

UNIVERSIDAD DE GRANADA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo de extractos funcionales de semillas
de leguminosas y plantas nativas de Ecuador:
análisis de su capacidad antioxidante, preventiva
y antitumoral**

Memoria presentada por **Don. Marco Orlando Fuel Herrera**
Para optar por el grado de Doctor por la Universidad de Granada

Granada, 29 de noviembre del 2021

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Marco Orlando Fuel Herrera
ISBN: 978-84-1117-580-7
URI: <https://hdl.handle.net/10481/77700>

Índice

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| ABREVIATURAS..... | 15 |
| RESUMEN..... | 19 |
| SUMMARY..... | 23 |
| 1. Introducción..... | 29 |
| 1.1 Cáncer de colon..... | 29 |
| 1.2 Datos epidemiológicos..... | 29 |
| 1.3 Etiología del CCR y factores de riesgo..... | 31 |
| 1.3.1 Factores dietéticos..... | 32 |
| 1.3.2 Problemas digestivos..... | 32 |
| 1.3.3 Consumo de alcohol y tabaco..... | 33 |
| 1.3.4 Obesidad e inactividad física..... | 34 |
| 1.3.5 Factores genéticos..... | 36 |
| 1.3.6 Alteraciones en las vías moleculares..... | 38 |
| 1.4 Fisiopatología del CCR..... | 44 |
| 1.5 Clasificación por etapas..... | 49 |
| 1.6 Metástasis del CCR..... | 53 |
| 1.7 Signos y síntomas clínicas..... | 57 |
| 1.8 Diagnóstico del CCR..... | 58 |
| 1.9 Tratamiento..... | 62 |
| 1.9.1 Tratamiento sistémico..... | 63 |
| 1.9.2 Perspectivas terapéuticas futuras..... | 65 |
| 1.10 Mecanismos de resistencia..... | 65 |
| 1.11 Alimentos funcionales y nutraceuticos..... | 68 |
| 1.12 Compuestos bioactivos eficaces para la terapéutica del CCR..... | 71 |
| 1.12.1 Polifenoles..... | 72 |
| 1.12.2 Carotenoides..... | 74 |
| 1.12.3 Estilbenos..... | 75 |
| 1.12.4 Terpenos..... | 76 |
| 1.13 Plantas nativas de Ecuador y sus propiedades antitumorales ... | 77 |
| 1.13.1 <i>Moringa oleifera</i> | 78 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 1.13.2 | <i>Tropaeolum tuberosum</i> | 79 |
| 1.13.3 | <i>Annona cherimola</i> | 80 |
| 1.14 | Leguminosas y sus propiedades antitumorales..... | 81 |
| 1.14.1 | Propiedades nutricionales | 81 |
| 1.14.2 | Propiedades antioxidantes | 82 |
| 1.14.3 | Control del síndrome metabólico | 83 |
| 1.14.4 | <i>Vicia faba</i> | 83 |
| 1.14.5 | <i>Vicia narbonensis</i> | 84 |
| 1.14.6 | <i>Vicia ervilia</i> | 85 |
| 1.14.7 | <i>Vicia sativa</i> | 86 |
| 1.14.8 | <i>Medicago sativa</i> | 86 |
| 1.14.9 | <i>Lupinus luteus</i> | 87 |
| 2. | Objetivos | 91 |
| 3. | Material y métodos..... | 95 |
| 3.1 | Material vegetal | 95 |
| 3.2 | Obtención del material de partida. | 96 |
| 3.3 | Preparación de los extractos etanólicos..... | 96 |
| 3.4 | Preparación de los Hidrolizados Proteicos | 97 |
| 3.4.1 | Rendimientos de la extracción | 98 |
| 3.5 | Pruebas bioquímicas para la determinación de la capacidad antioxidante | 99 |
| 3.5.1 | Cuantificación de polifenoles totales | 99 |
| 3.5.2 | Evaluación de la actividad antioxidante mediante ABTS | 100 |
| 3.5.3 | Ensayo de captación/retención de radicales (DPPH) | 101 |
| 3.5.4 | Ensayos de inhibición de la peroxidación lipídica (TBARS) ... | 102 |
| 3.6 | Capacidad antioxidante en cultivos celulares..... | 105 |
| 3.7 | Capacidad de inducción de enzimas detoxificantes..... | 106 |
| 3.7.1 | Tratamiento y purificación de la fracción citosólica..... | 106 |
| 3.7.2 | Ensayo de la glutatión S-transferasa (GST) | 107 |
| 3.7.3 | Ensayo de NAD(P)H: Quinona oxidoreductasa (QR)..... | 107 |
| 3.8 | Análisis cromatográficos | 108 |
| 3.9 | Cultivos celulares | 109 |
| 3.9.1 | Ensayo de viabilidad celular | 109 |

| | |
|--|-----|
| 3.9.2 Viabilidad celular en cultivos de MTSs | 111 |
| 3.10 Análisis del ciclo celular | 111 |
| 3.11 Análisis de proteínas por Western Blot | 112 |
| 3.11.1 Obtención de proteínas | 112 |
| 3.11.2 Cuantificación de proteínas | 113 |
| 3.11.3 Preparación del gel SDS-PAGE..... | 113 |
| 3.11.4 Preparación de las muestras | 114 |
| 3.11.5 Electroforesis..... | 114 |
| 3.11.6 Transferencia | 114 |
| 3.11.7 Bloqueo de la membrana e incubación con anticuerpos..... | 115 |
| 3.11.8 Revelado..... | 116 |
| 3.12 Etiquetado con Lysotracker | 116 |
| 3.13 Determinación de las especies reactivas de oxígeno celulares..... | 117 |
| 3.14 Extracción de RNA de las líneas celulares | 118 |
| 3.14.1 Cuantificación del RNA..... | 119 |
| 3.14.2 Transcriptasa reversa y reacción en cadena de la polimerasa | 119 |
| 3.14.3 Estudio de expresión de RNAm mediante q-PCR | 120 |
| 3.15 Análisis estadístico | 121 |
| 4. Resultados | 125 |
| 4.1 Rendimiento y actividad antioxidante | 125 |
| 4.2 Actividad antioxidante en cultivos celulares | 131 |
| 4.3 Análisis de espectrometría de masas | 132 |
| 4.4 Efectos de los extractos etanólicos sobre la actividad enzimática desintoxicante | 146 |
| 4.5 Actividad antiproliferativa en células cultivadas | 149 |
| 4.6 Efecto antiproliferativo de la terapia combinada de los extractos y del 5-FU | 152 |
| 4.7 Efecto de los extractos etanólicos en el ciclo celular..... | 156 |
| 4.8 Análisis molecular de la inducción de la muerte celular mediante extractos etanólicos | 159 |
| 4.9 Inducción de especies reactivas de oxígeno mediante extractos etanólicos | 162 |
| 4.10 Efecto de los extractos etanólicos sobre los marcadores de células madre cancerosas..... | 164 |

| | |
|-----------------------|-----|
| 5. Discusión..... | 167 |
| 6. Conclusiones | 183 |
| 7. Bibliografía..... | 187 |
| Anexo-..... | 233 |
| Publicación | 233 |

ABREVIATURAS

| | |
|--------|--|
| ABTS | 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) |
| AJCC | <i>American Joint Committee on Cancer</i> |
| APC | Poliposis adenomatosa coli |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| BER | Reparación de escisión de base |
| CA19-9 | Antígeno del cáncer 19 |
| CCK-8 | <i>Cell counting Kit-8</i> |
| CCR | Cáncer colorrectal |
| CIMP | Fenotipo metilador de la isla CpG |
| CIN | Vía de la inestabilidad cromosómica |
| CEA | Proteína del antígeno carcinoembrionario |
| CFTR | Gen regulador de la conductancia transmembrana |
| CMS | Subtipos moleculares de consenso |
| COX-2 | Ciclooxigenasa 2 |
| CSCs | Células madre tumorales |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DMSO | Dimetil sulfóxido |
| ECIS | <i>European Cancer Information System</i> |
| EE | Extracto etanólico |
| EGFR | Receptor del factor de crecimiento epidérmico |
| EMT | Transición epitelio-mesenquimal |
| FACS | <i>Calibur Flow cytometry system</i> |
| FAP | Poliposis adenomatosa familiar |
| FBS | Suero fetal bovino (<i>Fetal bovin serum</i>) |
| FIT | Prueba inmunoquímica fecal |
| FITC | Isotiocianato de fluoresceína |

| | |
|------------------|---|
| GAE | Equivalente de ácido gálico |
| HP | Hidrolizado proteico |
| IARC | <i>International Agency for Research on Cancer</i> |
| IC | Intervalo de confianza |
| IC ₅₀ | <i>Half maximal inhibitory concentration</i> |
| IGF-1 | Factor de crecimiento similar a la insulina 1 |
| GST | Glutación S-transferasa |
| HIF-1 α | Factor 1 α inducible por hipoxia |
| HNPCC | Cáncer colorrectal hereditario no polipósico |
| LPIC | <i>Lipid peroxidation inhibition capacity</i> |
| LV | Leucovorina |
| MAP | Síndrome de poliposis asociada a MYH |
| MAP-LC3 | <i>Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha</i> |
| MDA | Malondialdehído |
| MDR | Multidrogoresistente |
| MMR | <i>Mismatch repair</i> |
| MSI | Inestabilidad de microsatélites |
| MSS | Estabilidad de microsatélites |
| MTS | Esferoides tumorales multicelulares |
| MTT | <i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide</i> |
| NAC | N-acetil-l-cisteína |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| pb | Pares de bases |
| PCNA | Antígeno nuclear de células proliferantes |
| PI | Yoduro de propidio |
| PJS | Síndrome de Peutz-Jeghers |
| P-pg | P-glicoproteína |

| | |
|----------|---|
| QR | Quinona oxidoreductasa |
| QTOF | <i>Quadrupole-time-of-flight</i> |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| RPA | Proteína de replicación A |
| RT-qPCR | Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real |
| SDS-PAGE | Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis |
| SL | Síndrome de Lynch |
| SRB | Sulforodamina B |
| TBA | Ácido tiobarbitúrico |
| TBARs | <i>Thiobarbituric acid reactive substances</i> |
| TCA | Ácido tricloroacético |
| TR | Tiempo de retención |
| UPLC | Cromatografía líquida de ultra Alta resolución |
| UUA | Unidades de actividad antioxidante |
| VEGF | Factor de crecimiento endotelial vascular |
| 5-FU | 5-Fluorouracilo |

RESUMEN

El cáncer colorrectal (CCR) es uno de los tumores más comunes en todo el mundo, representando el 10% de todos los tumores. En los próximos años, según la “International Agency for Research on Cancer - IARC”, la incidencia y mortalidad incrementará progresivamente convirtiéndose el CCR en la tercera causa de muerte por cáncer en varones y la segunda en mujeres. Son necesarias, por tanto, nuevas estrategias terapéuticas que permitan mejorar el pronóstico de estos pacientes disminuyendo las recidivas, las metástasis y la resistencia a quimioterapia que provocan las terapias actuales.

Actualmente el CCR avanzado se trata habitualmente con quimioterapia (5-fluorouracilo (5-FU), oxaliplatino, cabecitabina, entre otros) y terapias dirigidas (cetuximab, Panitumumab bevacizumab entre otros) Sin embargo, la limitada eficacia clínica, el desarrollo de resistencia y efectos adversos suponen una grave limitación terapéutica del CCR. Por su parte las plantas y sus extractos poseen aplicaciones terapéuticas frente a células tumorales de cáncer de colon debido a la presencia de compuestos bioactivos que modulan vías de señalización, regulan la expresión génica e inducen apoptosis. Además, la combinación de estos componentes bioactivos con agentes quimioterapéuticos ha mostrado resultados favorables en el tratamiento del CCR relacionados con el control de los mecanismos de las vías metabólicas y mediante un efecto sinérgico que puede reducir el desarrollo de resistencias y reacciones adversas a los fármacos quimioterapéuticos.

Las leguminosas son un alimento importante en nutrición humana y animal debido a su alto contenido en proteína, fibra, hidratos de carbono complejos, vitaminas, minerales y grasa mayoritariamente poliinsaturada. Además, en los últimos años han ganado interés nutricional debido a que su consumo contribuye a la prevención de otras enfermedades como las cardiovasculares o la diabetes mellitus tipo 2.

De igual forma, algunas plantas tradicionales cultivadas en Ecuador como *Tropaeolum tuberosum*, *Annona cherimola* y *Moringa oleifera* han sido empleadas como medicina tradicional durante muchos años debido a sus propiedades terapéuticas en el tratamiento de enfermedades pulmonares, cutáneas, renales, enfermedades parasitarias, diabetes, úlceras pépticas y cáncer. Su actividad terapéutica se basa en la presencia de compuestos bioactivos como alcaloides, polifenoles y terpenoides, entre otros componentes bioactivos.

El objetivo de la presente tesis doctoral se centró en el estudio de la actividad antioxidante y antitumoral presente en los extractos etanólicos e hidrolizados proteicos de leguminosas y de las especies de *Tropaeolum tuberosum*, *Annona cherimola* y *Moringa oleifera* en líneas celulares de CCR, así como identificar los mecanismos de acción por los cuales estos extractos inducen muerte celular.

Con el objetivo de caracterizar la actividad antioxidante que presentaban los extractos funcionales, se determinó la capacidad antioxidante de los extractos utilizando diferentes pruebas bioquímicas y

una línea celular de adenocarcinoma de colon (HT-29). Asimismo, se analizó la actividad antitumoral *in vitro* en tres líneas tumorales de cáncer de colon (T84, HCT-15, SW440), en una línea de epitelio de colon no tumoral (CCD18) y en un modelo de esferoides tumorales multicelulares (MTS). Además, se evaluó la actividad sinérgica entre los extractos funcionales con el agente quimioterapéutico 5-FU y se llevaron a cabo estudios cromatográficos para identificar los potenciales compuestos bioactivos presentes en los extractos responsables de dicha actividad antioxidante y antitumoral.

Finalmente se realizaron ensayos más específicos para determinar los mecanismos de acción por el cual actúan los diferentes extractos funcionales, como es el ensayo del ciclo celular por citometría de flujo mediante tinción con yoduro de propidio, estudios de western blot para determinar la activación de las caspasas, estudios de autofagia mediante Lysotracker e identificación de la forma LC3- β 2, producción de especies reactivas de oxígeno mediante citometría de flujo con tinción DCFDA/H₂DCFDA y estudios de RT-qPCR para determinar marcadores de células madre tumorales (CSCs).

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la actividad antioxidante de los extractos funcionales de *Vicia faba*, *Vicia narbonensis* y *Medicago Sativa* y su capacidad para inhibir la proliferación celular de las líneas de cáncer de colon T84 y SW480, así como de estimular la producción de las enzimas detoxificantes glutatión S-transferasa y quinona oxidoreductasa.

Con respecto a las especies *Tropaeolum tuberosum*, *Annona cherimola* y *Moringa oleifera*. El extracto de *Annona cherimola* mostró la mayor actividad antioxidante, mientras que la *Moringa oleifera* mostró la mayor capacidad de potenciar la actividad de enzimas detoxificantes como la glutatión S-transferasa y la quinona oxidoreductasa. Además, estos dos extractos presentaron la menor IC₅₀ en las células T-84 y HCT-15 (resistente), así como el mayor nivel de inhibición de la proliferación en esferoides tumorales multicelulares de células HCT-15. El efecto inhibitor sobre las CSC es digno de mención porque, *in vivo*, estas células suelen ser responsables de las recidivas del cáncer y de la resistencia a la quimioterapia. Además, todos los extractos mostraron una actividad sinérgica con el 5-FU. El mecanismo antiproliferativo de los extractos se relacionó con la sobreexpresión de las caspasas 9, 8 y 3 y el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno. Además, se observó muerte celular por autofagia inducida por los extractos de *Moringa oleifera* y *Tropaeolum tuberosum*.

Como conclusión, cabe destacar la actividad antioxidante y antitumoral de los extractos funcionales obtenidos, los cuales son excelentes candidatos para futuros análisis moleculares de la presencia de compuestos bioactivos y estudios *in vivo* que podrían mejorar la terapia del cáncer de colon.

SUMMARY

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common tumors worldwide, representing 10% of all tumors. In the coming years, according to the International Agency for Research on Cancer (IARC), the incidence and mortality rate will increase progressively, making CRC the third leading cause of cancer death in men and the second in women. Therefore, new therapeutic strategies are needed to improve the prognosis of these patients by reducing recurrences, metastasis and resistance to chemotherapy caused by current therapies.

Currently, advanced CRC is usually treated with chemotherapy (5-fluorouracil (5-FU), oxaliplatin, capecitabine, among others) and targeted therapies (cetuximab, Panitumumab, bevacizumab, among others). However, the limited clinical efficacy, the development of resistance and adverse effects represent a serious therapeutic limitation of CRC. On the other hand, plants and their extracts have therapeutic applications against colon cancer tumor cells due to the presence of bioactive compounds that modulate signaling pathways, regulate gene expression and induce apoptosis. In addition, the combination of these bioactive compounds with chemotherapeutic agents has shown favorable results in the treatment of CRC related to the control of metabolic pathway mechanisms and through a synergistic effect that can reduce the development of resistance and adverse reactions to chemotherapeutic drugs.

Legumes are an important food in human and animal nutrition due to their high content of protein, fiber, complex carbohydrates, vitamins,

minerals and mostly polyunsaturated fat. In addition, in recent years they have gained nutritional interest due to the fact that their consumption contributes to the prevention of other diseases such as cardiovascular diseases or type 2 diabetes mellitus.

Similarly, some traditional plants cultivated in Ecuador such as *Tropaeolum tuberosum*, *Annona cherimola* and *Moringa oleifera* have been used as traditional medicine for many years due to their therapeutic properties in the treatment of pulmonary, skin, kidney, parasitic diseases, diabetes, peptic ulcers and cancer. Its therapeutic activity is based on the presence of bioactive compounds such as alkaloids, polyphenols and terpenoids, among other bioactive components.

The objective of this doctoral thesis focused on the study of the antioxidant and antitumor activity present in ethanolic extracts and protein hydrolysates of legumes and *Tropaeolum tuberosum*, *Annona cherimola* and *Moringa oleifera* species in CRC cell lines, as well as to identify the mechanisms of action by which these extracts induce cell death.

In order to characterize the antioxidant activity of the functional extracts, the antioxidant capacity of the extracts was determined using different biochemical tests and a colon adenocarcinoma cell line (HT-29). In vitro antitumor activity was also analyzed in three colon cancer tumor lines (T84, HCT-15, SW440), in a non-tumor colon epithelium line (CCD18) and in a multicellular tumor spheroid model (MTS). In addition, the synergistic activity between the functional extracts with the chemotherapeutic agent 5-FU was evaluated and chromatographic studies

were carried out to identify potential bioactive compounds present in the extracts responsible for such antioxidant and antitumor activity.

Finally, more specific assays were performed to determine the mechanisms of action by which the different functional extracts act, such as the cell cycle assay by flow cytometry using propidium iodide staining, western blot studies to determine the activation of caspases, autophagy studies by Lysotracker and identification of the LC3- β 2 form, reactive oxygen species production by flow cytometry with DCFDA/H₂DCFDA staining and RT-qPCR studies to determine tumor stem cell (CSCs) markers.

The results obtained show the antioxidant activity of functional extracts of *Vicia faba*, *Vicia narbonensis* and *Medicago Sativa* and their ability to inhibit cell proliferation of colon cancer lines T84 and SW480, as well as to stimulate the production of the detoxifying enzymes glutathione S-transferase and quinone oxidoreductase.

With respect to *Tropaeolum tuberosum*, *Annona cherimola* and *Moringa oleifera* species. *Annona cherimola* extract showed the highest antioxidant activity, while *Moringa oleifera* showed the highest capacity to enhance the activity of detoxifying enzymes such as glutathione S-transferase and quinone oxidoreductase. In addition, these two extracts presented the lowest IC₅₀ in T-84 and HCT-15 (resistant) cells, as well as the highest level of inhibition of proliferation in multicellular tumor spheroids of HCT-15 cells. The inhibitory effect on CSCs is noteworthy because, in vivo, these cells are often responsible for cancer recurrences

and resistance to chemotherapy. Moreover, all extracts showed synergistic activity with 5-FU. The antiproliferative mechanism of the extracts was related to overexpression of caspases 9, 8 and 3 and increased production of reactive oxygen species. In addition, cell death by autophagy induced by *Moringa oleifera* and *Tropaeolum tuberosum* extracts was observed.

In conclusion, the antioxidant and antitumor activity of the functional extracts obtained is noteworthy, which are excellent candidates for future molecular analysis of the presence of bioactive compounds and in vivo studies that could improve colon cancer therapy.

Introducción

1. Introducción

1.1 Cáncer de colon

El cáncer es una enfermedad que se desarrolla cuando las células del cuerpo humano comienzan a crecer y dividirse sin control escapando del proceso de muerte programada denominado apoptosis. Las estimaciones de GLOBOCAN indican que en el año 2020 se produjeron 19.3 millones de casos nuevos de cáncer a nivel mundial y cerca de 10 millones de muertes (Sung et al., 2021). Uno de los cánceres causante de los más altos índices de mortalidad y morbilidad es el cáncer colorrectal (CCR) que se origina por la proliferación celular descontrolada en el revestimiento interno del colon o del recto denominado pólipo. Existen dos tipos principales de pólipos y determinan si existe la probabilidad de que el paciente desarrolle cáncer, así los pólipos inflamatorios e hiperplásicos por lo general no son precancerosos, pero los pólipos adenomatosos (pólipos serrados sésiles y los serrados tradicionales) presentan una alta predisposición a generar CCR (West et al., 2019).

1.2 Datos epidemiológicos

Las incidencias y números de muertes por CCR varían en cada zona geográfica del mundo y en cada país dependiendo de los factores de riesgos a los que la población esté expuesta (**Figura 1**).

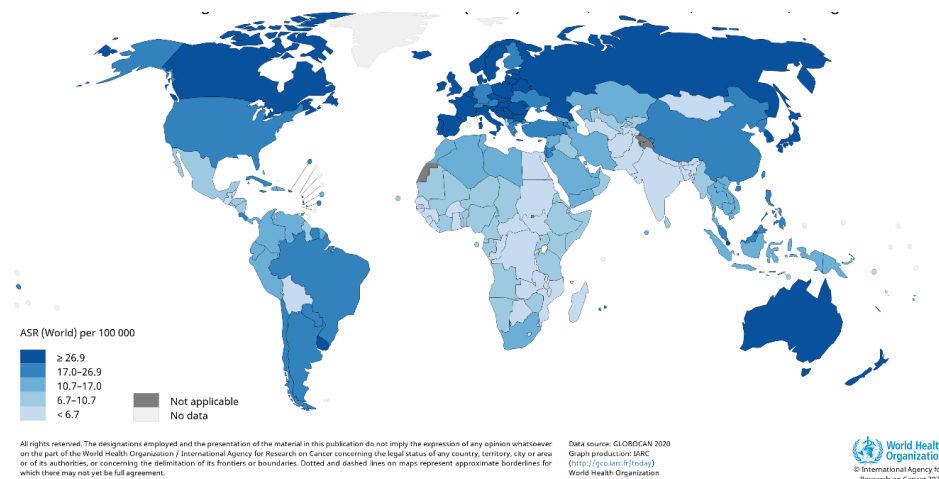


Figura 1. Tasas de estimadas de incidencia de CCR a nivel mundial por cada 100 000 personas. Tomado de GLOBOCAN 2020.

En el año 2020, se registraron 1.93 millones de nuevos casos de CCR a nivel mundial, equivalente al 10% de incidencia de cáncer en el mundo, lo que le convierte en el tercer tipo de cáncer con mayor frecuencia, además en este mismo año se registraron 0.94 millones de muertes por CCR, siendo la segunda causa de muerte por cáncer con mayor frecuencia en el mundo. Según el Sistema Europeo de Información sobre el Cáncer (ECIS), en el 2020 se registraron 341 419 casos nuevos de CCR en Europa y 156 105 muertes lo que convierte a este tipo de tumor en la segunda causa más común de muerte en mujeres (después del cáncer de mama) y la tercera en hombres (después del cáncer de pulmón y próstata) (European Cancer Information System, 2021).

La Organización Panamericana de la Salud indica que en la Región de las Américas el CCR es el cuarto cáncer con mayor incidencia con 240 000 nuevos casos y 112 000 muertes por cada año y se calcula que para el 2030 esta incidencia incremente en un 60% si no se mejoran las técnicas

para la detección temprana o se ponen en prácticas guías de tamizaje en la población de mayor riesgo (Organización Panamericana de la Salud, 2021).

La Sociedad Española de Oncología Médica estima que para el año 2021 existirán alrededor de 43 581 nuevos casos de CCR en España, ubicando a esta enfermedad como la segunda causa de muerte por cáncer con un índice de mortalidad del 14,6%. Durante el año 2020 fue responsable de 16 470 muertes (Sociedad Española de Oncología Médica, 2021).

En Estados Unidos el CCR es el tercer cáncer con mayor número de diagnósticos en mujeres y hombres, La Sociedad Estadounidense del Cáncer estima que hasta finales del 2021 existirán 45 230 nuevos casos de cáncer de recto y 10 4270 nuevos casos de cáncer de colon. El riesgo de padecer esta enfermedad es del 4% en mujeres y 4,3% en hombres, aunque la existencia de factores de riesgo y enfermedades comórbidas puede aumentar este porcentaje. Aunque los avances en salud han permitido obtener métodos de diagnóstico temprano y mejorar el tratamiento, se estima que este año el CCR será la causa de 52 980 muertes (American Cancer Society, 2021).

1.3 Etiología del CCR y factores de riesgo

Las tasas de incidencia del CCR difieren en cada país, estableciéndose que existen factores de riesgo ambientales y dietéticos que contribuyen en el origen del CCR. Es evidente, que la incidencia es mucho mayor en los países occidentales por la influencia de la dieta compuesta por un alto contenido de carne y grasa y otros factores como el consumo de

alcohol y tabaco, el estilo de vida sedentaria y la influencia de factores genéticos (Cancer Treatment Centers of America, 2020).

1.3.1 Factores dietéticos

Las dietas con elevadas cantidades de carnes rojas, alto contenido de grasas, hierro y proteínas elevan significativamente el riesgo de padecer CCR. Estudios in vitro e in vivo sugieren que el consumo de alimentos que contengan aminas heterocíclicas, aminas aromáticas e hidrocarburos aromáticos policíclicos aumentan el riesgo de desarrollar este tipo de tumor y son compuestos que se forman en el proceso denominado pirolisis de las proteínas y aminoácidos producidos al freír o asar carnes y pescado (Murphy et al., 2019). Otros estudios afirman que el consumo de vitamina D disminuye el riesgo de desarrollar CCR, algunos meta-análisis asocian la disminución de cáncer de colon y de cáncer de recto en personas con altos niveles de 25-hydroxyvitamin D en sangre al igual que con el alto consumo de calcio o leche diaria se encontraron efectos protectores frente al CCR y también el alto consumo de folato brinda protección frente a la formación del adenoma colorrectal, por lo que recomiendan llevar un patrón dietético saludable con altas ingestas de carnes blancas, productos lácteos, verduras y frutas para proteger el sistema digestivo de la formación de células cancerosas (Veettil et al., 2021).

1.3.2 Problemas digestivos

Algunas enfermedades inflamatorias intestinales tienen asociación con la neoplasia que puede sufrir el colon o el recto, por ejemplo, la colitis ulcerativa crónica, colangitis esclerosante primaria o la pancolitis ulcerosa

grave aumentan entre 5 y 15 veces los riesgos de padecer CCR, además existe evidencia científica sobre la disminución del riesgo de CCR con algunos tratamientos usados para la colitis ulcerosa (Hnatyszyn et al., 2019). Otros estudios indican que la Enfermedad de Crohn tiene un riesgo de malignidad similar a la colitis ulcerativa, aunque los datos de los estudios son poco consistentes existiendo diferencias entre los resultados mostrados por distintos autores aunque parece evidente que el riesgo es mayor cuando el daño involucra a más de un tercio de la mucosa del colon (Dominguez-Valentin et al., 2019).

Por otro lado, en los pacientes con Fibrosis Quística el riesgo de desarrollar CCR es 10 veces mayor que una persona sin la enfermedad, y este riesgo aumenta entre 2 a 5 veces luego del trasplante pulmonar, la relación del CCR con la Fibrosis Quística radica en el transporte anormal de cloruro y bicarbonato causado por las variaciones del gen regulador de la conductancia transmembrana (CFTR) que origina la producción anormal de moco y secreción en los pulmones pero también en el tracto gastrointestinal lo que vuelve a la mucosa más susceptible a desarrollar enfermedades como el CCR (Scott et al., 2020).

1.3.3 Consumo de alcohol y tabaco

Varios análisis de estudios asocian el consumo de alcohol con un alto riesgo de padecer cáncer de colon proximal y distal y cáncer rectal. Estadísticamente se concluye que del 45 al 89% de pacientes con CCR consumían alcohol en altas cantidades por más de 16 años. El CCR en estos pacientes pudo ser causado por mecanismos como la formación de

acetaldehído causada por la oxidación del alcohol que reduce los niveles de folato en el colon (un componente relacionado con la reducción de riesgos de CCR) (Kim et al., 2019).

Otro mecanismo sugiere que el alcohol causa la metilación anormal del ADN y promueve la carcinogénesis colónica al actuar como antagonista en el metabolismo de los grupos metilo. También existen mecanismos que actúan indirectamente pero favorecen el desarrollo de CCR por la alta ingesta de alcohol como el cambio en la composición de los ácidos biliares, la supresión del sistema inmune, la inducción de enzimas del citocromo P-450 y la activación de procarcinogénicos hepáticos, el retraso en la reparación del ADN y otras hipótesis que se siguen investigando (Lin et al., 2020).

El consumo a largo plazo de 20 a 40 paquetes de cigarrillos por año incrementa dos o tres veces el riesgo de desarrollar CCR. El tabaquismo causa varios cambios fisiológicos y en el CCR puede aumentar entre 20 y 60% el riesgo de la formación de pólipos adenomatosos por la formación de producto genotóxicos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, aminas aromáticas heterocíclicas y compuestos *N*-nitrosos que pueden causar lesiones precancerosas e irreversibles en la mucosa colorrectal (Amitay et al., 2020).

1.3.4 Obesidad e inactividad física

Datos epidemiológicos asocian la obesidad con el incremento del 30 a 70% de riesgo de padecer CCR en hombres y mujeres, además la obesidad abdominal y la acumulación de grasa visceral confieren un riesgo adicional.

Existen diferentes estudios que demuestran que la asociación entre obesidad y CCR puede ser causada por irregularidades en los niveles de secreción de adipocitocinas, cambios en la microbiota intestinal, resistencia a la insulina o alteraciones en los ácidos. La **Figura 2** muestra los factores potenciales que relacionan al CCR con la obesidad, los cambios metabólicos que se originan, las transformaciones celulares en el proceso cancerígeno y la secuencia desde el epitelio normal hasta la formación del carcinoma (Ye et al., 2020).

La inactividad física al igual que la obesidad puede causar resistencia a la insulina e hiperinsulinemia crónica que conduce a la reducción de la concentración de las proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) y aumenta su concentración en los tejidos y contribuye a la progresión y desarrollo de varios cánceres como el CCR. El aumento de actividad física diaria puede reducir hasta un 40% el riesgo de desarrollar CCR en hombres y mujeres debido al aumento de masa muscular, la reducción de grasa abdominal, la prevención de la obesidad y otros beneficios que trae a la salud el hacer ejercicio con regularidad (Singh et al., 2020).

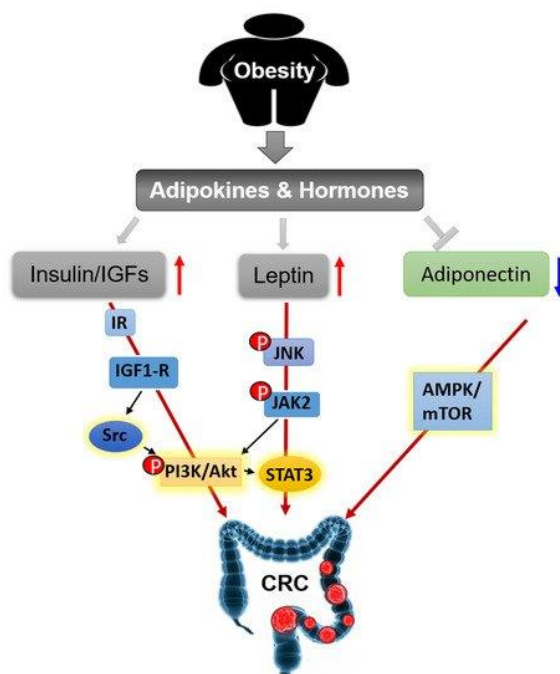


Figura 2. Las adipocinas y hormonas secretadas por la obesidad contribuyen a la patogénesis del CCR (P. Ye et al., 2020).

1.3.5 Factores genéticos

Varios factores genéticos y ambientales juegan un papel importante en el desarrollo del CCR, pero la alteración molecular más común en el CCR hereditario y esporádico es la mutación genética de la línea germinal en la poliposis adenomatosa coli (APC) localizada en el cromosoma 5q21 y causante de la poliposis adenomatosa familiar (FAP), un síndrome autosómico dominante que inicia con el crecimiento múltiple de pólipos no cancerosos en el colon con una progresión inevitable al CCR debido a la inactivación del gen APC que le impide actuar como gen supresor de tumores y no es capaz de controlar el crecimiento, proliferación, diferenciación y apoptosis celular al igual que sucede en las mutaciones del

gen que codifica la β -catenina (CTNNB1) relacionado altamente con la formación de pólipos pequeños (Aghabozorgi et al., 2019).

Otro síndrome genético relacionado con el desarrollo de CCR es el síndrome de Lynch (SL) que genera el cáncer colorrectal hereditario no polipósico (HNPCC) y es de herencia autosómica dominante. El síndrome predispone la formación de neoplasias colónicas y extracolónicas debido a las variantes germinales patogénicas en los genes que participan en la reparación de los errores en la replicación del ADN, en inglés “*mismatch repair*” (MMR), las alteraciones más comunes son en los genes *MLH1*, *MSH2*, *MLH3*, *MSH6*, *PMS1* y *PMS2* o la delección en el gen *EPCAM* que no es un gen MMR, pero inactiva el gen *MSH2*. Los errores en la replicación del ADN afectan al crecimiento y división celular y producen la tumorogénesis (Bucksch et al., 2020).

El síndrome de poliposis asociada a MYH (MAP) es causado por la mutación en el gen homólogo *MYH* (*MUTYH*) que se ubica en el cromosoma 1p34.1 e interviene en la vía de reparación de escisión de base (BER). Las mutaciones en el gen *MUTYH* causan una condición predisponen al CCR por la formación de entre 10 y 100 pólipos colorrectales similares a los que se forman en el FAP y ubicados en el colon proximal, está asociado con las mutaciones en los genes *APC* y *Kras*. Los portadores de mutaciones monoalélicas *MUTYH* con antecedentes familiares de CCR tienen un riesgo dos veces mayor de desarrollar CCR en comparación a la población general, además esta mutación es consistente

con el efecto dominando o codominante de mutaciones en otros genes que actúan en la maquinaria de reparación del ADN (Patel et al., 2020).

El síndrome de Peutz-Jeghers (PJS) es de herencia autosómica dominante y se caracteriza por la formación de pólipos hamartomatosos múltiples intestinales y extraintestinales precancerosos y la hiperpigmentación mucocutánea que aparecen en la infancia o en la adolescencia tardía. Es causado por la mutación del gen *STK11* o también conocido como *LKB1* localizado en el cromosoma 19p34-p36 encargado de regular el crecimiento de las células. Los pólipos se caracterizan por provocar sangrado, protrusión anal, obstrucción e invaginación intestinal (Wagner et al., 2021).

1.3.6 Alteraciones en las vías moleculares

- Alteración en la vía de señalización Wnt

APC es parte de una proteína compleja que interviene en la adhesión celular y en la migración, modulada por la vía de señalización Wnt que regula la fosforilación y degradación de la β -catenina, esta última es una proteína intracelular que se une a la E-cadherina y esta se adhiere con el citoesqueleto de la actina. En el proceso de fosforilación de la β -catenina, la ubiquitina ligasa es atraída para destruir la β -catenina en el proteasoma, pero si el APC está mutado, la β -catenina se acumula en el núcleo y atrae a los factores de transcripción Tcf lo que altera la expresión de varios genes como los que codifican la ciclina D1, el proto-oncogén *c-myc*, las metaloproteinasas de matriz, efrinas y caspasas que actúan en la

diferenciación, proliferación, migración y apoptosis celular (**Figura 3**) (Jung and Park, 2020).

