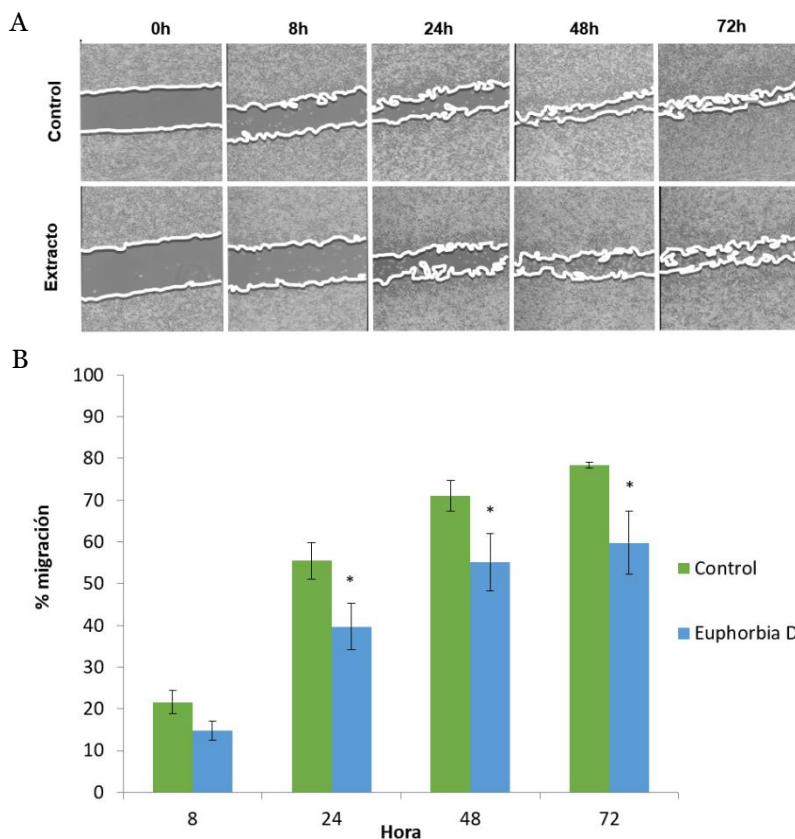


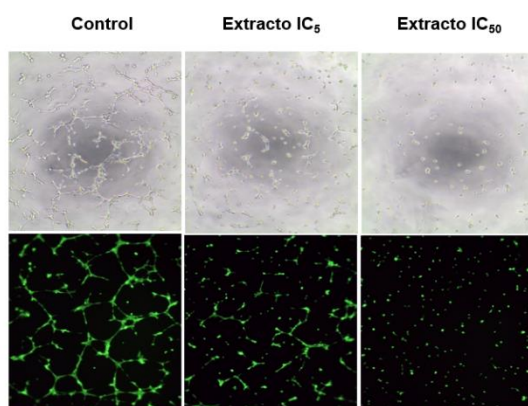
Figura 18. Análisis de capacidad migratoria de células de cáncer de colon T84 tratadas con extracto etanólico de *Euphorbia lathyris*. A) Imágenes representativas de la migración de células tumorales de colon T84 en diferentes momentos (0, 8, 24, 48 y 72h) después de la exposición a una dosis subcitotóxica (Ic5) del extracto etanólico de harina desengrasada de semillas maduras de *Euphorbia lathyris*. B) Representación gráfica del porcentaje de migración de células tumorales

de colon T84. Los datos representan la media de tres réplicas $\pm$ DS. * Datos con diferencias significativas entre células tratadas y no tratadas ($p < 0,05$).

4.1.6 Modulación de la angiogénesis por el extracto etanólico de *Euphorbia lathyris*

Para determinar si el extracto etanólico de *Euphorbia lathyris* tenía capacidad de modular la angiogénesis a través de su interacción con células endoteliales, cultivos de HUVEC se expusieron a medios condicionados obtenidos de cultivos de células T84 tratados con el extracto y sin tratar (control). Como se muestra en la Figura 19A, los medios condicionados inhibieron significativamente la formación de vasos sanguíneos por HUVEC. La cuantificación de la formación de vasos (número de extremos, nodos, uniones, mallas, segmentos formados y longitud de los segmentos) mostró una reducción significativa en comparación con las células de control (HUVEC sin exposición) (Figura 19B).

A



B

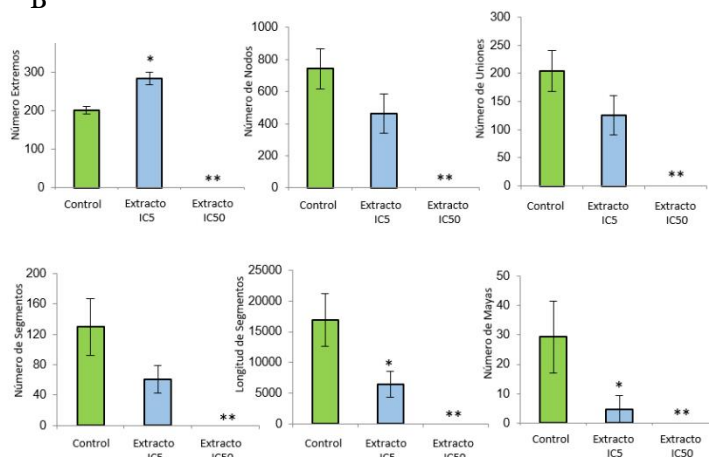


Figura 19. Análisis del efecto antiangiogénico del extracto etanólico de *Euphorbia lathyris*. A) Imágenes de microscopía óptica representativas de la formación de vasos sanguíneos por HUVEC después de la exposición a medios acondicionados obtenidos de células de cáncer de colon T84 tratadas con el extracto etanólico (IC5 e IC50). Imágenes de microscopía de fluorescencia de la formación de vasos sanguíneos por

HUVEC después de la exposición al medio acondicionado. B) Representación gráfica de diferentes parámetros angiogénicos medidos en imágenes de microscopía de fluorescencia, incluida la formación de nodos, ramas, segmentos y uniones. Los datos representan la media de tres réplicas $\pm$ DS; * $p < 0,05$ frente al grupo de control respectivo, ** $p < 0,01$ frente al grupo de control respectivo.

4.1.7 Análisis de la modulación de la expresión de marcadores de células madre de cáncer de colon.

Se realizó un análisis de RT-qPCR para determinar la modulación de la expresión de los marcadores específicos de CSCs de cáncer de colon (línea T84) después de la exposición al extracto etanólico de la harina desengrasada de semillas de *Euphorbia lathyris*. La Figura 20 muestra como dicho extracto, a concentraciones de IC₅₀, consiguió disminuir significativamente la expresión de CD44, CD24, NANOG, SOX-2 y OCT-4, indicando una reducción significativa de la presencia de CSCs en el cultivo.

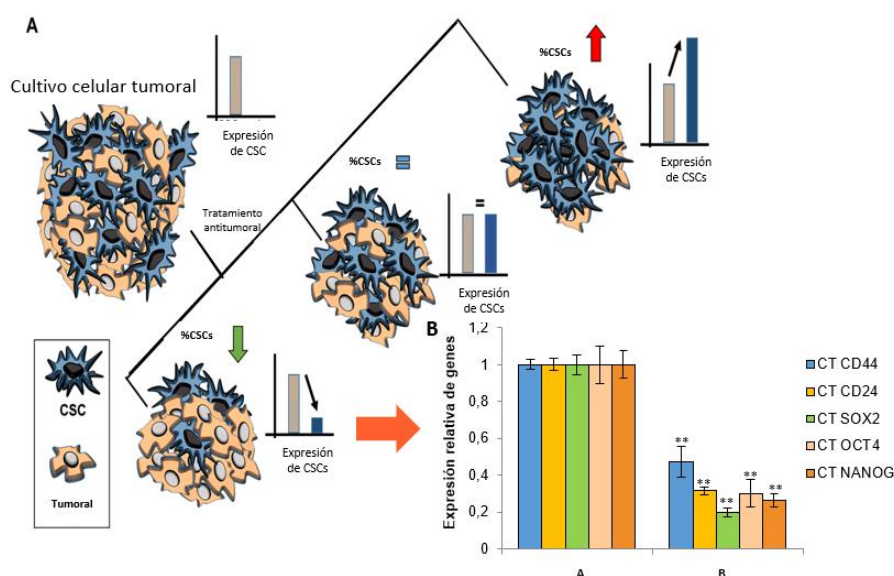


Figura 20. Análisis de RT-qPCR de marcadores de CSCs de la línea de cáncer de colon T84. A) Esquema representativo de las posibles respuestas tras el tratamiento antitumoral en la población basal de células tumorales. Los niveles de expresión de los marcadores de CSCs están relacionados con el porcentaje de este tipo celular en el cultivo después del tratamiento. B) Gráfico representativo que muestra la expresión génica relativa de los marcadores relacionados con las CSCs antes (basal) y después de la exposición al extracto etanólico de la harina desengrasada de *Euphorbia lathyris*. Los datos representan la media de tres réplicas $\pm$ DS; * $p < 0,05$ frente al grupo de control respectivo; ** $p < 0,01$ frente al grupo de control respectivo.