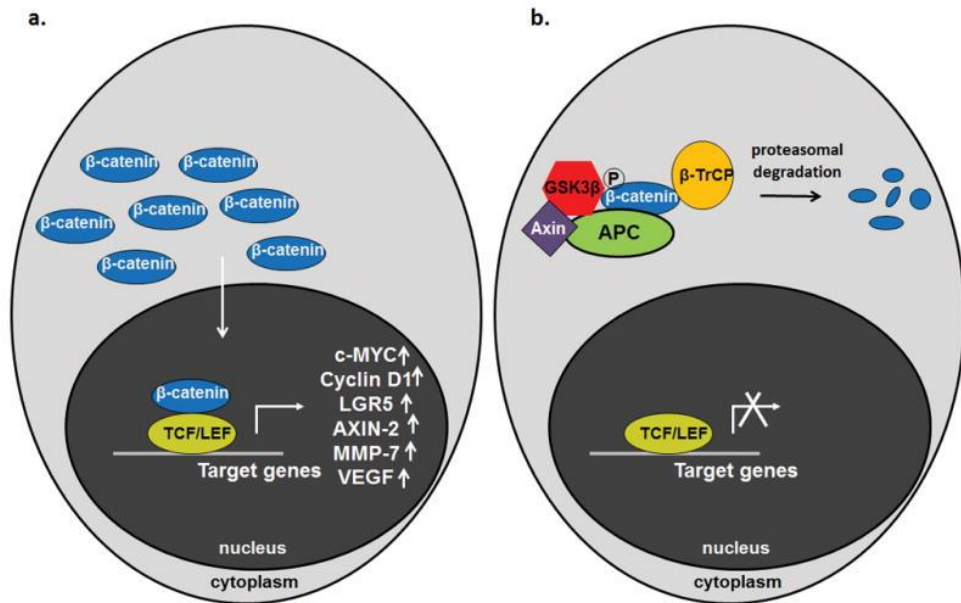


Figura 3. La proteína APC regula la vía de señalización Wnt (a) característico de CCR y pólipos adenomatosos por la acumulación de β-catenina y la unión a los factores de transcripción Tcf/Lef que promueven alteraciones genéticas (b) característico de células maduras y diferenciadas del epitelio colorrectal que expresan APC que promueve la degradación proteolítica de la β-catenina (Hankey et al., 2018).

APC también controla el ciclo celular al inhibir la progresión de las células desde la fase G₀/G₁ a la fase S para suprimir la tumorigénesis y además da firmeza a los microtúbulos generando estabilidad cromosómica. Por lo tanto, la inactivación del APC en el CCR lleva a la formación incontrolada de pólipos adenomatosos y defectos en los husos mitóticos y degradación cromosómica a nivel celular que contribuye a la progresión del CCR (Hankey et al., 2018).

- Alteración en la vía del sistema MMR

El sistema de reparación MMR es un mecanismo que actúa de forma indirecta al final del proceso de síntesis del ADN (proceso post-replicativo) que incluye varias proteínas para reconocer y reparar loops originados por la incorporación errónea de nucleótidos en el apareamiento base-base o por inserción/delección (IDLs) en las secuencias microsatélites introducidas por la ADN polimerasa. Cuando existen alteraciones en el sistema MMR, las regiones codificantes producen proteínas no funcionales que causan la inactivación del gen supresor de tumor *TGF-RII* y el *IGF-RII*. Las mutaciones germinales en algunos de los genes del sistema MMR como *MLH1*, *MSH2*, *MLH3*, *MSH6*, *PMS1* y *PMS2* alteran el correcto funcionamiento de la maquinaria de reparación. Por ejemplo, si la alteración genética está en los genes *MSH2*, *MSH6* o *MLH3* el sistema MMR será incapaz de reconocer los errores de apareamiento o lesiones específicas del ADN, además no se podrá formar los heterodímeros que reparan los errores de apareamiento base-base o IDLs; si la mutación es en los genes *MLH1* y *PMS2* se vería afectado el reclutamiento de enzimas utilizadas para la reparación de lesiones del ADN y si la mutación es en el gen *PCNA* se impide su interacción con la enzima Exo1 que en condiciones normales es responsable de la escisión del MMR y la resíntesis del ADN. Las mutaciones en cualquiera de los genes del sistema de reparación MMR incrementan de 100 a 1000 veces la tasa de errores durante la replicación del ADN que provoca la tumorigénesis en tejidos como del colon y recto (Castro and Carrillo, 2018; Pećina-Šlaus et al., 2020).

- Alteración en la vía de reparación de escisión de base (BER)

BER es una vía de reparación con múltiples reacciones y que actúa sobre las bases dañadas por desaminación, alquilación y oxidación. En el proceso de reparación de pares post replicativos juegan un papel importante los genes *MUTYH* y 8-oxoguanina-ADN glucosilasa (*OGG1*) para eliminar la forma oxidada de la guanina y prevenir mutaciones de transversión G: C a T: A originados por los daños oxidativos (**Figura 4**). La vía de reparación BER también participa en la reparación de los sitios A purínico/A pirimidínico (AP) que son mutagénicos a través de sus dos mecanismos: la vía de reparación BER de parches cortos donde intervienen los genes *POLB*, *APE1*, *XRCC1*, *PARP1*, *LIG1* y *LIG3* y la vía de reparación BER de parches largos donde intervienen los genes *PCNA*, *APE1*, *RFC*, *RPA*, *PARP1*, *FEN1*, *POLD/POLE* y *LIG1*. Por lo tanto, la alteración en cualquiera de estos genes y en especial del gen *MUTYH* se asocia al desarrollo del síndrome de poliposis asociada a MYH (MAP). Además, se investiga la asociación entre *MUTYH* y la proteína de replicación A (RPA), el antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA), p73, p53 y *APE1* para aumentar o disminuir su actividad (Vodicka et al., 2020).

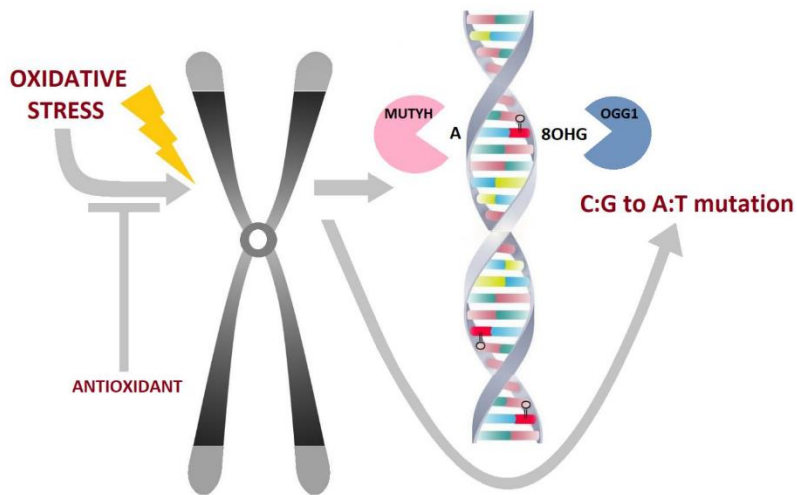


Figura 4. MUTYH y hOOG1 ayudan a prevenir las mutaciones de la transversión C:G a A:T bajo estrés oxidativo (Vodicka et al., 2020).

- Activación de las vías de señalización EGFR-Kras-BRAF y PI3K-AKT

Esta vía de señalización es activada por receptores fosforilados provocados por la dimerización de los receptores de EGFR y por Kras que es una GTPasa de iniciación temprana de otras cascadas de señalización que activa el protooncogén BRAF que involucra a la cascada de quinasas con la fosforilación y activación de MEK y la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) consecuentemente. La vía AKT también se activa por la fosforilación intracelular de los residuos de tirosina del receptor a través de fosfoinositida 3-quinasa (PI3K) donde puede intervenir la proteína supresora de tumores PTEN para inhibir esta vía. La activación en estas vías puede alterar los procesos de apoptosis, supervivencia o proliferación celular, por ejemplo, la activación de la vía PI3K-AKT hace que incremente la glucólisis y la proliferación celular. Algunas terapias usan inhibidores del

EGFR como cetuximab para bloquear las cascadas de señalización y mejorar el tratamiento del cáncer (**Figura 5**) (Koveitypour et al., 2019).

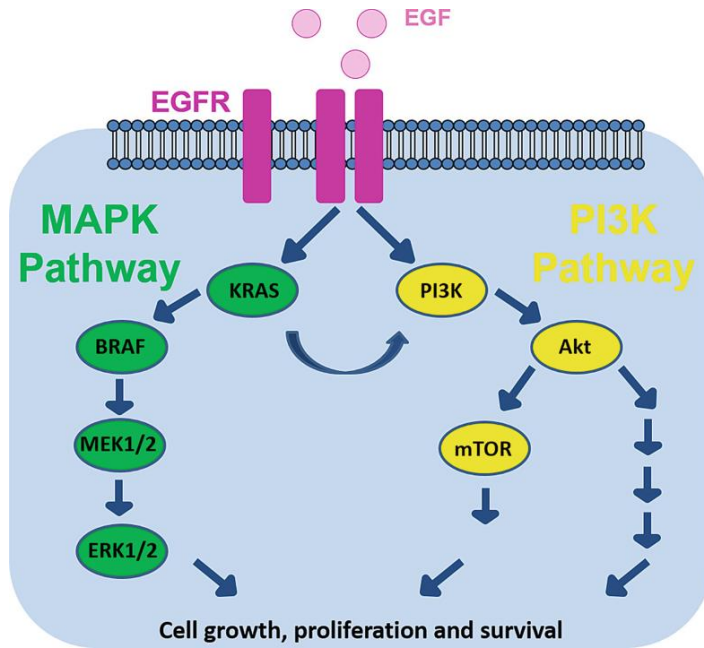


Figura 5. Representación simplificada de las vías de señalización MAPK y PI3K. Factor de crecimiento epidérmico EGF, receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR, fosfatidilinositol 3-quinasa PI3K, proteína quinasa activada por mitógeno MAPK, quinasa MEK1 / 2 MAPK 1/2, quinasa 1/2 regulada por señal extracelular ERK1 / 2, diana mTOR de rapamicina en mamíferos (Fernandes et al., 2019).

- Asociación de alteraciones genéticas en el desarrollo de CCR

El CCR es un proceso de múltiples pasos y asociación entre una variedad de alteraciones genéticas que inician desde la formación de criptas aberrantes e hiperproliferación celular que lleva a la generación de pólipos múltiples en el epitelio. Las mutaciones genes como el *APC*, la hipometilación del ADN, la activación del gen *Kras*, la pérdida de los genes *MCC* y *DDC* o la activación del oncogén *c-myc* son algunas de las alteraciones genéticas que permiten la formación de adenomas y su

conversión a carcinomas e incluso la evolución a la etapa metastásica del CCR. Las dos secuencias más estudiadas que indican la progresión desde el cáncer temprano hasta el cáncer avanzado son las que involucran a los genes *APC* y *CTNNB1* (**Figura 6**) (Mao et al., 2021).

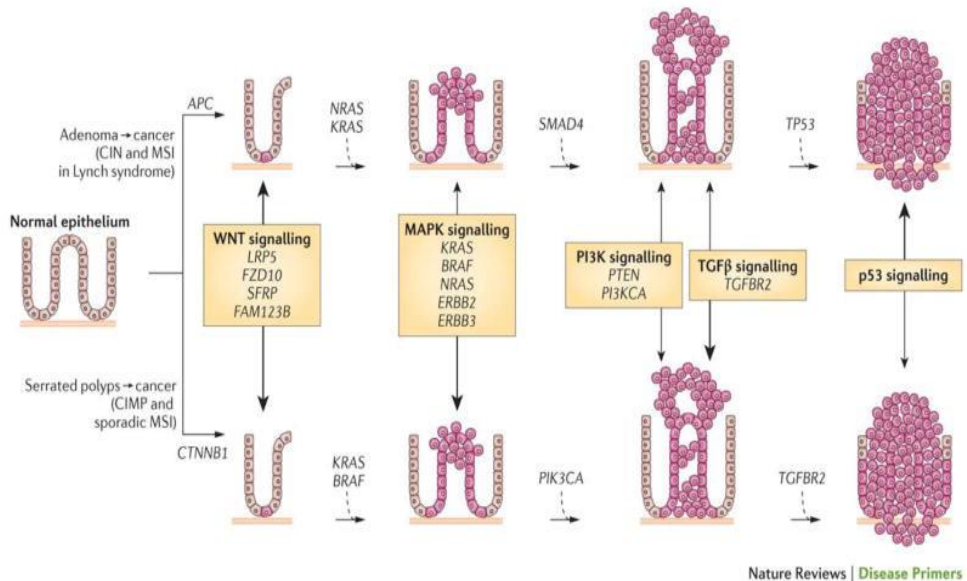


Figura 6. Alteraciones genéticas en la evolución del CCR. APC, poliposis adenomatosa coli; CIN, inestabilidad cromosómica; CTNNB1, catenina-β1; FAM123B, familia con similitud de secuencia 123B; FZD10, receptor de clase frizzled 10; LRP5, proteína 5 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad; MAPK, proteína quinasa activada por mitógeno; MSI, inestabilidad de microsatélites; PI3K, fosfoinositida 3-quinasa; PI3KCA, fosfoinositida-4,5-bisfosfato 3-quinasa catalítica subunidad-α; PTEN, homólogo de fosfatasa y tensina; SFRP, proteína secretada relacionada con frizzled; SMAD4, miembro de la familia SMAD 4; TGFβ, factor de crecimiento transformante-β; TGFBR2, TGFβ _ receptor 2 (Kuipers et al., 2015).

1.4 Fisiopatología del CCR

El desarrollo de CCR está influenciado por factores ambientales y genéticos, el origen de este tipo de cáncer se debe a la pérdida de estabilidad genómica y epigenómica a través de la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores. En consecuencia a la alteración genética, las células de la base de las criptas del colon adquieren

un comportamiento maligno y agresivo para formar pólipos que evolucionan a un adenoma temprano y progresan al carcinoma avanzado (Rampado et al., 2019). La inestabilidad genómica y epigenómica involucra ciertas etapas que están marcadas por múltiples mecanismos para el inicio y la progresión del tumor como: inestabilidad cromosómica, inestabilidad de microsatélites y fenotipo metilador de la isla CpG (**Figura 7**).

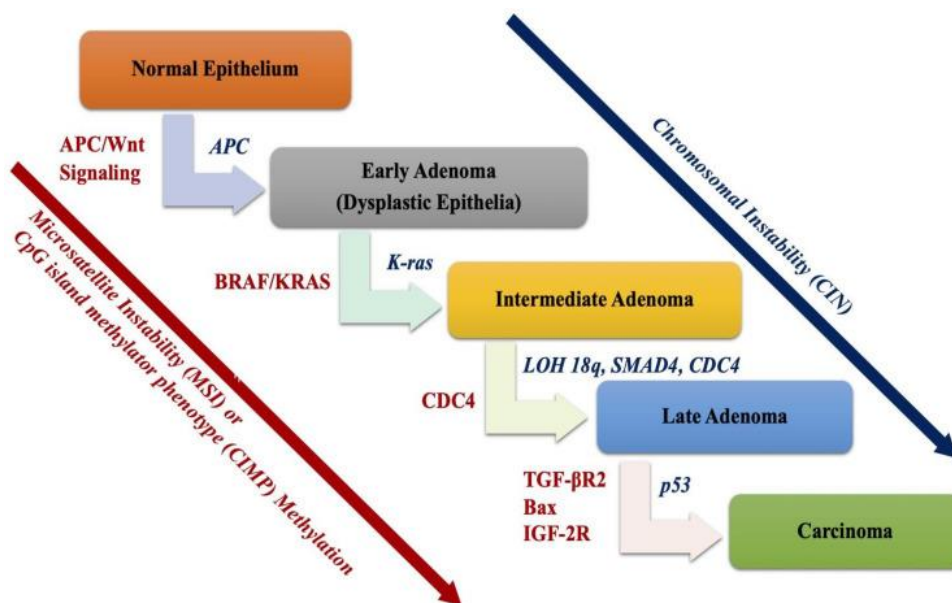


Figura 7. Modelo genético de múltiples pasos para la secuencia de adenocarcinoma colorrectal (Malki et al., 2021).

El CCR con inestabilidad cromosómica (CIN) afecta principalmente al colon izquierdo, su característica principal es la acumulación de alteraciones cromosómicas como trisomías y deleciones de brazos cromosómicos. La vía CIN es la que origina más del 85% de las transiciones de adenocarcinoma y de casos de CCR, esto le convierte en la vía más común de generación de inestabilidad genómica. Generalmente, se reconocen por la presencia de aneuploidía o poliploidía, es decir, por la

detección de cambios cromosómicos en número y múltiples aberraciones en la estructura de los cromosomas que pueden ser detectados por varias técnicas como la citometría de flujo de ADN, secuenciación del exoma completo, matrices de SNP de alta densidad e hibridación genómica comparativa. La vía CIN se caracteriza por la activación de los oncogenes *KRAS* y *BRAF*, además de la inactivación de *APC* y *TP53*, también se puede evidenciar la heterocigosidad en el brazo largo del cromosoma 18q, pérdida en los brazos cromosómicos 1p, 5q, 8p, 17p, 18p, 18q, 20p y 22q, y ganancias cromosómicas en el cromosoma 7 y en los brazos cromosómicos 1q, 8q, 12q, 13q y 20q. Todas las anormalidades denotan la presencia de los oncogenes antes mencionados y se desencadena el crecimiento de células mutadas y la transformación de células normales en cancerosas (Malki et al., 2021).

Por otro lado, alrededor del 20% de casos de CCR se relacionan con la inestabilidad de microsatélites (MSI) y de estos casos el 95% tienen su origen con el síndrome de Lynch. La MSI suelen formar cariotipos casi diploides y un conjunto de mutaciones genéticas únicas por la presencia de al menos un 30% de loci de microsatélites inestables en un panel de 5 a 10 loci. Las mutaciones se dan en la línea germinal en MMR y pueden ser en los genes *MLH1* y *MSH2* que conducen a un riesgo alto de desarrollar cáncer equivalente al 80% aproximadamente; mientras que las mutaciones en los genes *MSH6* y *PMS6* tienen un riesgo menor que va desde al 25 al 60% de los casos que desarrollan cáncer. Además, en los casos de MSI se pueden distinguir tres tipos: alta inestabilidad de microsatélites (MSI-H),

baja inestabilidad de microsatélites (MSI-L) y estabilidad de microsatélites (MSS), aunque la investigación clínica actual considera como un solo tipo a MSI-L y MSS, de esta manera, los tumores con loci inestables en más del 30% se clasifican como MSI-H y entre el 10 y 29% se consideran como MSI-L y MSS (Li et al., 2020).

En cuanto a las alteraciones epigenéticas, el fenotipo metilador de la isla CpG (CIMP) que origina la hipermetilación del ADN promotor de múltiples genes específicos en el CCR y que a lugar a un subtipo molecular distinto de CCR esporádico. El CIMP está mediado por metiltransferasas de ADN que promueven la hipermetilación en regiones ricas en CpG que están asociadas con un promotor de genes supresores de tumores que se inactivan por la transcripción y esto contribuye a la tumorigénesis y a la progresión del CCR. Esta vía da lugar al 20% de casos de CCR, se asocia con la localización de los tumores en el lado derecho del colon y con las mutaciones en *BRAF*, además de la metilación y el silenciamiento de *APC*, *MLH1*, *MGMT*, *SFRP1*, *SFRP2*, *CDKN2A*, *TIMP3*, *VIM*, *SEPT*, *CDHI* y *HLTF*. Todas éstas alteraciones pueden afectar prácticamente a todas las vías de señalización que incluyen a TP53, TGF β /SMAD, Wnt, NOTCH y receptores de tirosina quinasa, que participan en procesos como la apoptosis, adhesión célula-célula, invasión celular, regulación de la transcripción, regulación del ciclo celular, estabilidad del ADN, angiogénesis y metástasis (Zhang et al., 2021).

Las vías moleculares mencionadas que generan inestabilidad por alteraciones genéticas y epigenéticas dan lugar a la tumorigénesis, las

lesiones precancerosas y los pólipos adenomatosos. La secuencia de adenoma a carcinoma depende de la acumulación progresiva de cambios que promueven el crecimiento del tumor a lo largo del tiempo y por la malignidad invasiva, donde interviene principalmente el silenciamiento del gen *APC* y las mutaciones en *KRAS* y *TP53*. Por otro lado, existe una vía alternativa de la evolución del CCR donde se generan pólipos hiperplásicos, adenomas serrados sésiles o pólipos hiperplásicos mixtos, en estos casos particulares son las mutaciones en *BRAF* las que generan la agresión inicial que es agravada por la vía CIMP y en la mayoría de casos se beneficia de la disbiosis en la microbiota intestinal para que progrese de un pólipo serrado a un adenocarcinoma y los peores pronósticos suceden cuando hay combinación de CIMP, MSS y mutaciones en *BRAF* (Kasi et al., 2020).

Las distintas vías moleculares para la generación de la tumorigénesis en el CCR y el avance a la formación del adenocarcinoma influyen en la respuesta al tratamiento, por ello se ha establecido una clasificación molecular basada en estudios de transcriptómica y análisis de las expresiones génica. Dicha clasificación, establece los diferentes subtipos moleculares de consenso (CMS) que se detallan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Subtipos moleculares del cáncer de colon (Adaptado de Kasi et al., 2020)

| Subtipos de CMS | CMS 1 (inmune a MSI) | CMS 2 (canónico) | CMS 3 (molecular) | CMS 4 (mesenquimal) |
|--|---|--|--|---|
| Frecuencia | 14% | 37% | 23% | 13% |
| Patología | Hipermutación, MSI-H y CIMP-H | Activación de la vía de señalización Wnt / β -catenina y MYC | Desregulación metabólica de las vías de oxidación de carbohidratos y ácidos grasos | Transformación mesenquimatosas epitelial con infiltración estomal prominente, angiogénesis y regulación positiva de TGF-B |
| Alternaciones de números de copias somáticas (SCNA) | Bajo | Elevado | Bajo-moderado | Elevado |
| Perfil inmunológico | Infiltración activada inmunitaria de células TH1, NK-1, así como expresión de quimiocinas PD-1 y CTLA-4, CXCR3 / CCR5 | Inmune ignorante | Inmune ignorante | Infiltración inflamada tolerante inmune de TH-17 y MDSC, activación del complemento, expresión de quimiocinas CCL2 |
| Mutaciones genéticas asociadas | BRAF | TP53, EGFR | KRAS, PIK3CA e IGF2BP2 | NOTCH3 / VEGFR2 |
| Sitio | Predominio del colon proximal del lado derecho | Predominio de colon y recto del lado izquierdo | Relativamente más común en tumores del lado derecho | Relativamente más común en tumores del lado izquierdo y del recto |
| Tasas de supervivencia a 5 años | 73% pero escasa supervivencia después de la recaída | 77%, mayor supervivencia después de la recaída | 75% | 62%, peor SG y supervivencia sin recaídas |
| Implicación clínica | Puede resultar beneficioso para los inhibidores de puntos de control inmunitarios | Puede beneficiarse de las terapias anti-EGFR | Resistencia EGFR | Puede beneficiarse de los inhibidores de la angiogénesis, sin beneficio de la quimioterapia adyuvante |

1.5 Clasificación por etapas

La estadificación o determinación de las etapas del cáncer se determina para conocer la gravedad de la enfermedad y para establecer el

mejor tratamiento posible para cada paciente, además ayuda a conocer sobre la existencia de metástasis y en términos epidemiológicos permite conocer las estadísticas de supervivencia de cada paciente. Para establecer la etapa de CCR existe un sistema de estadificación denominado TNM y desarrollado por el American Joint Committee on Cancer (AJCC), este es el sistema más empleado y se basa en el análisis de tres parámetros principales:

- Primero se determina la extensión y el tamaño del tumor, es decir, como se ven afectadas las paredes del colon o del recto a nivel de profundidad tisular, para esto se examinan el revestimiento interno o mucosa, el tejido fibroso o capa submucosa, la capa muscular gruesa o muscularis propria y finalmente las capas más delgadas y externas del tejido conectivo que son la subserosa y la serosa que cubre solo al colon (**Figura 8**).
- Seguidamente, se evalúa la propagación a los ganglios o nódulos linfáticos adyacentes.
- Y por último se determina la existencia de episodios metastásicos, es decir, cuando se evidencia la presencia de tumores en sitios distantes al de origen del CCR, los órganos más afectados suelen ser el hígado y los pulmones.

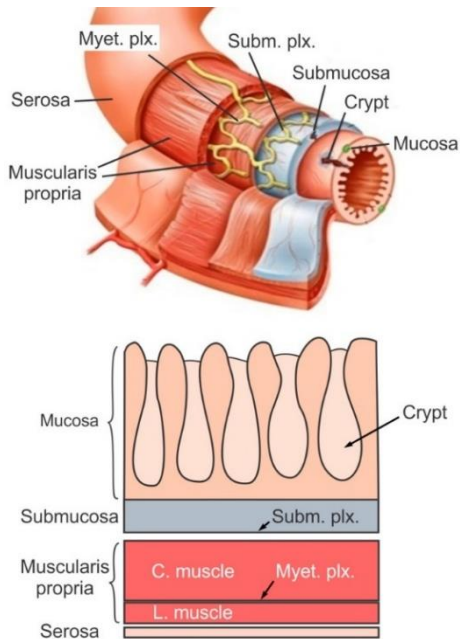


Figura 8. Estructura en capas del intestino grueso. Subm. plx.: Plexo submucosa; Myet. plx.: Plexo mientérico; C. músculo: capa del músculo circular; L. músculo: capa muscular longitudinal (Siri et al., 2020).

La estadificación del CCR se realiza a través de un examen del tejido obtenido en una cirugía, tras el análisis histológico se determina la fase o etapa (los cánceres más tempranos son denominados etapa I y los más avanzados como etapa IV). En la **Tabla 2** se puede observar todas las categorías establecidas por el sistema TNM.

Tabla 2. Etapas del cáncer colorrectal según el sistema TNM de AJCC (Adaptado de American Joint Committee on Cancer, 2018)

| Etapa | Definición de parámetros | Descripción de la etapa |
|----------|--------------------------|---|
| 0 | Tis No Mo | Etapa más temprana del cáncer, también conocida como carcinoma in situ o carcinoma intramucoso, solo se localiza en la mucosa del colon o recto |
| I | T1o T2 No Mo | El cáncer llega a la capa muscular de la mucosa o muscularis mucosae, cuando llega a la submucosa es T1 y cuando alcanza la muscular propia es T2, no hay propagación a los ganglios linfáticos ni metástasis |

| | | |
|-------------|-----------------------------------|---|
| IIA | T3 No Mo | El cáncer crece hasta la capa más externa del colon o recto, pero no la afecta, no hay propagación a los ganglios linfáticos ni metástasis |
| IIB | T4a No Mo | El cáncer afecta a la pared más externa del colon o recto, pero no invade otros tejidos u órganos adyacentes, no está presente en los ganglios linfáticos ni en sitios distantes. |
| IIC | T4b No Mo | El cáncer afecta a la pared más extensa del colon o recto y además crece el otros tejidos u órganos adyacentes, pero no está en los ganglios linfáticos ni en sitios distantes |
| IIIA | T1 o T2 N1/N1c Mo | El cáncer llega a la submucosa o hasta la muscular propia, se propagó entre 1 y 3 ganglios linfáticos adyacentes, pero no a sitios distantes |
| | T1 N2a Mo | El cáncer llega a la submucosa y se propaga de 4 a 6 ganglios linfáticos cercanos, pero no a sitios distantes |
| IIIB | T3 o T4a N1/N1c Mo | El cáncer llega a la capa más externa del colon o recto por el peritoneo visceral, se propaga de 1 a 3 ganglios linfáticos cercanos, pero no a sitios distantes |
| | T2 o T3 N2a Mo | El cáncer alcanza la muscula propia o la capa más externa del colon o recto, afecta de 4 a 6 ganglios linfáticos cercanos, pero no a sitios distantes |
| | T1 o T2 N2b Mo | El cáncer llega a la submucosa o hasta la muscular propia, se propaga a 7 o más ganglios linfáticos adyacentes, pero no a sitios distantes |
| IIIC | T4a N2a Mo | El cáncer ha crecido hasta la capa más externa incluyendo el peritoneo visceral, afecta de 4 a 6 ganglios linfáticos cercanos, pero no a sitios distantes |
| | T3 o T4a N2b Mo | El cáncer llega a las capas más externas e incluso al peritoneo visceral, se propaga a 7 o más ganglios linfáticos adyacentes, pero no a sitios distantes |
| | T4b N1 o N2 Mo | El cáncer ha crecido hasta la capa más externa del colon o recto y también hacia otros tejido u órganos adyacentes, se propaga por al menos un ganglio linfático cercano, pero no a sitios distantes |
| IVA | Cualquier T Cualquier N M1a | El cáncer llega a cualquier capa del colon o recto, está o no en los ganglios linfáticos adyacentes y se propaga a un órgano distante (hígado o pulmón) o a un grupo de ganglios linfáticos distantes, pero no a partes distantes del peritoneo |
| IVB | Cualquier T Cualquier N M1b | El cáncer llega a cualquier capa del colon o recto, está o no en los ganglios linfáticos adyacentes y se propaga a un órgano distante (hígado o pulmón) o |

| | | |
|------------|-----------------------------------|--|
| | | a un grupo de ganglios linfáticos distantes, pero no a partes distantes del peritoneo |
| IVC | Cualquier T Cualquier N M1c | El cáncer llega a cualquier capa del colon o recto, está o no en los ganglios linfáticos adyacentes y se propaga a un órgano distante (hígado o pulmón), llega a partes distantes del peritoneo y puede o no haberse propagado a órganos o ganglios linfáticos distantes |

1.6 Metástasis del CCR

La metástasis es la principal causa de muerte en pacientes con CCR, los sitios más comunes de la metástasis de esta enfermedad son el hígado y el peritoneo, aunque también se reportan casos de metástasis en los pulmones y en otras localizaciones anatómicas raras, pero en menor porcentaje. Aproximadamente, el 20% de pacientes desarrolla metástasis sincrónica comúnmente en el hígado y casi en el 60% de casos la metástasis se origina en los 5 primeros años de la enfermedad (metástasis metacrónica) (Biller and Schrag, 2021).

Las personas diagnosticadas con CCR metastásico tienen alrededor del 70% de probabilidad de supervivencia de más de un año, el 30% de 3 años y menos del 20% podrán sobrevivir alrededor de 5 años desde el momento del diagnóstico, esto también depende del grupo al que pertenezcan, en el caso de pacientes con metástasis sincrónicas el pronóstico es peor que el de los pacientes con metástasis metacrónicas (Holch et al., 2017).

La cascada de invasión-metástasis es el proceso mediante el cual las células tumorales abandonan su sitio primario y forman nuevas colonias en tejidos distantes. El proceso consta de cinco pasos:

1. Invasión local de las células tumorales en la matriz circundante
2. Intravasación de las células tumorales en el sistema circulatorio
3. Transporte sistémico de las células tumorales
4. Extravasación de las células tumorales en el parénquima distante
5. Colonización de órganos distantes y establecimiento de tumores macroscópicos

La biología tumoral y los mecanismos en cada paso son conocidos en su mayoría (**Figura 9**), pero existen algunos mecanismos y rutas metabólicas que no están completamente definidos y específicamente en el CCR, los mecanismos que determinan si la diseminación será hematológica o peritoneal son poco conocidos (Pretzsch et al., 2019).

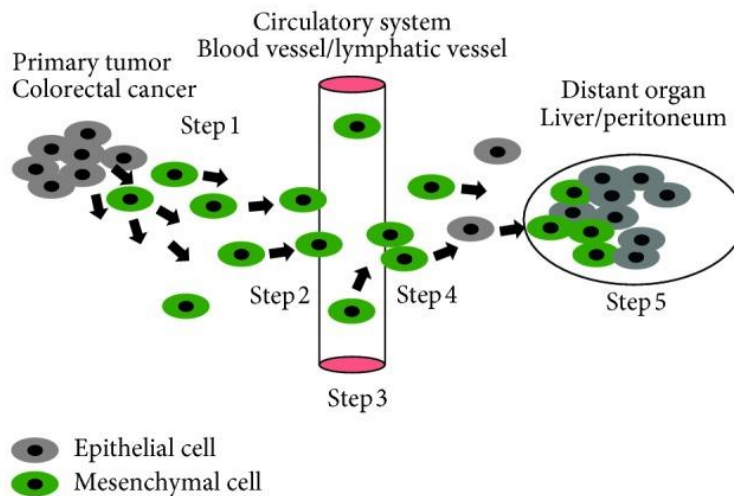


Figura 9. Cascada de invasión-metástasis (Pretzsch et al., 2019).

La transición epitelio-mesenquimal (EMT) es uno de los factores más importantes que desencadenan la metástasis ya que, permite que las células epiteliales tumorales estacionarias vayan perdiendo su adherencia intercelular y adquieran propiedades mesenquimales. Este proceso

proporciona a las células mayor movilidad, capacidad de invasión, resistencia a la apoptosis, degradación y producción de componentes de la matriz extracelular. Existen diferentes niveles moleculares que regulan la EMT como la vía WNT, la vía PI3K/AKT, la vía RAS/RAF/MEK/ERK/MAPK, la vía TGF- β /Smad y las regulaciones a nivel postranscripcional y postraduccional mediante miARN (**Figura 10**).

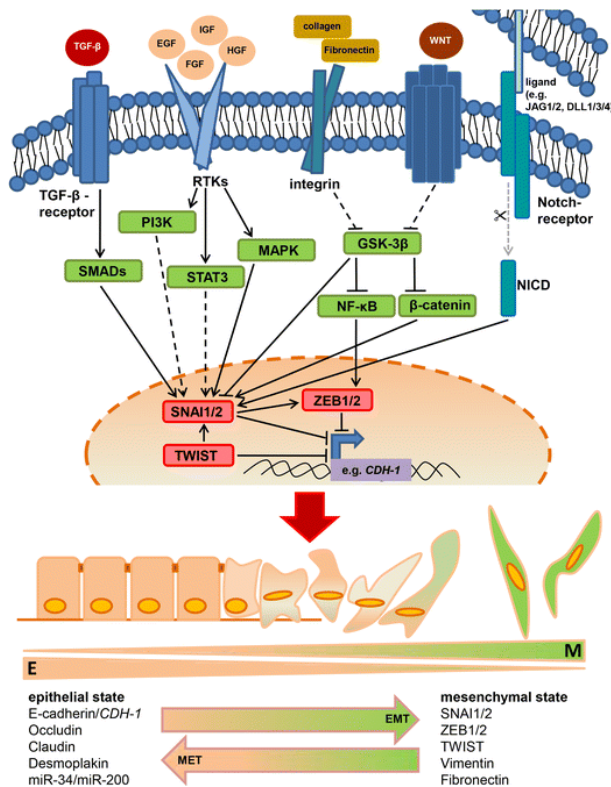


Figura 10. Mecanismo molecular que regula la EMT (Hahn and Hermeking, 2014).

Adicional al proceso EMT, la angiogénesis también se considera un paso crucial tanto en el crecimiento tumoral como en la determinación de la ruta de transporte para las células tumorales metastásicas, así contribuye a la inserción de las células tumorales en la vasculatura mediante la

formación de nuevos vasos que se conectarán con el sistema circulatorio. En el CCR la metástasis se relaciona con el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor 1α inducible por hipoxia (HIF- 1α), además intervienen las angiopoyetinas, Notch e integrinas y la activación de las células endoteliales por factores proangiogénicos, de esta manera la generación de nuevos vasos sanguíneos es consecuencia de las interacciones tumor-microambiente y contribuye a la generación de metástasis (Yin et al., 2020).

Un proceso alternativo al de la cascada invasión-metástasis es la carcinomatosis peritoneal, este mecanismo no se da por diseminación hematológica como en el caso de la diseminación hepática ya que existe diferencias en el transporte y unión de células tumorales (Sluiter et al., 2016). Este proceso se desarrolla en cinco etapas:

1. Desprendimiento de células tumorales del tumor primario y ganancia de motilidad
2. Evasión de anoikis
3. Adherencia a la superficie peritoneal
4. Invasión al peritoneo
5. Proliferación y formación de metástasis peritoneal

Por lo tanto, los mecanismos de metástasis en el CCR son dos: diseminación hematológica y diseminación peritoneal. En la diseminación hematológica las células tumorales se someten a EMT y se desprenden del tumor primario y mediante la angiogénesis ingresan al sistema circulatorio. Las células tumorales circulantes son protegidas de ataque inmunes y

situaciones de estrés por las plaquetas y los neutrófilos siendo capaces de fijarse al estroma de distintos órganos generando las metástasis.

Por otro lado, en la diseminación peritoneal las células tumorales abandonan el tumor primario debido al desprendimiento espontáneo de células tumorales, intervenciones quirúrgicas o exfoliación en el sistema linfático, llegan al líquido peritoneal y forman grupos para evadir el anoikis, Finalmente, se unen y expanden por todo el peritoneo gracias al proceso de angiogénesis (**Figura 11**) (Pretzsch et al., 2019).

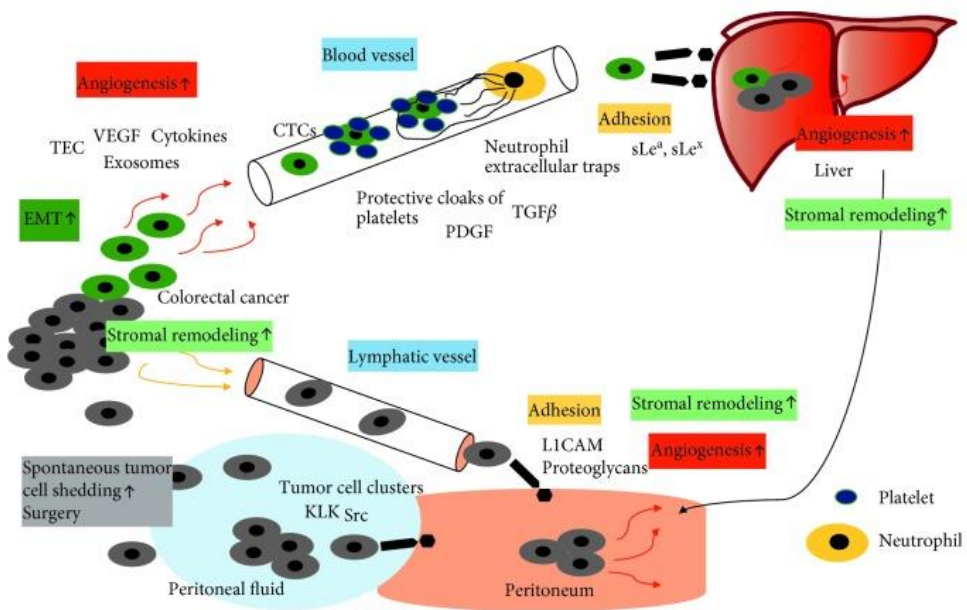


Figura 11. Mecanismos de metástasis en el CCR (Pretzsch et al., 2019).

1.7 Signos y síntomas clínicos

Las características clínico-patológicas del CCR se han implementado para poder determinar pautas en la derivación de los pacientes. Para poder mejorar las tasas de supervivencia del CCR, el primer paso para el proceso de diagnóstico es el reconocimiento de los síntomas por parte del paciente.

La mayoría de síntomas iniciales se producen a nivel gastrointestinal inferior: dolor abdominal, hemorragia rectal, alguna masa abdominal palpable, pérdida de peso y anemia ferropénica (Sawicki et al., 2021). Existen también síntomas no específicos como el cansancio, la pérdida inexplicable de apetito y la trombosis venosa profunda. Varias investigaciones analizan la importancia de reconocer los síntomas específicos e inespecíficos y la coexistencia entre algunos de estos síntomas para iniciar el diagnóstico de cáncer en la etapa temprana y tener un mejor pronóstico de la enfermedad (Rasmussen et al., 2015).

1.8 Diagnóstico del CCR

La importancia de un diagnóstico temprano se enfoca en controlar la progresión del CCR y la muerte, para esto ciertos estudios se enfocan en establecer métodos de detección adecuados que permitan detectar las lesiones precancerosas y el cáncer en su fase temprana. La opción de primer nivel suele ser la colonoscopia o la prueba inmunoquímica fecal (FIT) y también existen distintos biomarcadores sanguíneos como una alternativa no invasiva (Jeun et al., 2019).

Varias organizaciones nacionales e internacionales establecen diferentes directrices y recomendaciones para el cribado de CCR, en su mayoría parten con una prueba de sangre oculta en heces a partir de los 50 años. Otra alternativa es la colonoscopia, esta es una técnica endoscópica que se ha convertido en la base fundamental en la detección y vigilancia de CCR, ayuda a reconocer y detectar las lesiones serradas y sésiles características de los adenomas en el desarrollo del cáncer. Es importante

considerar que cuando se ha realizado una colonoscopia inicial, si el resultado es negativo, se requieren controles cada 10 años, pero cuando se visualizan más de 10 adenomas, la sugerencia de la mayoría de las organizaciones es realizar una nueva colonoscopia después de un año y en los casos donde existe menor presencia de adenomas se considera que es de riesgo bajo por lo que la segunda colonoscopia debe realizarse después de 5 o 10 años. El rango de edad establecido para esta prueba va de los 50 a 75 años ya que se considera que el riesgo de desarrollar CCR en personas menores a 40 años es bajo. Entonces, el objetivo principal de la colonoscopia es detectar las neoplasias existentes para sugerir su extirpación mediante una polipectomía endoscópica o cirugía. Entre los aspectos negativos de la colonoscopia se encuentran su elevado costo, además es un procedimiento invasivo que puede causar dolor, ansiedad, miedo y vulnerabilidad en los pacientes. A pesar de esto, la colonoscopia es muy empleada y más aún con los colonoscopios de alta definición y la nueva tecnología que mejoran la imagen visual con lo que se pueden visualizar incluso las lesiones planas y pequeñas (Gogenur and Qvortrup, 2021).

Por otro lado, se encuentran los biomarcadores de laboratorio, empleados principalmente para la predicción del riesgo de CCR. Entre este grupo de biomarcadores se encuentra la detección de hemoglobina fecal mediante la prueba inmunoquímica fecal (FIT), este es el biomarcador más empleado principalmente en programas de cribado como prueba primaria, además es destacable su alta sensibilidad del 80% y especificidad del 91% en individuos que son asintomáticos, también se trata de un biomarcador

cuantitativo por lo que puede servir para la estratificación del riesgo de CCR a través de la determinación del nivel absoluto de hemoglobina fecal (Hull et al., 2020). El ensayo FIT detecta el componente denominado globina que es parte de la hemoglobina a través de un inmunoensayo realizado en la materia fecal, el resultado de la concentración de hemoglobina fecal se expresa en microgramo de Hg por gramo de heces (D'Souza et al., 2021).

En segundo lugar, se utiliza la determinación inmunohistoquímica de la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) puesto que está presente entre el 25 al 90% de pacientes con CCR. Este ensayo es de gran importancia para determinar el uso adecuado de agentes terapéuticos que sean efectivos en cada individuo que incremente la eficacia de las terapias dirigidas empleando fármacos como cetuximab o panitumumab, aunque la mayoría de los estudios actuales no muestran mayor correlación entre el grado de expresión de EGFR y la respuesta terapéutica a los fármacos antes mencionados (Kim et al., 2020).

En tercer lugar, se realiza determinaciones inmunohistoquímicas para detectar las proteínas de reparación de errores de apareamiento de ADN (MMR), esta herramienta es sencilla y útil para poder determinar la deficiencia de MMR que causa un alto nivel de inestabilidad de microsatélites (**Figura 12**). Este ensayo se ha convertido en una herramienta de cribado histopatológico muy empleada, principalmente para la detección del síndrome de Lynch en el CCR (Chen and Frankel, 2019).

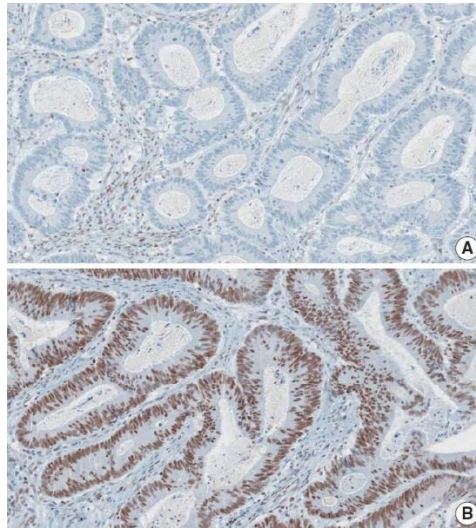


Figura 12. Ensayo inmunohistoquímico MMR de un caso representativo de CCR. A) La tinción indica negatividad de la expresión nuclear de *MLH1* en las celulares tumorales; B) la tinción demostró positividad para la expresión nuclear de *MSH2* en las células tumorales. (Kim et al., 2020).

Aproximadamente, el 15% de los casos de CCR muestran inestabilidad de microsatélites (MSI) que es una manifestación funcional relacionada con el sistema defectuoso de reparación de desajustes de ADN (dMMR), incluye mutaciones en *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* y la hipermetilación del promotor *MLH1*. En la evaluación de MSI se emplea como estándar de oro la electroforesis en gel capilar que realiza una comparación de la longitud de los productos obtenidos por PCR entre el tejido canceroso y el tejido normal, aunque un método alternativo aceptable puede ser la inmunohistoquímica que se analizó previamente ya que incluye a las mismas cuatro proteínas de reparación de los errores de apareamiento (Chen and Frankel, 2019).

En cuarto lugar, la denominada prueba de ADN fecal multiobjetivo basada en la detección de mutación en *KRAS*, *NRAS*, *BMP3* metilado y

metilación del promotor *NDRG4*, presenta una sensibilidad superior al 90% pero, además de tratarse de un ensayo costoso, su rendimiento es limitado en la detección de adenomas colorrectales avanzados. Estas pruebas son más recomendadas en casos de CCR metastásicos y las metodologías más empleadas son la secuenciación por Sanger, la pirosecuenciación y los métodos basados en PCR en tiempo real (Hull et al., 2020).

Finalmente, para la determinación de la existencia de metástasis se utiliza la estadificación diagnóstica que generalmente incluye: i) una tomografía computarizada con contraste del tórax, el abdomen y la pelvis; ii) una resonancia magnética; iii) una tomografía por emisión de positrones. Adicionalmente, en la detección de metástasis también se emplean marcadores tumorales por ejemplo el de la proteína del antígeno carcinoembrionario (CEA) y del antígeno del cáncer 19 (CA19-9) que ayudan también a monitorear la respuesta al tratamiento. En los análisis inmunohistoquímicos se determinan los tumores de tipo MSI-H o MMR-D para conocer el perfil molecular del paciente y el tipo de metástasis (Biller and Schrag, 2021).

1.9 Tratamiento

En el estadio inicial o temprano, con enfermedad localizada, el tratamiento estándar que se emplea actualmente es la resección del tumor primario junto con los ganglios linfáticos regionales. El tratamiento tras la cirugía depende del estadio de la enfermedad:

-En el estadio I, únicamente se emplea una cirugía y como resultado se obtiene una alta tasa de supervivencia libre de enfermedad de aproximadamente 5 años en el 95% de los casos.

-En el estadio II, la tasa de supervivencia disminuye al 82% cuando se aplica únicamente la cirugía y el tratamiento conjunto con quimioterapia adyuvante puede ser aplicado en base a las características clínico-patológicas del paciente.

-En el estadio III, La tasa de supervivencia a más de 5 años disminuye al 45%, en estos pacientes cuando únicamente se opta por la resección del tumor, pero este porcentaje incrementa al 67% cuando se administra quimioterapia adyuvante, solo el 17% de pacientes alcanzan una supervivencia a largo plazo (Chakrabarti et al., 2020).

-En el CCR metastásico, el conocimiento de diferentes biomarcadores ha permitido una selección de tratamientos individualizados que han permitido obtener una tasa de respuesta que supera el 50%.

1.9.1 Tratamiento sistémico

En el estadio II, tal y como se ha comentado con anterioridad el tratamiento se reduce a la resección quirúrgica del tumor y los resultados obtenidos en diferentes ensayos clínicos son controvertidos. El tratamiento con quimioterapia es recomendado en pacientes considerados de alto riesgo que presenta alguna de estas características: i) tumor pobremente diferenciado; ii) menos de 12 ganglios linfáticos regionales analizados; iii) invasión vascular, linfática o perineural; iv) obstrucción o perforación del

tumor al diagnóstico y pT4. En estos pacientes se han utilizado distintas combinaciones de quimioterapia, en su mayoría emplean 5 fluorouracil (5-FU) u oxaliplatino, 5-FU y leucovorina (LV), e incluso se ha añadido oxaliplatino en la combinación de 5-FU/LV observándose que la supervivencia general puede llegar a los 10 años.

En los casos de CCR III, la supervivencia incrementa con la quimioterapia adyuvante basada en 5-FU y la actividad antitumoral mejora con LV donde las dosis pueden ser administradas semanalmente durante 2 meses, con este tratamiento se ha visto beneficiada incluso la población de edad avanzada, además se han reportado tasas de toxicidad menores, también se han realizado ensayos clínicos donde añaden oxaliplatino pero los resultados obtenidos aún son controvertidos, pero en los casos con tumores dMMR o MSI-H el oxaliplatino es el medicamento de primera línea y la monoterapia con 5-FU está contraindicada (Chakrabarti et al., 2020).

Existen otras opciones de agentes quimioterapéuticos, algunos de ellos no contribuyen a la terapia adyuvante por lo que se emplean como terapias dirigidas combinadas, inclusive pueden emplearse juntamente con anticuerpos monoclonales contra EGFR en pacientes con CCR metastásico. Como opciones posoperatorias también se puede considerar a la capecitabina y el bolo intravenoso de 5-FU con LV que tienen eficacia similar al empleo de fluoropirimidinas, además están el irinotecán, cetuximab, bevacizumab, panitumumab, FOLFIRI y FOLFOX (Wysocki, 2021).

1.9.2 Perspectivas terapéuticas futuras

En el campo del CCR, la evidencia emergente a nivel molecular de ciertas alteraciones que causan la carcinogénesis ha llevado a realizar distintas investigaciones para establecer nuevos objetivos farmacológicos para el desarrollo de terapias dirigidas, pero para lograr esto es indispensable la comprensión de las funciones integrales de los mutantes y las proteínas efectoras que actúan en los mecanismos moleculares que dan lugar a la tumorigénesis. Un ejemplo es la restauración del APC que involucra muchas vías de señalización importantes, principalmente la vía de señalización Wnt que se ve afectada con la mutación de APC y da lugar a la carcinogénesis del CCR. Las investigaciones recientes se centran en el desarrollo de estrategias terapéuticas que estén dirigidas a la vía de señalización canónica de Wnt en el CCR y se ha logrado demostrar que varias moléculas inhiben la actividad, pero poseen una alta toxicidad para el epitelio intestinal normal, lo que se ha convertido en una gran limitación en las aplicaciones clínicas futuras, pero se continúan investigando los avances (Hankey et al., 2018; Zhang and Shay, 2017).

1.10 Mecanismos de resistencia

El CCR persistente se presenta en hasta un 90% de pacientes con cáncer metastásico convirtiendo en incurable a esta enfermedad. Los mecanismos de acción por los que se genera resistencia al tratamiento de esos pacientes dependen del tratamiento quimioterapéutico (**Tabla 3**) o de las terapias dirigidas (**Tabla 4**) utilizadas.

Tabla 3. Resistencias a agentes quimioterapéuticos (Adaptado de Hammond et al., 2016)

| Agente quimioterapéutico | Enzima / Vía de señalización | Mecanismo de resistencia |
|---------------------------------|---|---|
| 5-FU | Sintasa timidilato (TS) | Aumento de la expresión que conduce a un aumento del objetivo de la inhibición del 5-FU y disminución de la retroalimentación negativa de la TS-FdUMP sobre su propia expresión. |
| | Metileno tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) | El aumento de la actividad de la MTHFR disminuye la disponibilidad de CH ₂ THF necesaria para la inhibición de la ST. |
| | Timidina fosforilasa (TP) | El aumento de la expresión puede conducir a un aumento de la vía de salvamento de los nucleótidos. La baja expresión se correlaciona con una mayor respuesta a la terapia con 5-FU. |
| | Orotato fosforibosil transferasa (OPRT) | La disminución de la expresión, como la alta expresión se correlacionan con la sensibilidad. |
| | Dihidropiridina deshidrogenasa (DPD) | El aumento de la expresión conduce a un aumento de la degradación. |
| Capecitabina | Timidina fosforilasa (TP) | La disminución de la expresión conduce a una menor formación del metabolito activo. |
| | Dihidropiridina deshidrogenasa (DPD) | El aumento de la expresión conduce a un aumento del metabolismo., |
| Irinotecan | Proteína de resistencia multidireccional (MRP) | El aumento de la expresión lleva a un aumento del flujo |
| | Uridina difosfato glucoronosiltransferasa (UGT) | El aumento de la expresión conduce a un aumento del metabolismo de SN-38. |
| | Carboxilasa | La disminución de la expresión como la enzima son necesarias para crear el metabolito activo. |

| | | |
|---------------------|--|---|
| | Topoisomerasa I | La disminución del número de copias del gen TOP 1 y el aumento del número de copias. Alteraciones en el sitio de unión. |
| Oxaliplatino | Proteína de resistencia multidireccional (MRP) | El aumento de la expresión que lleva a un aumento del eflujo. |
| | Glutación (GSH) | El aumento de los niveles de GSH inactiva el platino y aumenta la exportación de la célula. |
| | ERCC1 | El aumento de la expresión conduce a un aumento de la reparación por escisión de nucleótidos. |

Tabla 4. Resistencias frente a terapias dirigidas (Adaptado de Hammond et al., 2016)

| Diana terapéutica | Enzima / Vía de señalización | Mecanismo de acción |
|------------------------------|-------------------------------------|--|
| Antagonistas del EGFR | EGFR | La disminución y el aumento de la expresión se correlaciona con la mejora de la respuesta. |
| | KRAS | Mutación activadora y amplificación. |
| | NRAS | Mutación activadora. |
| | PTEN | La pérdida de la función (mutación o pérdida de expresión) conduce a la activación constitutiva de AKT. |
| | PI3K | Mutación activadora. |
| | HER 2 | La amplificación sirve como una derivación o mecanismo de escape. |
| | MET | La amplificación sirve como una derivación o mecanismo de escape. |
| | BRAF | Mutación activadora, activación constitutiva de la vía MAPK. |
| | Activación paracrina | El aumento de los niveles séricos y de la unión de ligandos alternativos, TGF- α y anfiregulina. |
| Cetuximab | Mutación puntual EGFR S492 | Confiere resistencia al cetuximab tras la exposición, pero no al panitumumab. |
| Antagonistas del VEGF | VEGF | Señalización autocrina con aumento de la expresión causada por la retroalimentación positiva (aumento de HIF inducido por la hipoxia). |
| | Ligandos alternativos | Aumento de la expresión de PIGF, IL-8 y VEGF-D. |

| | | |
|--------------------|-----------------------------|---|
| | Protección vascular | Reclutamiento de factores proangiogénicos, por ejemplo, BMDCs, macrófagos asociados al tumor, hemagiocitos positivos a TIE2 y VEGFR1. Mayor cobertura pericútica. |
| | Mayor capacidad de invasión | Aumento de la invasión local y de la metástasis al cooptar la vasculatura local. |
| Aflibercept | VEGF-C | Aumento de la unión. |

1.11 Alimentos funcionales y nutraceuticos

El interés científico dirigido a los alimentos funcionales y nutraceuticos ha aumentado significativamente en los últimos años, permitiendo determinar el modo de acción biológico y la eficacia con la que funcionan. El descubrimiento de muchos de estos productos parte del uso de herramientas computacionales empleadas para determinar moléculas bioactivas que pueden convertirse en componentes alimentarios bioactivos. El término nutraceutico viene de la combinación de nutriente y fármaco y se define como un alimento o parte de un alimento que tiene propiedades bioactivas que proporcionan beneficios para la salud en la prevención y/o tratamiento de enfermedades. Por otra parte, un alimento funcional es aquel consumido como parte de una dieta normal, que contiene uno o más ingredientes activos que pueden mostrar efectos fisiológicos favorables y mejorar el estado de salud de una persona. La inserción de estas nuevas terminologías en el mercado de la matriz alimentaria y su actual tendencia y crecimiento se debe al objetivo de adoptar hábitos alimentarios más saludables, convirtiendo a los alimentos nutraceuticos y funcionales en productos complementarios o nuevas

alternativas que ayuden a la prevención y/o mejora del tratamiento de las enfermedades (Carpio et al., 2021).

Varios estudios han demostrado el beneficio para la salud que conlleva el consumir estos tipos de alimentos, por lo que la investigación y el número de patentes existentes en el mercado ha ido incrementando en los últimos años. Las principales características de los nutracéuticos y los alimentos funcionales son sus efectos antioxidantes para la salud gastrointestinal, reproductiva y renal, además de la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares, enfermedades orales, osteoartritis, diabetes, obesidad y su capacidad antitumoral. Las propiedades que brindan estos alimentos se deben a la adición de un ingrediente beneficioso o a la eliminación de algún componente dañino para la salud, todo esto ha convertido a la industria de productos funcionales y nutracéuticos en un campo innovador y dinámico (Topolska et al., 2021).

Una adecuada nutrición y los buenos hábitos en la dieta diaria son determinantes para la prevención de varias enfermedades ya que existe suficiente evidencia científica que indica que la nutrición tiene un impacto directo en la salud y que una alimentación adecuada puede desarrollar un sistema sofisticado y cooperativo de mecanismos de defensa antioxidante frente a intermediarios tóxicos. De esta forma, la ingesta de antioxidantes puede reducir el riesgo de enfermedades como el cáncer. Por lo tanto, los nutracéuticos, los alimentos funcionales y los micronutrientes suplementarios tienen el potencial de prevenir o reducir el crecimiento de

células cancerosas e inhibir la proliferación celular a través de la inducción de apoptosis (Calvani et al., 2020).

En cuanto al CCR, se conoce que la dieta y los estilos de vida modernos que incluyen el alto consumo de carne y alcohol, junto con la inactividad física aumentan periódicamente los niveles de incidencia y mortalidad debido a esta enfermedad. Debido a esta problemática, muchos estudios se centran en la necesidad de desarrollar nuevas terapias farmacológicas novedosas y a la vez ambientalmente benignas, estas nuevas ideas incluyen a los alimentos funcionales y a los nutraceuticos que se derivan de diversas fuentes naturales como plantas medicinales, leguminosas, verduras, organismos marinos y frutas.

Los compuestos bioactivos y metabolitos secundarios obtenidos de extractos naturales han demostrado un alto potencial de reducir el riesgo de la carcinogénesis colorrectal o de disminuir su progresión a través de diversos mecanismos moleculares (Kuppusamy et al., 2014). En la **Tabla 5** se detalla el mecanismo molecular de un conjunto importante de nutraceuticos frente al CCR.

Tabla 5. Mecanismo molecular de nutraceuticos en el control de la progresión de CCR (Adaptado de Kuppusamy et al., 2014)

| Nutraceuticos | Mecanismo molecular | Línea de células cancerosas |
|----------------------|--|------------------------------------|
| α - Tocoferol | Antiproliferación, fosforilación oxidativa | HCT-116 |
| Silbinina | Crecimiento celular reducido | HT-29 |
| Fenogreco | Citocinas, reacciones redox | HT-29 |
| Curcumina (cúrcuma) | Estimulación de MAPk, Plsk / Akt | HT29 |
| Alimentos con hierro | Receptor de transferrina (TfR1) | Cao-2, HCT-116 |

| | | |
|------------------------------|---|---------------|
| Semilla de uva | Controlar la epigenética relacionada con la señalización, la expresión del oncogén. | HCT-116 |
| Zerumbone | Regulación al alza de DR4 y DR5 MMP-9, familia Cdc | HCT-116 |
| Alicina | Inhibe la sobreexpresión del gen de la familia TNF- α | HCT-116 |
| Rizochalin | Activación de caspasa-3 y PRAP | HT-29 |
| Fucoxantina | Inducir la apoptosis | Caco-2, HT-29 |
| Proteínas y péptidos (leche) | Hipoproliferación del epitelio | HCT-116 |
| Garcinol | Inhibición de la fosforilación de tirosina. | HT-29 |
| Xanthohumol | Regulación al alza de caspasa-3, -8, -9 | HT-29 |
| Ácido boswélico | Disminución de la expresión de ciclina D1 | HT-29 |
| β -escina | Detención del ciclo celular inducida en la fase G ₁ / S | HT-29 |
| Quercetina | Inhibición de la expresión de ciclina D1 | SW 480 |
| Fisetina | Activación de NF- κ B y disminución de la expresión de ciclina D1 | HT-29 |

1.12 Compuestos bioactivos eficaces para la terapéutica del CCR

Los agentes bioactivos naturales de las plantas poseen propiedades anticancerígenas e incluso pueden mejorar la eficacia de la quimioterapia o disminuir los efectos secundarios de los fármacos que se usan como agentes quimioterapéuticos con alta frecuencia. Los efectos anticancerígenos y/o inmunomoduladores se deben a diferentes mecanismos inhibidores potenciales sobre la carcinogénesis, el crecimiento tumoral, la invasión y mutagénesis del cáncer incluyendo el CCR (Subramaniam et al., 2019).

1.12.1 Polifenoles

Los polifenoles son fitoquímicos con una amplia diversidad de propiedades terapéuticas. Se derivan de varias fuentes como plantas, algas marinas y microorganismos y conforman el grupo más numeroso de fitoquímicos con más de diez mil estructuras químicas diferentes. En el CCR muestran un impacto importante en la iniciación y progresión del cáncer mediante la modulación de diferentes vías de señalización y por sus propiedades antioxidantes, anticancerígenas y antiinflamatorias. Se conoce que los polifenoles de la dieta interfieren en los procesos celulares actuando como bloqueantes quimiopreventivos. Entre sus mecanismos anticancerígenos principales se destaca su eficacia en la eliminación del oxígeno singlete y varios radicales libres que generan daños en el ADN. Además, se conoce su actividad quimiopreventiva por el control en la bioactivación de carcinógenos a través de la inhibición de las enzimas del citocromo P450 de la familia CYP1A, así como el incremento en la actividad de las enzimas metabolizadoras de fase II. A través de estos mecanismos proporcionan efectos beneficiosos contra el CCR (Alam et al., 2018).

Los polifenoles se dividen en dos grandes grupos conocidos como ácidos fenólicos y flavonoides. Algunos de los componentes orgánicos más importantes de estos grupos son las flavonas, isoflavonas, catequinas y epicatequinas. Existen diversos fitoquímicos polifenoles con propiedades anticancerígenas frente al CCR. Por ejemplo, la silimarina inhibe la transducción de la señal Wnt en las células tumorales, de esta manera se reduce la expresión de hidrocatenina y TCF4, lo que da lugar a los efectos

de apoptosis y proliferación celular. También destacan el resveratrol, la epigallocatequina-3-O-galato y la curcumina que muestran capacidad para inducir apoptosis y detener el ciclo celular en el desarrollo de CCR así como propiedades antiproliferativas y antiangiogénicas (Ding et al., 2020).

La curcumina es un diarilheptanoide que procede de la cúrcuma (*Curcuma longa*), se describe como quimiopreventivo para el CCR con gran frecuencia ya que se ha demostrado que reduce la proliferación y la migración de células de CCR en el modelo de línea celular HCT-116, ralentizando además el crecimiento *in vivo* de la metástasis. También se conoce que la curcumina ayuda a mejorar la eficacia de otras terapias combinadas por ejemplo con 5-FU o con oxaliplatino. Su mecanismo de acción se centra en la inhibición del ciclo celular y la activación de p53 y p21. Además, desencadena la senescencia celular a través de la activación de la enzima lisosomal asociada a la senescencia β -galactosidasa. También se ha demostrado que induce la apoptosis mediante el estrés oxidativo causado por la producción del anión superóxido que contribuye a la citotoxicidad celular independiente de p53 (Herrero de la Parte et al., 2021).

Dentro de los flavonoides, merece especial mención la luteolina que se encuentra presente en varias plantas y vegetales comestibles. Es eficaz frente al CCR por sus metabolitos secundarios ya que inducen el bloqueo del ciclo celular en HT-29 y previenen el crecimiento de células cancerosas en las fases G1/S y G2/M, también suprime la sobreexpresión de algunas proteínas antiapoptóticas y regula la expresión y la actividad de las

proteínas CDC2 quinasa y ciclina B1 que inician la fase de transición G2/M. Otro fitoquímico que se destaca es la fisetina, flavonoide que forma parte de muchas frutas y verduras y provoca la inducción de apoptosis activando la caspasa 3 y modulando la expresión de los metabolitos Bcl-2 para inducir la vía apoptótica mitocondrial en las células cancerosas (Kuppusamy et al., 2014).

1.12.2 Carotenoides

Los carotenoides se caracterizan porque en su conformación estructural contienen un grupo específico de pigmentos naturales de tipo polieno, se puede encontrar en frutas y verduras sin almidón. Se clasifican en hidrocarburos (α -caroteno, β -caroteno, licopeno) y xantofilas (β -criptoxantina, luteína, zeaxantina). Se conoce que su principal propiedad es la potencial eliminación de las especies reactivas de oxígeno ya que actúan como antioxidantes, eliminando radicales libres y reduciendo el daño de las ROS e inhibiendo la peroxidación lipídica, también se destaca la eficacia en el mantenimiento de la integridad de la membrana celular y las propiedades antimutagénicas (Panic et al., 2017).

El licopeno se encuentra presente en varias fuentes dietéticas y se caracteriza por su capacidad de captar radicales libres e inhibir la progresión del cáncer. Asimismo, la halocintaxantina combinada con un ligando inductor de apoptosis como el TRAIL puede estimular esta actividad en las células de cáncer como DLD-1. Otros efectos anticancerígenos descritos son la escisión de la poli (ADN-ribosa) polimerasa, la inducción de inhibidores de caspasa y la condensación

nuclear, mediante los cuales se potencia la regulación de la muerte celular programada en las células de cáncer de colon. También se destacan los carotenoides como la xantofila, astaxantina, criptoxantina y zeaxantina en el tratamiento de CCR (Kuppusamy et al., 2014).

1.12.3 Estilbenos

Los estilbenos son un grupo de fitoquímicos no flavonoides de estructura polifenólica que se caracteriza por contener un grupo 1,2-difeniletileno. Las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, además de la activación de la muerte celular asociadas a una baja toxicidad en estudios *in vitro* e *in vivo* son las principales propiedades por las que son un grupo potencial en la prevención del cáncer (Sirerol et al., 2016). En la **Figura 13** se pueden observar las múltiples dianas sobre las que actúan los estilbenos y los efectos quimiopreventivos que poseen.

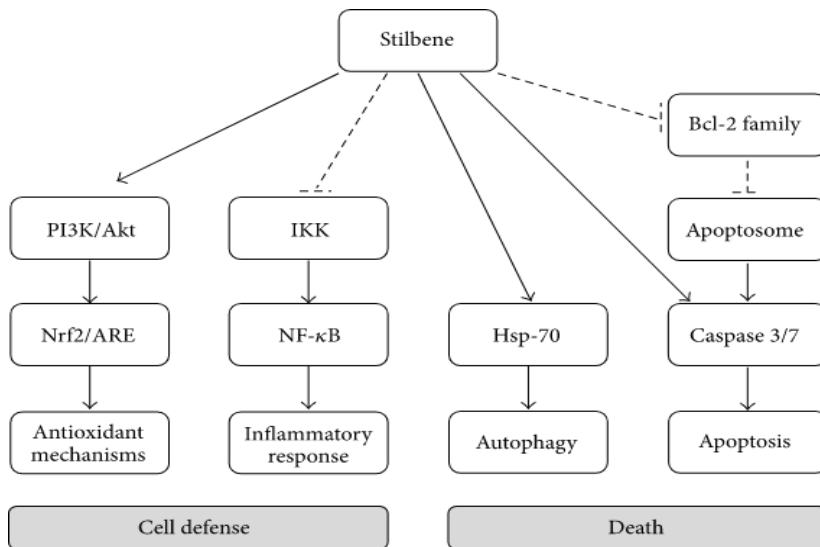


Figura 13. Mecanismos anticancerígenos inducidos por los estilbenos (Sirerol et al., 2016)

Los compuestos bioactivos más importantes de este grupo en el ámbito de la prevención del cáncer son el piceatanol, pinosilvina o pterostilbeno, pero sobre todo el resveratrol que es un estilbeno natural que se encuentra en más de 185 especies de plantas. En los últimos años se han realizado cientos de estudios que evalúan sus propiedades quimiopreventivas y quimioterapéuticas asociadas principalmente a su actividad antioxidante y anticancerígena relacionada con la inhibición de la ciclooxigenasa 2 (COX-2). El resveratrol es además un inhibidor natural de la proliferación celular y disminuye la actividad de unión al ADN de NF-KB. También se ha descrito su acción quimioterapéutica en combinación con otros agentes usados con este fin, mostrando una actividad sinérgica en el CCR (Redondo-Blanco et al., 2017).

1.12.4 Terpenos

Otro gran grupo de metabolitos bioactivos con más de 50 mil moléculas son los terpenos. Estos se clasifican según el número de unidades de isopreno biosintético que contengan en monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y tetraterpenos. Cuando los terpenos atraviesan una etapa de oxidación, pasan a denominarse terpenoides que se encuentran en gran cantidad en las algas marinas. Estos metabolitos secundarios tienen una excelente propiedad antioxidante y anticancerígena (Tamanna and Norhana, 2021).

En el tratamiento del CCR han destacado algunos terpenos como el artesunato que muestra una potente actividad citotóxica en las células HTC-116 e induce la detención del ciclo celular en G1 debido a la regulación

por la baja de ciclina D1 y sobreexpresión de p21. También destaca la actividad del geraniol que es el componente principal de aceites esenciales y actúa como anticancerígeno al provocar la reducción de la supervivencia celular en un modelo de xenoinjerto tumoral de la línea TC-118 sinérgicamente con el 5-FU para disminuir el tamaño del tumor en un 83%. Otros compuestos que muestran actividad quimioterapéutica en combinación con otros agentes son el irofluen, triptolida, ácido ursólico, panaxadiol, celastrol, ácido betulínico y fucoxantina que tienen distintos mecanismos de acción, pero contribuyen al tratamiento frente al CCR (Redondo-Blanco et al., 2017).

1.13 Plantas nativas de Ecuador y sus propiedades antitumorales

Los estudios etnobotánicos de las plantas nativas de Ecuador y de la región andina tienen gran importancia por las propiedades que brindan las miles de especies existentes en el territorio. La medicina tradicional es altamente empleada en este país, tanto por su valor cultural como por los beneficios que puede brindar, por este motivo, el consumo de plantas medicinales es persistente y elevado, no solo en la población rural, sino también en la población urbana. Los estudios de la diversidad vegetal que posee el territorio ecuatoriano son de gran importancia debido a las propiedades terapéuticas que ofrecen las plantas medicinales frente a distintas enfermedades, actuando como anticancerígenas, antiinflamatorias, antibacteriales, antimicóticas y en la prevención de enfermedades como la diabetes, la obesidad, las enfermedades

cardiovasculares, etc. Así, afirma la OMS que el bienestar en salud de los países en desarrollo se debe principalmente en un 80% al uso de plantas medicinales aplicadas a través de la medicina natural, terapias espirituales y prácticas curativas ancestrales (Tinitana et al., 2016).

Ecuador es un país bien reconocido por su diversidad y su riqueza ancestral. Aunque actualmente, médicos y científicos se enfocan en investigar distintos tratamientos curativos y paliativos frente al cáncer como por ejemplo la quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia y la terapia genética, en los pueblos indígenas y étnicos de Ecuador son aplicados varios tratamientos a base de plantas medicinales de especies endémicas del país que han mostrado resultados de gran interés. Por este motivo, el estudio de la composición de los derivados y metabolitos químicos de estas plantas es de gran importancia para la descripción de la actividad antitumoral y el potencial anticanceroso de los distintos extractos de las plantas o los metabolitos aislados de estas especies etnomédicas (Bailon-Moscoso et al., 2015).

Entre la diversidad de especies que existen, se puede destacar las propiedades antitumorales y antiinflamatorias de las siguientes plantas:

1.13.1 *Moringa oleifera*

Es una planta crucífera perteneciente a la familia Moringaceae, se ha convertido en un alimento básico y popular en distintas partes del mundo ya que posee gran valor nutricional y medicinal. Sus propiedades anticancerígenas han sido demostradas en los análisis de extractos hojas y corteza, ya que, por los fitoquímicos que contiene, puede inhibir

eficazmente el crecimiento de las células cancerosas de mama, páncreas y CCR. Este gran beneficio está relacionado con la presencia de diferentes compuestos aislados de la planta como los isotiocianatos. Se ha demostrado que los isocianatos de alilo inhiben el crecimiento de células de cáncer de próstata humanas independientes (PC-3) y dependientes de andrógenos (LNCaP), debido a la acción de diversos mecanismos como la acumulación de células en fase (G2/M) y aumento de la apoptosis. Adicionalmente, se conoce que *Moringa oleifera* inhibe selectivamente la proliferación de diferentes líneas celulares como en el carcinoma hepatocelular humano HepG2, células HCT-8 de cáncer de colon, cáncer de pulmón A549 y carcinoma de mama MDA-MB-231 (Kou et al., 2018).