4.1.8 Análisis molecular de la inducción de la muerte celular por el extracto etanólico de *Euphorbia lathyris*

Para determinar el mecanismo molecular de muerte celular inducida por los extractos etanólicos de la harina desengrasada de semillas de *Euphorbia lathyris*, se analizaron la expresión de caspasas, polimerización / despolimerización de microtúbulos celulares y autofagia. Como muestra la Figura 21, los extractos etanólicos indujeron apoptosis de las células T84 mediada por caspasa, lo que resultó en una disminución significativa en la expresión de procaspasa 9, 8, 3 y un aumento significativo en la expresión de caspasa 9, 8 y caspasa escindida 3 en comparación con aquellas encontradas en las células de control. Además, se detectó la formación significativa de vesículas de autofagia alrededor del núcleo celular en las líneas celulares expuestas al extracto (Figura 22). Por el contrario, como muestra la Figura 22, la inmunofluorescencia con α -tubulina no mostró diferencias significativas entre la polimerización/ despolimerización de microtúbulos de células T84 expuestas y no expuestas al extracto etanólico.

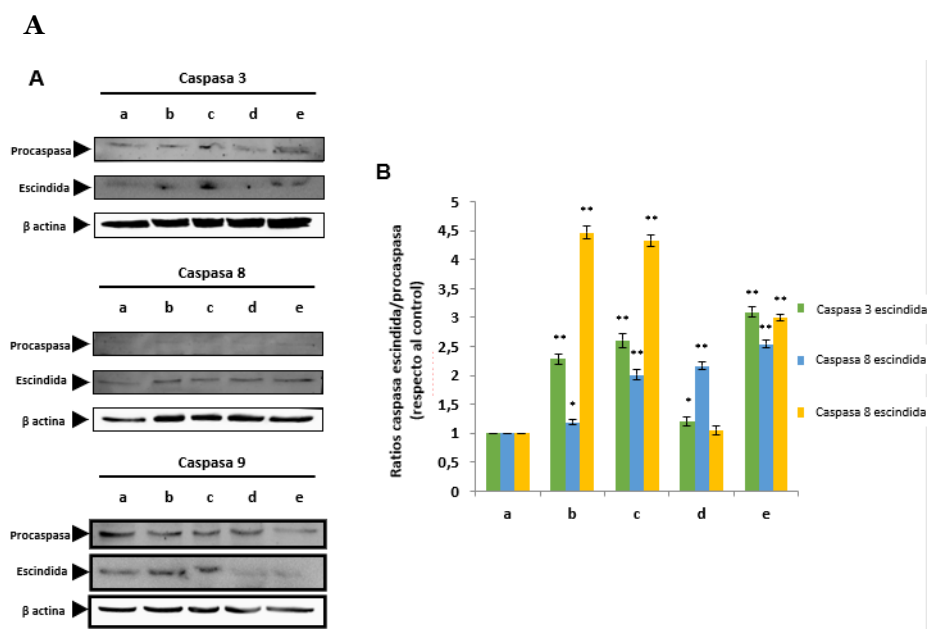


Figura 21. Mecanismo de muerte celular por el extracto etanólico de *Euphorbia lathyris*. A) Análisis de Western blot de la expresión de procaspasa y caspasa escindida 3, 8 y 9 en células T84 antes del tratamiento (a) y después de la exposición al extracto etanólico durante 12 h con dosis IC₅₀ (b), 12 h con dosis 2x IC₅₀ (c), 24h de tratamiento con dosis IC₅₀ (d) y 24h con dosis 2x IC₅₀ (e). B) Representación gráfica del análisis de densitometría de Western blot de las bandas correspondientes al coeficiente entre la expresión de caspasa escindida y procaspasa 3, 8 y 9 después del tratamiento con el extracto etanólico (dosis IC₅₀ y 2x IC₅₀) en diferentes momentos (12 y 24 h) (b, c, d, e) en comparación con el control no tratado (a). Los datos representan la

media de tres réplicas $\pm$ DS; * $p < 0,05$ frente al grupo de control; ** $p < 0,01$ frente al grupo de control.

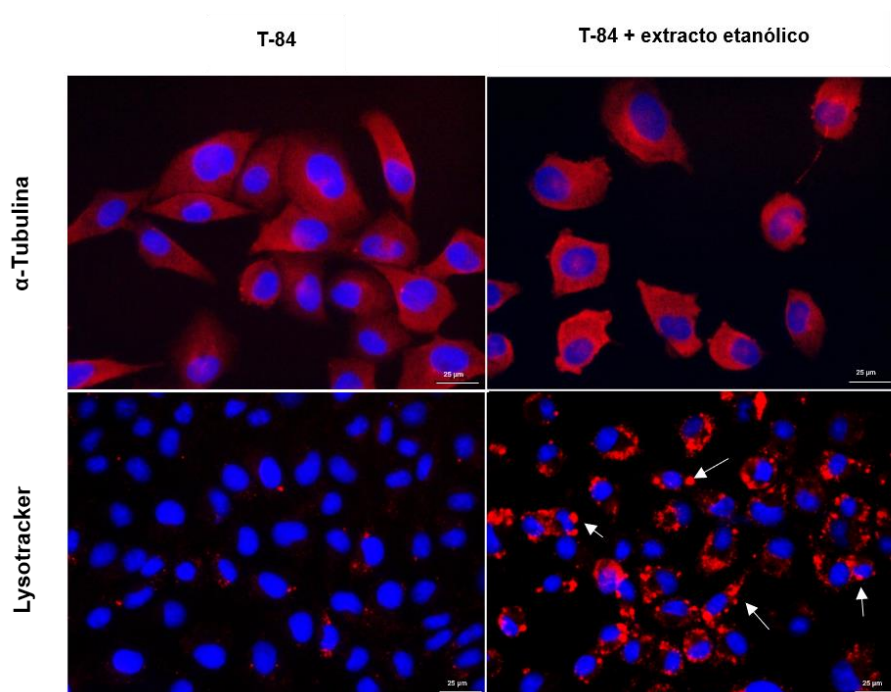


Figura 22. Mecanismo de muerte celular por el extracto etanólico de *Euphorbia lathyris*. Estudio mediante inmunofluorescencia de la presencia de la expresión de α -tubulina y de vesículas de autofagia en células de línea celular T84 expuesta al extracto etanólico. La formación de vesículas autofágicas fue evidente en las células tratadas (flechas).

5. Discusión

A pesar de los avances terapéuticos en la quimioterapia del cáncer, los tratamientos actuales de esta enfermedad están lejos de ser satisfactorios. El fracaso del tratamiento está relacionado con la conocida baja selectividad de los fármacos por las células tumorales, sus efectos secundarios y la generación de resistencia frente a ellos mediada por varios mecanismos. Por tanto, se requieren estrategias novedosas para desarrollar alternativas terapéuticas que puedan mejorar el tratamiento del cáncer o potenciar los efectos antitumorales de los agentes quimioterapéuticos existentes (Koklesova y cols., 2020; Vaghari-Tabari y cols., 2020). En este contexto, se han aislado numerosos agentes quimioterapéuticos o quimiopreventivos naturales de diferentes orígenes, entre ellos los de origen vegetal, que actualmente se están utilizando o se están ensayando para el tratamiento del cáncer.

Los vegetales han sido y siguen siendo una fuente esencial para la obtención de extractos de los que poder aislar compuestos bioactivos. Existe una amplia metodología que se ha aplicado en el proceso de obtención de extractos a partir de fuentes vegetales (Zhang y cols., 2018).