La inhibición de diversos tipos de células cancerosas mediante el empleo de extractos de *M. oleifera* se produce mediante la inducción de la apoptosis, esta propiedad convierte a esta planta y sus componentes bioactivos en potenciales agentes farmacológicos antineoplásicos eficaces. Los compuestos más identificados y estudiados procedentes de la moringa son el ácido gálico, ácido clorogénico, rutina, apigenina, astragalina, quercetina y kaempferol. Dichos compuestos causan la activación de proteína proapoptóticas como las caspasas, TRAIL, bax y bad e inhiben la actividad de las proteína antiapoptóticas como Bcl2, IAP y FLIP (Adebayo et al., 2017).

1.13.2 *Tropaeolum tuberosum*

Otra especie empleada habitualmente en medicina natural es *Tropaeolum tuberosum*, un tubérculo nativo andino consumido

tradicionalmente por la población indígena. Las investigaciones realizadas indican que los compuestos aislados con diferentes extractos de la planta presentan actividad citotóxica y capacidad apoptótica contra algunas líneas celulares de cáncer humano. Las diversas propiedades medicinales de la planta se relacionan principalmente con los fitoquímicos que contiene como las antocianinas, glucosinolatos de macamidas e isotiocionatos (Apaza et al., 2020).

Recientes investigaciones han mostrado la existencia de dos compuestos aislados que son el 2-bencil-3-tioxohexahidropirroló [1,2-c]imidazol-1-ona y N-(4-acetil-5-metil-5-fenil-4,5-dihidro-1,3,4-tiadiazol-2-il) acetamida, los cuales indujeron un aumento en la tasa de apoptosis de las células cancerígenas tras el tratamiento con dichos compuestos de varias líneas celulares (Apaza et al., 2020).

1.13.3 *Annona cherimola*

Todas las especies de *Annona* que pertenecen a la familia Annonaceae son una fuente valiosa de agentes anticancerígenos. Esta propiedad se relaciona con la presencia de un grupo de fitoquímicos denominados acetogeninas, además de alcaloides, aceites esenciales, flavonoides, terpenoides y otras clases químicas. El grupo de alcaloides aislados están ampliamente relacionados con la actividad antitumoral de los extractos naturales. Específicamente, el alcaloide isocoreximina provoca citotoxicidad frente a diferentes líneas celulares cancerígenas que causa la inhibición de la viabilidad celular en porcentajes hasta del 94% (Nugraha et al., 2019).

Annona cherimola es una especie comestible que da frutos tropicales, comúnmente conocida como “chirimoya”. Así mismo, se ha descrito su efecto antioxidante y proapoptótico por el alto contenido de terpenos, además de flavonoides, taninos, alcaloides y fitoesteroles. Se han identificado fitoquímicos como la annomolina y las acetogeninas, aislados de los extractos de las semillas de la planta, que han demostraron su efecto antitumoral en líneas celulares de cáncer de próstata, colon y mama (Ammoury et al., 2019).

1.14 Leguminosas y sus propiedades antitumorales

Las leguminosas son una amplia familia de plantas de las que se puede cosechar semillas con interesantes propiedades nutricionales y funcionales. Dichas semillas han sido tradicionalmente infrautilizadas y en la actualidad numerosas investigaciones tratan de dilucidar su alto potencial como fuente de alimento nutracéutico debido a sus propiedades antioxidantes presentes especialmente en la cubierta de las semillas. Es igualmente importante destacar el alto contenido de carotenoides, taninos naturales y compuestos fenólicos (Bhattacharya and Malleshi, 2012).

1.14.1 Propiedades nutricionales

Una característica general de las leguminosas es su alto contenido proteico. Generalmente, las proteínas y péptidos que las conforman tienen una amplia gama de funciones fisiológicas, entre las que se incluyen la capacidad de actuar como agentes anticancerosos. Una de las especies con mayor contenido proteico es la soja y ha sido considerada como alimento

funcional por las sustancias fitoquímicas que entran a formar parte de su composición, donde se destacan los carotenoides, curaminas, flavonoides, lignanos, ácido fítico, triterpenos y fenólicos que intervienen en la prevención del cáncer (Kim et al., 2021).

1.14.2 Propiedades antioxidantes

Las leguminosas contienen numerosos compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes como los flavonoides, los cuales contienen un gran número de sustituciones de hidroxilo que estimula la donación de átomos de hidrógeno y la eliminación de radicales libres. Además se han identificado un grupo de conglutinas que tienen la capacidad de reducir la expresión de citocinas proinflamatorias así como grupos fenólicos con un poder antioxidante reductor (Priego-Poyato et al., 2021).

La eliminación de los radicales libres y de las especies reactivas del oxígeno inhibe los mecanismos oxidativos que conducen a distintas enfermedades, entre las cuales se encuentra el cáncer. Los mecanismos antioxidantes biológicos naturalmente existentes por los compuestos bioactivos de las leguminosas combaten el estrés oxidativo y los antioxidantes naturales de las dietas fortalecen las defensas antioxidantes endógenas. Los taninos y otros polifenoles son los antioxidantes dietéticos más importantes, ya que actúan como agentes reductores, quelantes de iones metálicos e inhibidores de oxígeno singlete para prevenir el daño oxidativo a biomoléculas (Marathe et al., 2011).

1.14.3 Control del síndrome metabólico

El consumo de leguminosas tiene un papel fundamental en la dieta diaria para la prevención y para el tratamiento del síndrome metabólico que es la agrupación de varios trastornos metabólicos asociados a la obesidad y la resistencia a la insulina. La prevención de un gran número de enfermedades puede conseguirse mediante la modificación de la dieta diaria, por lo que las leguminosas han ganado gran interés principalmente en el control de la homeostasis del metabolismo glucídico y lipídico (efecto hipolipemiante, reducción de los niveles de colesterol y control de peso debido a la regulación de las hormonas que controlan el apetito y la saciedad). Sus propiedades beneficiosas se deben a la presencia de compuestos bioactivos como el almidón resistente, oligosacáridos, fitatos, polifenoles y saponinas que actúan como moduladores fisiológicos del metabolismo, inhiben la actividad de la enzima convertidora de angiotensina y exhiben efectos prebióticos, antioxidantes y con un alto potencial como alimentos funcionales (Martínez et al., 2016).

1.14.4 *Vicia faba*

También conocida como haba, pertenece al género *Vicia* y a la familia Fabaceae, se cultiva como fuente de alimento humano y animal desde tiempos inmemoriales, por lo que es la tercera leguminosa más consumida a nivel mundial y presenta un alto valor nutricional. Aunque la composición química depende en gran medida del genotipo de las semillas cultivadas y las condiciones ambientales, el contenido en nutrientes del haba presenta muchos beneficios para la salud, a los que hay que añadir los

derivados de sus componentes no nutricionales como compuestos fenólicos con potencial actividad antitumoral (El-Feky et al., 2018).

Se ha investigado el efecto de los extractos de las habas sobre líneas celulares de cáncer humano BL13, AGS, Hep G2 y HT-29, encontrándose que existe una capacidad de protección celular contra las especies reactivas de oxígeno que dañan al ADN y una inhibición en la proliferación de las líneas células de cáncer asociada a la inducción a la apoptosis en las células de leucemia promielocítica aguda HL-60. Las propiedades funcionales antioxidantes y quimiopreventivas, además de los efectos inhibidores sobre la enzima convertidora de angiotensina, la α glucosidasa y la lipasa pancreática se relacionan con la existencia de compuestos fenólicos activos (Siah et al., 2012).

Es conocido que la dieta que incluye el consumo de habas secas o molidas corrige los niveles de biomarcadores oxidativos e inflamatorios, e incluso se observan mejoras en los daños histológicos ya que los extractos de la planta ayudan a atenuar el daño oxidativo y las lesiones colónicas gracias a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Eskandrani, 2021).

1.14.5 *Vicia narbonensis*

Es una planta con buena adaptación a climas cálidos y secos que produce granos denominados alverjones o frijol narbón. Ha sido utilizada tradicionalmente como fuente de alimentación para animales, sin embargo, los compuestos bioactivos que contiene y su alto contenido de proteínas lo convierten en una nueva alternativa de consumo humano con

grandes beneficios. Los estudios en estas especies de leguminosa son atractivos para la comunidad científica por la variedad de beneficios potenciales que muestra para la salud como un menor riesgo de diabetes o en el tratamiento de la obesidad, enfermedades cardiovasculares o ciertos tipos de cáncer. Dichos efectos beneficiosos se relacionan principalmente con la presencia de compuestos fenólicos, fitoquímicos y péptidos con bioactividad antioxidante (Del Pino-García et al., 2018).

1.14.6 *Vicia ervilia*

Se trata de una especie milenaria que ha sido cultivada tradicionalmente en la región mediterránea, es fácil de cultivar incluso en suelos pobres, alcalinos y secos. Se obtienen semillas conocidas como arveja amarga y los altos niveles de componentes nutricionales y funcionales, especialmente los polifenoles y algunos aminoácidos libres hacen que esta planta sea investigada para determinar sus potenciales propiedades beneficiosas en la salud (Vioque et al., 2020).

Se ha determinado que esta especie tiene actividades antiinflamatorias, analgésicas, antiulcerogénicas, antihiper glucémicas y antivirales, estando todo este amplio espectro de actividades biológicas relacionado con el contenido de polifenoles y de canavanina. Dichos componentes incrementan su eficacia medicinal, lo que le convierte en una buena opción para nuevos estudios que determinen todas sus propiedades (Okba et al., 2017).

1.14.7 *Vicia sativa*

Conocida como arveja común, es una leguminosa importante cultivada en muchos países del mundo. Las investigaciones relacionadas con esta especie se centran en su contenido en nutrientes y valor nutricional. Al tratarse de una leguminosa es conocido su alto contenido proteico, y la amplia gama de funciones fisiológicas que pueden mostrar las proteínas y péptidos que las conforman, entre las que se incluyen la capacidad de actuar como agentes anticancerosos (Grela et al., 2020).

El valor nutricional de esta especie la ha convertido en una fuente potencial de alimento tanto para seres humanos como para animales y aunque existe una falta de estudio fitoquímico y en la evaluación de sus actividades biológicas, se ha logrado determinar su poder antioxidante por la acción de compuestos como flavonas, flavonol, cumarina y triterpenoides, además muestra potencial para captar radicales libres y también tiene actividades citotóxicas en células tumorales como HeLa, HepG2 y HL-60 (Liu et al., 2020).

1.14.8 *Medicago sativa*

M. sativa pertenece a la familia Fabaceae y es conocida como alfalfa. Ha sido empleada de forma medicinal y con un uso dietético. En la medicina tradicional aplicada en China, India, América y algunos países del Oriente Medio se ha empleado para tratar diversos trastornos. La alfalfa es una valiosa fuente de fitoquímicos como alcaloides, aminoácidos, carotenos, cumarinas, flavonoides, compuestos fenólicos, saponinas, poliaminas, terpenos, furanoides y cetonas, entre otros, que confieren a la

planta propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, inmunomoduladoras y anticancerígenas (Zagórska-Dziok et al., 2020).

Se ha determinado que las saponinas que provienen de esta especie poseen efectos apoptóticos, actividad citotóxica y antitumoral en las líneas celulares HeLa y MCF-7. Además, mediante la combinación con el agente anticancerígeno cisplatino se evidencia potenciación en las actividades en las líneas celulares tumorales (Avato et al., 2017). Otro estudio indica que los polisacáridos que contienen selenio muestran potenciales actividades antioxidantes y antitumorales en la línea celular tumoral HepG2 (Gao et al., 2020).

1.14.9 *Lupinus luteus*

El lupino o altramuza amarillo, también perteneciente a la familia Fabaceae, crece en suelos ácidos y arenosos, siendo cultivado especialmente en Austria Occidental. Posee un alto contenido de proteínas y fibra que le confiere un alto valor nutricional y varios beneficios para la salud asociados. Entre los fitoquímicos más destacados de esta especie están algunos polisacáridos que exhiben actividades antioxidantes e inmunoestimuladoras significativas, lo que los convierte en una excelente alternativa como alimento nutracéutico y funcional (Thambiraj et al., 2018).

La genisteína es otro compuesto aislado de *L. luteus* que ha mostrado un alto potencial anticarcinogénico ya que es capaz de inhibir el crecimiento de varias líneas celulares cancerosas como las de la leucemia, cáncer de mama, próstata, pulmón, cabeza, cuello y linfomas. Los efectos

se logran mediante diversos mecanismos de acción como la inducción a la apoptosis, la detención del ciclo celular, la inhibición de la ADN topoisomerasa II, la supresión de la actividad de la telomerasa y la inhibición de la angiogénesis (Antosiak et al., 2017).

Objetivos

2. Objetivos

El objetivo principal del estudio es evaluar la capacidad antioxidante y antitumoral frente a líneas de cáncer de colon que presentan los extractos etanólicos e hidrolizados proteicos de leguminosas, así como los extractos etanólicos de las especies *Tropaeolum tuberosum*, *Annona cherimola* y *Moringa oleifera*

Para la consecución del objetivo principal los objetivos específicos fueron:

- 1) Obtener extractos etanólicos a partir de las semillas de leguminosas y de las especies *Tropaeolum tuberosum*, *Annona cherimola* y *Moringa oleifera*.
- 2) Obtener hidrolizados proteicos a partir de las semillas de leguminosas.
- 3) Valorar la capacidad antioxidante de los extractos funcionales obtenidos mediante distintas pruebas químicas (polifenoles totales, DDPH, ABTS, inhibición de la peroxidación lipídica) y en un modelo celular utilizando la línea HT-29 de cáncer de colon.
- 4) Determinar si los extractos tienen efecto inductor sobre la actividad de las enzimas detoxificantes de fase II glutatión S transferasa y Quinona oxidoreductasa.
- 5) Determinar la capacidad antiproliferativa de los extractos funcionales en diferentes líneas celulares de cáncer de colon,

como son: T84, HCT-15, CCD18 y Sw480, así como en MTS de HCT15.

- 6) Determinar los mecanismos implicados en la muerte celular producida por los extractos funcionales en las líneas celulares de cáncer de colon, así como su efecto en la población de Células madre tumorales.

Material y métodos

3. Material y métodos

3.1 Material vegetal

Para este estudio se utilizaron semillas secas y maduras de las especies *Vicia faba* las cuales se dividieron en cuatro tipos: Haba alta en taninos y alta en vicina y convicina, haba alta en taninos y baja en vicina y convicina, haba baja en taninos y alta en vicina y convicina, haba baja en taninos y baja en vicina y convicina y otras especies de leguminosas no habituales de consumo humano, las cuales fueron proporcionadas por la empresa Cellbitec SL.

La vicina y convicina son dos β -glucósidos que sufren hidrólisis en el tubo digestivo para producir divicina e isouramilo los cuales son capaces de actuar como agentes oxidantes y producir lisis eritrocitaria (hemólisis) en situaciones de deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, síndrome conocido como fabismo, por lo cual han sido obtenidos nuevas plantas con modificación del contenido de estos β -glucósidos y se quieran ensayar.

Además de leguminosas se emplearon semillas secas de las especies *Tropaeolum tuberosum*, *Annona cherimola* y *Moringa oleifera* los cuales fueron proporcionadas por M. Fuel del mercado Santa Clara de Quito-Ecuador.

3.2 Obtención del material de partida.

Los tubérculos de *Tropaeolum tuberosum* previamente fueron sometidos a la liofilización, los cuales junto a las semillas fueron molidas y trituradas hasta la obtención de su harina fina con un tamaño de partícula de 100-150 μM y se conservaron a una temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3 Preparación de los extractos etanólicos

A partir de las harinas de las semillas y los tubérculos se llevó a cabo los extractos etanólicos a temperatura ambiente y siguiendo el protocolo de Kapravelou et al., (2015):

Se mezclaron 5 gramos de las harinas con 15 mL de solución extractora (50% de etanol absoluto: 50% agua bidestilada: 0,25% HCl). Se agitó a 600-700 rpm, se midió el pH y se llevó a un valor de 2, añadiendo HCl 6N. En caso de que la muestra se hubiese tornado espesa se sonicó durante 1 minuto (intervalos de 30 segundos). Posteriormente, se creó una atmosfera reductora inyectando Nitrógeno (N_2) y sellando el vaso con Parafilm. Se agitó durante 30 minutos a 700-900 rpm, en frío (rodeado de hielo). Tras el proceso de agitación se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante en un tubo Falcon el cual se conservó en frío.

En el precipitado sobrante se volvió a realizar una segunda extracción, siguiendo el mismo procedimiento anterior, pero en esta ocasión se añadieron 10 mL de la solución extractora. De nuevo se recogió el sobrenadante, se mezcló con el anterior y la mezcla se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tras permanecer a -20°C los extractos durante 1 día, se centrifugaron durante 15 minutos a 4000 rpm y 4°C con la finalidad de eliminar cualquier material sólido que estuviera suspendido en el extracto y se alicuotaron en tubos eppendorf de 1 mL, almacenándose a -80°C .

3.4 Preparación de los Hidrolizados Proteicos

La obtención de los hidrolizados proteicos se lleva a cabo mediante dos procesos consecutivos, el primero corresponde al proceso de extracción y el segundo al de la hidrólisis proteica. Para lo cual se siguió el siguiente procedimiento:

Se pesaron 25 gramos de harina y 0,25 g de sulfito sódico Na_2SO_3 (25%), y se añadió un volumen de 100 mL de agua bidestilada a 33°C . Se agitó a 700 rpm y seguidamente se ajustó el pH a 8,8 añadiendo NaOH (3N), se mantuvo la agitación por 50 minutos. Se dejó decantar por 5 minutos y se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos tras lo cual se recogió el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 50 mL de agua bidestilada y se agitó durante 50 minutos a 33°C a pH 8,8. Se centrifugó nuevamente y el sobrenadante se añadió al anterior.

Para la hidrólisis se mantuvo el sobrenadante a 45°C en agitación a 45°C por 30 minutos y se añadió CaCl_2 (0,1 M) y MgSO_4 (0,1 M), a razón de 1 mL por cada 100 mL muestra. Se añadió alcalasa de "*Bacillus licheniformis*" Sigma-Aldrich (Madrid, España) en una relación de 0,3 AU/g proteína y se dejó en agitación 30 minutos manteniendo el pH a 8,8 y la temperatura de 45°C . Posteriormente se añadió proteasa de "*Aspergillus oryzae*" Sigma-Aldrich (Madrid, España) a razón de 100

LAPU/g proteína y se dejó en agitación 30 minutos, manteniendo el pH a 8,8 añadiendo NaOH y a temperatura de 47°C. Finalmente, la solución se congeló a -80°C previamente a su liofilización. Posteriormente se liofilizó y se resuspendió en agua bidestilada para futuros ensayos.

3.4.1 Rendimientos de la extracción

Para el extracto etanólico se partió de 5 g de harina de semillas y se extrajo con la solución extractora. El extracto etanólico se alicuotó en eppendorf (1 mL), y parte de este volumen se preservó a -20°C, mientras que otra parte fue evaporada, alicuotada al mismo volumen, y liofilizada en equipo TELSTAR Cryodos-50 durante 24 horas con la finalidad de conocer el peso de los extractos etanólicos. En los eppendorf destinados a liofilización, el rendimiento se calculó de la siguiente manera:

$$R = \frac{\left(\frac{mg}{mL}\right) muestra \times VT (mL)}{g harina inicial} = \frac{mg}{g} harina$$

En el caso del hidrolizado proteico se partió de 25 gramos de harina de semillas. El volumen total de extracto funcional obtenido se congeló a -80°C y se liofilizó. El rendimiento se expresó como miligramos resultantes por peso de partida.

$$R = \frac{gramos liofilizados \times \frac{1000mg}{g}}{g harina inicial} = \frac{mg}{g} harina$$

3.5 Pruebas bioquímicas para la determinación de la capacidad antioxidante

3.5.1 Cuantificación de polifenoles totales

Para cuantificar los polifenoles totales se llevó a cabo el método de Dewanto et al., (2002).

Se preparó una recta patrón de ácido gálico con las siguientes concentraciones 50, 100, 200, 300, 400 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para el blanco se utilizó 125 μl de agua bidestilada, además se midió la solución extractora empleada para realizar los extractos etanólicos, añadiendo 125 μL de la misma. Las mediciones de las muestras, puntos de la recta y las soluciones extractoras se realizaron por triplicado.

Se añadió en tubos de ensayo 125 μL de muestra, 500 μL de agua bidestilada y 125 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu. Se dejó reaccionar por 6 minutos en oscuridad. Posteriormente, se añadió 1,25 mL de Na_2CO_3 (10%) /NaOH (1M), se enrasó a 3 mL con agua bidestilada y se dejó 90 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se centrifugó a 2500 rpm por 5 minuto y se midió en el sobrenadante la absorbancia a 750 nm utilizando un espectrofotómetro (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific. Shanghai, China) en cubetas de 1 mL.

Para el cálculo de la concentración se realizó mediante la interpolación de los valores de absorbancia respecto a los de la recta patrón del ácido gálico, expresándose el resultado final en μg de equivalente de ácido gálico/mg de extracto.

3.5.2 Evaluación de la actividad antioxidante mediante ABTS

Los compuestos cromógenos como el ATBS, son utilizados para determinar la capacidad de los compuestos fenólicos para captar los radicales libres generados, actuando así en contra de los efectos perjudiciales de los procesos de oxidación

El ABTS es un radical libre que tiene que ser generado tras una reacción química o enzimática. Con el ABTS se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica. Para llevar a cabo este ensayo se siguió la metodología de Miller et al., (1993).

El radical ABTS⁺ se genera tras la reacción de ABTS con persulfato potásico, los cuales se preparan individualmente en eppendorf de 5 mL.

El ABTS se preparó a la concentración de 7 nM para lo cual se disolvieron 0.0192 g de ABTS en 5 mL de agua destilada. El persulfato potásico se preparó a la concentración de 4.9 mM, para lo cual se disolvió 0.0066g en 5 mL de agua destilada. Tras disolverlos bien, se mezclaron en un tubo de 10 mL y se dejaron en oscuridad y a temperatura ambiente durante mínimo 4h. El persulfato desaparece el ABTS y es lo que forma el compuesto activo. Pasadas las 4h, se diluyó con etanol hasta conseguir una absorbancia de 0.7 nm a una longitud de onda de 734 nm en cubetas de cuarzo.

Se preparó una recta patrón con ácido gálico a una concentración de 0, 20, 40, 60, 80, 100 µg/mL. Para la determinación de la capacidad antioxidante un volumen de 6 µL de extractos etanólicos o solución estándar de ácido gálico se mezcló con 294 µL de ABTS y se incubó durante

3 minutos. Una vez finalizada la reacción, la densidad óptima de las muestras se midió a 620 nm (Multiskan™ FC, Fotómetro de Microplacas, Thermo Fisher Scientific). Para el blanco se utilizó agua (6 µL) y 294 µL de ABTS. Los resultados se expresaron como µg de equivalente de ácido gálico (GAE) por mg de muestra.

3.5.3 Ensayo de captación/retención de radicales (DPPH)

Para este ensayo se utilizó el método de Brand-Williams et al., (1995) con algunas modificaciones. El ensayo se basa en la reacción que se produce cuando el electrón desapareado del átomo de nitrógeno del α -diphenyl- β -picrilhydrazyl DDPH recibe un átomo de hidrógeno u otra especie radical (R) de los antioxidantes perdiendo su coloración violeta. Por lo que según Kedare y Singh (2011) el DPPH se utiliza para determinar el poder antioxidante de una sustancia por captura de radicales libres. La disminución de absorbancia a 515 nm del DPPH es proporcional a la actividad de los compuestos antioxidantes que contiene la muestra debido a que la pérdida de color corresponde estequiométricamente con la ganancia de electrones.

Se pesaron 0,0012 g de DDPH (394,32 g/mol) Sigma-Aldrich (Madrid, España) y se disolvieron en 50 mL de metanol, conservándose la solución refrigerada y en oscuridad durante 30 min hasta estabilidad. Para este ensayo se preparó la recta patrón con el antioxidante Trolox (Sigma-Aldrich, Madrid, España). El Trolox “6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid” es un análogo de la vitamina E, soluble en agua empleado como referencia para la medida de la capacidad

antioxidante de una sustancia en fase lipídica o acuosa. Se mide en unidades llamadas equivalente de Trolox Santosh et al., (2002). Se partió de una solución 2 mM (solución A) de la cual se realizaron las siguientes diluciones con metanol: 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.5 nM.

Adicionalmente, se midió un control de la solución extractora. Para determinar la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos, se añadió 10 μ L de extracto + 240 μ L de DPPH. El DPPH es sensible a la luz por lo que se necesita trabajar en oscuridad. Se realizaron triplicados para la recta patrón, los controles de la solución extractora y las muestras. Una vez añadido el DPPH, se midió la absorbancia a 493 nm; a tiempo cero en placas multipocillo en el espectrofotómetro y tras 15 minutos. Se calculó el porcentaje de inhibición de cada muestra frente al control blanco realizado con metanol y se interpoló con la recta patrón del Trolox, para conocer la concentración de equivalente de Trolox que poseían los extractos etanólicos. A mayor concentración de unidades de equivalentes de Trolox que hay en una muestra mayor será la pérdida de color del DPPH, lo cual significa que el extracto posee una mayor capacidad antioxidante. El resultado de esta prueba se expresa en μ g de equivalentes de Trolox/mg de extracto.

3.5.4 Ensayos de inhibición de la peroxidación lipídica (TBARs)

La peroxidación lipídica consiste en la degradación oxidativa de los lípidos inducida por la captación de electrones de los lípidos por parte de los radicales libres. Se forma en primer lugar un producto primario estable, el hidroperóxido lipídico, y posteriormente el producto estable aldehído

lipídico. Este proceso ocurre en cadena, por lo que, si la reacción no termina con rapidez, causa daños a las membranas celulares. Algunos de los productos finales corresponden al malondialdehído (MDA) que es carcinógeno dado que reacciona con la deoxiadenosina y deoxiguanosina del DNA y provoca daños en el mismo.

Por tanto, para evaluar la inhibición de este proceso por parte de los extractos etanólicos e hidrolizados proteicos se utilizó el ensayo descrito por Kapravelou et al., (2015). Para ello se empleó tricloruro de hierro (FeCl_3) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para oxidar el sustrato, un homogeneizado del encéfalo de rata, produciendo el MDA. Al añadir ácido tiobarbitúrico (TBA) en medio ácido y con calor (75°C), se obtiene una coloración rosa que se mide en el espectrofotómetro. Su intensidad es proporcional a la peroxidación lipídica que sufre el encéfalo de rata, por lo que, si los extractos etanólicos e hidrolizados proteicos evitan su oxidación, significa que inhiben la peroxidación lipídica.

Para llevar a cabo el ensayo se realizó el siguiente procedimiento: Se pesaron 1,2 gramos de encéfalo de rata y se añadió 10 mL de KCl 1,15% y TRITON X-100 0,1% tras lo cual se homogeneizó durante 30 segundos. Se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min a 4°C y se recogió el sobrenadante. A continuación, se llevaron a cabo dos reacciones distintas y consecutivas. Primero la reacción de oxidación y después la reacción TBARS (especies reactivas del ácido tiobarbitúrico, TBA). La detección del TBARS se realizó siguiendo la metodología descrita por Okhawa et al., (1979). Para la reacción de oxidación y formación del MDA se añadieron y

mezclaron los siguientes compuestos: 1,3 mL de KCl 0.15% sin TRITON, 100 µL de homogeneizado de cerebro, 100 µL de F₃Cl₃ (10 mM), 100 µL de H₂O₂ (1 mM) y 150 µL de KCl para el control y 150 µL para las muestras. Se mezclaron los contenidos y se incubó a 37°C en el baño durante 1 hora.

Para la reacción TBARs se empleó lo siguiente: 1.5 mL de HCl 0.25 N/TCA 15%/DETAPAC 1.34 mM/ BHT 0.5% para detener la reacción de oxidación anterior y precipitar las proteínas y 300 µL SDS 8.1% y 300 µL de TBA 3% para reaccionar con el MDA. Se mezcló en el vórtex e incubó en un baño a 75°C por 1 hora. Finalmente, una vez que se han dado las dos reacciones. Se dejó enfriar los tubos, se centrifugó a 2500 rpm durante 5 min a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia de las muestras en el espectrofotómetro (Evolution 300 UV-VIS, Thermo Scientific, USA) mediante el software VisPro® a 532 nm.

El porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica se calculó mediante la siguiente fórmula

$$\% \text{ de Inhibición} = 100 - \left(100 * \frac{\text{Absorbancia blanco}}{\text{Absorbancia muestra}} \right)$$

Por su parte, el número de unidades antioxidantes (UA) se define como la cantidad de muestra que tiene capacidad para reducir la formación de TBARs en un 50%, y para calcularlo se utilizó la siguiente fórmula:

$$UA = \frac{\% \text{ de Inhibición}}{50}$$

La capacidad antioxidante se expresó como unidades de actividad antioxidante por mg de extracto.

3.6 Capacidad antioxidante en cultivos celulares

Para determinar la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos e hidrolizados proteicos en cultivo celular, se sembraron células HT-29 en placas de 96 pocillos (5×10^4 células/pocillo) en un volumen de 150 μL de medio de cultivo DMEM+10% Suero Bovino Fetal y se incubaron a 37°C y 5% de CO_2 . Tras 24 horas de incubación, el medio se sustituyó por un medio sin suero, ya que este nuevo medio no permitirá que las células sigan proliferando y muestra una menor capacidad antioxidante. Un día después, se retiró el medio y se añadió 200 μL de DMEN sin suero con las diferentes concentraciones de los extractos etanólicos e hidrolizados proteicos utilizando una dilución no citotóxica, realizándose el tratamiento durante otras 24 horas. El sobrenadante que contenía los extractos etanólicos se desechó y se añadió el agente oxidante H_2O_2 (200 μL) utilizando dos concentraciones (2 mM y 3 mM), procediéndose a un periodo de incubación de 6 horas. Posteriormente se sustituyó por 200 μL de medio libre de suero. A continuación, se incubaron las células durante un periodo adicional de 12 horas y se evaluó la viabilidad celular mediante MTT [(3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Bromuro de difeniltetrazolio), Sigma-Aldrich, Madrid, España]. Brevemente, se añadieron 30 μl de MTT por pocillo durante 4 h en condiciones de cultivo. A continuación, se descartó el medio y se añadieron 200 μl de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, Madrid, España) más 25 μl de tampón de glicina de Sorensen (glicina 0,1M, NaCl 0,1M, pH 10,5 con 0,1 NaOH) por pocillo para disolver los cristales de formazán. Tras 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se midió

la densidad óptica de los pocillos a 570 nm y a una longitud de onda de referencia de 690 nm (Colorímetro Titertekmultiscan, Flow, Irvine) para determinar la proliferación relativa (%RP) de las células tratadas mediante el ensayo MTT. Los resultados de este ensayo se expresaron como unidades de actividad antioxidante (UAA), que se define como el valor de 10 unidades porcentuales (10%) de recuperación de la viabilidad celular con respecto al control correspondiente tratado con peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

3.7 Capacidad de inducción de enzimas detoxificantes

3.7.1 Tratamiento y purificación de la fracción citosólica

Las células de adenocarcinoma de colon HT29 se sembraron en frascos de cultivo T25 (1×10^6) en 5 mL de DMEM completo y se incubaron durante 24 horas. A continuación, se expusieron las células a los extractos etanólicos o hidrolizados proteicos de las semillas, utilizando dosis no citotóxicas, disueltos en DMEM sin SBF durante 48h. El sulforafano se utilizó como control positivo en dos concentraciones (5 μM y 10 μM) disuelto en las mismas condiciones que los extractos. Después de este período de incubación de 48 horas, se retiró el medio y las células se lavaron con PBS y se tripsinizaron. La actividad de la tripsina se neutralizó con el doble de volumen de DMEM completo y las células se transfirieron a tubos eppendorf de 1,5 mL y se centrifugaron a $10000 \times g$, $4^\circ C$ durante 5 minutos. Tras el lavado de las células con PBS, se procedió a resuspenderlas en 500 μL de Tris-HCl 25mM, pH-6,4. Finalmente, las células se lisaron por

sonicación durante 10 segundos a una frecuencia del 40% en hielo y se centrifugaron a 10000 ×g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante citosólico se utilizó para determinar la actividad enzimática de GST y QR.

3.7.2 Ensayo de la glutatión S-transferasa (GST)

La enzima GST cataliza la adición nucleofílica del glutatión a un centro electrofílico que se encuentra en los xenobióticos, desactivando los compuestos citotóxicos y genotóxicos. Esta enzima no suele funcionar a su máxima capacidad, pero puede ser inducida por una variedad de compuestos naturales, ejerciendo así una protección eficaz contra la carcinogénesis. El ensayo de GST se mide observando la conjugación del 1-cloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB) (extinción molar $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) con el glutatión reducido (GSH). La mezcla de reacción contenía 980 μL de tampón fosfato 100 mM (pH 6,5), 10 μL de CDNB 100 mM, 10 μL de glutatión reducido (GSH) 100 mM. Se añadieron 100 μL de cada muestra (sobrenadante citosólico) a una cubeta que contenía 1 mL de la mezcla de reacción y se midió la absorbancia a 340 nm cada minuto durante 5 minutos. A la cubeta del blanco se añadieron 100 μL de PBS a la mezcla de reacción. La actividad de GST se calculó como el aumento de la absorbancia por minuto por mg de proteína total de la muestra.

3.7.3 Ensayo de NAD(P)H: Quinona oxidoreductasa (QR)

La quinona oxidoreductasa es una flavoproteína citosólica que previene la toxicidad de las quinonas y quinoneimas reduciéndolas a sus correspondientes hidroquinonas utilizando tanto NADH como NADPH como donantes, evitando la generación de intermediarios semiquinónicos,

que tienen una alta tendencia a reaccionar con el oxígeno dando lugar a superóxido. La mezcla de reacción contenía 881,5 μL de Tris-HCl 25 mM (pH-6,5), 60 μL de BSA (1mg/mL), 2,5 μL de Tween (20%), 5 μL de FAD 10 μM , 10 μL de NADH 20 mM y 16 μL de DCPIP 5 mM. Se añadieron 25 μL de cada muestra (sobrenadante citosólico) a una cubeta que contenía 1 mL de la mezcla de reacción y se midió la absorbancia a 600 nm cada minuto durante 5 minutos. Para la cubeta del blanco se añadieron 25 μL de Tris-HCl a la mezcla de reacción. La actividad QR se calculó como la disminución de la absorbancia por minuto por mg de proteína total de la muestra.

3.8 Análisis cromatográficos

El análisis de los constituyentes con actividad biológica presentes en los extractos etanólicos de las harinas de semillas se analizó mediante Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución (UPLC) acoplada a un Espectrómetro de Masas Cuadrupolar de Tiempo de Vuelo (QTOF, Synap G2, Waters, Milford, MA, USA). Los polifenoles se separaron analíticamente mediante una columna analítica Acquity HSS T33 (100 mm x 2,1 mm de diámetro interno, Waters, Milford, MA, USA). La fase móvil de la columna consistió en un gradiente formado por el disolvente A (agua desionizada con 0,5% de ácido acético), y el disolvente B (acetonitrilo con 0,5% de ácido acético). El flujo de la fase móvil fue de 0-4 mL/min. El análisis por espectrometría de masas de alta resolución se llevó a cabo en ionización por electro-spray negativo (ESI-eve) y los espectros se registraron en un rango de masa/carga (m/z) de 50-1200. Los

cromatogramas se analizaron con el programa MassLynx V4.1 y los compuestos se validaron analizando al menos 3 subfragmentos obtenidos de la base de datos CHEMnetBase y Chempider.

3.9 Cultivos celulares

Las líneas celulares sobre las cuales se desarrollaron los diferentes experimentos del presente estudio, fueron obtenidas de la ATCC (American Type Culture Collection) y se corresponden a las siguientes: T84 derivada de carcinoma de colon humano grado II; HT-29 derivada de células de adenocarcinoma de colon humano grado I, adquieren un crecimiento de multicapa indiferenciada y no polarizada; HCT-15 derivada de adenocarcinoma colorrectal humano y resistente a quimioterapia; SW480 las células se derivan de adenocarcinoma de colon humano de grado III-IV; CCD18 derivada de colon humano normal pero inmortalizado con morfología de fibroblastos.

3.9.1 Ensayo de viabilidad celular

Para investigar el efecto de los extractos etanólicos e hidrolizados proteicos sobre la proliferación de las células del CCR, se sembraron 4×10^3 células / pocillo de T-84, 5×10^3 células/pocillo de HCT-15, 5×10^3 células/pocillo de SW480 y 4×10^3 células/pocillo de CCD18 en placas de 48 pocillos y se incubaron durante la noche. Tras 24 h, los cultivos celulares se expusieron durante 72 ha a un amplio rango de concentraciones de los extractos etanólicos e hidrolizados proteicos disueltos en DMEM sin suero. Previamente, los extractos se evaporaron para eliminar la toxicidad del

etanol. Además, se probó el tratamiento combinado con extractos etanólicos o hidrolizados proteicos asociados a 5-FU (1,5-5 μ M). Tras la exposición al tratamiento (72h), se determinó la viabilidad celular mediante sulforodamina B. Tras descartar el medio de cultivo de los pocillos de las placas, las células se fijaron con 300 μ L de ácido tricloroacético (TCA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) frío al 10% durante 20 minutos a 4 °C, posteriormente se lavaron los pocillos con agua bidestilada y se secaron a temperatura ambiente. Una vez secas, las placas se tiñeron con 300 μ L de sulforodamina B (SRB) al 0,4% en ácido acético al 1% (20 min, en agitación). Se eliminó el exceso de SRB mediante tres lavados con ácido acético al 1% y se dejó secar a temperatura ambiente. La SRB se solubilizó con 300 μ L de Trizma® 10 mM a pH 10,5 en agitación. Finalmente, se transfirieron alícuotas de 100 μ L a placas de 96 pocillos y se midió la densidad óptica (DO) a 492 nm en un espectrofotómetro EX-Thermo Multiskan. La supervivencia celular (%) se calculó según la siguiente ecuación $\text{Supervivencia celular (\%)} = \frac{\text{DO de las células tratadas} - \text{blanco}}{\text{DO de control} - \text{blanco}} \times 100$. Además, se calculó la Concentración inhibidora 50% (IC₅₀) (GraphPad Prism 6 Software, La Jolla, CA, USA).

Para analizar el efecto de la combinación se calculó el índice de combinación (IC) utilizando el software Compusyn (Chou y Martin, 2005), donde un IC > 1 indica antagonismo, CI < 1 indica sinergia y CI igual a 1 indica aditividad.

3.9.2 Viabilidad celular en cultivos de MTSs

Seleccionamos las células tumorales HCT-15 para generar esferoides tumorales multicelulares (MTS) e investigar el efecto de los extractos etanólicos y la terapia combinada (extractos etanólicos +5-FU) en un sistema experimental que imita el tumor primario in vivo. Se sembraron $1,5 \times 10^4$ células/pocillo de HCT-15 en 200 μ L de DMEM completo en placas de 96 pocillos que previamente contenían una superficie de agarosa al 1% (50 μ L). La placa se centrifugó a 900 \times g durante 15 minutos y se incubó durante 3 días a 37°C al 5% de CO₂. A continuación, las MTS se trataron con extractos etanólicos (1,5 \times IC₅₀, 2 \times IC₅₀ y 4 \times IC₅₀) solos o en combinación con 5-FU (2 μ M) disueltos en DMEM. Al final del tiempo de exposición se comprobó la proliferación celular con el Cell Counting Kit-8 (CCK-8) (Dojindo Molecular Technologies, Inc.). Brevemente, se añadió 20 μ L de CCK-8 a cada pocillo para alcanzar una concentración final del 10%. Tras 4 h de incubación, se midió la densidad óptica de los pocillos a 450 nm y una longitud de onda de referencia de 620 nm (Titertekmultiscan Colorimeter, Flow, Irvine) para determinar la proliferación relativa (%RP) de MTS.

3.10 Análisis del ciclo celular

La citometría de flujo fue utilizada para determinar el efecto en la variación del porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular tras la exposición a los extractos etanólicos. Para ello, se sembraron $1,5 \times 10^4$ células de HCT-15 en 1 mL de DMEM en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37°C al 5% de CO₂. Después de 24 h, se eliminó el medio de

cultivo y se añadió 1 mL de medio de cultivo sin suero para detener el ciclo celular. A continuación, se sustituyó el medio de cultivo por DMEM sin suero con extractos etanólicos a la concentración de IC₂₅ e IC₅₀ y terapia combinada (extractos etanólicos (IC₁₀ e IC₂₀) +5-FU (2µM) y se incubaron durante 48 horas. Después, se recogió el medio en tubos de citometría y las células se despegaron con tripsina y se transfirieron a los tubos de citometría, la tripsina se neutralizó con el medio recogido y se centrifugó durante 3 minutos a 1500 rpm. Tras esto se lavaron con PBS y se fijaron con etanol al 70% en agitación a 4 °C (1 h) y se lavaron dos veces con PBS. Las células se incubaron con solución de extracción de DNA (192 mL de Na₂HPO₄ 0.2M y 8 mL de ácido cítrico 0.1 M a pH 7.8) durante 15 minutos a 37°C. Por último, las células se procesaron utilizando el kit de solución PI/RNASE (100 µg/mL RNAsa, 40 µg/mL IP) (Immunostep, Salamanca, España) para cuantificar el contenido total de ADN celular mediante el citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, San José, CA, EE.UU.) utilizando el software FlowJo (Treestar, Ashland, OR, EE.UU.), determinando la fase del ciclo celular predominante.

3.11 Análisis de proteínas por Western Blot

3.11.1 Obtención de proteínas

El medio de las células se descartó y las células se lavaron 2 veces con PBS, se despegaron con tripsina durante 5 minutos a 37°C en estufa al 5% CO₂. Una vez despegadas se añadió el doble de volumen de DMEM completo para neutralizar la tripsina y las células se recogieron en tubos de

15 mL en donde fueron centrifugadas durante 5 minutos a 1500 rpm. Se repitió el proceso lavando con PBS al botón. Se descartó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 100 μ L del tampón de lisis Radio-Immunoprecipitation Assay (RIPA) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Una vez resuspendido el pellet se almacenó a -80°C .

3.11.2 Cuantificación de proteínas

Para determinar la concentración de proteínas de las muestras se sonicaron en hielo y a continuación se procedió a su cuantificación por el método de Bradford utilizando una curva patrón de albúmina de concentraciones 0.5, 1, 2, 3, 5 y 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. La cuantificación se realizó en placas de 96 pocillos mediante la adición de 285 μL de reactivo de Bradford y 5 μL de cada una de las muestras. Se dejó incubar por 5 minutos en oscuridad y se determinó la absorbancia a 570 nm en el colorímetro (Multiskan Ex Thermo Electron Corporation, USA). Los valores de DO se obtuvieron mediante el programa informático “Ascent Software for Multiskan” para Windows v.2.6 (Thermo Labsystems, USA).

3.11.3 Preparación del gel SDS-PAGE

Para la preparación de los geles superior o “upper” e inferior o “lower” se utilizó los reactivos incluidos en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Reactivos para la preparación de geles

| | Lower 12% | Upper |
|-------------------------------------|-----------|-------|
| Acril/Bis 30% (mL) | 4.8 | 2.56 |
| Agua Bidestilada (mL) | 4.2 | 12.2 |
| Lower B. (4X pH 6.8) | 3 | - |
| Upper B. (4X pH 8.8) | - | 5 |
| APS 10% (1G/10ML) (μL) | 60 | 100 |
| Temed (μL) | 4 | 20 |

- Buffer Tris Lower 4X: 1.5M Tris, SDS 20% en agua destilada pH 8.8
- Buffer Tris Upper 4x: 0.5M Tris, SDS 20% en agua destilada pH 6.8

3.11.4 Preparación de las muestras

Las muestras de proteínas se disolvieron hasta obtener un volumen 24 μ L, que contiene 4 μ L de tampón de carga 1x (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 10% de SDS, 30% de β -mercaptoetanol, 6 mL de glicerol y 0.1% de azul de bromofenol) 40 μ g de proteína por muestra y el resto de agua destilada hasta obtener el volumen final de 24 μ L. Posteriormente, las muestras se calentaron a 95°C durante 5 minutos y se conservó a 4°C hasta su utilización. Se utilizó en los geles un marcador de pesos moleculares (PAGERuler Plus Protein Ladder for protein electrophoresis, Thermofisher, Madrid).

3.11.5 Electroforesis

Para la electroforesis, se colocaron los geles en sus soportes en las cubetas de electroforesis Mini Protean II cell (Bio-Rad, Hercules, CA) rellenas con Running buffer 5x (9 g Tris Base, 43.2 g de glicina, 3 g de SDS en agua miliQ). La electroforesis se realizó a voltaje constante 120 V, 400 mA durante 120 minutos.

3.11.6 Transferencia

Una vez finalizada la electroforesis de las proteínas en el gel de poliacrilamida, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 45 μ m (Hybond ECL, GE Healthcare) con tampón de transferencia 1x (5.8 g de Tris Base, 2.9 g de glicina, 200 ml etanol y SDS al 20% en agua miliQ) mediante el sistema “semiseco” con el aparato Trans

blot SD semi-dry transfer cell (Bio-Rad). A continuación, se preparó el “sándwich” de transferencia en el siguiente orden: papel Whatman, gel de poliacrilamida, membrana de nitrocelulosa y papel Whatman y la transferencia se realizó a 20 voltios, 01 A, 300 w durante 75 minutos.

3.11.7 Bloqueo de la membrana e incubación con anticuerpos

Una vez completada la transferencia, las membranas de nitrocelulosa se trataron en solución de bloqueo (solución salina tamponada con fosfato (PBS)-0,1% de Tween-20 + 5% (p/v) de leche en polvo) durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. A continuación, se retiró la solución de bloqueo y se realizó tres lavados con PBS-Tween-20 al 0.1% en agitación. Posteriormente se añadió el anticuerpo primario a la dilución apropiada disuelto en solución de bloqueo y se incubó a 4°C overnight en agitación.

Los anticuerpos utilizados se detallan en continuación en la **Tabla**

7.

Tabla 7. Anticuerpos empleados en el western blot

| Anticuerpos Primarios | | | |
|------------------------------|-----------------|---------------|--|
| Anticuerpo | Dilución | Tamaño | Referencia |
| β -actina | 1:1000 | 43 kDa | Santa Cruz Biotechnology, Inc. sc-47778 |
| Anti-caspasa 3 | 1: 500 | 32 kDa | Santa Cruz Biotechnology, Inc. sc-56052 |
| Anti-caspasa 8 | 1:1000 | 55 kDa | Santa Cruz Biotechnology, Inc. sc-56070 |
| Anti-caspasa 9 | 1:1000 | 46 kDa | Santa Cruz Biotechnology, Inc. sc-73548 |

| anti-MAP LC3 β | 15 kDa | 1:500 | Santa Cruz Biotechnology, Inc. sc- 271625 |
|------------------------------|-----------------|--|---|
| Anticuerpo secundario | | | |
| Anticuerpo | Dilución | Tamaño | Referencia |
| anti-mouse IgG | 1:5000 | HRP (horseradish peroxidase conjugated secondary antibody) | Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA |

Una vez transcurrido el tiempo, las membranas se lavaron 3 veces con PBS-Tween-20 al 0.1% y se adicionó el anticuerpo secundario a una dilución de 1:5000 en solución de bloqueo y se incubó durante 1 h en agitación a temperatura ambiente. El mismo procedimiento se realizó por la β -actina (dilución 1:1000) utilizada como control interno.

3.11.8 Revelado

Las señales se detectaron con un reactivo de detección de Western blot ECLTM (quimioluminiscencia mejorada; Bonnus, Amersham, Little Chalfont, Reino Unido) en el equipo LAS-400 mini. Una vez realizado el Western blot, las bandas obtenidas en los geles se analizaron mediante el software analítico Quantity One (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.)

3.12 Etiquetado con Lysotracker

Para determinar la apoptosis por autofagia mediante la sonda Lysotracker, primero se sembraron $1,5 \times 10^4$ células de células HCT-15 en 200 μ L de DMEM completo en portaobjetos de cultivo de 8 pocillos (Corning, EEUU.) y se incubaron durante 24^h a 37°C. Al día siguiente se expusieron a los extractos etanólicos (IC50) disueltos en DMEN sin suero durante 24 h y se tiñeron y cargaron con Lysotracker (50 nM) durante 30

min a 37 °C (Lysotracker® Red DND-99, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU.). Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se tiñeron con DAPI (1:1000). Finalmente, se observaron las vesículas de autofagia bajo microscopía de fluorescencia (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

3.13 Determinación de las especies reactivas de oxígeno celulares

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se evaluaron mediante citometría de flujo y el kit de ensayo de ROS celulares DCFDA/H₂DCFDA (Abcam, España) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células T84 sembradas en placas de 6 pocillos (1,5x 10⁴ células/pocillo) y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Al día siguiente se expusieron a los extractos etanólicos (IC₂₅ e IC₅₀) disueltos en DMEN sin suero durante 48 h. A continuación, se recogieron las células en tubos de citometría, se tiñeron con 20 µM de DCFDA durante 30 minutos a 37°C y se analizaron inmediatamente con el citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, San Jose, USA). Para determinar si la producción de ROS influye en la citotoxicidad de los extractos en las células T84, se sembraron las células en placas de 48 pocillos (3x10³ células/pocillo) durante 24 horas, y se cambió el medio por DMEN sin FBS y se pretrataron las células con 100 µM de N-acetil-l-cisteína (NAC) durante 2 horas. A continuación, se añadieron extractos etanólicos y se incubaron durante 72 h para evaluar la proliferación celular. Como control se utilizaron células T84 sin

pretratamiento con NAC. La NAC se utiliza habitualmente para identificar los inductores de ROS, ya que inhibe su producción.

3.14 Extracción de RNA de las líneas celulares

Para la obtención de RNA total de los cultivos celulares tratados se utilizó el kit de extracción de RNA Qiagen RNeasy Mini Kit combinado con la técnica de trizol cloroformo. Para ello se añadió 750 µL de Trizol a los pellets de células de cada uno de los falcon de cultivo y se almacenó a -80 °C. Al día siguiente se vortearon los eppendorf con las muestras y se homogenizaron con una jeringa de insulina (0.5x16 mm) durante 15 veces. Se incubó durante 5 min a temperatura ambiente para continuar la disociación de los complejos nucleoproteicos, como los ribosomas. A continuación, se añadió 0.2 ml de cloroformo/mL Trizol se vorteo incubó durante 15 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000g por 15 min a 4°C para obtener la fase acuosa en donde se encuentra el RNA, el cual fue recogido y sometido al protocolo de extracción Quiagen Rneasy Mini Kit. Todas las centrifugaciones a partir de este punto fueron a 4°C. A la fase acuosa que contiene el RNA se adicionó el mismo volumen de etanol al 70% y se mezcló antes de depositar en la columna. Se centrifugó a 10000 rpm por 1 min, seguidamente se descargó el sobrenadante y se lavó con 700 µL de buffer RW1 y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones anteriores. Tras esto se añadió 500 µL del segundo buffer de lavado RPE seguido de una centrifugación en las mismas condiciones anteriores. Con la finalidad de mejorar el lavado del ácido nucleico retenido en la columna se realizó una nueva centrifugación sin nada. Finalmente, la elución del

RNA se realizó con el agregado de 25 μL de agua libre de RNAsas y centrifugación en las condiciones anteriores. El RNA obtenido se cuantificó y almacenó a -80°C .

3.14.1 Cuantificación del RNA

El RNA obtenido se cuantificó espectrofotométricamente en un NanoDrop 2000 (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) a las densidades ópticas 260, 280 y 230 obteniendo sus ratios de cada una de las muestras. En todos los casos se trabajó con muestras con un ratio entre 1.8 y 2.

3.14.2 Transcriptasa reversa y reacción en cadena de la polimerasa

El RNA fue sometido a transcripción reversa utilizando el kit retro-transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) Cada tubo de reacción contenía 20 μL (**Tabla 8**).

Tabla 8. Componente y cantidades de la transcriptasa reversa

| Componente | Cantidad |
|----------------------------------|-------------------|
| MgCl ₂ , 25 mM | 4 μL |
| Buffer Transcriptasa Reversa 10X | 2 μL |
| dNTP, 10 mM | 2 μL |
| Proteína inhibidora de RNAsa | 0.5 μL |
| AMV Transcriptasa Reversa | 15 u |
| Random Primer | 0.5 μg |
| RNA total | 1 μg |
| Agua libre de Nucleasa hasta | 20 μL |

Los tubos se calentaron a 70°C durante 10 minutos para desnaturalizar el RNA, tras esto la reacción de transcriptasa reversa tuvo lugar a 37°C durante 50 min. Tras este periodo los tubos se enfriaron y guardó el cDNA a -20°C hasta su utilización.

3.14.3 Estudio de expresión de RNAm mediante q-PCR

Para la realización de la qPCR se empleó 2µl del cDNA por muestra. Se cargaron 10 µl de la master mix en una placa de 96 pocillos. La master mix contiene los primer 10x, el SYBR Green (Takara) y el agua bidestilada. Se empleó GADPH como control endógeno. Los genes amplificados, así como su temperatura de annealing se recogen en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Secuencias de cebadores utilizadas para analizar los marcadores de las CSCs

| Nombre del primer | Secuencia | Tm (°C) |
|-------------------|-----------------------|---------|
| CD24-F | CAGTAGTCTTGATGACCAAAG | 56.4 |
| CD24-R | ACAGCATTCTGGAATAAAGC | 58.4 |
| CD44-F | TTATCAGGAGACCAAGACAC | 58.6 |
| CD44-R | ATCAGCCATTCTGGAATTTG | 61.5 |
| SOX-2-F | ATAATAACAATCATCGGCGG | 61.1 |
| SOX-2-R | AAAAAGAGAGAGGCAAACCTG | 57.8 |
| NANOG-F | CTATCCATCCTTGCAAATGTC | 60.9 |
| NNAOG-R | GTTCTGGTCTTCTGTTTCTTG | 58 |
| OCT-4-F | GATCACCTGGGATATACAC | 58.1 |
| OCT-4-R | GCTTTGCATATCTCCTGAAG | 59.1 |
| GADPH-F | TGCACCACCAACTGCTTAGC | 58.3 |
| GADPH-R | GGCATGGACTGTGGTCATGAG | 58.1 |
| CD133-RT-F | CTGGGGCTGCTGTTTATTATT | 56 |
| CD133-RT-R | ACGCCTTGTCCTTGGTAGTGT | 59.5 |

Todos los cebadores están escritos en dirección 5' a 3' y agrupados por pares. F, forward primer; R, reverse primer.

La expresión de cada gen se calcula como:

$\Delta Ct = \text{valor Ct medio (ARNm de referencia)} - \text{valor Ct medio (ARNm de interés)}$

La normalización de cada muestra se realizó comparándola con la expresión del gen endógeno GADPH, correspondiendo la expresión de cada gen al valor de $2^{\Delta Ct}$.

3.15 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con IBM SPSS Statistics 26.0 y GraphPad Prism 8. Todos los datos se presentaron como el valor medio con desviación estándar (SD). Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Tras la prueba de homogeneidad de la varianza, se realizó la prueba t para comparar las diferencias entre dos grupos con igual varianza, mientras que la prueba F se utilizó para los grupos con varianza desigual. Para analizar la diferencia entre tres o más grupos se realizó un análisis de varianza ANOVA y un test de comparaciones múltiples. Los valores de significación se denotaron con (*) $p < 0,05$ significativo; (**) $p \leq 0,01$ altamente significativo, (***) $p \leq 0,001$ muy altamente significativo.

Resultados

4. Resultados

4.1 Rendimiento y actividad antioxidante

En relación con la especie *Vicia faba*, los extractos etanólicos de semillas de habas germinadas mostraron un mayor rendimiento en relación con las habas crudas ($p < 0,05$). Destacando las semillas de *V. faba* var. baraca las cuales mostraron el mayor rendimiento de extracción (132.4 ± 0.83 mg/g de harina). En relación con los hidrolizados de proteína de la familia *V. faba* las habas germinadas obtuvieron el mayor rendimiento ($p < 0,05$) especialmente la *V. faba* var cana (510.3 ± 1.40 mg/g de harina).

En relación con las leguminosas *Vicia narbonensis*, *Vicia Ervill*a y *Vicia Sativa*. El extracto etanólico de *Vicia Narbonensis* obtuvo el mayor rendimiento (101.9 ± 2.85 mg/g de harina), mientras que fue el hidrolizado proteico de *Vicia Ervill*a el de mayor rendimiento ($p < 0,05$) (385.6 ± 0.80 mg/g de harina)

Por último, el hidrolizado de proteína de *Lupinus luteus* obtuvo el mayor rendimiento (553.6 ± 1.72 mg/g de harina) en comparación con las demás legumbres ($p < 0,05$).

La actividad antioxidante se evaluó mediante diferentes ensayos como el contenido de polifenoles totales, ABTS, capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica (LPIC) y DPPH. Todos los extractos etanólicos e hidrolizados proteicos de las leguminosas, así como los extractos etanólicos de las especies *M. oleífera* y *Annona cherimola* y del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* presentaron propiedades antioxidantes como se

muestran en la **Tabla 10**. Los extractos etanólicos de las semillas de haba crudas mostraron un mayor contenido en polifenoles totales que las habas germinadas ($p < 0,05$), con la excepción de la *V. faba* var cana ($p < 0,05$). Específicamente, el extracto etanólico de *V. faba* var. aldaba mostró el mayor contenido en polifenoles ($5.00 \pm 0.14 \mu\text{g GAE}/\text{mg}$ de extracto). Por otra parte, la mayor inhibición de la peroxidación lipídica fue inducida por las habas crudas ($p < 0,05$) y específicamente por *V. faba* var. cana ($471.6 \pm 1.69 \text{ mUUA} / \text{mg}$ de extracto). Además, la prueba del DPPH mostró un resultado mayor para las habas crudas (excepto para la *V. faba* var cana) destacando la *V. faba* var. alameda ($50.0 \pm 1.23 \mu\text{M Trolox} / \text{mg}$ de extracto) ($p > 0,05$).

Con respecto al contenido de polifenoles totales de los hidrolizados proteicos, las habas germinadas mostraron mayores valores en comparación a las crudas ($p < 0,05$) con excepción de la *V. faba* var 1268 (cruda) ($35.4 \pm 2.15 \mu\text{g GAE}/\text{mg}$ de extracto). En la prueba ABTS, las habas crudas mostraron la mayor actividad ($p < 0,05$) y especialmente la *V. faba* var chipen ($5.26 \pm 0.02 \mu\text{g GAE}/\text{mg}$ de extracto).

En relación con las leguminosas *Vicia narbonensis*, *Vicia Ervill*a y *Vicia Sativa*. El extracto etanólico de *Vicia Narbonensis* mostró el valor más alto de capacidad antioxidante en el ensayo ABTS ($5.21 \pm 0.02 \mu\text{g GAE}/\text{mg}$ de extracto) ($p < 0,05$). Mientras que la mayor inhibición de la peroxidación lipídica fue inducida por el extracto etanólico de *Vicia Ervill*a ($2534.2 \pm 3.97 \text{ mUUA}/\text{mg}$ de extracto). El hidrolizado proteico de esta especie mostró el contenido más alto de polifenoles totales ($27.6 \pm 0.11 \mu\text{g}$

GAE/mg de extracto) ($p < 0,05$). Finalmente, el extracto etanólico de *Vicia Sativa* mostró el resultado más alto en la prueba DDPH ($15.06 \pm 0.57 \mu\text{M}$ Trolox/mg de extracto) en estas especies.

Por otra parte, el extracto etanólico y el hidrolizado de proteínas de *Medicago sativa* destacan por su alto rendimiento (117.9 ± 0.42 y 384.4 ± 0.64 mg/g de harina) y contenido en polifenoles (49.9 ± 2.14 y $91.8 \pm 0.82 \mu\text{g}$ GAE/ mg de extracto respectivamente) ($p < 0,05$). Además, el extracto etanólico dio el resultado más alto en la prueba de DPPH ($36.5 \pm 1.15 \mu\text{M}$ Trolox/mg de extracto) y el hidrolizado de proteínas presentó el resultado más alto para ABTS ($12.18 \pm 0.02 \mu\text{g}$ GAE/mg de extracto) en comparación con las otras legumbres ensayadas ($p < 0,05$).

En cuanto a las especies no pertenecientes a la familia de las leguminosas *M. oleífera*, *Tropaeolum tuberosum* y *Annona cherimola*. Todos los extractos etanólicos exhibieron propiedades antioxidantes, destacándose el extracto de *Annona cherimola* por mostrar el mayor rendimiento (131.7 ± 0.47 mg/g de harina), contenido en polifenoles ($27.7 \pm 1.03 \mu\text{g}$ GAE/ mg de extracto) y ABTS ($2.50 \pm 0.21 \mu\text{g}$ GAE/ mg de extracto) ($p < 0,05$).

Tabla 10. Rendimiento de extracción, contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante de los extractos funcionales ensayados.

| | Tipo de extracto | Rendimiento (mg/g harina) | Polifenoles totales (µg GAE/mg extracto) | LPIC (mUUA/mg extracto) | DPPH (µM Trolox/mg de extracto) | ABTS (µg GAE/mg extracto) |
|--|-------------------------|----------------------------------|---|--------------------------------|--|----------------------------------|
| <i>V. faba</i> var <i>chipen</i> cruda | EE | 87.0 ± 1.07 ^c | 3.54 ± 0.10 ^{**b} | 379.1 ± 2.15 ^{***e} | 49.8 ± 0.13 ^{***f} | |
| | HP | 384.5 ± 1.89 ^c | 34.9 ± 0.07 ^{***d} | | | 5.26 ± 0.02 ^{***i} |
| germinada | EE | 89.5 ± 0.45 ^{*c,d} | 2.73 ± 0.22 ^a | 324.3 ± 5.35 ^d | 19.5 ± 0.32 ^b | |
| | HP | 478.9 ± 0.61 ^{***g} | 23.5 ± 0.14 ^b | | | 3.62 ± 0.04 ^g |
| <i>V. faba</i> var <i>aldaba</i> cruda | EE | 77.8 ± 0.61 ^a | 5.00 ± 0.14 ^{***e} | 317.6 ± 2.07 ^{***d} | 44.9 ± 1.10 ^{***e} | |
| | HP | 427.3 ± 2.95 ^e | 28.9 ± 0.33 ^{***c} | | | 3.76 ± 0.07 ^{***h} |
| germinada | EE | 95.7 ± 1.01 ^{***d} | 3.64 ± 0.04 ^{b,c} | 122.5 ± 4.16 ^a | 28.6 ± 0.21 ^d | |
| | HP | 477.5 ± 0.87 ^{***g} | 22.5 ± 0.11 ^b | | | 2.61 ± 0.03 ^f |
| <i>V. faba</i> var <i>alameda</i> cruda | EE | 66.4 ± 1.28 ^b | 4.05 ± 0.13 ^d | 390.9 ± 5.59 ^f | 50.0 ± 1.23 ^f | |
| | HP | 351.9 ± 2.72 ^b | 18.68 ± 0.17 ^a | | | 0.61 ± 0.01 ^a |
| <i>V. faba</i> var 1268 cruda | EE | 75.4 ± 2.16 ^b | 3.94 ± 0.25 ^{c,d} | 462.9 ± 1.43 ^g | 24.5 ± 0.73 ^c | |
| | HP | 334.2 ± 1.97 ^a | 35.4 ± 2.15 ^d | | | 1.64 ± 0.07 ^d |
| <i>V. faba</i> var <i>cana</i> cruda | EE | 71.4 ± 3.28 ^{a,b} | 3.49 ± 0.06 ^b | 471.6 ± 1.69 ^{***g} | 44.1 ± 0.63 ^e | |
| | HP | 413.3 ± 0.59 ^d | 18.09 ± 0.02 ^a | | | 1.02 ± 0.03 ^c |
| germinada | EE | 110.3 ± 2.02 ^e | 3.82 ± 0.04 ^{**b,c,d} | 222.8 ± 2.54 ^c | 48.6 ± 0.30 ^{***f} | |
| | HP | 510.3 ± 1.40 ^{***h} | 20.77 ± 0.03 ^{***ab} | | | 1.87 ± 0.03 ^{***e} |

| | | | | | | |
|----------------------------------|----|------------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <i>V. faba</i> var <i>baraca</i> | | | | | | |
| germinada | EE | 132.4 ± 0.83 ^{***f} | 2.39 ± 0.04 ^a | 157.7 ± 5.03 ^b | 9.99 ± 0.79 ^a | |
| | HP | 455.2 ± 0.90 ^f | 31.6 ± 0.02 ^c | | | 0.91 ± 0.00 ^b |
| <i>Lupinus luteus</i> | EE | 108.3 ± 1.24 ^c | 4.35 ± 0.20 ^a | 1391.6 ± 4.95 ^b | 3.65 ± 0.30 ^a | |
| | HP | 553.6 ± 1.72 ^d | 13.8 ± 0.12 ^a | | | 2.90 ± 0.01 ^b |
| <i>Vicia narbonensis</i> | EE | 101.9 ± 2.85 ^{b,c} | 4.97 ± 0.09 ^a | 1290.3 ± 5.48 ^a | 3.07 ± 0.69 ^a | |
| | HP | 262.1 ± 4.03 ^a | 24.1 ± 0.02 ^b | | | 5.21 ± 0.06 ^d |
| <i>Medicago sativa</i> | EE | 117.9 ± 0.42 ^d | 49.9 ± 2.14 ^c | 2164.2 ± 3.67 ^c | 36.5 ± 1.15 ^d | |
| | HP | 384.4 ± 0.64 ^c | 91.8 ± 0.82 ^e | | | 12.18 ± 0.02 ^e |
| <i>Vicia ervilia</i> | EE | 98,4 ± 2,87 ^b | 5.93 ± 0.09 ^a | 2534.2 ± 3.97 ^e | 8.93 ± 0.05 ^b | |
| | HP | 385.6 ± 0.80 ^c | 27.6 ± 0.11 ^d | | | 2.51 ± 0.02 ^a |
| <i>Vicia sativa</i> | EE | 90.0 ± 0.04 ^a | 9.12 ± 0.19 ^e | 2190.1 ± 3.12 ^d | 15.06 ± 0.57 ^c | |
| | HP | 365.8 ± 1.07 ^b | 26.35 ± 0.06 ^c | | | 3.57 ± 0.01 ^c |
| <i>Moringa oleifera</i> | EE | 170.1 ± 0.57 ^b | 9.71 ± 1.78 ^a | | | 1.68 ± 0.18 ^a |
| <i>Tropaeolum tuberosum</i> | EE | 280.6 ± 1.79 ^c | 18.27 ± 0.83 ^b | | | 2.18 ± 0.25 ^b |
| <i>Annona cherimola</i> | EE | 131,7 ± 0,47 ^a | 27,7 ± 1,03 ^c | | | 2,50 ± 0,21 ^b |

Los datos se presentan como media ± SD con experimentos realizados por triplicado. EE: Extracto etanólico. HP: Hidrolizado proteico. GAE: equivalente de ácido gálico. LPIC: Capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica. El análisis de Anova y la prueba HSD Tukey se indican mediante superíndice. Los valores de a, b y c corresponden a los grupos de los subconjuntos homogéneos. Las medias dentro de una columna con diferentes superíndices son significativamente diferentes (P<0.05).

4.2 Actividad antioxidante en cultivos celulares

La influencia de las especies de leguminosas, así como las especies *M. oleífera*, *Tropaeolum tuberosum* y *Annona cherimola* sobre la capacidad antioxidante en un modelo de cultivo celular con la línea HT29 sometida a estrés oxidativo utilizando generadores de radicales libres (H_2O_2 y Paraquat) se muestra en la **Tabla 11**. Los extractos etanólicos e hidrolizados proteicos de las variedades de *Vicia faba* mostraron una gran capacidad antioxidante frente al estrés oxidativo, destacando los extractos de *V. faba* var chipen (crudo) y *V. faba* var baraca (germinado).

En relación con las especies *Vicia narbonensis*, *Vicia ervilia* y *Vicia sativa*, el extracto etanólico y el hidrolizado proteico de *Vicia sativa* mostraron la mayor capacidad antioxidante. Por su parte, *Medicago sativa*, tanto el extracto etanólico como el hidrolizado proteico, mostró una alta capacidad antioxidante, lo cual no se observó en el caso de *Lupinus luteus*, cuya capacidad antioxidante fue moderada.

En relación con *Moringa oleífera*, *Tropaeolum tuberosum* y *Annona cherimola*, destaca el extracto etanólico de *Annona cherimola* por presentar la mayor actividad antioxidante ($p < 0.05$).

Tabla 11. Resultados de la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos y de los hidrolizados proteicos en las células HT29.

| | | Actividad antioxidante <i>in vitro</i> (mUAA/mg) | |
|---------------------------|-------|---|------------------------------|
| | | 2,5 mM | 3 mM |
| <i>V. faba</i> var chipen | cruda | EE | 482.4 ± 1.19 ^{***h} |
| | | HP | 551.9 ± 1.09 ^{***i} |
| | | | 302.9 ± 1.77 ^f |
| germinada | EE | 253.0 ± 1.22 ^f | 268.1 ± 1.52 ^f |

| | | | |
|-----------------------------------|----|--|--|
| | HP | | 219.3 ± 1.16 ^c |
| <i>V. faba</i> var <i>aldaba</i> | | | |
| cruda | EE | 200.1 ± 1.12 ^d | 224.2 ± 1.92 ^d |
| | HP | | 143.0 ± 1.76 ^b |
| germinada | EE | 19.38 ± 0.91 ^a | 32.61 ± 1.62 ^a |
| | HP | | 130.3 ± 2.18 ^a |
| <i>V. faba</i> var <i>alameda</i> | | | |
| cruda | EE | 242.5 ± 1.23 ^e | 233.3 ± 1.49 ^e |
| | HP | | 283.8 ± 0.63 ^e |
| <i>V. faba</i> var <i>1268</i> | | | |
| cruda | EE | 265.4 ± 1.47 ^g | 324.2 ± 0.99 ^g |
| | HP | | 284.3 ± 1.54 ^e |
| <i>V. faba</i> var <i>cana</i> | | | |
| cruda | EE | 117.9 ± 1.33 ^b | 105.88 ± 1.01 ^c |
| | HP | | 267.7 ± 1.73 ^d |
| germinada | EE | 129.9 ± 1.09 ^c | 95.8 ± 1.08 ^b |
| | HP | | 309.12 ± 1.89 ^g |
| <i>V. faba</i> var <i>baraca</i> | | | |
| germinada | EE | 492.3 ± 1.26 ^{***i} | 491.2 ± 2.07 ^h |
| | HP | | 368.9 ± 1.91 ^h |
| <i>Lupinus luteus</i> | EE | 3.84 ± 0.29 ^A | 5.08 ± 0.14 ^A |
| | HP | | 273.2 ± 1.42 ^B |
| <i>Vicia narbonensis</i> | EE | 6.02 ± 0.67 ^B | 7.93 ± 0.87 ^B |
| | HP | | 301.4 ± 1.51 ^C |
| <i>Medicago sativa</i> | EE | 507.7 ± 2.18 ^{***E} | 474.8 ± 1.37 ^{***D} |
| | HP | | 616.2 ± 1.58 ^{***E} |
| <i>Vicia ervilia</i> | EE | 90.9 ± 0.93 ^D | 82.2 ± 0.51 ^C |
| | HP | | 236.7 ± 1.98 ^A |
| <i>Vicia sativa</i> | EE | 86.5 ± 1.02 ^C | 104.1 ± 2.1 ^D |
| | HP | | 437.2 ± 1.61 ^D |
| <i>Moringa oleifera</i> | EE | 20.9 x 10 ³ ± 1.33 ^b | 24.9 x 10 ³ ± 2.11 ^b |
| <i>Tropaeolum tuberosum</i> | EE | 18.8 x 10 ³ ± 2.45 ^a | 20.3 x 10 ³ ± 2.17 ^a |
| <i>Annona cherimola</i> | EE | 41.6 x 10 ³ ± 3.68 ^c | 47.6 x 10 ³ ± 1.52 ^c |

Los datos se presentan como media ± SD de los experimentos realizados por triplicado. EE: Extracto etanólico. HP: Hidrolizado proteico. Unidades de Actividad (AAU), que se define como el valor de 10 unidades porcentuales (10%) de recuperación de la viabilidad celular con respecto al control correspondiente tratado con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) para los extractos etanólicos y Paraquat en el caso de los hidrolizados proteicos. El análisis de Anova y la prueba HSD Tukey se indican mediante superíndice. Los valores de a, b y c corresponden a los grupos de los subconjuntos homogéneos. Las medias dentro de una columna con diferentes superíndices son significativamente diferentes (P<0.05).