En nuestro estudio, la fuente utilizada fue la *Euphorbia lathyris* y la metodología para la obtención de extractos se asoció a un proceso previo de desengrasado a partir de sus semillas maduras, no solo para aumentar la concentración de polifenoles, moléculas con alta capacidad

bioactiva, sino también para evitar interferencias en el proceso de extracción provocadas por el alto contenido graso que presentan las semillas, asegurando así un alto rendimiento de extracción. Además, nuestra metodología de extracción, empleó como solvente una solución hidroalcohólica al 50% de etanol, con el objetivo de evitar la potencial toxicidad que presentan los solventes de extracción orgánicos utilizados en la mayoría de los estudios en los que pretenden obtener extractos funcionales a partir de vegetales. Entre las ventajas de la utilización de un extracto etanólico se encuentra su potencial aplicación clínica, ya que el etanol se emplea de forma habitual y en bajas concentraciones en la administración de principios activos (Rivers-Auty y Ashton, 2013). De hecho, agentes quimioterapéuticos empleados actualmente en clínica y administrados vía intravenosa contienen etanol como excipiente. Es el caso de la gemcitabina y el docetaxel, entre otros quimioterapéuticos y fármacos comerciales que también presentan bajas concentraciones de etanol en su presentación comercial (Lenz, 2007).

La especie vegetal seleccionada en nuestro estudio, la *Euphorbia lathyris*, pertenece al género *Euphorbia*, un género que ha demostrado ser un excelente recurso para obtener compuestos bioactivos con actividad antitumoral. La mayoría de los estudios llevados a cabo con este género se han centrado principalmente en aislar compuestos diterpenoides. Así, los *Euphorbia* Factor, aislados a partir de semillas de

Euphorbia lathyris ya han mostrado una significativa actividad antitumoral frente a la línea de cáncer de mama MCF-7 y la línea de glioma C6 (Lu et al., 2014). Otros autores como Bicchi y cols. (2001) describieron estos compuestos diterpenoides aislados a partir del aceite obtenido de semillas de *Euphorbia lathyris*. Además de las semillas, las raíces de especies del género *Euphorbia* también contienen diterpenoides con actividad biológica (Lee y cols., 2016; Liu y cols., 2014; Ul-Haq y cols., 2012). De hecho, se ha descrito recientemente que las raíces de *Euphorbia lathyris* son una nueva fuente de biomoléculas que pueden mostrar beneficios adicionales (Ricigliano y cols., 2020).

En nuestro estudio, como resultado del proceso de extracción descrito y utilizando un procedimiento previo de desengrasado, los extractos etanólicos de la harina desengrasada obtenidos mostraron un alto contenido de polifenoles totales ($33,5 \pm 5,79$ μg equivalentes de GA / g de harina) y una elevada actividad antioxidante ($23,0 \pm 1,92$ μg equivalentes de GA / mg de extracto), que además fueron significativamente mayores a los obtenidos por los extractos etanólicos a partir de semilla sin desengrasar. Los extractos obtenidos, a diferencia de otros descritos en la literatura, son de utilidad clínica al presentar sólo la toxicidad propia del uso de etanol. Así, otros métodos de extracción, como el empleado por Zhang y cols. (2017), emplearon acetona y acetato de etilo para desarrollar extractos y/o aislar

compuestos bioactivos a partir de diferentes partes vegetales de la especie *Euphorbia lathyris* (raíces, hojas, semillas y testa (tegumento que rodea a las semillas)). Sin embargo, la toxicidad celular de estos solventes los invalida para cualquier posible aplicación clínica y de hecho no se llevaron a cabo ensayos *in vitro* a pesar de la notable capacidad antioxidante que demostraron.

Nam y Lee (2000) emplearon metanol para llevar a cabo extractos a partir de *Euphorbia lathyris* y otras especies vegetales mientras que Fang y cols. (2014) y Teng y cols. (2018) emplearon etanol al 95% y un proceso de aislamiento de compuestos mediante fracciones por cromatografía con éter de petróleo. Ambas mostraron ser metodologías eficaces para un enriquecimiento de terpenos en el extracto de *Euphorbia*. Estos compuestos aislados presentaron citotoxicidad frente a líneas celulares tumorales humanas de mama y de cáncer de pulmón. Sin embargo, debido a los solventes empleados por dichos autores, su potencial uso en pacientes parece poco probable a menos que se realice un tratamiento adicional para eliminar esos solventes tan tóxicos.

Podemos corroborar que, aunque autores como los mencionados utilicen el etanol como solvente para obtener extractos de semillas de *Euphorbia lathyris*, las diferencias metodológicas en cuanto a la concentración de etanol empleado, condiciones de temperatura, de pH

y tiempo de extracción, implica la obtención de distintos compuestos bioactivos.

Cabe destacar el hecho de que la metodología empleada para el desarrollo de los extractos funcionales determinará los compuestos bioactivos presentes en los mismos, ya que los diterpenos obtenidos por Teng y cols (2018) no estaban presentes en el extracto obtenido con la metodología desarrollada en este trabajo. Recientemente, Fan y cols. (2019) demostraron que el factor L2, aislado a partir de las semillas de *Euphorbia*, presenta actividad antiproliferativa contra un tipo muy específico de tumor, el carcinoma hepatocelular. En nuestro caso, los extractos etanólicos desarrollados a partir de la misma semilla fue especialmente rico en compuestos fenólicos ($33,52 \pm 5,79 \mu\text{g}$ equivalentes GA / mg extracto). Este hallazgo supuso el diseño de experiencias que nos permitieran determinar de forma más precisa los componentes del extracto, los posibles biomoléculas implicadas en su acción y el mecanismo molecular a través del cual estas provocaban lesión en las células tumorales.

Uno de los estudios que determinó parte de la composición de los extractos obtenidos fue la cromatografía. El análisis cromatográfico, tanto del extracto etanólico de la harina desengrasada como sin desengrasar de *Euphorbia lathyris*, mostró la presencia de biomoléculas del tipo esculetina, euforbetina, gaulterina y kaempferol-

3-rutinósido. Este hallazgo fue corroborado en todos los casos mediante el uso de patrones específicos y certificados para la esculetina, la euforbetina y el kaempferol-3-rutinósido. Asimismo, el proceso de desengrasado supuso un aumento en la presencia de esculetina y kaempferol-3-rutinósido en el extracto.

Numerosos estudios demuestran que algunos los compuestos presentes en los extractos funcionales exhiben actividad antiproliferativa, como la esculetina. Sin embargo, otros compuestos como la euforbetina están aún por estudiar. De hecho, hasta donde sabemos, es la primera vez que se aísla euforbetina a partir de la semilla de *Euphorbia lathyris*. Esta molécula se ha aislado a partir de las hojas de la especie *Fraxinus hupehensis* mediante una extracción inicial con metanol al 80% (Zhao y cols, 2020). Zhou y cols (2009) aislaron euforbetina y esculetina mediante una extracción con etil acetato a partir de la planta completa de la especie *Viola yedoensis* Makino, presentando ambos compuestos actividad anticoagulante.

Cabe destacar que la mayoría de los estudios llevados a cabo por otros autores analizan estos compuestos de forma independiente y se obtuvieron a partir de proveedores especializados en vez de a partir de extractos de *Euphorbia lathyris*. Así, Lee y cols. (2016), Wang y cols. (2002) y Turkekul y cols. (2018) demostraron el efecto antitumoral de la esculetina, contra el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NCI-

H358 y NCI-H1299), células de leucemia (HL-60), líneas celulares de cáncer de colon como HCT116 y cáncer de próstata células (PC3, DU145 y LNCaP). Sin embargo, por lo que respecta a nuestro estudio, este es el primer ensayo de actividad antitumoral del extracto etanólico completo de la harina desengrasada y sin desengrasar de *Euphorbia lathyris*. En este caso no se aislaron compuestos individuales, sino que se estudió el efecto conjunto de todos los compuestos bioactivos que conforman los extractos funcionales. Dichos extractos no solo mostraron una potente actividad antitumoral en células de cáncer de colon T84 no resistentes, con valores de IC₅₀ de 16,29 µg / ml para el extracto etanólico a partir de semillas desengrasadas, sino también en células de cáncer de colon quimiorresistentes como la línea celular HCT-15, con valores de IC₅₀ de 72,9 µg / ml para dicho extracto. Por el contrario, se observó un efecto antiproliferativo bajo en células usadas como control (células de colon CCD-18 normales) en comparación con las células tumorales. Esta actividad también fue observada para el extracto etanólico a partir de semilla sin desengrasar.

Por otra parte, la actividad del extracto etanólico a partir de semilla desengrasada de *Euphorbia lathyris* no se observó sólo en células tumorales de colon, sino que también fue detectado en células de otros tipos tumorales como glioblastoma multiforme, adenocarcinoma de páncreas y cáncer de mama, sin bien los resultados fueron diversos.

Así, en las células de glioblastoma A-172 el extracto mostró una alta actividad (IC_{50} de $18,58 \mu\text{g} / \text{ml}$) que, sin embargo, fue sólo moderada en las líneas LN-229, SF-268 y SK- N-SH. Por el contrario, la actividad antitumoral fue baja en las líneas celulares de adenocarcinoma de páncreas (PANC-1) y cáncer de mama (MCF-7) (IC_{50} : $185,76 \pm 25,8 \mu\text{g} / \text{ml}$ y $89,57 \pm 6,29 \mu\text{g} / \text{ml}$, respectivamente). Esta es la primera vez que se ha testado un extracto etanólico de la semilla de *Euphorbia lathyris* frente a líneas celulares de glioblastoma multiforme, adenocarcinoma pancreático y líneas celulares de cáncer de mama. Además, es la primera vez que se llevan a cabo estudios moleculares para dilucidar los mecanismos por los que un extracto etanólico de semilla desengrasada de *Euphorbia lathyris* induce muerte celular en la línea de cáncer de colon T84.

El análisis molecular de los mecanismos por los que el extracto etanólico indujo la muerte celular sugirió una doble vía basada en la apoptosis mediada por caspasas y la autofagia. Esta actividad puede deberse a la presencia de esculetina en el extracto. En diversos estudios, la esculetina, ensayada de forma independiente, indujo apoptosis en la línea celular de cáncer de mama humano ZR-75-1 a través de vías apoptóticas mitocondriales mediante la caspasa 9, así como en las líneas celulares de cáncer de páncreas PANC-1, MIA PaCa-2 y AsPC-1 (IC_{50} de $100 \mu\text{M}$) (Arora y cols., 2016). Los resultados obtenidos en el presente

estudio soportan la hipótesis de la apoptosis a través de la vía mitocondrial como mecanismo de acción del extracto ya que fue corroborada la activación de la caspasa 9. De hecho, estudios recientes han demostrado que la esculetina, como compuesto independiente, inhibe la proliferación en células de cáncer de colon LoVo mediante la detención en la fase G₀ / G₁ del ciclo celular así como mediante apoptosis por activación de las caspasas 3, 7 y 9 (Choi y cols., 2019; Kim y cols., 2015). Wang et al. (2019) obtuvieron resultados similares en líneas celulares de leucemia, que exhibieron muerte celular mediante mecanismos de apoptosis y autofagia después del tratamiento con la esculetina. Estos resultados apoyan lo observado con el uso del extracto etanólico desarrollado en el presente trabajo, que también activó ambos mecanismos, sugiriendo que el efecto puede estar asociado en gran medida a la presencia de este compuesto. Sin embargo, los resultados obtenidos demostraron claramente que la exposición de las células tumorales al extracto condujo a la activación de la vía de apoptosis intrínseca, con un aumento significativo en la expresión de las caspasas escindidas 9 y 3, y la vía de apoptosis extrínseca con un aumento en la expresión de caspasa escindida 8.

Por otra parte, nuestro estudio analizó el efecto de los extractos etanólicos de la harina desengrasada de *Euphorbia lathyris* sobre factores que están relacionados con la progresión del cáncer de colon.

Hasta donde sabemos, es la primera vez que se describen los efectos de extractos de *Euphorbia lathyris* sobre la modulación de la angiogénesis, el potencial metastásico y la las CSCs. Previamente, Park y cols. (2011) demostraron mediante estudios *in vitro* que la línea celular HUVEC expuesta a la esculetina redujo la síntesis de VEGF sin causar citotoxicidad y promoviendo la disminución de la angiogénesis. En nuestro estudio, no se incubaron las células HUVEC con el extracto etanólico directamente, sino que estas fueron expuestas a un medio condicionado, medio que contenía solo factores producidos por células de cáncer de colon T84 incubadas con el extracto funcional. Esta experiencia demostró una inhibición significativa de la formación de vasos sanguíneos, sugiriendo que el extracto puede modular la liberación de factores proangiogenicos por parte de las células tumorales que influyen en las HUVEC. Este mecanismo explicaría por qué existe una reducción en la formación de neovasos y apoyaría la hipótesis del efecto antiangiogénico del extracto, de gran relevancia desde el punto de vista clínico, dada la estrecha relación entre la progresión del tumor y el proceso angiogénico (Zheng y cols., 2021).

Del mismo modo, dosis no citotóxicas del extracto etanólico indujeron una disminución significativa en la migración de células tumorales que fue más evidente a las 72 h (18,7%). Este hecho puede estar relacionado con la presencia de kaempferol en el extracto. Autores

como Li y cols (2017) demostraron que el kaempferol inhibe el factor de crecimiento TGF- β , uno de los principales factores implicados en la regulación de diversas funciones celulares como son la proliferación, diferenciación y la migración celular.

Por último, nuestros resultados demuestran por primera vez que el extracto etanólico a partir de semillas desengrasadas de *Euphorbia lathyris* induce una disminución significativa en las subpoblaciones de CSCs. Estas células indiferenciadas y pluripotentes muestran una alta capacidad tumorigénica y resistencia terapéutica (quimiorresistencia), siendo las principales responsables de la recurrencia clínica y el fracaso de los regímenes quimioterapéuticos actuales (Hirata y cols., 2019). Los resultados obtenidos son clínicamente relevantes debido a que no solo muchos de los regímenes quimioterapéuticos actuales no afectan a las CSCs, sino que muchos de ellos seleccionan esta subpoblación de células, lo que supone la recurrencia temprana del tumor, aumenta su agresividad e induce la aparición de metástasis (Yujuan Zhou y cols., 2018).

6. Conclusiones

Los resultados obtenidos por la investigación que se divulga en el presente trabajo demuestran que:

- 1) La metodología empleada para la obtención de extractos funcionales a partir de la harina procedente de semillas maduras sin desengrasar y desengrasadas de *Euphorbia lathyris*, da como resultado un producto con alto contenido en polifenoles.
- 2) El procesamiento metodológico de desengrasado supone una ventaja adicional, ya que permite, por una parte, la concentración de polifenoles de alta capacidad bioactiva que asegure un rendimiento de extracción elevado, y, por otra, la eliminación de compuestos diterpenoides que pueden resultar tóxicos.
- 3) Los extractos funcionales a partir de semillas desengrasadas y sin desengrasar de *Euphorbia lathyris* poseen una elevada actividad antitumoral en células derivadas de cáncer de colon tanto resistentes como no resistentes a quimioterapia. Este efecto no se observó en células normales de epitelio de colon, lo que implica que existe un amplio rango terapéutico.

- 4) El extracto etanólico procedente de harina de semilla desengrasada de *Euphorbia lathyris* también posee una elevada actividad antitumoral frente a líneas celulares de glioblastoma multiforme y adenocarcinoma pancreático.
- 5) Concentraciones no citotóxicas del extracto etanólico procedente de semillas maduras desengrasadas de *Euphorbia lathyris*, inhiben hasta en un 20% la migración de las células tumorales de cáncer de colon.
- 6) El mecanismo de la actividad antitumoral que presenta el extracto etanólico procedente de semillas maduras desengrasadas de *Euphorbia lathyris* está mediado por la activación de caspasas, que provoca muerte celular por apoptosis, y por autofagia.
- 7) El extracto etanólico procedente de semillas maduras desengrasadas de *Euphorbia lathyris* presentó una alta proporción de polifenoles, destacando la presencia de esculetina, euforbetina, gaulterina y kaempferol-3-rutinósido.
- 8) El extracto etanólico procedente de semillas maduras desengrasadas de *Euphorbia lathyris* presenta una elevada capacidad antiangiogénica y provoca una reducción de las

subpoblaciones de CSCs, células que están claramente relacionadas con la recidiva y la agresividad del tumor.