4.3 Análisis de espectrometría de masas

Se realizó un análisis por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS) para evaluar la presencia de compuestos bioactivos presentes en los diferentes

extractos etanólicos. Los cromatogramas de los extractos y compuestos validados se presentan en la **Tabla 12-20**. Los compuestos tentativos identificados mostraron actividad antioxidante y antitumoral, fueron polares y correspondieron a metabolitos secundarios de plantas como compuestos fenólicos, terpenoides, glucósidos, saponinas y policétidos. Dentro del grupo de compuestos fenólicos, destacaron los flavonoides (flavonas, flavanonas y flavanoles), los ácidos fenólicos y los fenilpropanoides. Además, identificamos acetogeninas, una clase de policétidos pertenecientes a la familia Annonaceae, en el extracto etanólico de *Annona cherimola*.

Tabla 12. Identificación de compuestos bioactivos en el extracto etanólico de *Vicia Faba*

| Compuesto y actividad | MF | [M-H]- | TR | PPM | % Conf | Fragmentos de MS | | | Ref. |
|---------------------------------|---|-----------|-------|------|--------|------------------|-----------|-----------|-------------------------|
| Oligosacárido | | | | | | | | | |
| Verbascose** | C ₃₀ H ₅₂ O ₂₆ | 827.2630 | 1.242 | -4.7 | 94.61 | 827.2673 | 665.2070 | 545.1785 | (Olsson et al., 2004) |
| Flavonoide | | | | | | | | | |
| Kaempferol-3-O-rutinósido** | C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅ | 593.1503 | 2.818 | -0.5 | 99.59 | 594.1541 | 593.1519 | 503.1219 | (Wang et al., 2018) |
| Rutina** | C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ | 609.1454 | 3.145 | -0.3 | 97.61 | 610.1494 | 609.1451 | 463.0874 | (Enogieru et al., 2018) |
| Terpenoide | | | | | | | | | |
| Hidrangenósido A dimetil acetal | C ₃₃ H ₄₆ O ₁₄ | 665.2783 | 4.341 | -3.9 | 95.15 | 518.2524 | 503.2521 | 450.1393 | (Sakai et al., 2007) |
| Soyasaponina I* | C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈ | 941.5090 | 7.654 | -2.1 | 99.03 | 942.5137 | 941.5098 | 923.5037 | (Wu et al., 2001) |
| Sojaasaponina VI | C ₅₄ H ₈₄ O ₂₁ | 1067.5426 | 8.531 | -0.1 | 99.99 | 1068.5446 | 1067.5415 | 1050.5358 | (Ruiz et al., 1996) |

MF: fórmula molecular; [M-H]-: masa; TR: tiempo de retención; PPM: error; % Conf: porcentaje de fiabilidad. *actividad antitumoral; ** actividad antioxidante

Tabla 13. Identificación de compuestos bioactivos en el extracto etanólico de *Vicia Narbonensis*

| Compuesto y actividad | MF | [M-H]- | TR | PPM | % Conf | Fragmentos de MS | | | Ref. |
|------------------------------|---|---------------|-----------|------------|---------------|-------------------------|----------|----------|------------------------|
| Ácidos fenólicos | | | | | | | | | |
| Ácido 3-p-cumarolquínico* | C ₁₆ H ₁₈ O ₈ | 337.0933 | 3.548 | 3.0 | 99.99 | 207.0589 | 202.0058 | 173.0123 | (Sharma et al., 2018) |
| Flavonoides | | | | | | | | | |
| Quercetina 3-O-sophoroside** | C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇ | 625.1395 | 3.897 | -1.6 | 99.94 | 393.1153 | 259.0491 | 241.0176 | (Plumb et al., 1997) |
| Glucósidos | | | | | | | | | |
| Rutinósido antiarol** | C ₂₁ H ₃₂ O ₁₃ | 491.1765 | 4.174 | -4.5 | 99.96 | 393.1188 | 250.0547 | 225.0697 | (Thai et al., 2017) |
| Terpenoides | | | | | | | | | |
| Ardisiacrispin A** | C ₅₂ H ₈₄ O ₂₂ | 1059.5383 | 4.174 | 0.7 | 99.76 | 712.2795 | 699.2693 | 653.2561 | (Mbaveng et al., 2018) |
| Esteviobósido** | C ₃₂ H ₅₀ O ₁₃ | 641.3171 | 8.195 | -0.3 | 99.97 | 592.2615 | 570.2758 | 555.2863 | (Chen et al., 2016) |

MF: fórmula molecular; [M-H]-: masa; TR: tiempo de retención; PPM: error; % Conf: porcentaje de fiabilidad. *actividad antitumoral; ** actividad antioxidante

Tabla 14. Identificación de compuestos bioactivos en el extracto etanólico de *Vicia ervilia*

| Compuesto y actividad | MF | [M-H]- | TR | PPM | % Conf | Fragmentos de MS | | | Ref. |
|-------------------------|---|----------|-------|-------|--------|------------------|----------|----------|---------------------------|
| Flavonoides | | | | | | | | | |
| Millettocalyxin C ** | C ₁₉ H ₁₄ O ₅ | 321.0729 | 1.552 | -10.6 | 99.73 | 321.0717 | 303.0634 | 191.0187 | (Sritularak et al., 2002) |
| Cinarósido A** | C ₂₁ H ₃₂ O ₁₀ | 443.1917 | 2.119 | -2.9 | 99.98 | 443.1910 | 405.1750 | 403.1587 | (Zou et al., 2018) |
| Gossypin* | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃ | 479.0826 | 2.930 | 1.3 | 100.00 | 449.1114 | 318.0302 | 317.0297 | (Cinar, 2020) |
| Complanatoside A** | C ₂₇ H ₃₀ O ₁₈ | 641.1346 | 2.930 | -1.2 | 96.61 | 641.1355 | 625.1400 | 611.1237 | (Fan et al., 2017) |
| Carlinoside** | C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅ | 579.1358 | 3.584 | 1.4 | 99.99 | 580.1387 | 579.1359 | 479.0840 | (Das et al., 2018) |
| Apiina** | C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄ | 563.1401 | 3.964 | 0.0 | 99.97 | 564.1418 | 563.1396 | 549.1688 | (P. Li et al., 2014) |
| Terpenoides | | | | | | | | | |
| Citrifolinoside** | C ₂₈ H ₃₀ O ₁₅ | 606.1512 | 4.467 | 1.0 | 100.00 | 606.1534 | 605.1512 | 564.1454 | (Sang et al., 2002) |

MF: fórmula molecular; [M-H]-: masa; TR: tiempo de retención; PPM: error; % Conf: porcentaje de fiabilidad. *actividad antitumoral; ** actividad antioxidante

Tabla 15. Identificación de compuestos bioactivos en el extracto etanólico de *Vicia sativa*

| Compuesto y actividad | MF | [M-H]- | TR | PPM | % Conf | Fragmentos de MS | | | Ref. |
|---------------------------------|---|---------------|-----------|------------|---------------|-------------------------|----------|----------|-------------------------------|
| Glucósidos | | | | | | | | | |
| Primulaverin** | C ₂₀ H ₂₈ O ₁₃ | 475.1460 | 1.817 | 1.7 | 98.17 | 253.0988 | 207.0555 | 173.0099 | (Müller et al., 2006) |
| Primeverin** | C ₂₀ H ₂₈ O ₁₃ | 475.1452 | 2.094 | 1.1 | 100.0 | 253.0990 | 239.0822 | 207.0557 | (Müller et al., 2006) |
| Picroside I | C ₂₄ H ₂₈ O ₁₁ | 491.1524 | 2.969 | -5.9 | 95.64 | 236.0337 | 233.0958 | 231.0570 | (Dong et al., 2021) |
| Lactonas fenólicas | | | | | | | | | |
| Leucodrina** | C ₁₅ H ₁₆ O ₈ | 323.0783 | 2.235 | 5.0 | 85.12 | 253.0990 | 239.0822 | 173.0104 | (Kesinger and Stevens, 2009) |
| Derivados de salicilatos | | | | | | | | | |
| Gaultherin** | C ₁₉ H ₆₂ O ₁₂ | 445.1393 | 2.969 | 10.6 | 87.00 | 263.1105 | 249.0938 | 207.0549 | (Katanić et al., 2018) |
| Proantocianidina | | | | | | | | | |
| Procianidina B2* | C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂ | 577.1372 | 2.969 | 4.5 | 92.44 | 237.0754 | 231.0570 | 221.0717 | (Núñez-iglesias et al., 2021) |

MF: fórmula molecular; [M-H]-: masa; TR: tiempo de retención; PPM: error; % Conf: porcentaje de fiabilidad. *actividad antitumoral; ** actividad antioxidante

Tabla 16. Identificación de compuestos bioactivos en el extracto etanólico de *Medicago sativa*

| Compuesto y actividad | MF | [M-H]- | TR | PPM | % Conf | Fragmentos de MS | | | Ref. |
|------------------------------|---|---------------|-----------|------------|---------------|-------------------------|----------|----------|----------------------------|
| Glucósidos | | | | | | | | | |
| Dactilorina E** | C ₂₇ H ₄₀ O ₁₆ | 619.2238 | 2.078 | -6.9 | 98.36 | 590.2597 | 393.1171 | 309.1172 | (X. Wang et al., 2020) |
| Flavonoides | | | | | | | | | |
| Apigenina 7-O-diglucuronida* | C ₂₇ H ₂₆ O ₁₇ | 621.1092 | 3.373 | -0.3 | 99.96 | 393.1107 | 241.0200 | 225.0641 | (Meng et al., 2009) |
| Naringina* | C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄ | 579.1758 | 4.699 | 7.6 | 98.71 | 393.1141 | 241.0203 | 235.0361 | (Y. S. Zhang et al., 2018) |
| Isoquercetina* | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂ | 463.0859 | 4.490 | -3.9 | 95.54 | 393.1187 | 241.0153 | 173.0124 | (Chen et al., 2016) |
| Antocianina | | | | | | | | | |
| Salvianina** | C ₄₂ H ₃₈ O ₂₄ | 925.1698 | 3.616 | 2.5 | 99.65 | 393.1206 | 253.1007 | 241.0159 | (Nakayama et al., 2003) |
| Xanthone | | | | | | | | | |
| Sibiricaxanthone B** | C ₂₄ H ₂₆ O ₁₄ | 537.1254 | 4.315 | 1.9 | 96.82 | 393.1208 | 239.0843 | 235.0320 | (Ramli et al., 2021) |
| Terpenoides | | | | | | | | | |
| Bruceósido A* | C ₃₂ H ₄₂ O ₁₆ | 681.2114 | 4.135 | 2.8 | 98.39 | 668.2753 | 637.2905 | 622.2701 | (Y. Xu et al., 2019) |
| clethroidoside B | C ₄₉ H ₈₀ O ₂₀ | 987.5170 | 8.160 | 0.5 | 99.99 | 866.4643 | 590.2614 | 555.2853 | (S.-L. Zhang et al., 2018) |

MF: fórmula molecular; [M-H]-: masa; TR: tiempo de retención; PPM: error; % Conf: porcentaje de fiabilidad; *actividad antitumoral; ** actividad antioxidante

Tabla 17. Identificación de compuestos bioactivos en el extracto etanólico de *Lupinus luteus*

| Compuesto | MF | [M-H]- | TR | PPM | % Conf | Fragmentos de MS | | | Ref. |
|----------------------------------|---|---------------|-----------|------------|-------------------|-------------------------|----------|----------|----------------------------------|
| Flavonoides | | | | | | | | | |
| Vaccarin** | C ₃₂ H ₃₈ O ₁₉ | 725.1935 | 3.475 | 0.8 | 99.93 | 648.2111 | 253.0977 | 239.0824 | (F. Xu et al., 2019) |
| Kaempferitrin* | C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄ | 577.1564 | 4.246 | 1.2 | 99.81 | 253.0989 | 221.0741 | 197.0269 | (Govindarasu et al., 2021) |
| Myricomplanoside** | C ₂₂ H ₂₂ O ₁₃ | 493.0982 | 5.537 | -2.6 | 99.75 | 253.1001 | 221.0708 | 197.0281 | (Hu et al., 2017) |
| Syringetin-3-glucoside** | C ₂₃ H ₂₄ O ₁₃ | 507.1130 | 5.537 | -1.8 | 100.00 | 239.0833 | 225.0663 | 173.0103 | (Becker Pertuzatti et al., 2021) |
| Glucósidos | | | | | | | | | |
| Hidrangenósido A dimetil acetal* | C ₃₃ H ₄₆ O ₁₄ | 665.2844 | 5.154 | 5.3 | 97.04 | 618.2738 | 613.2400 | 593.2565 | (Sakai et al., 2007) |

MF: fórmula molecular; [M-H]-: masa; TR: tiempo de retención; PPM: error; % Conf: porcentaje de fiabilidad. *actividad antitumoral; ** actividad antioxidante

Tabla 18. Identificación de compuestos bioactivos en el extracto etanólico de *Moringa oleifera*

| Compuesto y actividad | MF | [M-H]- | TR | PPM | % Conf | Fragmentos de MS | | | Ref. |
|--|---|----------|-----------|------|-----------|------------------|--------------|--------------|-------------------------|
| Fenilpropanoides | | | | | | | | | |
| Ácido 3-O-cafeoil-5-O-malonilquínico** | C ₁₉ H ₂₀ O ₁₂ | 439.0857 | 0.961 | -4.6 | 98.11 | 293.060 2 | 239.085 5 | 226.986 8 | (Henc et al., 2017) |
| Ácidos fenólicos | | | | | | | | | |
| Ácido secalónico D* | C ₃₂ H ₃₀ O ₁₄ | 637.1563 | 4.24 9 | 0.9 | 99.73 | 370.1013 | 324.0951 | 272.1134 | (H. Zhang et al., 2019) |
| Flavonoides | | | | | | | | | |
| Vicenin-2* | C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅ | 593.1526 | 3.617 | 3.4 | 87.31 | 173.0702 | 172.0379 | 167.0394 | (Baruah et al., 2018) |
| Vitexina* | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀ | 431.0996 | 4.28 3 | 4.2 | 99.9 9 | 324.1230 | 243.034 0 | 198.009 4 | (X. Liu et al., 2019) |
| Isovitexina* | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀ | 431.1013 | 4.24 9 | 8.1 | 99.9 3 | 241.0167 | 225.0247 | 209.026 4 | (Cao et al., 2019) |
| Isorhamnetina 3-glucósido* | C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂ | 477.101 | 4.94 8 | -4.8 | 83.37 | 324.1212 | 243.029 8 | 239.088 5 | (Q. Wu et al., 2018) |
| Pancibiflavonol* | C ₃₀ H ₂₀ O ₁₂ | 571.0916 | 0.99 5 | 6.8 | 77.3 | 370.1054 | 348.097 9 | 328.0919 | (Gupta and Gupta, 2020) |
| Abiesinol A* | C ₃₀ H ₂₂ O ₁₂ | 573.1038 | 1.66 | 0.9 | 99.79 | 294.0162 | 255.0672 | 189.0529 | (Ren et al., 2019) |
| Calistefina* | C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀ | 432.102 | 4.24 9 | -8.3 | 87.12 | 402.086 9 | 393.1151 | 363.0781 | (Zhao et al., 2019) |
| Dihidrokaempferol* | C ₁₅ H ₁₂ O ₆ | 287.0556 | 5.473 | 3.8 | 99.97 | 221.0791 | 207.060 0 | 201.0170 | (Y. Zhang et al., 2018) |
| Glucósidos | | | | | | | | | |
| Difilina* | C ₂₁ H ₁₆ O ₇ | 379.0818 | 0.92 7 | -5.8 | 99.8 2 | 380.095 9 | 226.058 3 | 216.0362 | (Chen et al., 2018) |

| | | | | | | | | | |
|-------------------------|---|----------|-----------|------|-----------|--------------|--------------|----------|---------------------------|
| Forsythoside E* | C ₂₀ H ₃₀ O ₁₂ | 461.1708 | 3.40 9 | 10.6 | 99.77 | 461.1745 | 339.1331 | 338.1213 | (Bao et al., 2017) |
| Neesiinósido B** | C ₃₃ H ₃₆ O ₁₇ | 703.1874 | 0.82 | -0.4 | 98.5 8 | 539.1399 | 456.1078 | 455.1072 | (Sridhar et al., 2015) |
| Cleistanthin B* | C ₂₇ H ₂₆ O ₁₂ | 541.1322 | 0.82 | -4.4 | 93.55 | 457.1229 | 456.1078 | 455.1072 | (Thummar et al., 2016) |
| Sesquiterpenoide | | | | | | | | | |
| Artemisinina* | C ₁₅ H ₂₂ O ₁₅ | 441.0872 | 0.92 7 | -1.8 | 97.52 | 225.066 4 | 222.082 2 | 221.0739 | (Waseem et al., 2018) |

MF: fórmula molecular; [M-H]-: masa; TR: tiempo de retención; PPM: error; % Conf: porcentaje de fiabilidad.

*actividad antitumoral; ** actividad antioxidante

Tabla 19. Identificación de compuestos bioactivos en el extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum*

| Compuesto y actividad | MF | [M-H]- | TR | PPM | % Conf | Fragmentos de MS | | | Ref. |
|---|---|----------|-------|-------|--------|------------------|----------|----------|-------------------------|
| Fenilpropanoides | | | | | | | | | |
| Ácido 3-O- cafeoil-5-O- malonilquínico* | C ₁₉ H ₂₀ O ₁₂ | 439.0831 | 0.927 | -10.5 | 88.65 | 395.1028 | 377.0927 | 323.0671 | (Henc et al., 2017) |
| Flavonoides | | | | | | | | | |
| Galocatequina** | C ₁₅ H ₁₄ O ₇ | 305.0678 | 2.776 | 5.6 | 99.89 | 275.0494 | 254.0492 | 248.0617 | (G. J. Du et al., 2012) |
| Rutina* | C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ | 609.1439 | 4.106 | -2.8 | 99.31 | 432.0998 | 339.1267 | 293.0536 | (Iriti et al., 2017) |
| Cynarotrioside | C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀ | 755.205 | 4.699 | 2 | 85.99 | 432.0785 | 392.1186 | 327.1155 | (Olatunde et al., 2021) |
| Glucósido | | | | | | | | | |
| Sasanquín** | C ₂₁ H ₃₀ O ₁₁ | 457.1719 | 5.121 | 2 | 100 | 368.1500 | 338.1278 | 295.1510 | (Dong et al., 2017) |
| Kelampayoside A* | C ₂₀ H ₃₀ O ₁₃ | 477.1619 | 3.582 | 2.3 | 99.97 | 392.1106 | 338.1295 | 324.114 | (J. Wang et al., 2020) |
| Zizybeoside II** | C ₂₅ H ₃₈ O ₁₆ | 593.2072 | 2.674 | -1.7 | 99.21 | 338.1290 | 324.1156 | 281.0872 | (B. Li et al., 2014) |
| Mangliesida B* | C ₂₀ H ₂₈ O ₁₁ | 433.1587 | 4.699 | 7.7 | 99.7 | 392.1186 | 339.1281 | 327.1155 | (Van Kiem et al., 2008) |
| Sesquiterpenoide | | | | | | | | | |
| Glucozaluzanina C* | C ₂₁ H ₂₈ O ₈ | 407.1734 | 2.602 | 6.9 | 99.58 | 338.1290 | 324.1156 | 292.1751 | (Surowiak et al., 2021) |
| Terpenos | | | | | | | | | |
| Plantarenalósido* | C ₁₆ H ₂₄ O ₉ | 359.1368 | 3.582 | 7.2 | 88.72 | 324.1114 | 267.1150 | 265.0703 | (Rana et al., 2014) |

| | | | | | | | | | |
|------------------------|--|----------|--------|------|-------|----------|----------|----------|-------------------------|
| Triterpenoides | | | | | | | | | |
| Ácido ganodérico H* | C ₃₂ H ₄₄ O ₉ | 571.2888 | 14.909 | -3.3 | 94.6 | 556.2717 | 339.1367 | 338.1315 | (Gill et al., 2016) |
| Policétido | | | | | | | | | |
| Anfibinina B* | C ₂₅ H ₄₂ O ₇ | 453.2831 | 11.831 | -4.6 | 89.62 | 354.2745 | 345.2077 | 313.2462 | (Nuzzo et al., 2019) |

MF: fórmula molecular; [M-H]-: masa; TR: tiempo de retención; PPM: error; % Conf: porcentaje de fiabilidad.

*actividad antitumoral; ** actividad antioxidante

Tabla 20. Identificación de compuestos bioactivos en el extracto etanólico de *Annona cherimola*

| Compuesto y actividad | MF | [M-H]- | TR | PPM | % Conf | Fragmentos de MS | | | Ref. |
|---|---|----------|--------|------|--------|------------------|----------|----------|----------------------------|
| Fenilpropanoides | | | | | | | | | |
| Ácido 3-O-cafeoil-5-O-malonilquínico* | C ₁₉ H ₂₀ O ₁₂ | 439.0877 | 0.926 | -6.1 | 88.6 | 395.1389 | 395.0916 | 380.1014 | (Henc et al., 2017) |
| Flavonoides | | | | | | | | | |
| Procianidina B1* | C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂ | 577.1326 | 3.199 | -3.5 | 83.66 | 255.0349 | 241.0181 | 207.0597 | (Raphaelli et al., 2021) |
| Procianidina B2* | C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂ | 577.1331 | 3.231 | -2.6 | 99.74 | 221.0785 | 212.0748 | 209.0731 | (Y. Li et al., 2021) |
| Quercetina-3-O- α -L-ramnopyranosil-(16)- $\rightarrow\beta$ -D-galactopyranosido* | C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ | 609.143 | 4.173 | -2.6 | 96.72 | 432.0931 | 311.1356 | 302.0753 | (Viet Thanh et al., 2019) |
| Rutina* | C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ | 609.1475 | 4.139 | 3.1 | 96.28 | 326.1186 | 313.1008 | 311.1356 | (Caparica et al., 2020) |
| Triterpenoides | | | | | | | | | |
| Salannin* | C ₃₄ H ₄₄ O ₉ | 595.2877 | 13.788 | -5 | 91.87 | 339.1322 | 327.1168 | 324.1174 | (Zhu et al., 2018) |
| Lineariifolianoide A* | C ₃₄ H ₄₂ O ₉ | 593.2732 | 12.006 | -3.2 | 89.53 | 415.2292 | 339.1310 | 327.1133 | (Qin et al., 2016) |
| Trichagmalina D* | C ₃₆ H ₄₄ O ₁₃ | 683.2697 | 5.82 | -1 | 98.9 | 645.2592 | 636.2661 | 629.3030 | (Q. Zhang et al., 2011) |
| Terpeno | | | | | | | | | |
| Ácido dulcioico** | C ₇ H ₁₂ O ₈ | 223.0455 | 0.926 | 0.4 | 93.79 | 207.0594 | 187.0321 | 181.0741 | (Fan et al., 2016) |
| Acetogeninas | | | | | | | | | |
| Annohexocina* | C ₃₅ H ₆₄ O ₉ | 627.4454 | 13.788 | -2.9 | 86.42 | 389.2912 | 339.1435 | 315.2602 | (Antony and Vijayan, 2016) |
| Annopentocina A* | C ₃₅ H ₆₄ O ₈ | 611.4494 | 13.613 | -4.7 | 83.66 | 321.1305 | 301.2411 | 287.2318 | (Rady et al., 2018) |

| | | | | | | | | | |
|------------------------------|---|----------|--------|-------|-------|----------|----------|----------|---------------------------------|
| (2,4-cis)- isoannonacina* | C ₃₅ H ₆₄ O ₇ | 595.4561 | 15.012 | -2.2 | 89.62 | 499.3634 | 411.2801 | 382.2663 | (Moghadamtousi et al., 2015) |
| Annocatalin* | C ₃₅ H ₆₄ O ₇ | 595.4561 | 15.012 | -2.2 | 89.62 | 417.3553 | 413.3029 | 411.2801 | (Rady et al., 2018) |
| Glucósidos | | | | | | | | | |
| Difilina* | C ₂₁ H ₁₆ O ₇ | 379.0779 | 0.926 | -10.3 | 88.9 | 335.0846 | 293.0541 | 216.0387 | (Chen et al., 2018) |
| Saponinas | | | | | | | | | |
| Filiasparósido C* | C ₄₄ H ₇₂ O ₁₆ | 855.4698 | 7.252 | -5.1 | 99.96 | 639.3006 | 637.2774 | 617.2721 | (J. J. Wu et al., 2010) |

MF: fórmula molecular; [M-H]-: masa; TR: tiempo de retención; PPM: error; % Conf: porcentaje de fiabilidad.

*actividad antitumoral **; actividad antioxidante

4.4 Efectos de los extractos etanólicos sobre la actividad enzimática desintoxicante

La acción quimiopreventiva de los extractos etanólicos se evaluó en función de la capacidad de inducción de las enzimas desintoxicantes GST y QR en la línea celular HT-29. Para inducir la actividad de estas enzimas desintoxicantes, las células HT-29 fueron expuestas a dosis no citotóxicas de los extractos etanólicos e hidrolizados proteicos de leguminosas, así como los extractos etanólicos de las especies de *Moringa oleifera*, *Tropaeolum tuberosum* y *Annona cherimola*. Como se muestra en la **Tabla 21**, tanto el extracto etanólico como el hidrolizado proteico de las semillas de leguminosas indujeron la actividad de las enzimas GST y QR. Específicamente, se observó que el extracto etanólico e hidrolizado proteico de *V. faba* var baraca (germinada), *V. narbonensis* y *M. sativa* inducían la actividad de estas enzimas siendo esta inducción mayor en los hidrolizados proteicos. De estas leguminosas el extracto etanólico e hidrolizado proteico de *M. sativa* destaca por su particularidad de inducir mayor actividad de estas enzimas en comparación con las otras especies y el control positivo (sulforafano) ($p < 0.05$). En relación con las otras especies cabe destacar que de igual forma todos los extractos indujeron la actividad de ambas enzimas en mayor magnitud en comparación con el control positivo (sulforafano). El extracto de *Moringa oleifera* mostró la mayor capacidad para inducir la actividad GST, seguido de *Tropaeolum tuberosum* y *Annona cherimola*, sin diferencias significativas entre estos últimos. El extracto de *Annona cherimola* mostró la mayor inducción de QR, seguido de *Tropaeolum tuberosum* y *Moringa oleifera*.

Tabla 21. Tasa de inducción GST y QR en células HT-29 después del tratamiento con extractos funcionales.

| | | | GST | | | QR | | |
|---------------------------------------|----|----------------------------|--------------|-------------|--|---------------|---------------|--|
| | | Concentración del extracto | U/mL | U/mg | Tasa de inducción (tratada/controlada) | U/mL | U/mg | Tasa de inducción (tratada/controlada) |
| Control | | - | 72.9 ± 2.66 | 20.6 ± 0.76 | 1.00 ± 0.00 | 229.4 ± 1.72 | 591.8 ± 0.24 | 1.00 ± 0.00 |
| <i>V. faba</i> var baraca (germinada) | EE | 40 µg/ml | 166.4 ± 3.21 | 32.4 ± 0.63 | 1.58 ± 0.03*** | 5036.8 ± 3.45 | 1116.8 ± 0.44 | 1.89 ± 0.02*** |
| | HP | 25 µg/ml | 179.1 ± 1.80 | 37.9 ± 0.38 | 1.84 ± 0.02*** | 6383.4 ± 2.61 | 1305.4 ± 0.34 | 2.21 ± 0.01*** |
| <i>V. narbonensis</i> | EE | 40 µg/ml | 203.1 ± 0.83 | 31.0 ± 0.13 | 1.51 ± 0.01*** | 4242.3 ± 3.61 | 812.7 ± 0.34 | 1.37 ± 0.01*** |
| | HP | 25 µg/ml | 197.9 ± 3.43 | 37.9 ± 0.66 | 1.84 ± 0.03*** | 5661.7 ± 4.19 | 1139.2 ± 0.64 | 1.92 ± 0.03*** |
| <i>M. sativa</i> | EE | 40 µg/ml | 221.4 ± 1.81 | 46.3 ± 0.38 | 2.25 ± 0.02*** | 6938.0 ± 4.52 | 1659.8 ± 0.85 | 2.80 ± 0.04*** |
| | HP | 25 µg/ml | 220.9 ± 4.18 | 51.9 ± 1.29 | 2.53 ± 0.05*** | 6684.4 ± 3.91 | 1768.4 ± 0.51 | 2.99 ± 0.02*** |
| <i>Moringa oleifera</i> | EE | 2.5 µg/ml | 224.9 ± 1.01 | 48.4 ± 0.42 | 2.34 ± 0.02*** | 5603.6 ± 0.45 | 1033.9 ± 0.25 | 1.73 ± 0.02*** |
| <i>Tropaeolum tuberosum</i> | EE | 2.0 µg/ml | 208.1 ± 0.71 | 37.1 ± 0.28 | 1.78 ± 0.02*** | 6941.3 ± 0.51 | 1200.9 ± 0.31 | 2.01 ± 0.02*** |
| <i>Annona cherimola</i> | EE | 1.5 µg/ml | 229.9 ± 1.20 | 34.8 ± 0.54 | 1.67 ± 0.03*** | 6752.4 ± 0.59 | 1490.6 ± 0.34 | 2.51 ± 0.02*** |

| | | | | | | | |
|-------------|------------|------------------|-----------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| Sulforafano | 5 μ M | 66.3 \pm 1.49 | 22.3 \pm 0.50 | 1.08 \pm 0.02* | 5852.4 \pm 1.20 | 1336.1 \pm 0.14 | 2.28 \pm 0.01*** |
| Sulforafano | 10 μ M | 116.2 \pm 3.87 | 26.5 \pm 0.88 | 1.29 \pm 0.04*** | 4947.9 \pm 2.64 | 1660.4 \pm 0.12 | 2.81 \pm 0.01*** |

Resultados de inducción expresados como media de la relación de actividad GST o QR de muestras tratadas vs control (no tratadas). Los valores significativos se denotan por (*) $p < 0,05$ *significativo*; (**) $p \leq 0,01$ altamente significativo, (***) $p \leq 0,001$ muy altamente significativo.

4.5 Actividad antiproliferativa en células cultivadas

El efecto antiproliferativo de los extractos etanólicos y los hidrolizados proteicos se evaluó en diferentes líneas celulares de CCR como se describe en la **Tabla 22**. La viabilidad de las células del CCR se inhibió de manera dependiente de la dosis, en el caso de la especie *V. faba* sólo el hidrolizado proteico de *V. faba* var baraca (germinada) indujo una actividad antitumoral significativa en las células de cáncer de colon T84 (valor IC₅₀ de 360.8 ± 2.35 µg/mL) y SW480 (397.3 ± 1.06 µg/mL). El resto de las variedades de *Vicia faba* no presentaron una actividad antitumoral relevante. Del mismo modo, del género *Vicia* el hidrolizado de proteínas de *V. narbonensis* mostró una actividad antitumoral significativa en las células T-84 (IC₅₀ 328.8 ± 3.46 µg/mL) y SW4480 (405.5 ± 1.03 µg/mL).

Por otro lado, en relación con el resto de leguminosas analizadas, el hidrolizado proteico de *M. sativa* demostró la mayor actividad antiproliferativa en las líneas celulares T84, SW480, e incluso en la línea resistente HC-T15 (IC₅₀ 269.2 ± 0.32 , 328.2 ± 1.68 y 452.8 ± 5.49 µg/mL, respectivamente). Este extracto también moduló la capacidad proliferativa la línea normal de epitelio de colon CCD18, aunque a concentraciones muy elevadas (IC₅₀ 710.35 ± 5.90 µg / mL).

En relación con los extractos etanólicos de *Moringa oleifera*, *Tropaeolum tuberosum* y *Annona cherimola*. El extracto etanólico de *Annona cherimola* mostró los valores más bajos de IC₅₀ en T84, mientras que el extracto de *Moringa oleifera* mostró los valores más bajos de IC₅₀ en HCT-15 y SW480. El extracto de *Tropaeolum tuberosum* exhibió los valores más altos de IC₅₀ en las tres líneas celulares de CCR testadas (T84, HCT15 y SW480). La inhibición de la proliferación por los extractos en todas las líneas celulares del CCR fue mayor en comparación con la línea celular no tumoral CCD18. Además, los extractos etanólicos también causaron inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de esferoides tumorales multicelulares de células HCT15 (MTS; **Figura 14**; $p < 0,001$). El extracto etanólico de *Annona cherimola* mostró los niveles más altos de inhibición, seguido de *Moringa oleifera* y *Tropaeolum tuberosum*. De hecho, el extracto de *Annona cherimola* redujo la proliferación de los MTS de HCT15 al 34% y 10% utilizando $1,5 \times IC_{50}$ y $4 \times IC_{50}$, respectivamente. Finalmente, los extractos etanólicos de *Moringa oleifera* redujeron la proliferación de los MTS de HCT15 al 43% ($1,5 \times IC_{50}$) y 24% ($4 \times IC_{50}$) y los de *Tropaeolum tuberosum* al 46% ($1,5 \times IC_{50}$) y al 24% ($4 \times IC_{50}$). Es importante destacar que el nivel más alto de inhibición se registró para $4 \times IC_{50}$ ($p < 0.001$) para todos los extractos.

Tabla 22. Dosis IC₅₀ de los extractos etanólicos y de los hidrolizados de proteínas de las distintas especies en las líneas celulares de cáncer de colon y en la línea normal de epitelio de colon

| | | IC ₅₀ (µg/mL) | | | |
|-----------------------------------|----|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| | | T84 | HCT-15 | SW480 | CCD18 |
| <i>V. faba</i> var <i>chipen</i> | | | | | |
| cruda | EE | - | - | - | - |
| | HP | - | - | - | - |
| germinada | EE | - | - | - | - |
| | HP | - | - | - | - |
| <i>V. faba</i> var <i>aldaba</i> | | | | | |
| cruda | EE | - | - | - | - |
| | HP | - | - | - | - |
| germinada | EE | - | - | - | - |
| | HP | - | - | - | - |
| <i>V. faba</i> var <i>alameda</i> | | | | | |
| cruda | EE | - | - | - | - |
| | HP | - | - | - | - |
| <i>V. faba</i> var <i>1268</i> | | | | | |
| cruda | EE | - | - | - | - |
| | HP | - | - | - | - |
| <i>V. faba</i> var <i>cana</i> | | | | | |
| cruda | EE | - | - | - | - |
| | HP | - | - | - | - |
| germinada | EE | - | - | - | - |
| | HP | - | - | - | - |
| <i>V. faba</i> var <i>baraca</i> | | | | | |
| germinada | EE | - | - | - | - |
| | HP | 360.8 ± 2.35 | - | 397.3 ± 1.06 | - |
| <i>Vicia narbonensis</i> | | | | | |
| | EE | - | - | - | - |
| | HP | 328.8 ± 3.46 | - | 405.5 ± 1.03 | 879.5 ± 1.20 |
| <i>Vicia ervilia</i> | | | | | |
| | EE | - | - | - | - |
| | HP | 954.88 ± 0.58 | - | - | - |
| <i>Vicia sativa</i> | | | | | |
| | EE | - | - | - | - |
| | HP | - | - | - | - |
| <i>Lupinus luteus</i> | | | | | |
| | EE | - | - | - | - |
| | HP | - | - | - | - |
| <i>Medicago Sativa</i> | | | | | |
| | EE | - | 915.97 ± 2.81 | 826.7 ± 1.26 | - |
| | HP | 269.2 ± 0.32 | 452.8 ± 5.49 | 328.2 ± 1.68 | 710.35 ± 5.90 |
| <i>Moringa oleifera</i> | | | | | |
| | EE | 33,3 ± 2,70 ^b | 24,6 ± 2,16 ^a | 19,8 ± 2,68 ^a | 98,9 ± 1,85 ^a |
| <i>Tropaeolum tuberosum</i> | | | | | |
| | EE | 84,4 ± 0,84 ^c | 41,4 ± 0,98 ^c | 43,7 ± 0,25 ^c | 189,8 ± 0,66 ^c |
| <i>Annona cherimola</i> | | | | | |
| | EE | 23,2 ± 2,75 ^a | 30,9 ± 0,32 ^b | 33,0 ± 1,52 ^b | 176,3 ± 0,06 ^b |

Los datos se informan como \pm SD media con experimentos realizados por triplicado. El análisis de Anova y la prueba HSD Tukey se indican mediante superíndice. Los valores de a, b y c corresponden a los grupos de los subconjuntos homogéneos. Las medias dentro de una columna con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$)

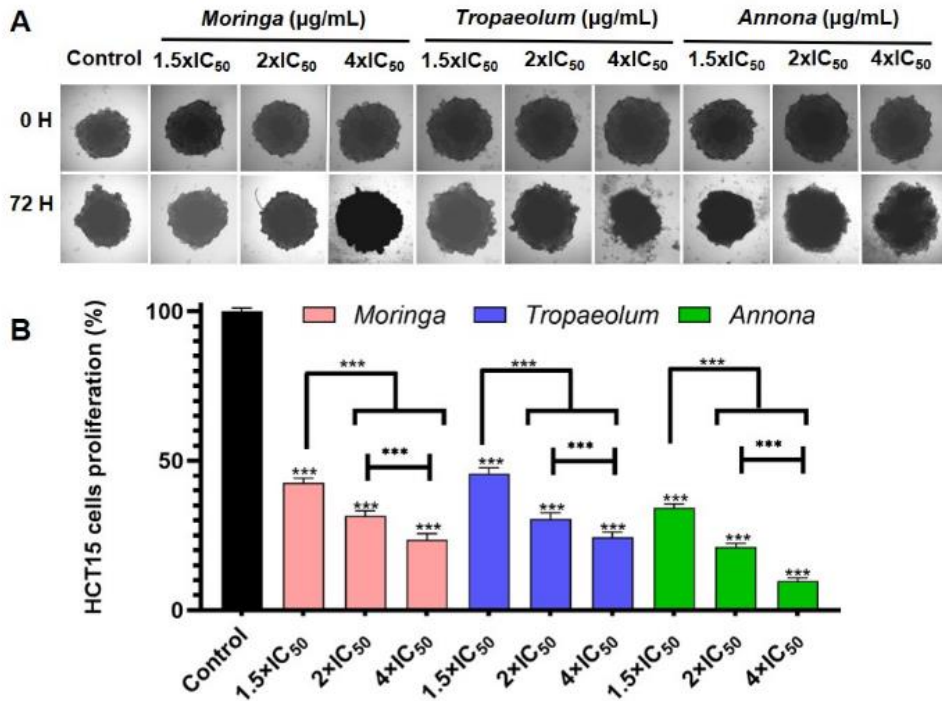


Figura 14. Esferoides tumorales multicelulares (MTS) de HCT15 tratados con los extractos etanólicos de *Moringa oleifera*, *Tropaeolum tuberosum* y *Annona cherimola*. (A) Imagen representativa del MTS tratado con los extractos etanólicos. Las imágenes fueron tomadas con imágenes de microscopía de luz ($10\times$ magnificación). (B) Ensayo de proliferación con CCK8 en MTS tratado durante 72 h con los extractos etanólicos a diferentes dosis ($1,5 \times \text{IC}_{50}$, $2 \times \text{IC}_{50}$ y $4 \times \text{IC}_{50}$). Las barras rosadas representan el extracto etanólico de *Moringa oleifera*, las barras azules representan el extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* y las barras verdes representan el extracto etanólico de *Annona cherimola*. Las diferencias significativas frente al control se denotan por (*) $p < 0,05$; (**) $p \leq 0,01$, (***) $p \leq 0,001$.