7. Bibliografía

- Aarons, C. B., Shanmugan, S., and Bleier, J. I. S. (2014). Management of malignant colon polyps: Current status and controversies. *World Journal of Gastroenterology*, 20(43), 16178-16183. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i43.16178>
- Abenavoli, L., Izzo, A. A., Milić, N., Cicala, C., Santini, A. and Capasso, R. (2018). Milk thistle (*Silybum marianum*): A concise overview on its chemistry, pharmacological, and nutraceutical uses in liver diseases. *Phytotherapy Research: PTR*, 32(11), 2202-2213. <https://doi.org/10.1002/ptr.6171>
- Aiello, P., Sharghi, M., Mansourkhani, S. M., Ardekan, A. P., Jouybari, L., Daraei, N., Peiro, K., Mohamadian, S., Rezaei, M., Heidari, M., Peluso, I., Ghorat, F., Bishayee, A., and Kooti, W. (2019). Medicinal Plants in the Prevention and Treatment of Colon Cancer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 2075614. <https://doi.org/10.1155/2019/2075614>
- American Cancer Society. (2021). <https://www.cancer.org>
- Amin, A. R. M. R., Kucuk, O., Khuri, F. R. and Shin, D. M. (2009). Perspectives for Cancer Prevention With Natural Compounds. *Journal of Clinical Oncology*, 27(16), 2712-2725. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.6235>
- Anandhi Senthilkumar, H., Fata, J. E. and Kennelly, E. J. (2018). Phytoestrogens: The current state of research emphasizing

- breast pathophysiology. *Phytotherapy Research: PTR*, 32(9), 1707-1719. <https://doi.org/10.1002/ptr.6115>
- Arneth, B. (2019). Tumor Microenvironment. *Medicina*, 56(1). <https://doi.org/10.3390/medicina56010015>
- Arora, R., Sawney, S., Saini, V., Steffi, C., Tiwari, M. and Saluja, D. (2016). Esculetin induces antiproliferative and apoptotic response in pancreatic cancer cells by directly binding to KEAP1. *Molecular Cancer*, 15(1), 64. <https://doi.org/10.1186/s12943-016-0550-2>
- Barbato, L., Bocchetti, M., Di Biase, A., and Regad, T. (2019). Cancer Stem Cells and Targeting Strategies. *Cells*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/cells8080926>
- Belwal, T., Nabavi, S. F., Nabavi, S. M. and Habtemariam, S. (2017). Dietary Anthocyanins and Insulin Resistance: When Food Becomes a Medicine. *Nutrients*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/nu9101111>
- Berman, B. (2012). New developments in the treatment of actinic keratosis: Focus on ingenol mebutate gel. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 5, 111-122. <https://doi.org/10.2147/CCID.S28905>
- Berrino, F., De Angelis, R., Sant, M., Rosso, S., Bielska-Lasota, M., Lasota, M. B., Coebergh, J. W., and Santaquilani, M.,

- EUROCARE Working group. (2007). Survival for eight major cancers and all cancers combined for European adults diagnosed in 1995-99: Results of the EUROCARE-4 study. *The Lancet. Oncology*, 8(9), 773-783. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(07\)70245-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(07)70245-0)
- Bicchi, C., Appendino, G., Cordero, C., Rubiolo, P., Ortelli, D., and Veuthey, J. L. (2001). HPLC-UV and HPLC-positive-ESI-MS analysis of the diterpenoid fraction from caper spurge (*Euphorbia lathyris*) seed oil. *Phytochemical Analysis: PCA*, 12(4), 255-262. <https://doi.org/10.1002/pca.592>
- Binnewies, M., Roberts, E. W., Kersten, K., Chan, V., Fearon, D. F., Merad, M., Coussens, L. M., Gabrilovich, D. I., Ostrand-Rosenberg, S., Hedrick, C. C., Vonderheide, R. H., Pittet, M. J., Jain, R. K., Zou, W., Howcroft, T. K., Woodhouse, E. C., Weinberg, R. A., and Krummel, M. F. (2018). Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nature Medicine*, 24(5), 541-550. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0014-x>
- Blaszczyk, A., Sady, S., and Sielicka, M. (2019). The stilbene profile in edible berries. *Phytochemistry Reviews*, 18(1), 37-67. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9580-2>

- Bonta, R. K. (2020). Dietary Phenolic Acids and Flavonoids as Potential Anti-Cancer Agents: Current State of the Art and Future Perspectives. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 20(1), 29-48.
<https://doi.org/10.2174/1871520619666191019112712>
- Bregni, G., Akin Telli, T., Camera, S., Deleporte, A., Moretti, L., Bali, A. M., Liberale, G., Holbrechts, S., Hendlisz, A. and Sclafani, F. (2020). Adjuvant chemotherapy for rectal cancer: Current evidence and recommendations for clinical practice. *Cancer Treatment Reviews*, 83, 101948.
<https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2019.101948>
- Choi, Y. J., Lee, C. M., Park, S.-H., and Nam, M. J. (2019). Esculetin induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer LoVo cells. *Environmental Toxicology*, 34(10), 1129-1136.
<https://doi.org/10.1002/tox.22815>
- Colon Cancer. (2018). *American Family Physician*, 97(10), Online.
- Cruz, L. S., de Oliveira, T. L., Kanunfre, C. C., Paludo, K. S., Minozzo, B. R., Prestes, A. P., Wang, M., Fernandes, D., Santos, F. A. dos, Manda, V. K., Khan, S. I., Ali, Z., de Messias-Reason, I. J., Avula, B., Khan, I. A., and Beltrame, F. L. (2018). Pharmacokinetics and cytotoxic study of euphol from Euphorbia

- umbellata (Bruyns) Pax latex. *Phytomedicine*, 47, 105-112.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.04.055>
- Dawson, M. A., and Kouzarides, T. (2012). Cancer epigenetics: From mechanism to therapy. *Cell*, 150(1), 12-27.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.013>
- Dienstmann, R., Salazar, R., and Tabernero, J. (2015). Personalizing colon cancer adjuvant therapy: Selecting optimal treatments for individual patients. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33(16), 1787-1796. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.60.0213>
- Duh, P.D., Tu, Y.Y., and Yen, G.C. (1999). Antioxidant Activity of Water Extract of Harnng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *LWT - Food Science and Technology*, 32(5), 269-277.
<https://doi.org/10.1006/fstl.1999.0548>
- Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E. B., Cicala, C., Caiazzo, E., Izzo, A. A., Novellino, E., and Santini, A. (2019). Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy Research: PTR*, 33(9), 2221-2243.
<https://doi.org/10.1002/ptr.6419>
- Erices, J. I., Torres, Á., Niechi, I., Bernales, I. and Quezada, C. (2018). Current natural therapies in the treatment against

- glioblastoma. *Phytotherapy Research: PTR*, 32(11), 2191-2201.
<https://doi.org/10.1002/ptr.6170>
- Evans, F. J., and Taylor, S. E. (1983). Pro-Inflammatory, Tumour-Promoting and Anti-Tumour Diterpenes of the Plant Families Euphorbiaceae and Thymelaeaceae. En J. G. Buchanan, P. Crews, B. Epe, F. J. Evans, F. J. Hanke, L. V. Manes, A. Mondon, S. Naylor, & S. E. Taylor (Eds.), *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* (pp. 1-99). Springer.
https://doi.org/10.1007/978-3-7091-8714-2_1
- Fan, L., Zhu, H., Tao, W., Liu, L., Shan, X., Zhao, M. and Sun, D. (2019). Euphorbia factor L2 inhibits TGF- β -induced cell growth and migration of hepatocellular carcinoma through AKT/STAT3. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 62, 152931.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152931>
- Fang, X., Yan, B., Duan, F., Li, C., Zhang, C. and Wang, Y. (2014). *Chemical composition and biological activity analysis of semen Euphorbiae petroleum ether extracts*. Undefined.
</paper/Chemical-composition-and-biological-activity-of-Fang-Yan/6a6103d7114b275ff94fad1d9950a26f3886e2eb>

- Farhadi, F., Khameneh, B., Iranshahi, M., and Iranshahy, M. (2019). Antibacterial activity of flavonoids and their structure-activity relationship: An update review. *Phytotherapy Research: PTR*, 33(1), 13-40. <https://doi.org/10.1002/ptr.6208>
- Fernandez, L. M., Parlade, A. J., Wasser, E. J., Dasilva, G., de Azevedo, R. U., Ortega, C. D., Perez, R. O., Habr-Gama, A., Berho, M., and Wexner, S. D. (2019). How Reliable Is CT Scan in Staging Right Colon Cancer? *Diseases of the Colon and Rectum*, 62(8), 960-964. <https://doi.org/10.1097/DCR.0000000000001387>
- Fraga, C. G., Croft, K. D., Kennedy, D. O. and Tomás-Barberán, F. A. (2019). The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food & Function*, 10(2), 514-528. <https://doi.org/10.1039/c8fo01997e>
- Freeman, H. J. (2013). Early stage colon cancer. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 19(46), 8468-8473. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i46.8468>
- Goyal, S., Gupta, N., Chatterjee, S. and Nimesh, S. (2017). Natural Plant Extracts as Potential Therapeutic Agents for the Treatment of Cancer. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 17(2), 96-106. <https://doi.org/10.2174/1568026616666160530154407>

- Grada, A., Otero-Vinas, M., Prieto-Castrillo, F., Obagi, Z., and Falanga, V. (2017). Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. *The Journal of Investigative Dermatology*, 137(2), e11-e16. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.11.020>
- Gutierrez-Orozco, F. and Failla, M. L. (2013). Biological activities and bioavailability of mangosteen xanthenes: A critical review of the current evidence. *Nutrients*, 5(8), 3163-3183. <https://doi.org/10.3390/nu5083163>
- Hamilton, W., Round, A., Sharp, D. and Peters, T. J. (2005). Clinical features of colorectal cancer before diagnosis: A population-based case-control study. *British Journal of Cancer*, 93(4), 399-405. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602714>
- Hinshaw, D. C. and Shevde, L. A. (2019). The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Research*, 79(18), 4557-4566. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3962>
- Hirata, A., Hatano, Y., Niwa, M., Hara, A., and Tomita, H. (2019). Heterogeneity of Colon Cancer Stem Cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1139, 115-126. https://doi.org/10.1007/978-3-030-14366-4_7