4.6 Efecto antiproliferativo de la terapia combinada de los extractos y del 5-FU

En este estudio se utilizó la línea celular T-84 para determinar el efecto sinérgico de los extractos etanólicos y proteicos de las leguminosas y

el 5-FU y, la línea HCT-15 para analizar dicho efecto sinérgico en *Annona cherimola*, *Moringa oleifera* y *Tropaeolum tuberosum*.

En el primer caso, el único extracto que demostró sinergia con el 5-FU, mejorando el efecto de éste fue el hidrolizado proteico de *M. sativa* con un IC <1 (**Figura 15**).

En el segundo caso, en los estudios llevados a cabo en la línea HCT-15, el tratamiento combinado (extractos etanólicos + 5-FU) mostró efectos sinérgicos en comparación con la monoterapia (IC <1) (**Figura 16**). Este sinergismo fue más evidente para todas las combinaciones del extracto etanólico de *Annona cherimola* junto con 5-FU (IC < 1). Además, el 5-FU (2 µM) combinado con extractos etanólicos de *Annona cherimola*, *Moringa oleifera* y *Tropaeolum tuberosum* a 2.5, 5 y 10 µg/mL, respectivamente produjo el mayor efecto sinérgico, con una inhibición cercana al 50% (IC < 1). Estos resultados también se confirmaron en MTS donde se alcanzó la mayor actividad sinérgica con la combinación del extracto etanólico de *Annona cherimola* y 5-FU (**Figura 17**). Además, las combinaciones de los extractos etanólicos de *Annona cherimola* y *Moringa oleifera* (5 y 20 µg/mL, respectivamente) con 5-FU (2 µM) produjeron más del 50% de inhibición (IC < 1). Por el contrario, la combinación del extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* (40 µg/mL) con el de 5-FU (2 µM) sólo dio lugar a una inhibición del 40% (IC < 1).

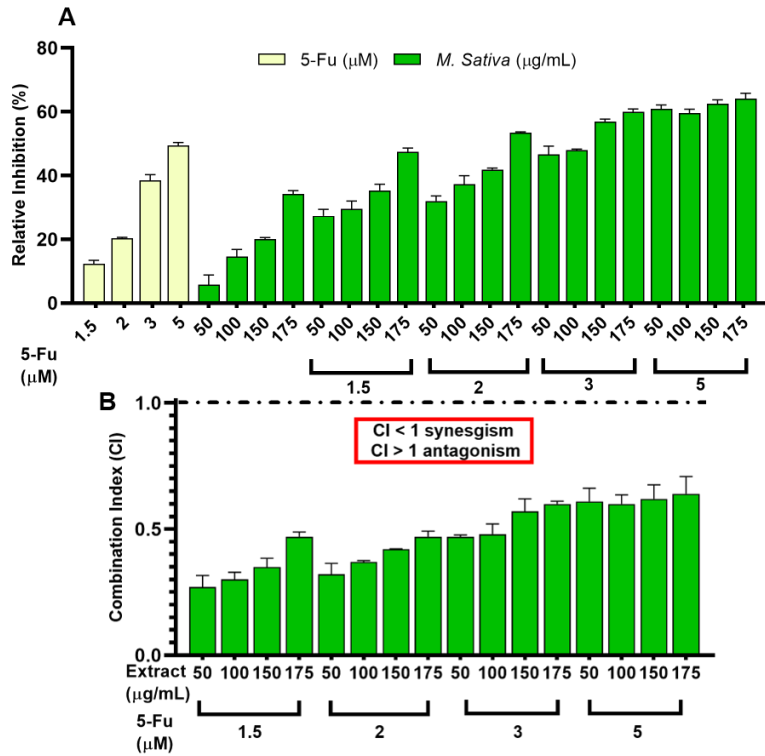


Figura 15. Efecto antiproliferativo del tratamiento combinado (hidrolizada proteico de *M. sativa* y 5-FU) en células T-84. A. Hidrolizada proteico de *M. sativa* y 5-FU. B. Los valores del índice de combinación (CI) de la proteína hidrolizada de *M. sativa* y el 5-FU se muestran encima de las barras. CI < 1, = 1 y > 1 indican sinergia, adición y antagonismo, respectivamente.

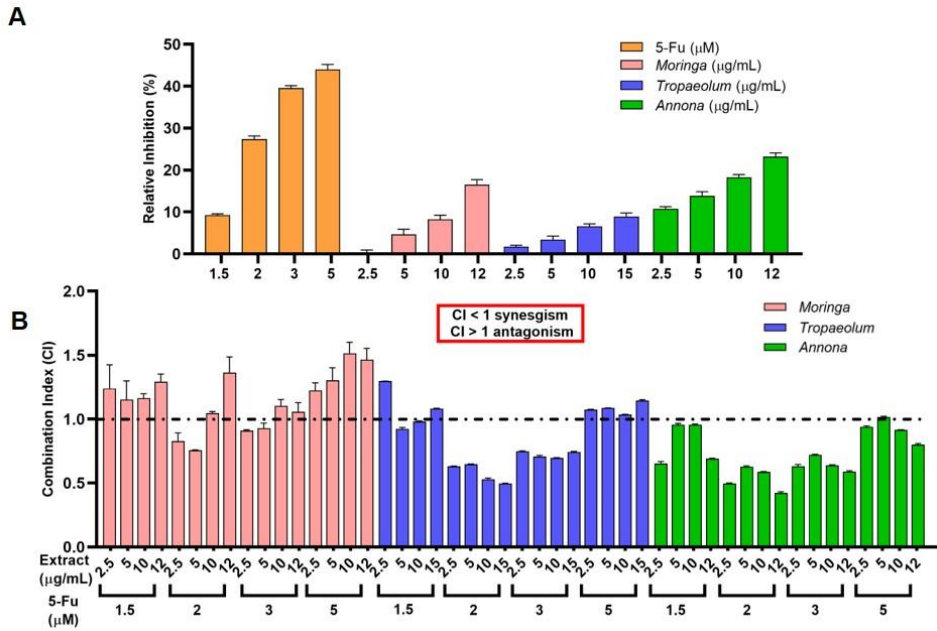


Figura 16. Efecto antiproliferativo del tratamiento combinado (extractos etanólicos y 5-FU) sobre las células HCT-15. A. *Moringa oleifera*, *T. tuberosum* y *Annona cherimola* con 5-FU. B. Los valores del índice de combinación (IC) de extractos etanólicos y 5-FU se muestran sobre las barras. $IC < 1$, $= 1$ y > 1 indican sinergismo, adición y antagonismo, respectivamente.

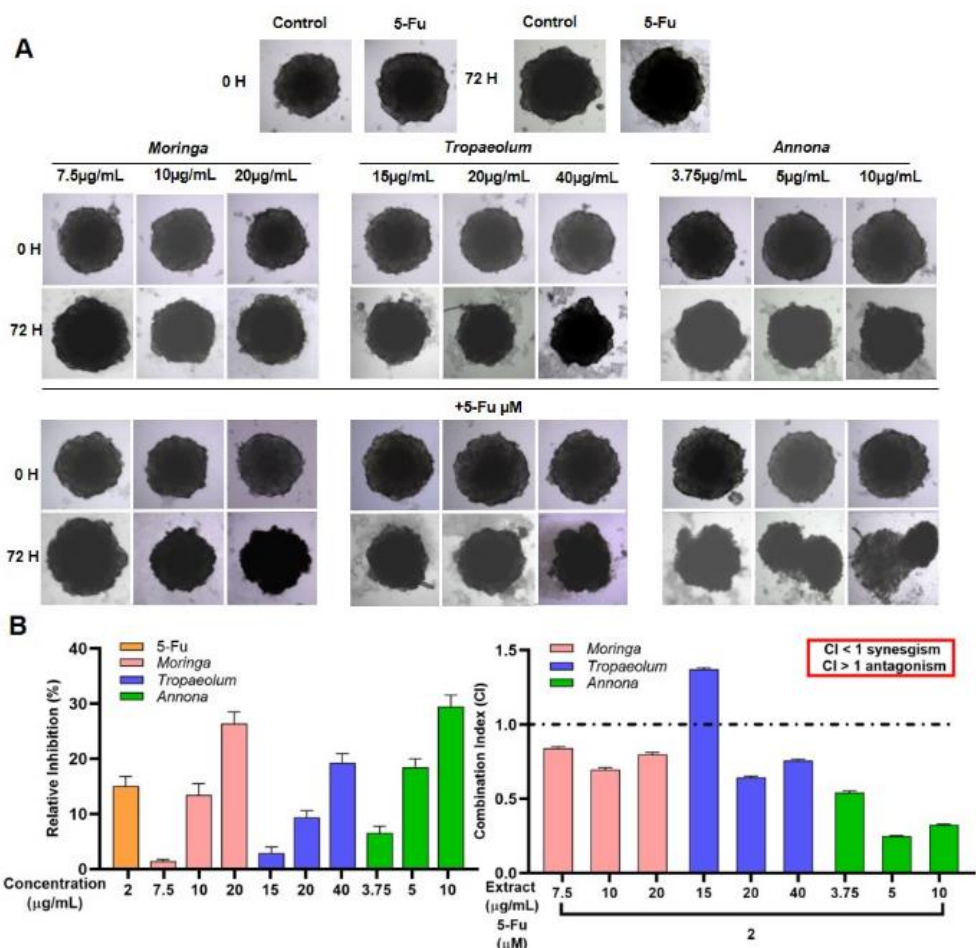


Figura 17. Efecto antiproliferativo del tratamiento combinado (extractos etanólicos y 5-FU) sobre los MTS HCT-15. (A) Imagen representativa del MTS tratado con los extractos etanólicos del tratamiento combinado (diferentes concentraciones en $\mu\text{g/mL}$) y 5-FU ($2 \mu\text{M}$). Las imágenes fueron tomadas con imágenes de microscopía de luz ($10\times$ magnificación). (B) Ensayo de inhibición relativa con CCK8 en MTS tratado durante 72 h con los extractos etanólicos a diferentes del tratamiento combinado (extractos etanólicos y 5-FU). Los valores del índice de combinación (IC) de extractos etanólicos y 5-FU se muestran sobre las barras. $\text{IC} < 1$, $= 1$ y > 1 indican sinergismo, adición y antagonismo, respectivamente.

4.7 Efecto de los extractos etanólicos en el ciclo celular

Como se muestra en la **Figura 18**, todos los extractos etanólicos indujeron la modulación del ciclo celular en la línea HCT-15 para las concentraciones de IC_{25} e IC_{50} . De hecho, las tres especies, *Moringa*

oleifera, *Annona cherimola* y *Tropaeolum tuberosum*, indujeron un aumento en la fase SubG1, con un aumento de la fase S que también se observó con el uso de extractos de *Moringa oleifera* y *Annona cherimola*. Una disminución significativa en las células de fase G2/M solo se observó con los extractos de *Annona cherimola* y *Tropaeolum tuberosum*. Además, las células HCT-15 fueron tratadas con combinaciones de extractos etanólicos + 5-FU. Como se muestra en la **Figura 19**, el uso de extractos etanólicos de *Annona cherimola* a las concentraciones de IC₁₀ y IC₂₀ y 5-FU (2µM) resultó en un menor porcentaje de células en G₀/G₁ y un aumento en las de fase S, lo que indica que este extracto mejoró el efecto de 5-FU ($p < 0.001$). No se observó modulación del ciclo celular para las combinaciones con los otros extractos (datos no mostrados).

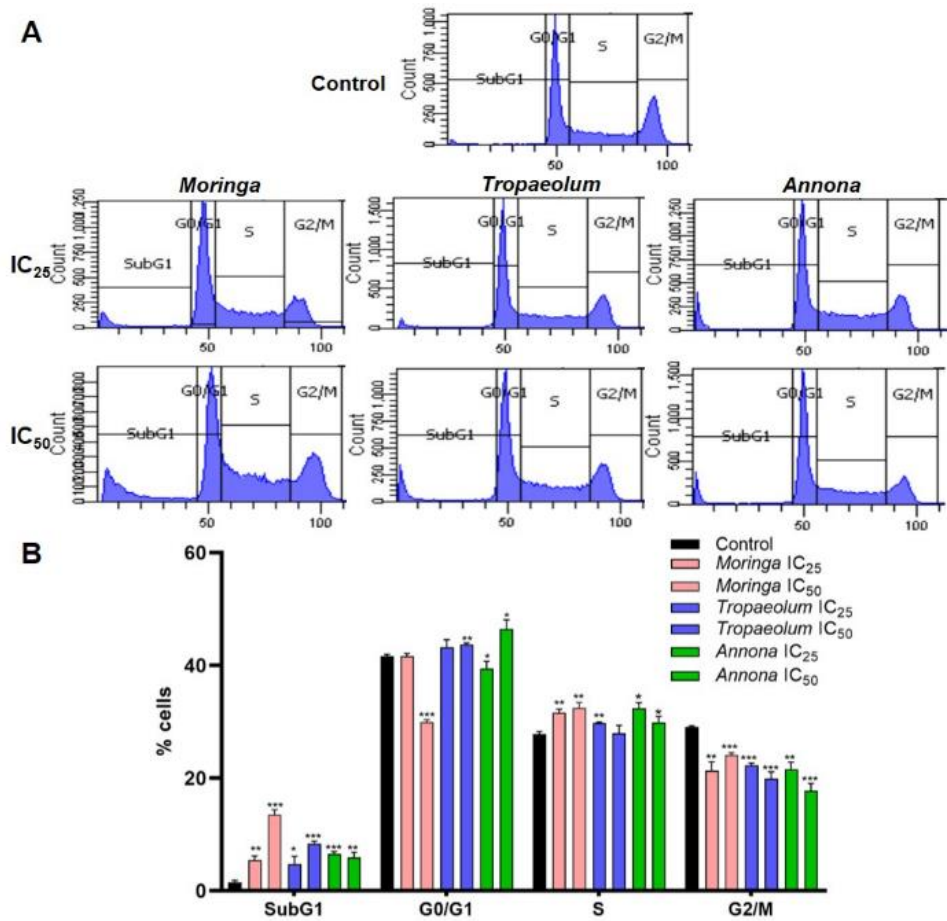


Figura 18. Análisis del ciclo celular de células HCT-15 tratadas con extractos etanólicos. (A) Imágenes de los resultados de la citometría de flujo FACScan de células HCT-15 expuestas a PI/RNase (Fluoresceína, FITC). (B) Representación gráfica del porcentaje de células etiquetadas en cada fase del ciclo celular. Las diferencias significativas vs control se denotan por (*) $p < 0,05$; (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,001$.

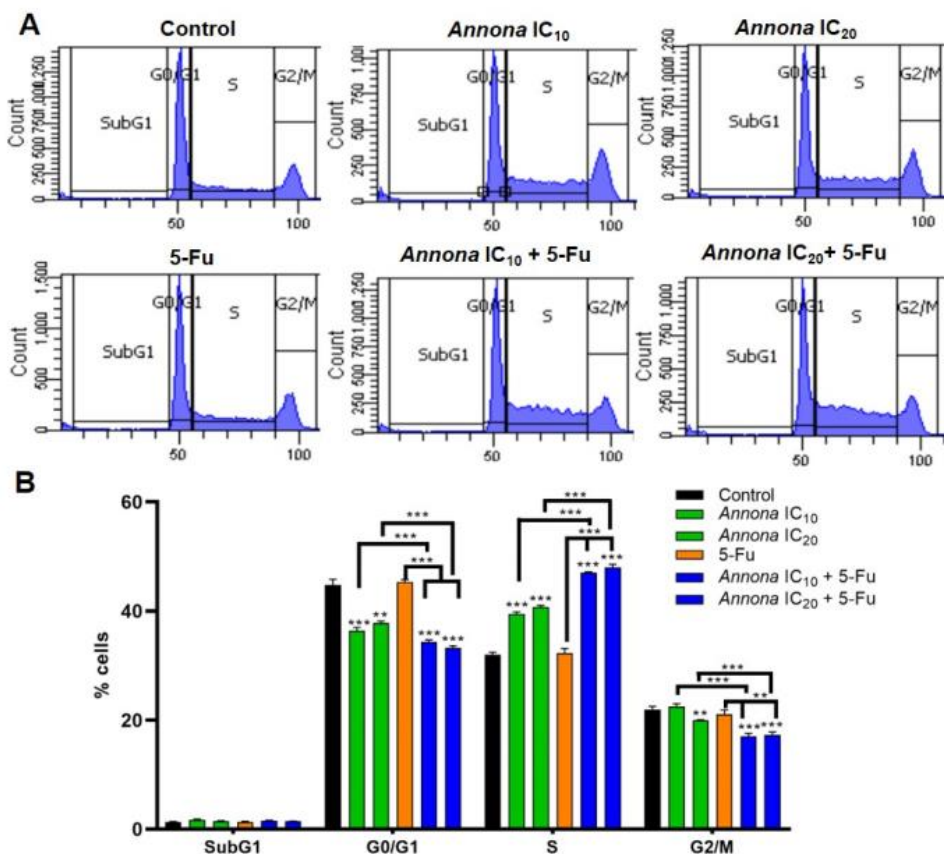


Figura 19. Análisis del ciclo celular de células HCT-15 tratadas con extractos etanólicos de *Annona cherimola* (IC₁₀, IC₂₀) y 5-FU (2 μ M). (A) Imágenes del FACScan de los resultados de la citometría de flujo de células HCT-15 expuestas a PI/RNase (Fluoresceína, FITC). (B) Representación gráfica del porcentaje de células etiquetadas en cada fase del ciclo celular. Las diferencias significativas vs control se denotan por (*) $p < 0,05$; (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,001$.

4.8 Análisis molecular de la inducción de la muerte celular mediante extractos etanólicos

Se realizó un análisis de Western blot para determinar los mecanismos moleculares antitumorales de los extractos etanólicos. Como se muestra en las **Figuras 20A y B**, el extracto etanólico de *Moringa oleifera* incrementó la expresión de las caspasas 8, 9 y 3 escindidas en más de 1.13, 2.18 y 1.83 veces respectivamente en la línea celular HCT15 a las

24h en comparación con las células no tratadas (**Figs. 20A y B**). El extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* también aumentó la expresión de dichas caspasas escindidas (8, 9 y 3) en más de 6.97, 1.85 y 1.30 veces en HCT15 a las 12 h. Sin embargo, la mayor expresión de caspasa escindida 9 se obtuvo a las 24 h con un aumento de 3,06 veces en la expresión en células HCT15 en comparación con el control no tratado (Figs. 20A y B). Finalmente, el extracto etanólico de *Annona cherimola* indujo el mayor aumento en la expresión de caspasa escindida (8, 9 y 3), en más de 1.12, 3.63 y 2.22 veces en HCT15 a las 24 h (Figs. 20A y B).

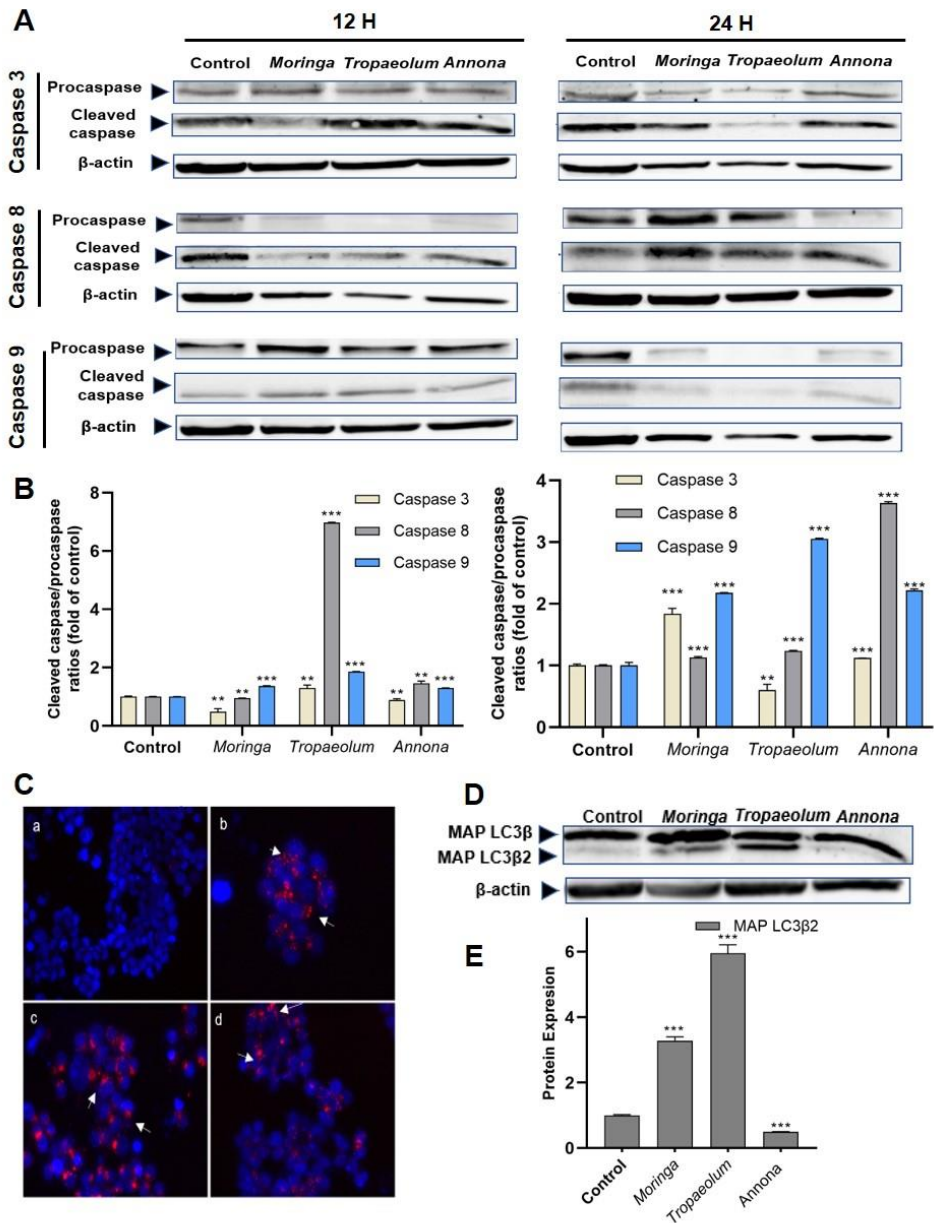


Figura 20. Mecanismos de inducción de la muerte celular por extractos etanólicos. A) Análisis de Western blot de la procaspasa y la caspasa escindida 3, 8 y 9; (B) Representación gráfica del análisis densitométrico de las caspasas escindidas de caspasa. (C) Tinción de LisoTracker que revela la formación de vesículas de autofagia después del tratamiento con extracto etanólico. (E) Análisis de Western blot de la expresión de MAP LC3β2, (E) Representación gráfica del análisis densitométrico de las bandas de MAP LC3β2. Las diferencias significativas vs control se denotan por (*) $p < 0,05$; (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,001$.

De interés, utilizamos la sonda LysoTracker® para analizar los mecanismos por los que la autofagia contribuía a la muerte celular, lo que reveló que los extractos etanólicos formaron vesículas autofágicas en células HCT-15 (**Figura 20C**). Para verificar la presencia de estas vesículas, determinamos la proteína de cadena ligera 3 asociada a microtúbulos (MAP-LC3) el cual indica la formación de autofagosomas al existir un aumento en la expresión del LC3-tipo II por western blot. Este análisis indicó que los extractos etanólicos de *Moringa oleifera* y *Tropaeolum tuberosum* aumentaron significativamente la expresión de MAP-LC3 ($p < 0,001$; Figs. 20 D y E).

4.9 Inducción de especies reactivas de oxígeno mediante extractos etanólicos

Como se muestra en la **Figura 21A**, en comparación con el control, los extractos etanólicos aumentaron significativamente la producción intracelular de ROS después de 48 h de tratamiento. Este efecto fue especialmente evidente después del tratamiento con extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* (dosis IC75) que aumentó la producción de ROS en aproximadamente 21 veces, mientras que los extractos de *Moringa oleifera* y *Annona cherimola* aumentaron la producción de ROS en aproximadamente 2 y 9 veces, respectivamente en comparación con el control (**Figura 21 B**). Se agregó el pretratamiento con NAC para disminuir la producción de ROS y, como se muestra en la **Figura 21 C**, NAC suprimió la producción de ROS, causando un aumento muy significativo en la proliferación celular ($p < 0.001$).

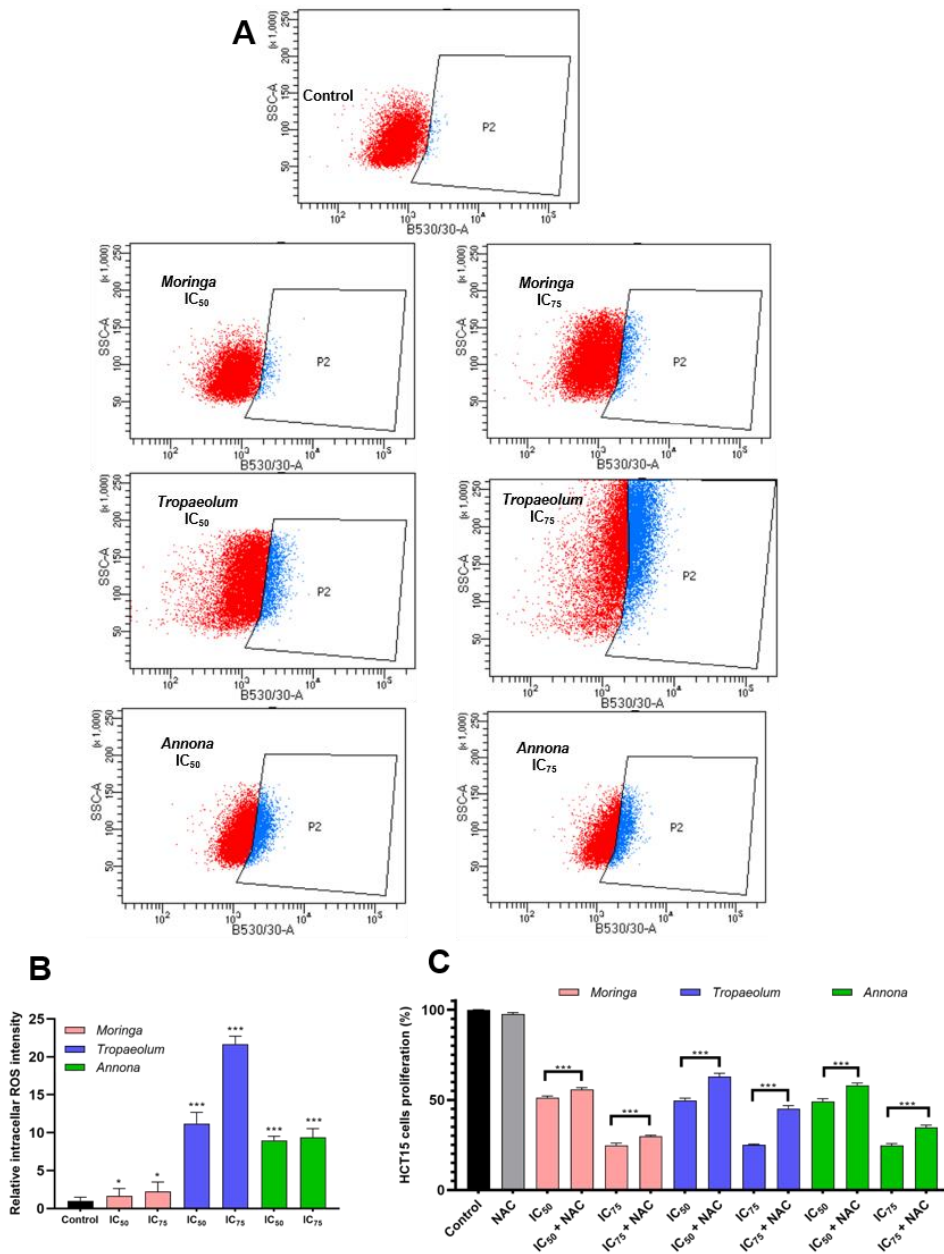


Figura 21. Efecto de los extractos etanólicos sobre la inducción de la acumulación de ROS. (A) Imágenes del FACScan de los resultados de la citometría de flujo de células T-84 expuestas a DCFDA (Fluoresceína, FITC). (B) Representación gráfica de la producción de ROS mediante extractos etanólicos; (C) Análisis de la producción de ROS después del pretratamiento de NAC (100 μ M). Las diferencias significativas vs control se denotan por (*) $p < 0,05$; (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,001$.

4.10 Efecto de los extractos etanólicos sobre los marcadores de células madre cancerosas

Para determinar la modulación de la expresión de los marcadores de células madre del CCR tras el tratamiento con los extractos etanólicos de *M. oleífera*, *Tropaeolum tuberosum* y *Annona cherimola*, se realizó un análisis RT-qPCR. Como se muestra en la **Figura 22**, los extractos etanólicos de *Moringa oleífera*, *Tropaeolum tuberosum* y *Annona cherimola* disminuyeron la expresión de los marcadores de CSC, lo que indica una reducción en el número de CSC en el cultivo. El extracto etanólico de *Moringa oleífera* mostró el efecto más fuerte sobre los marcadores CD133, CD24, SOX2 y NANOG. Por el contrario, los extractos etanólicos de *Tropaeolum tuberosum* y *Annona cherimola* solo mostraron efectos significativos para los marcadores OCT4 y CD44, respectivamente.

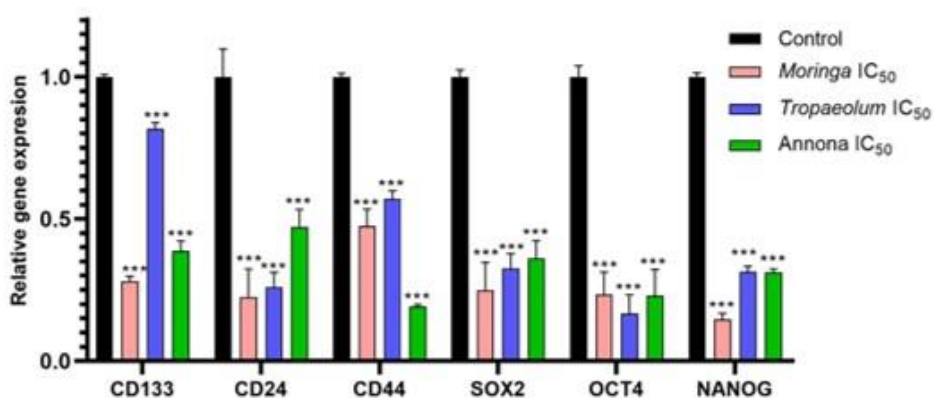


Figura 22. Análisis RT-qPCR de marcadores de células madre cancerosas. Las diferencias significativas vs control se denotan por (*) $p < 0,05$; (**) $p \leq 0,01$; (***) $p \leq 0,001$.

Discusión

5. Discusión

El tratamiento del CCR, especialmente en sus etapas más avanzadas o metastásicas, sigue siendo un reto para la medicina, si bien se ha avanzado en la comprensión de los mecanismos que producen esta patogenicidad y en el desarrollo de terapias dirigidas que han permitido aumentar la esperanza de vida de los pacientes, los tratamientos quimioterapéuticos siguen presentando limitaciones como son los efectos adversos, toxicidad en tejidos no cancerosos, así como el desarrollo de células quimio resistentes (Xie et al., 2020). Por su parte el uso de tratamientos tradicionales ha recibido atención en los últimos años debido a que los metabolitos bioactivos de las plantas medicinales solos o en combinación con otros agentes terapéuticos tienen un gran efecto beneficioso, además de presentar seguridad, eficacia, toxicidad reducida y baja propensión al desarrollo de resistencia. A esto se suma su origen natural, disponibilidad en las comunidades locales y fácil administración. (Kuruppu et al., 2019).

Por otro lado, la selección de los disolventes apropiados y un procedimiento de extracción estándar para la obtención de compuestos bioactivos de las plantas medicinales juega un papel importante, ya que la trazabilidad y la reproducibilidad de dichos procedimientos condicionará la obtención de resultados de calidad. Además, la mayoría de las moléculas con actividad biológica presentan poca solubilidad en agua debido a la presencia de grupos fenólicos o residuos hidrofóbicos. Los disolventes comúnmente utilizados en la extracción de estos compuestos son

disolventes polares (por ejemplo, agua, alcoholes), con polaridad intermedia (por ejemplo, acetona, diclorometano) y no polares (por ejemplo, n-hexano, éter, cloroformo) (Abubakar and Haque, 2020). El problema del empleo de disolventes no polares radica en su toxicidad, lo que limita su aplicabilidad. Truong et al., (2019) evaluaron la actividad antioxidante y antiinflamatoria in vitro de los extractos de las ramas de *Severinia buxifolia* (Rutaceae) empleando diferentes disolventes y mostraron que los extractos obtenidos con disolventes hidroalcohólicos presentaron mayores rendimientos, así como una mayor recuperación de compuestos bioactivos del tipo fenólico, flavonoide y alcaloide resultando en una mayor actividad antioxidante y antiinflamatoria en comparación con los disolventes orgánicos. De hecho, un procedimiento similar utilizado por Khalil et al., (2020) evidenciaron que el extracto etanólico rico en polifenoles de partes aéreas de *Thymbra spicata* L presentó una alta actividad anti proliferativa en la línea celular de cáncer de mama humana MCF-7, sin efectos significativos sobre las células no neoplásicas. Recientemente, nuestro grupo ha utilizado un procedimiento similar para obtener compuestos bioactivos de las semillas desengrasadas de *Euphorbia lathyris* que mostraron actividad antiproliferativa contra varias líneas celulares de CCR humano (Mesas et al., 2021).