- Hosoe, N., Takabayashi, K., Ogata, H., and Kanai, T. (2019). Capsule endoscopy for small-intestinal disorders: Current status. *Digestive Endoscopy: Official Journal of the Japan Gastroenterological Endoscopy Society*, 31(5), 498-507. <https://doi.org/10.1111/den.13346>
- Howard, R. A., Freedman, D. M., Park, Y., Hollenbeck, A., Schatzkin, A. and Leitzmann, M. F. (2008). Physical activity, sedentary behavior, and the risk of colon and rectal cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Cancer Causes & Control: CCC*, 19(9), 939-953. <https://doi.org/10.1007/s10552-008-9159-0>
- Huang, W.Y., Cai, Y.Z. and Zhang, Y. (2010). Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: Potential use for cancer prevention. *Nutrition and Cancer*, 62(1), 1-20. <https://doi.org/10.1080/01635580903191585>
- Ibn Waḥshīyah, A. ibn 'Alī, Levey, M. (1966). *Medieval Arabic toxicology; The book on poisons of Ibn Waḥshīya and its relation to early Indian and Greek texts*. American Philosophical Society. <https://catalog.hathitrust.org/Record/001588121>
- Idrees, M. and Tejani, M. (2019). Current Treatment Strategies for Elderly Patients with Metastatic Colon Cancer. *Cureus*, 11(5), e4713. <https://doi.org/10.7759/cureus.4713>

- Ivey, K. L., Lewis, J. R., Lim, W. H., Lim, E. M., Hodgson, J. M., and Prince, R. L. (2013). Associations of proanthocyanidin intake with renal function and clinical outcomes in elderly women. *PloS One*, 8(8), e71166. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071166>
- Jia, Z. and Orsat V. (2016). Encapsulation of phenolic compounds present in plants using protein matrices. *Food Bioscience*, 15, 87-104. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2016.05.007>
- Kabera, J. (2014). Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Classification, Function and Pharmacological Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2 (2014), 2, 377-392.
- Kanwal, R., Gupta, K., and Gupta, S. (2015). Cancer epigenetics: An introduction. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1238, 3-25. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1804-1_1
- Kapravelou, G., Martínez, R., Andrade, A. M., Chaves, C. L., López-Jurado, M., Aranda, P., Arrebola, F., Cañizares, F. J., Galisteo, M. and Porres, J. M. (2015). Improvement of the antioxidant and hypolipidaemic effects of cowpea flours (*Vigna unguiculata*) by fermentation: Results of in vitro and in vivo experiments. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(6), 1207-1216. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6809>

- Keum, N., and Giovannucci, E. (2019). Global burden of colorectal cancer: Emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 16(12), 713-732. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0189-8>
- Kim, A. D., Han, X., Piao, M. J., Hewage, S. R. K. M., Hyun, C. L., Cho, S. J. and Hyun, J. W. (2015). Esculetin induces death of human colon cancer cells via the reactive oxygen species-mediated mitochondrial apoptosis pathway. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 39(2), 982-989. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.03.003>
- Koklesova, L., Liskova, A., Samec, M., Qaradakhi, T., Zulli, A., Smejkal, K., Kajo, K., Jakubikova, J., Behzadi, P., Pec, M., Zubor, P., Biringer, K., Kwon, T. K., Büsselberg, D., Sarria, G. R., Giordano, F. A., Golubnitschaja, O. and Kubatka, P. (2020). Genoprotective activities of plant natural substances in cancer and chemopreventive strategies in the context of 3P medicine. *The EPMA Journal*, 11(2), 261-287. <https://doi.org/10.1007/s13167-020-00210-5>
- Kuipers, E. J., Grady, W. M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J. J., Boelens, P. G., van de Velde, C. J. H. and Watanabe, T. (2015). Colorectal cancer. *Nature Reviews. Disease Primers*, 1, 15065. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.65>

- Kupchan, S. M., Uchida, I., Branfman, A. R., Dailey, R. G., and Fei, B. Y. (1976). Antileukemic principles isolated from euphorbiaceae plants. *Science (New York, N.Y.)*, 191(4227), 571-572.
<https://doi.org/10.1126/science.1251193>
- Lasisi, F. and Rex, D. K. (2011). Improving protection against proximal colon cancer by colonoscopy. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 5(6), 745-754.
<https://doi.org/10.1586/egh.11.78>
- Lee, J. W., Lee, C., Jin, Q., Jang, H., Lee, D., Lee, H.-J., Shin, J. W., Han, S. B., Hong, J. T., Kim, Y., Lee, M. K., and Hwang, B. Y. (2016). Diterpenoids from the Roots of *Euphorbia fischeriana* with Inhibitory Effects on Nitric Oxide Production. *Journal of Natural Products*, 79(1), 126-131.
<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00789>
- Lee, R., Jeon, Y., Cho, J., Jang, J., Kong, I., Kim, S.H., Kim, M.S., Chung, H.J., Oh, K.B., Park, S.M., Shin, J.C., Seo, J.M., Ko, S., Shim, J.H., and Chae, J.I. (2016). Esculetin exerts anti-proliferative effects against non-small-cell lung carcinoma by suppressing specificity protein 1 in vitro. *General Physiology and Biophysics*, 36(1), 31-39.
https://doi.org/10.4149/gpb_2016024

- Lenz, H.J. (2007). *Management and preparedness for infusion and hypersensitivity reactions. The oncologist*, 12(5), 601-609.
<https://doi.org/10.1634/theoncologist.12-5-601>
- Li, L., Greene, I., Readhead, B., Menon, M.C., Kidd, B.A., Uzilov, A.V., Wei, C., Philippe, N., Schroppel, B., He, J.C., Chen, R., and Dudley, J.T. (2017). Novel Therapeutics Identification for Fibrosis in Renal Allograft Using Integrative Informatics Approach. *Scientific Reports*, 7, 39487.
<https://doi.org/10.1038/srep39487>
- Li, T., Kang, G., Wang, T., and Huang, H. (2018). Tumor angiogenesis and anti-angiogenic gene therapy for cancer. *Oncology Letters*, 16(1), 687-702. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8733>
- Liao, S.G., Zhan, Z.J., Yang, S.P., and Yue, J.M. (2005). Lathyranoic Acid A: First Secolathyrane Diterpenoid in Nature from *Euphorbia lathyris*. *Organic Letters*, 7(7), 1379-1382.
<https://doi.org/10.1021/ol050206a>
- Lin, O. S. (2009). Acquired risk factors for colorectal cancer. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 472, 361-372.
https://doi.org/10.1007/978-1-60327-492-0_16
- Liu, Z.G., Li, Z.L., Bai, J., Meng, D.L., Li, N., Pei, Y.H., Zhao, F., and Hua, H.M. (2014). Anti-inflammatory diterpenoids from the

- roots of *Euphorbia ebracteolata*. *Journal of Natural Products*, 77(4), 792-799. <https://doi.org/10.1021/np400873v>
- Loree, J. M., and Kopetz, S. (2017). Recent developments in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 9(8), 551-564. <https://doi.org/10.1177/1758834017714997>
- Lu, J., Li, G., Huang, J., Zhang, C., Zhang, L., Zhang, K., Li, P., Lin, R., and Wang, J. (2014). Lathyrane-type diterpenoids from the seeds of *Euphorbia lathyris*. *Phytochemistry*, 104, 79-88. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.04.020>
- Maffione, A. M., Rubello, D., Caroli, P., Colletti, P. M., and Matteucci, F. (2020). Is It Time to Introduce PET/CT in Colon Cancer Guidelines? *Clinical Nuclear Medicine*, 45(7), 525-530. <https://doi.org/10.1097/RLU.0000000000003076>
- Mileo, A. M., and Miccadei, S. (2016). Polyphenols as Modulator of Oxidative Stress in Cancer Disease: New Therapeutic Strategies. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 6475624. <https://doi.org/10.1155/2016/6475624>
- Miller, D. D., Schricker, B. R., Rasmussen, R. R., and Van Campen, D. (1981). An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 34(10), 2248-2256. <https://doi.org/10.1093/ajcn/34.10.2248>

- Nakayama, M., and Oshima, M. (2019). Mutant p53 in colon cancer. *Journal of Molecular Cell Biology*, 11(4), 267-276.
<https://doi.org/10.1093/jmcb/mjy075>
- Nam, K.A. and Lee, S.K. (2000). Evaluation of Cytotoxic Potential of Natural Products in Cultured Human Cancer Cells. *Natural Product Sciences*, 6(4), 183-188.
- Nambudiri, N. S., and Nambudiri, V. E. (2013). Euphorbia peplus: 18th-century insights on a 21st-century therapy. *JAMA Dermatology*, 149(9), 1081.
<https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2013.5118>
- Nappi, A., Berretta, M., Romano, C., Tafuto, S., Cassata, A., Casaretti, R., Silvestro, L., Divitiis, C. D., Alessandrini, L., Fiorica, F., Ottaiano, A., and Nasti, G. (2018). Metastatic Colorectal Cancer: Role of Target Therapies and Future Perspectives. *Current Cancer Drug Targets*, 18(5), 421-429.
<https://doi.org/10.2174/1568009617666170209095143>
- Nassar, D., and Blanpain, C. (2016). Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. *Annual Review of Pathology*, 11, 47-76. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044438>
- Nebbioso, A., Tambaro, F. P., Dell'Aversana, C., and Altucci, L. (2018). Cancer epigenetics: Moving forward. *PLoS Genetics*,

- 14(6), e1007362.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007362>
- Nee, J., Chippendale, R. Z., and Feuerstein, J. D. (2020). Screening for Colon Cancer in Older Adults: Risks, Benefits, and When to Stop. *Mayo Clinic Proceedings*, 95(1), 184-196.
<https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.02.021>
- Nguyen, L. H., Goel, A., and Chung, D. C. (2020). Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology*, 158(2), 291-302.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.08.059>
- NIH (nciglobal,ncienterprise). (2011, febrero 2). [NciAppModulePage].
<https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/sistema-de-estadificacion-del-ajcc>
- Ortiz, R., Prados, J., Melguizo, C., Rama, A. R., Segura, A., Rodríguez-Serrano, F., Boulaiz, H., Hita, F., Martínez-Amat, A., Madeddu, R., Ramos, J. L., and Aranega, A. (2009). The cytotoxic activity of the phage E protein suppress the growth of murine B16 melanomas in vitro and in vivo. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 87(9), 899-911.
<https://doi.org/10.1007/s00109-009-0493-9>
- Oyenihi, A. B., and Smith, C. (2019). Are polyphenol antioxidants at the root of medicinal plant anti-cancer success? *Journal of*

- Ethnopharmacology*, 229, 54-72.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.09.037>
- Park S.S., Park S.K., Lim J.H., Choi Y.H., Kim W.J., and Moon S.K. (2011). *Esculetin inhibits cell proliferation through the Ras/ERK1/2 pathway in human colon cancer cells*. *Oncology Report*. 25(1), 223-30.
- Park, Y., Subar, A. F., Kipnis, V., Thompson, F. E., Mouw, T., Hollenbeck, A., Leitzmann, M. F., and Schatzkin, A. (2007). Fruit and vegetable intakes and risk of colorectal cancer in the NIH-AARP diet and health study. *American Journal of Epidemiology*, 166(2), 170-180.
<https://doi.org/10.1093/aje/kwm067>
- Patel, J. D., and Chang, K. J. (2016). The role of virtual colonoscopy in colorectal screening. *Clinical Imaging*, 40(2), 315-320.
<https://doi.org/10.1016/j.clinimag.2015.07.009>
- Peters, J. M., and Gonzalez, F. J. (2018). The Evolution of Carcinogenesis. *Toxicological Sciences*, 165(2), 272-276.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy184>
- Porres, J. M., Aranda, P., López-Jurado, M., and Urbano, G. (2005). Nutritional potential of raw and free alpha-galactosides lupin (*Lupinus albus* Var. Multolupa) seed flours. Effect of phytase treatment on nitrogen and mineral dialyzability. *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 3088-3094.
<https://doi.org/10.1021/jf0479968>
- Praud, D., Parpinel, M., Guercio, V., Bosetti, C., Serraino, D., Facchini, G., Montella, M., La Vecchia, C., and Rossi, M. (2018). Proanthocyanidins and the risk of prostate cancer in Italy. *Cancer Causes & Control: CCC*, 29(2), 261-268.
<https://doi.org/10.1007/s10552-018-1002-7>
- Rahimi, E., Yazdani Charati, J., Mohammad Pour Tahamtan, R., and Maleki, I. (2020). Evaluation of demographic, pathologic, and clinical characteristics and overall survival of patients with colon cancer in Northern Iran (Mazandaran Province) during 2012-2019. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 13(3), 209-218.
- Rees, A., Dodd, G. F., and Spencer, J. P. E. (2018). The Effects of Flavonoids on Cardiovascular Health: A Review of Human Intervention Trials and Implications for Cerebrovascular Function. *Nutrients*, 10(12).
<https://doi.org/10.3390/nu10121852>
- Reglero, C., and Reglero, G. (2019). Precision Nutrition and Cancer Relapse Prevention: A Systematic Literature Review. *Nutrients*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/nu11112799>

- Ricigliano, V. A., Sica, V. P., Knowles, S. L., Diette, N., Howarth, D. G., and Oberlies, N. H. (2020). Bioactive diterpenoid metabolism and cytotoxic activities of genetically transformed *Euphorbia lathyris* roots. *Phytochemistry*, 179, 112504. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112504>
- Rivers-Auty, J., and Ashton, J. C. (2013). Vehicles for lipophilic drugs: implications for experimental design, neuroprotection, and drug discovery. *Current neurovascular research*, 10(4), 356-360. <https://doi.org/10.2174/15672026113109990021>
- Roslan, N. H., Makpol, S., and Mohd Yusof, Y. A. (2019). A Review on Dietary Intervention in Obesity Associated Colon Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 20(5), 1309-1319. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.5.1309>
- Sdayria, J., Rjeibi, I., Feriani, A., Ncib, S., Bouguerra, W., Hfaiedh, N., Elfeki, A., and Allagui, M. S. (2018). Chemical Composition and Antioxidant, Analgesic, and Anti-Inflammatory Effects of Methanolic Extract of *Euphorbia retusa* in Mice. *Pain Research & Management*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/4838413>
- Sen, T., and Samanta, S. K. (2015). Medicinal plants, human health and biodiversity: A broad review. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 147, 59-110. https://doi.org/10.1007/10_2014_273

- SEOM: *Sociedad Española de Oncología Médica*. (2019).
<https://seom.org/info-sobre-el-cancer/colon-recto?start=1>
- Shi, Q.W., Su, X.H., and Kiyota, H. (2008). Chemical and pharmacological research of the plants in genus *Euphorbia*. *Chemical Reviews*, 108(10), 4295-4327.
<https://doi.org/10.1021/cr078350s>
- Shrikanta, A., Kumar, A., and Govindaswamy, V. (2015). Resveratrol content and antioxidant properties of underutilized fruits. *Journal of Food Science and Technology*, 52(1), 383-390.
<https://doi.org/10.1007/s13197-013-0993-z>
- Silva, V. A. O., Rosa, M. N., Tansini, A., Oliveira, R. J. S., Martinho, O., Lima, J. P., Pianowski, L. F., and Reis, R. M. (2018). In vitro screening of cytotoxic activity of euphol from *Euphorbia tirucalli* on a large panel of human cancer-derived cell lines. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 16(2), 557-566.
<https://doi.org/10.3892/etm.2018.6244>
- Singla, R. K., Dubey, A. K., Garg, A., Sharma, R. K., Fiorino, M., Ameen, S. M., Haddad, M. A., and Al-Hiary, M. (2019). Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures. *Journal of AOAC International*, 102(5), 1397-1400. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.19-0133>

- Siritapetawee, J., Teamtisong, K., Limphirat, W., Charoenwattanasatien, R., Attarataya, J., and Mothong, N. (2020). Identification and characterization of a protease (EuRP-61) from *Euphorbia resinifera* latex. *International journal of biological macromolecules*, 145, 998-1007. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.190>
- Stannard, J. (1964). A Fifteenth-Century Botanical Glossary. *Isis*, 55(3), 353-367. <https://doi.org/10.1086/349871>
- Luca, S. V., Macovei, I., Bujor, A., Miron, A., Skalicka-Woźniak, K., Aprotosoiaie, A.C., and Trifan, A. (2020). *Bioactivity of dietary polyphenols: The role of metabolites*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*; *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1546669>
- Tamas, K., Walenkamp, A. M. E., de Vries, E. G. E., van Vugt, M. A. T. M., Beets-Tan, R. G., van Etten, B., de Groot, D. J. A., and Hospers, G. a. P. (2015). Rectal and colon cancer: Not just a different anatomic site. *Cancer Treatment Reviews*, 41(8), 671-679. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2015.06.007>
- Tariq, A., Sadia, S., Pan, K., Ullah, I., Mussarat, S., Sun, F., Abiodun, O. O., Batbaatar, A., Li, Z., Song, D., Xiong, Q., Ullah, R., Khan, S., Basnet, B. B., Kumar, B., Islam, R., and Adnan, M. (2017). A systematic review on ethnomedicines of anti-cancer

- plants. *Phytotherapy Research: PTR*, 31(2), 202-264.
<https://doi.org/10.1002/ptr.5751>
- Teng, Y.-N., Wang, Y., Hsu, P.-L., Xin, G., Zhang, Y., Morris-Natschke, S. L., Goto, M., and Lee, K.-H. (2018). Mechanism of action of cytotoxic compounds from the seeds of *Euphorbia lathyris*. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 41, 62-66.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.02.001>
- Thanikachalam, K., and Khan, G. (2019). Colorectal Cancer and Nutrition. *Nutrients*, 11(1).
<https://doi.org/10.3390/nu11010164>
- Thapliyal, A., Khar, R. K., and Chandra, A. (2018). *Overview of Cancer and Medicinal Herbs used for Cancer Therapy*. 8.
- Tresserra-Rimbau, A., Rimm, E. B., Medina-Remón, A., Martínez-González, M. A., López-Sabater, M. C., Covas, M. I., Corella, D., Salas-Salvadó, J., Gómez-Gracia, E., Lapetra, J., Arós, F., Fiol, M., Ros, E., Serra-Majem, L., Pintó, X., Muñoz, M. A., Gea, A., Ruiz-Gutiérrez, V., and Estruch, R., PREDIMED Study Investigators. (2014). Polyphenol intake and mortality risk: A re-analysis of the PREDIMED trial. *BMC Medicine*, 12, 77.
<https://doi.org/10.1186/1741-7015-12-77>

- Turkekul, K., Colpan, R. D., Baykul, T., Ozdemir, M. D., and Erdogan, S. (2018). Esculetin Inhibits the Survival of Human Prostate Cancer Cells by Inducing Apoptosis and Arresting the Cell Cycle. *Journal of Cancer Prevention*, 23(1), 10-17. <https://doi.org/10.15430/JCP.2018.23.1.10>
- Ul-Haq, I., Ullah, N., Bibi, G., Kanwal, S., Sheeraz Ahmad, M., and Mirza, B. (2012). Antioxidant and Cytotoxic Activities and Phytochemical Analysis of Euphorbia wallichii Root Extract and its Fractions. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 11(1), 241-249.
- Vaghari-Tabari, M., Majidinia, M., Moein, S., Qujeq, D., Asemi, Z., Alemi, F., Mohamadzadeh, R., Targhazeh, N., Safa, A., and Yousefi, B. (2020). MicroRNAs and colorectal cancer chemoresistance: New solution for old problem. *Life Sciences*, 259, 118255. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118255>
- Vasas, A., and Hohmann, J. (2014). Euphorbia diterpenes: Isolation, structure, biological activity, and synthesis (2008-2012). *Chemical Reviews*, 114(17), 8579-8612. <https://doi.org/10.1021/cr400541j>
- Viallard, C., and Larrivé, B. (2017). Tumor angiogenesis and vascular normalization: Alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*, 20(4), 409-426. <https://doi.org/10.1007/s10456-017-9562-9>

- Wang, C. J., Hsieh, Y. J., Chu, C. Y., Lin, Y. L., and Tseng, T. H. (2002). Inhibition of cell cycle progression in human leukemia HL-60 cells by esculetin. *Cancer Letters*, 183(2), 163-168. [https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(02\)00031-9](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(02)00031-9)
- Wang, Q., Zhen, Y.Q., Gao, F., Huang, S., and Zhou, X.L. (2018). Five New Diterpenoids from the Seeds of *Euphorbia lathyris*. *Chemistry & Biodiversity*, 15(11), e1800386. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201800386>
- Wang, X., Yang, C., Zhang, Q., Wang, C., Zhou, X., Zhang, X., and Liu, S. (2019). In vitro anticancer effects of esculetin against human leukemia cell lines involves apoptotic cell death, autophagy, G0/G1 cell cycle arrest and modulation of Raf/MEK/ERK signalling pathway. *Journal of B.U.ON.: Official Journal of the Balkan Union of Oncology*, 24(4), 1686-1691.
- Whiteside, T. L. (2008). The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*, 27(45), 5904. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.271>
- Wong, F.C., Chai, T.T., and Xiao, J. (2019). The influences of thermal processing on phytochemicals and possible routes to the discovery of new phytochemical conjugates. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(6), 947-952. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1479681>

- Wu, C. (2018). Systemic Therapy for Colon Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 27(2), 235-242.
<https://doi.org/10.1016/j.soc.2017.11.001>
- Wu, T., and Dai, Y. (2017). Tumor microenvironment and therapeutic response. *Cancer Letters*, 387, 61-68.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.043>
- Xiao, Y., Zhang, S., Tong, H., and Shi, S. (2018). Comprehensive evaluation of the role of soy and isoflavone supplementation in humans and animals over the past two decades. *Phytotherapy Research: PTR*, 32(3), 384-394.
<https://doi.org/10.1002/ptr.5966>
- Xing, L., Zhang, H., Qi, R., Tsao, R., and Mine, Y. (2019). Recent Advances in the Understanding of the Health Benefits and Molecular Mechanisms Associated with Green Tea Polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(4), 1029-1043.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06146>
- Yu, Z., Pestell, T. G., Lisanti, M. P., and Pestell, R. G. (2012). Cancer Stem Cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(12), 2144.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.08.022>
- Zanotelli, M. R., and Reinhart-King, C. A. (2018). Mechanical Forces in Tumor Angiogenesis. *Advances in Experimental Medicine and*

- Biology*, 1092, 91-112. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95294-9_6
- Zhang, L, Wang, C., Meng, Q., Tian, Q., Niu, Y., and Niu, W. (2017). Phytochemicals of *Euphorbia lathyris* L. and Their Antioxidant Activities. *Molecules* (Basel, Switzerland), 22(8). <https://doi.org/10.3390/molecules22081335>
- Zhang, L., and Shay, J. W. (2017). Multiple Roles of APC and its Therapeutic Implications in Colorectal Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 109(8). <https://doi.org/10.1093/jnci/djw332>
- Zhang, Q. W., Lin, L. G., and Ye, W. C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese medicine*, 13, 20. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>
- Zhang, Y., and Weinberg, R. A. (2018). Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: Complexity and opportunities. *Frontiers of Medicine*, 12(4), 361-373. <https://doi.org/10.1007/s11684-018-0656-6>
- Zhao, C. N., Yao, Z. L., Yang, D., Ke, J., Wu, Q. L., Li, J. K., and Zhou, X. D. (2020). Chemical Constituents from *Fraxinus hupehensis* and Their Antifungal and Herbicidal

- Activities. *Biomolecules*, 10(1), 74.
<https://doi.org/10.3390/biom10010074>
- Zheng, X., Liu, J., Li, X., Tian, R., Shang, K., Dong, X., and Cao, B. (2021). Angiogenesis is promoted by exosomal DPP4 derived from 5-fluorouracil-resistant colon cancer cells. *Cancer Letters*, 497, 190-201.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.10.009>
- Zhou, H. Y., Hong, J. L., Shu, P., Ni, Y. J., and Qin, M. J. (2009). A new dicoumarin and anticoagulant activity from *Viola yedoensis* Makino. *Fitoterapia*, 80(5), 283-285.
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.03.005>
- Zhou, Y., Zheng, J., Li, Y., Xu, D.P., Li, S., Chen, Y.M., and Li, H.B. (2016). Natural Polyphenols for Prevention and Treatment of Cancer. *Nutrients*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/nu8080515>
- Zhou, Y., Xia, L., Wang, H., Oyang, L., Su, M., Liu, Q., Lin, J., Tan, S., Tian, Y., Liao, Q., and Cao, D. (2018). Cancer stem cells in progression of colorectal cancer. *Oncotarget*, 9(70), 33403-33415. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23607>
- Zhu, A., Zhang, T., and Wang, Q. (2018). The phytochemistry, pharmacokinetics, pharmacology and toxicity of *Euphorbia* semen. *Journal of Ethnopharmacology*, 227, 41-55.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.08.024>

8. Anexo 1.

Publicaciones