Por lo tanto, en este trabajo empleamos la extracción hidroalcohólica y acuosa a pH básico con objeto de obtener extractos funcionales de leguminosas y de algunas especies empleadas en varias comunidades indígenas del Ecuador para el tratamiento de varias

enfermedades que, durante muchos años ha resultado beneficiosas para la salud. Sin embargo, el mecanismo de acción por el cual actúan sigue siendo desconocido (Andrade et al., 2017; Saltos et al., 2016). Tres de estas especies *M. oleífera*, *Tropaeolum tuberosum* y *Annona cherimola* se seleccionaron debido a su actividad antitumoral frente al cáncer de colon.

En relación con las leguminosas, la especie de *Vicia faba* se caracteriza por su amplia variabilidad genética y rendimiento variable dependiendo del entorno, lo que ha llevado al desarrollo de fenotipos con una baja concentración de taninos (aproximadamente el 1%) lo que resulta en un mayor rendimiento, contenido de proteínas, reducción de factores antinutricionales, mayor capacidad de fijación de nitrógeno y mayor productividad del cultivo (Mayer et al., 2021). Por otro lado, el fabismo, una enfermedad hereditaria ligada al cromosoma X, se produce por el consumo de habas. En las habas, los compuestos vicina y convicina se encuentran entre 0,44 a 0,82% y 0,13 a 0,64%, respectivamente. Dichos compuestos se consideran tóxicos ya que al hidrolizarse en el tracto digestivo, dan lugar a divicina e isouramilo, que causan anemia hemolítica por ser radicales libres altamente reactivos (Du et al., 2021). Por esta razón, se utilizaron diferentes variedades de especies de *Vicia faba* con diferentes variaciones en la concentración de vicina y convicina, así como taninos. Los extractos funcionales de estas variedades mostraron una alta actividad antioxidante y un alto contenido en polifenoles, lo que concuerda con los resultados de Valente et al., (2018) quienes analizaron las vainas de siete variedades de especies de *Vicia faba*, encontrando un alto contenido en polifenoles y

actividad antioxidante atribuida a los compuestos ácido cafeico, ácido cumárico y kaempferol. Con respecto a las concentraciones de taninos y vicina-convicina, aunque no se observó correlación entre la actividad antioxidante y su concentración, el mayor contenido de polifenoles totales en los extractos etanólicos se encontró en las variedades con menor concentración de taninos y vicina-convicina, mientras que la mayor actividad inhibidora de DPPH se encontró en las variedades con una mayor concentración de vicina-convicina. Los resultados más altos de ABTS se encontraron en los hidrolizados proteicos derivados de habas con alta concentración de vicina-convicina. En relación con la actividad antioxidante *in vitro*, los extractos etanólicos e hidrolizados proteicos derivados de habas con mayor concentración de taninos mostraron un mayor efecto protector frente a los generadores de estrés oxidativo H₂O₂ y Paraquat. Estos resultados son similares a los obtenidos en el estudio de Oomah et al., (2011) que describieron una correlación entre el contenido de taninos y el de polifenoles totales, además de la presencia de una mayor actividad antioxidante en habas con un mayor contenido de taninos. El mismo resultado se obtuvo al analizar semillas de la leguminosa *Vigna aconitifolia*, que mostraron una alta capacidad antioxidante, antidiabética y antihipertensiva debido a su contenido en taninos, catequinas y ácido gálico (Bhadkaria et al., 2021).

Los posibles compuestos responsables de la actividad antioxidante en las semillas de *Vicia faba* son la verbascosa, el kaempferol-3-O-

rutinósido y la rutina. Estos compuestos han sido descritos en otras investigaciones (Lin et al., 2021; Wani et al., 2021).

En cuanto a la actividad antitumoral, el hidrolizado proteico de *V. faba* var baraca (germinada) inhibió la proliferación de las líneas celulares T84 y SW480, lo que podría explicarse por el hecho de que el proceso de hidrólisis natural de la proteína proporciona péptidos bioactivos que aumentan las propiedades funcionales y antioxidantes de las habas (Samaei et al., 2020). Además, se encontró una posible molécula responsable de la actividad antiproliferativa denominada Soyasaponina I, que ha sido descrita en algunas variedades de habas y otras leguminosas (Taroncher et al., 2021). Esta molécula también es capaz de inhibir el crecimiento tumoral y la metástasis en células cancerosas (Omar et al., 2020), lo que explicaría este efecto en nuestro estudio.

En relación con las otras especies de leguminosas de igual forma presentaron altos rendimientos, contenido en polifenoles y actividad antioxidante, destacando *Medicago sativa* y *Vicia sativa*. Nuestros resultados coinciden con otros autores Liu et al., (2020) que describieron una alta capacidad antioxidante y moderada actividad citotóxica frente a células tumorales Hela por el extracto orgánico en fase cloroformo de los tallos y hojas de *Vicia sativa* L, atribuyéndolos a la presencia de compuestos fenólicos, flavonas, curcumina y triterpenoides. En relación al extracto etanólico e hidrolizado proteico de *Medicago sativa*, se ha descrito su actividad antioxidante en estudios *in vitro* (Zagórska-Dziok et al., 2020) e *in vivo* (Raeszadeh et al., 2021) asociada a la presencia de

compuestos flavonoides de tipo glucósido (Farag et al., 2021) como Apigenina-7-diglucuronida (Hsu et al., 2021). La actividad antiproliferativa del hidrolizado proteico de *Medicago sativa* se atribuye a la presencia de péptidos bioactivos ricos en cisteína (Kobbi et al., 2018) como el péptido Medicago Sativa Defensin I (MsDef1) que ha demostrado actividad antitumoral en células cancerosas MDR (Pandurangi et al., 2021). En cuanto a la actividad antiproliferativa por parte del hidrolizado proteico de *Vicia narbonensis*, no se han descrito estudios similares. Sin embargo, se han identificado compuestos bioactivos como glucósidos flavonoides del tipo kaempferol y glucósidos de quercetina (Salehi et al., 2021) que han mostrado actividad antitumoral (Kubina et al., 2021).

En referencia a los extractos etanólicos de *Moringa oleifera*, *Tropaeolum tuberosum* y *Annona cherimola*, nuestros resultados mostraron que el extracto etanólico de semillas de *Moringa oleifera* exhibió la mayor actividad antiproliferativa en las líneas celulares de CCR en comparación con el resto de los extractos. De hecho, este extracto mostró un IC₅₀ en HCT-15 y SW480 CCR de $24,6 \pm 2,16$ y $19,8 \pm 2,68$ $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. Además, el extracto etanólico de las semillas de *Moringa oleifera* también mostró una actividad antioxidante moderada en las células de adenocarcinoma de colon HT-29. Estos resultados apoyan los de Yong-Bing et al., (2019) que demostraron que los extractos etanólicos de hojas, raíces y semillas presentaban una alta actividad antioxidante y antiinflamatoria como resultado de su diferente concentración de flavonoides. Por otra parte, otros autores evaluaron previamente la

actividad antioxidante del extracto etanólico de hojas de *Moringa oleifera* y atribuyeron una fuerte actividad antioxidante a la presencia de compuestos fenólicos como kaempferol 3-O-rutinósido, quercetina 3-O-(6"-malonil-glucósido), kaempferol 3-O-glucósido y derivado de quercetina (Xu et al., 2021).

En cuanto a su actividad antiproliferativa, Mohd Fisall et al., (2021) demostraron que la fracción diclorometano del extracto metanólico de la hoja de *Moringa oleifera* inhibía la proliferación de células de cáncer de mama MCF7 y atribuyeron este efecto a la presencia de compuestos como el bencenoacetonitrilo, el ácido 4-hidroxi- y bencenoacético, el 4-hidroxi-, el éster metílico entre otros encontrados en esta fracción. De igual modo, un extracto de alcaloides de *Moringa oleifera* inhibió la proliferación y migración de células de cáncer de pulmón A549 al inhibir la activación de la vía JAK2/STAT3 (Xie et al., 2021). Por otra parte, con el fin de investigar la bioaccesibilidad de estos compuestos, Bhadresha et al., (2021) sometieron el extracto de *Moringa oleifera* a un proceso de digestión *in vitro* y demostró su efecto protector sobre la metástasis ósea al inhibir la proliferación de células tumorales PC3.

En este contexto, se realizó un análisis cromatográfico del extracto etanólico de semillas de *M. oleifera*, el cual mostró la presencia de una alta proporción de compuestos fenólicos como vitexina, isovitexina e isorhamnetina-3-O- β -D-glucopiranosido. Compuestos similares también fueron detectados en hojas de *Moringa oleifera* por Ye et al., (2018). Recientemente, Liu et al., (2019) han descrito que la vitexina induce una

disminución significativa en la proliferación en las células de cáncer de pulmón A549, induciendo la apoptosis a través de una vía mitocondrial y la vía de señalización PI₃K/Akt/mTOR. Además, Cao et al., (2019) demostraron que la isovitexina inhibió la carcinogenicidad de las células similares a las células madre del carcinoma hepático (HSCLC), al regular a la baja la expresión de FoxM1 y superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD). Finalmente, el isorhamnetin-3-O-β-D-glucopiranosido exhibió acción antiproliferativa en la línea de cáncer de mama MCF-7 al inducir apoptosis dependiente de ROS (Tundis et al., 2008). La presencia de estos compuestos podría explicar el importante efecto antiproliferativo del extracto de *M. oleífera* contra las células del CCR.

En contraste, el extracto etanólico del tubérculo *Tropaeolum tuberosum* mostró una actividad antioxidante moderada tanto en el ensayo ABTS como en el estudio in vitro con células HT-29. Curiosamente, este extracto etanólico mostró un efecto antiproliferativo mayor y selectivo contra las células T84, HCT-15 y SW480 CCR ($84,4 \pm 0,84$; $41,4 \pm 0,98$; y $43,7 \pm 0,25$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) que frente a la línea de colon epitelial normal CCD-18 ($\text{IC}_{50} = 189,8 \pm 0,66$ $\mu\text{g/mL}$). Experimentos previos, habían mostrado los extractos crudos de cuatro genotipos de *Tropaeolum tuberosum* tenían una actividad antioxidante significativa, como lo demuestra su efecto inhibitor sobre el generador de radicales libres APPH o sobre la oxidación inducida por Cu de los ácidos grasos poliinsaturados, así como en la hemólisis eritrocítica inducida por APPH (Chirinos et al., 2008). Estos efectos protectores y la actividad antioxidante se atribuyeron

al alto contenido de compuestos fenólicos, antocianinas y flavonoides en el extracto. Además, extractos similares mostraron actividad antiproliferativa contra las líneas tumorales A549, Caki-1, T24 y PC-3 (Apaza Ticona et al., 2020).

El extracto etanólico de *Annona cherimola* mostró la mayor actividad antioxidante *in vitro* (células HT29) y en la prueba ABTS ($2,50 \pm 0,21$ μg de extracto de GAE/ mg) en comparación con los otros extractos. No obstante, aunque su actividad antitumoral también fue significativa, esta actividad fue inferior a los extractos descritos anteriormente, mostrando una capacidad antiproliferativa más intensa frente a las células T-84 ($\text{IC}_{50} = 23,2 \pm 2,75$ $\mu\text{g}/\text{mL}$). Haykal et al., (2019) atribuyeron la actividad antioxidante de un extracto etanólico foliar de esta planta a su contenido fenólico y su actividad antiproliferativa contra las líneas celulares HeLa y HepG2 a la presencia de fitoesteroles como β -sitosterol, β -stigmasterol y compuestos de acetogenina. El análisis cromatográfico mostró la presencia de compuestos como catequina y quercetina 3-O-rutinósido y otros que previamente habían sido detectados en el género *Annonaceae* como una procianidina B2 (Justino et al., 2019), rutina (Calzada et al., 2017), compuestos de acetogeninas (Yong-Bing et al., 2019) y procianidina B1 (Baskaran et al., 2016).

Curiosamente el hidrolizado proteico de *Medicago sativa* cuando se asoció con el tratamiento con 5-FU (el fármaco de elección para el tratamiento del CCR), se evidenció un aumento significativo en su actividad antitumoral en la línea T-84. De hecho, todas las combinaciones reflejan

una actividad sinérgica (IC <1). Esta actividad sinérgica ha sido reportada por parte de las saponinas de las especies *Medicago* con el cisplatino en el tratamiento contra las células de carcinoma de mama MCF7 y células de carcinoma cervical humano HeLa (Avato et al., 2017). De igual forma un inhibidor de la tripsina extraído de *Medicago scutellata* L. potenció la muerte inducida por el cisplatino en las mismas células (Lanza et al., 2004).

De igual forma, cuando los extractos etanólicos de *Moringa oleifera*, *Tropaeolum tuberosum* y *Annona cherimola* se asociaron con el tratamiento con 5-FU detectamos un aumento significativo en su actividad antitumoral. De hecho, el extracto etanólico de *Moringa oleifera* (5 µg/mL) combinado con 5-FU mejoró la actividad antitumoral de este último hasta alcanzar aproximadamente el 50% de inhibición de la proliferación de células de CCR HCT15. Además, se detectó una inhibición de la tasa de proliferación similar (53%) al combinar el extracto etanólico de *Moringa oleifera* (20 µg/mL) y 5-FU en MTS de HCT15, un sistema in vitro que imita los tumores primarios de CCR. Nur et al., (2010) también mostraron que el extracto etanólico de *Moringa oleifera* aumentó la sensibilidad de las células CCR WiDr a 5-FU. Berkovich et al., (2013) encontraron actividad sinérgica con agentes quimioterapéuticos como el cisplatino en la línea de cáncer de páncreas Panc-1.

La asociación de los extractos de *Tropaeolum tuberosum* y *Annona cherimola* con 5-FU también mejoró la actividad antitumoral de 5-FU. De hecho, se reportó un efecto sinérgico del género *Tropaeolum* (especie,

Tropaeolum majus L) después de combinar sus extractos con 5-FU en células de cáncer de mama MCF-7 (Espinoza Silva, 2019). Nuestros resultados mostraron que la combinación de extracto de *Tropaeolum tuberosum* a 15 µg/mL o 40 µg/mL con 5-FU inhibió significativamente la proliferación de células CCR HCT-15 (50%) y su MTS (40%). Del mismo modo, el extracto etanólico de *Annona cherimola* mostró actividad sinérgica con 5-FU para todas las combinaciones, aunque el mayor efecto se logró con 12 µg/mL del extracto (55% de inhibición de la proliferación en células HCT15) y 5 µg/mL 5-FU (inhibición de proliferación del 64% en MTS de HCT15). En este contexto, el extracto etanólico y de cloroformo de otra especie de la familia Annonaceae, *Annona muricata*, mostró un efecto sinérgico con 5-FU en las células de carcinoma de esófago SKG (Addai et al., 2021). Además, el extracto etanólico de las hojas de *A. muricata* junto con la doxorrubicina produjo un mayor efecto citotóxico contra las células de cáncer de mama murino 4T1 (Salsabila et al., 2021). Por último, el extracto de corteza de *A. muricata* mejoró la actividad de docetaxel en un 50% contra las células de cáncer de próstata humano DU-145 (Foster et al., 2020). Estos resultados sugieren la aplicabilidad del uso combinado de quimioterapia con nuestros extractos para potenciar los efectos antitumorales. Las posibles causas para justificar esta sinergia con el 5-FU podrían estar relacionadas con el efecto del extracto sobre diversos mecanismos de resistencia al 5-FU como el aumento de la producción de ROS (**Figura 21**) que se ha demostrado que aumenta la apoptosis del 5-FU (Vodenkova et al., 2020; Zhang et al., 2008), la clara disminución de

las CSC del colon (**Figura 22**), una población celular más resistente al 5-FU (Vodenkova et al., 2020; Zhang et al., 2008) y, finalmente, la posible inhibición de la glicoproteína P (P-gp), una importante bomba de eflujo asociada al desarrollo de resistencia a múltiples fármacos, incluido el 5-FU. De hecho, los extractos de la misma especie de nuestras plantas fueron capaces de bloquear la resistencia mediada por P-gp (Akinlolu et al., 2021; Jeevitha Priya et al., 2020; Kuete et al., 2016).

Finalmente, los extractos funcionales de las leguminosas *V. faba* var baraca (germinada), *V. narbonensis* y *Medicago sativa* y los extractos etanólicos de *Moringa oleifera*, *Tropaeolum tuberosum* y *Annona cherimola* fueron capaces de inducir actividad GST y QR que constituyen mecanismos de defensa contra la carcinogénesis química (Lee et al., 2021). De hecho, se ha reportado que algunas especies de leguminas como lentejas, guisantes y judías tienen la capacidad de inducir estas enzimas (Hodges and Minich, 2015). De igual forma destaca el extracto etanólico de *Moringa oleifera* que causó una mayor inducción de la actividad enzimática (tasa de inducción = $2,34 \pm 0,002$) en comparación con los otros extractos. Recientemente, Cuellar-Núñez et al., (2021) reportaron el efecto beneficioso del consumo de hojas de moringa oleifera en un modelo murino de colitis asociada al cáncer colorrectal al reducir la inflamación y elevar las actividades enzimáticas del hígado y las enzimas colónicas GST y NQO1. Asimismo, Famurewa et al., (2019) demostraron que el aceite de semilla de *Moringa oleifera* redujo la nefrotoxicidad in vivo y la hepatotoxicidad de

5-FU al modular tanto el desequilibrio redox como la vía de señalización iNOS/NF- κ B/caspasa-3, así como al aumentar la expresión de GSH.

El extracto etanólico de *Annona cherimola* produjo una mayor expresión QR (tasa de inducción = $2,51 \pm 0,02$) en comparación con el control del sulforafano y los otros extractos. Curiosamente, Ramos et al., (2021) informaron previamente que el extracto crudo y la fracción rica en polifenoles de la fruta *A. crassiflora* redujeron el daño oxidativo hepático en ratones hiperlipidémicos inducidos por Tritón WR-1339 al elevar los niveles de enzimas desintoxicantes como el glutatión. Aunque se necesitarán más estudios, nuestros resultados sugieren que los extractos etanólicos podrían desempeñar un papel importante en la prevención de la toxicidad de la quimioterapia en pacientes con cáncer.

Conclusiones

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 harina de semillas de leguminosas, de las especies *Moringa oleifera*, *Annona cherimola* y del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* condujo a la obtención de un producto rico en compuestos fenólicos tipo flavonoides, terpenoides, glicósidos o saponinas, por lo que es importante recalcar su potencial a nivel biológico y sus diversas propiedades nutricionales.
- 2) Los extractos funcionales de leguminosas y de las especies *Moringa oleifera*, *Annona cherimola* y *Tropaeolum tuberosum* presentaron una elevada actividad antioxidante tanto en las pruebas bioquímicas como en cultivos celulares de células de CCR HT-29.
- 3) Los extractos funcionales de algunas leguminosas y de las especies *Moringa oleifera*, *Annona cherimola* y *Tropaeolum tuberosum* a concentraciones no citotóxicas tuvieron un efecto sobre la actividad de las enzimas detoxificantes de fase II glutatión S transferasa y quinona oxidoreductasa aumentando su actividad en comparación con el control positivo (sulforafano).
- 4) Los hidrolizados proteicos de *V. faba* var baraca (germinada), *V. narbonensis* y los extractos etanólicos de *Moringa oleifera*, *Annona cherimola* y *Tropaeolum tuberosum* presentaron una elevada

actividad antitumoral en células de CCR tanto resistentes como no resistentes a la quimioterapia.

- 5) Los extractos etanólicos de *Moringa oleifera*, *Annona cherimola* y *Tropaeolum tuberosum* inhibieron la proliferación de la línea celular de CCR HCT-15 así como de sus MTSs cuando se emplean solos o en combinación con el agente quimioterapéutico 5-FU.
- 6) El mecanismo responsable de la actividad antitumoral que presentan los extractos etanólicos de *Moringa oleifera*, *Annona cherimola* y *Tropaeolum tuberosum* está mediado por aumento en la producción de ROS, activación de las caspasas y la consiguiente muerte celular por apoptosis y autofagia.
- 7) Los extractos etanólicos de *Moringa oleifera*, *Annona cherimola* y *Tropaeolum tuberosum* presentaron la capacidad de reducir la subpoblación de CSCs, las cuales están relacionadas con la recidiva y agresividad tumoral.

Bibliografía

7. Bibliografia

- Abubakar, A. R., and Haque, M. (2020). Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 12(1), 1. https://doi.org/10.4103/JPBS.JPBS_175_19
- Addai, S. N., Mshimesh, B. A. R., and Al-Shammari, A. M. (2021). Anti-proliferative activity of annona muricata seeds extracts against esophageal carcinoma within skg cell line. *International Journal of Drug Delivery Technology*, 11(1), 21–28. <https://doi.org/10.25258/ijddt.11.1.4>
- Adebayo, I. A., Balogun, W. G., and Arsad, H. (2017). Moringa oleifera: An apoptosis inducer in cancer cells. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 16(9), 2289. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v16i9.34>
- Aghabozorgi, A. S., Bahreyni, A., Soleimani, A., Bahrami, A., Khazaei, M., Ferns, G. A., Avan, A., and Hassanian, S. M. (2019). Role of adenomatous polyposis coli (APC) gene mutations in the pathogenesis of colorectal cancer; current status and perspectives. *Biochimie*, 157, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.11.003>
- Akinlolu, A. A., Oyewopo, A. O., Kadir, R. E., Lawal, A., Ademiloye, J., Jubril, A., Ameen, M. O., and Ebitto, G. E. (2021). Moringa oleifera and Musa sapientum ameliorated 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene-induced upregulations of Ki67 and multidrug resistance 1 genes in rats. *International Journal of Health Sciences*, 15(3), 26–33. [/pmc/articles/PMC8220645/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8220645/)

- Alam, M. N., Almoyad, M., and Huq, F. (2018). Polyphenols in Colorectal Cancer: Current State of Knowledge including Clinical Trials and Molecular Mechanism of Action. *BioMed Research International*, 2018, 1–29. <https://doi.org/10.1155/2018/4154185>
- American Cancer Society. (2021). *Colorectal Cancer Statistics*. https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/about/key-statistics.html?fbclid=IwARo8ToTMwokv_YnkmC3k3PFFiVKaoG4DOAkBB7YazACoCr_DgBYIoElz2sw
- American Joint Committee on Cancer. (2018). *Cancer Staging manual* (8th editio). American College of Surgeons.
- Amitay, E. L., Carr, P. R., Jansen, L., Roth, W., Alwers, E., Herpel, E., Kloor, M., Bläker, H., Chang-Claude, J., Brenner, H., and Hoffmeister, M. (2020). Smoking, alcohol consumption and colorectal cancer risk by molecular pathological subtypes and pathways. *British Journal of Cancer*, 122(11), 1604–1610. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0803-0>
- Ammoury, C., Younes, M., El Khoury, M., Hodroj, M. H., Haykal, T., Nasr, P., Sily, M., Taleb, R. I., Sarkis, R., Khalife, R., and Rizk, S. (2019). The pro-apoptotic effect of a Terpene-rich *Annona cherimola* leaf extract on leukemic cell lines. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1), 365. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2768-1>
- Andrade, J. M., Lucero Mosquera, H., and Armijos, C. (2017). Ethnobotany of Indigenous Saraguros: Medicinal Plants Used by Community Healers “Hampiyachakkuna” in the San Lucas Parish, Southern

- Ecuador. *BioMed Research International*, 2017.
<https://doi.org/10.1155/2017/9343724>
- Antony, P., and Vijayan, R. (2016). Acetogenins from *Annona muricata* as potential inhibitors of antiapoptotic proteins: A molecular modeling study. *Drug Design, Development and Therapy*, 10, 1399–1410.
<https://doi.org/10.2147/DDDT.S103216>
- Antosiak, A., Milowska, K., Maczynska, K., Rozalska, S., and Gabryelak, T. (2017). Cytotoxic activity of genistein-8-C-glucoside from *Lupinus luteus* L. and genistein against human SK-OV-3 ovarian carcinoma cell line. *Medicinal Chemistry Research*, 26(1), 64–73.
<https://doi.org/10.1007/s00044-016-1725-5>
- Apaza Ticona, L., Arnanz Sebastián, J., Serban, A. M., and Rumbero Sánchez, Á. (2020a). Alkaloids isolated from *Tropaeolum tuberosum* with cytotoxic activity and apoptotic capacity in tumour cell lines. *Phytochemistry*, 177, 112435.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112435>
- Apaza Ticona, L., Arnanz Sebastián, J., Serban, A. M., and Rumbero Sánchez, Á. (2020b). Alkaloids isolated from *Tropaeolum tuberosum* with cytotoxic activity and apoptotic capacity in tumour cell lines. *Phytochemistry*, 177, 112435.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112435>
- Apaza Ticona, L. N., Tena Pérez, V., and Bermejo Benito, P. (2020). Local/traditional uses, secondary metabolites and biological activities of Mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón). *Journal of*

Ethnopharmacology, 247, 112152.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112152>

Avato, P., Migoni, D., Argentieri, M., Fanizzi, F. P., and Tava, A. (2017).

Activity of Saponins from Medicago species Against HeLa and MCF-7 Cell Lines and their Capacity to Potentiate Cisplatin Effect. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 17(11).

<https://doi.org/10.2174/1871520617666170727152805>

Bailon-Moscoso, N., Romero-Benavides, J. C., Tinitana-Imaicela, F., and

Ostrosky-Wegman, P. (2015). Medicinal plants of Ecuador: A review of plants with anticancer potential and their chemical composition.

Medicinal Chemistry Research, 24(6), 2283–2296.

<https://doi.org/10.1007/s00044-015-1335-7>

Bao, J., Ding, R. B., Liang, Y., Liu, F., Wang, K., Jia, X., Zhang, C., Chen,

M., Li, P., Su, H., Wan, J. B., Wang, Y., and He, C. (2017). Differences in Chemical Component and Anticancer Activity of Green and Ripe

Forsythiae Fructus. *American Journal of Chinese Medicine*, 45(7),

1513–1536. <https://doi.org/10.1142/S0192415X17500823>

Baruah, T. J., Sharan, R. N., and Kma, L. (2018). Vicenin-2: a potential

radiosensitizer of non-small cell lung cancer cells. *Molecular Biology Reports*, 45(5), 1219–1225. [https://doi.org/10.1007/s11033-018-](https://doi.org/10.1007/s11033-018-4275-8)

4275-8

Baskaran, R., Pullencheri, D., and Somasundaram, R. (2016).

Characterization of free, esterified and bound phenolics in custard apple (*Annona squamosa* L) fruit pulp by UPLC-ESI-MS/MS. *Food*

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.02.001>

- Becker Pertuzatti, P., Teixeira Barcia, M., Gómez-Alonso, S., Teixeira Godoy, H., and Hermosin-Gutierrez, I. (2021). Phenolics profiling by HPLC-DAD-ESI-MSn aided by principal component analysis to classify Rabbiteye and Highbush blueberries. *Food Chemistry*, 340, 127958. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127958>
- Berkovich, L., Earon, G., Ron, I., Rimmon, A., Vexler, A., and Lev-Ari, S. (2013). Moringa Oleifera aqueous leaf extract down-regulates nuclear factor-kappaB and increases cytotoxic effect of chemotherapy in pancreatic cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 212. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-212>
- Bhadkaria, A., Srivastava, N., and Bhagyawant, S. S. (2021). A prospective of underutilized legume moth bean (*Vigna aconitifolia* (Jacq.) Marechàl): Phytochemical profiling, bioactive compounds and in vitro pharmacological studies. *Food Bioscience*, 42, 101088. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101088>
- Bhadresha, K. P., Jain, N. K., and Rawal, R. M. (2021). Assessing the Protective Effect of Moringa oleifera Extract against Bone Metastasis: An In Vitro Simulated Digestion Approach. *Nutrition and Cancer*, 1–14. <https://doi.org/10.1080/01635581.2021.1933099>
- Bhattacharya, S., and Malleshi, N. G. (2012). Physical, chemical and nutritional characteristics of premature-processed and matured green legumes. *Journal of Food Science and Technology*, 49(4), 459–466.

<https://doi.org/10.1007/s13197-011-0299-y>

Billir, L. H., and Schrag, D. (2021). Diagnosis and Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *JAMA*, 325(7), 669.

<https://doi.org/10.1001/jama.2021.0106>

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., and Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. In *LWT - Food Science and Technology* (Vol. 28, Issue 1, pp. 25–30). Academic Press.

[https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

Bucksch, K., Zachariae, S., Aretz, S., Büttner, R., Holinski-Feder, E., Holzapfel, S., Hüneburg, R., Kloor, M., von Knebel Doeberitz, M., Morak, M., Möslein, G., Nattermann, J., Perne, C., Rahner, N., Schmiegel, W., Schulmann, K., Steinke-Lange, V., Strassburg, C. P., Vangala, D. B., ... Engel, C. (2020). Cancer risks in Lynch syndrome, Lynch-like syndrome, and familial colorectal cancer type X: a prospective cohort study. *BMC Cancer*, 20(1), 460.

<https://doi.org/10.1186/s12885-020-06926-x>

Calvani, M., Pasha, A., and Favre, C. (2020). Nutraceutical Boom in Cancer: Inside the Labyrinth of Reactive Oxygen Species. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 1936.

<https://doi.org/10.3390/ijms21061936>

Calzada, F., Solares-Pascasio, J. I., Ordoñez-Razo, R. M., Velazquez, C., Barbosa, E., García-Hernández, N., Mendez-Luna, D., and Correa-Basurto, J. (2017). Antihyperglycemic activity of the leaves from *Annona cherimola* miller and rutin on alloxan-induced diabetic rats.

Pharmacognosy Research, 9(1), 1–6. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.199781>

Cancer Treatment Centers of America. (2020). *Colorectal cancer risk factors*.

Cao, X., Liu, L., Yuan, Q., Li, X., Cui, Y., Ren, K., Zou, C., Chen, A., Xu, C., Qiu, Y., Quan, M., Zhang, J., Cao, J., and Chen, X. (2019). Isoviteixin reduces carcinogenicity and stemness in hepatic carcinoma stem-like cells by modulating MnSOD and FoxM1. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 38(1), 264. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1244-6>

Caparica, R., Júlio, A., Araújo, M. E. M., Baby, A. R., Fonte, P., Costa, J. G., and Santos de Almeida, T. (2020). Anticancer Activity of Rutin and Its Combination with Ionic Liquids on Renal Cells. *Biomolecules*, 10(2), 233. <https://doi.org/10.3390/biom10020233>

Carpio, L. E., Sanz, Y., Gozalbes, R., and Barigye, S. J. (2021). Computational strategies for the discovery of biological functions of health foods, nutraceuticals and cosmeceuticals: a review. *Molecular Diversity*, 25(3), 1425–1438. <https://doi.org/10.1007/s11030-021-10277-5>

Castro, M., and Carrillo, C. (2018). Síndrome de Lynch: aspectos genéticos, clínicos y diagnósticos. *Revista de Gastroenterología Del Perú*, 38(3). http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1022-51292018000300008

Chakrabarti, S., Peterson, C. Y., Sriram, D., and Mahipal, A. (2020). Early

- stage colon cancer: Current treatment standards, evolving paradigms, and future directions. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, *12*(8), 808–832. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v12.i8.808>
- Chen, F., Chen, X., Yang, D., Che, X., Wang, J., Li, X., Zhang, Z., Wang, Q., Zheng, W., Wang, L., Wang, X., and Song, X. (2016). Isoquercitrin inhibits bladder cancer progression in vivo and in vitro by regulating the PI3K/Akt and PKC signaling pathways. *Oncology Reports*, *36*(1), 165–172. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4794>
- Chen, H., Liu, P., Zhang, T., Gao, Y., Zhang, Y., Shen, X., Li, X., and Shen, W. (2018). Effects of diphyllin as a novel V-ATPase inhibitor on TE-1 and ECA-109 cells. *Oncology Reports*, *39*(3), 921–928. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6191>
- Chen, J., Ding, L., Sui, X., Xia, Y., Wan, H., and Lu, T. (2016). Production of a bioactive sweetener steviolbioside via specific hydrolyzing ester linkage of stevioside with a β -galactosidase. *Food Chemistry*, *196*, 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.035>
- Chen, W., and Frankel, W. L. (2019). A practical guide to biomarkers for the evaluation of colorectal cancer. *Modern Pathology*, *32*(S1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41379-018-0136-1>
- Chirinos, R., Campos, D., Warnier, M., Pedreschi, R., Rees, J. F., and Larondelle, Y. (2008). Antioxidant properties of mashua (*Tropaeolum tuberosum*) phenolic extracts against oxidative damage using biological in vitro assays. *Food Chemistry*, *111*(1), 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.038>

- Cinar, I. (2020). Apoptosis-Inducing Activity and Antiproliferative Effect of Gossypin on PC-3 Prostate Cancer Cells. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 21(4), 445–450. <https://doi.org/10.2174/1871520620666200721103422>
- Cuellar-Núñez, M. L., Gonzalez de Mejia, E., and Loarca-Piña, G. (2021). Moringa oleifera leaves alleviated inflammation through downregulation of IL-2, IL-6, and TNF- α in a colitis-associated colorectal cancer model. *Food Research International*, 144, 110318. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110318>
- D'Souza, N., Georgiou Delisle, T., Chen, M., Benton, S., and Abulafi, M. (2021). Faecal immunochemical test is superior to symptoms in predicting pathology in patients with suspected colorectal cancer symptoms referred on a 2WW pathway: a diagnostic accuracy study. *Gut*, 70(6), 1130–1138. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-321956>
- Das, S., Teja, K. C., Mukherjee, S., Seal, S., Sah, R. K., Duary, B., Kim, K.-H., and Bhattacharya, S. S. (2018). Impact of edaphic factors and nutrient management on the hepatoprotective efficiency of Carlinoside purified from pigeon pea leaves: An evaluation of UGT1A1 activity in hepatitis induced organelles. *Environmental Research*, 161, 512–523. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.11.054>
- Del Pino-García, R., Rico, D., and Martín-Diana, A. B. (2018). Evaluation of bioactive properties of Vicia narbonensis L. as potential flour ingredient for gluten-free food industry. *Journal of Functional Foods*, 47, 172–183. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.05.049>

- Dewanto, V., Xianzhong, W., Adom, K. K., and Liu, R. H. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(10), 3010–3014. <https://doi.org/10.1021/jf0115589>
- Ding, S., Xu, S., Fang, J., and Jiang, H. (2020). The Protective Effect of Polyphenols for Colorectal Cancer. *Frontiers in Immunology*, *11*, 1407. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01407>
- Dominguez-Valentin, M., Seppälä, T. T., Sampson, J. R., Macrae, F., Winship, I., Evans, D. G., Scott, R. J., Burn, J., Möslein, G., Bernstein, I., Pylvänäinen, K., Renkonen-Sinisalo, L., Lepistö, A., Lindblom, A., Plazzer, J.-P., Tjandra, D., Thomas, H., Green, K., Lalloo, F., ... Møller, P. (2019). Survival by colon cancer stage and screening interval in Lynch syndrome: a prospective Lynch syndrome database report. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*, *17*(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s13053-019-0127-3>
- Dong, P. L., Gao, Z. L., Yin, X., Li, Z. Q., and Han, H. (2021). Hepatoprotective activity assessment of amino acids derivatives of picroside I and II. *Chemical Biology and Drug Design*, *97*(2), 341–348. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13786>
- Dong, Z., Lu, X., Tong, X., Dong, Y., Tang, L., and Liu, M. (2017). Forsythiae Fructus: A review on its phytochemistry, quality control, pharmacology and pharmacokinetics. *Molecules*, *22*(9), 1466. <https://doi.org/10.3390/molecules22091466>
- Du, G. J., Zhang, Z., Wen, X. D., Yu, C., Calway, T., Yuan, C. S., and Wang,

- C. Z. (2012). Epigallocatechin gallate (EGCG) is the most effective cancer chemopreventive polyphenol in green tea. *Nutrients*, *4*(11), 1679–1691. <https://doi.org/10.3390/nu4111679>
- Du, G., Xiao, M., Chen, B., Wang, A., Zhu, Q., and Cai, W. (2021). Metabolic profiling reveals alterations in the erythrocyte response to fava bean ingestion in G6PD-deficient mice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *101*(4), 1562–1571. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10775>
- El-Feky, A. M., Elbatanony, M. M., and Mounier, M. M. (2018). Anti-cancer potential of the lipoidal and flavonoidal compounds from *Pisum sativum* and *Vicia faba* peels. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, *5*(4), 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.ejbas.2018.11.001>
- Enogieru, A. B., Haylett, W., Hiss, D. C., Bardien, S., and Ekpo, O. E. (2018). Rutin as a Potent Antioxidant: Implications for Neurodegenerative Disorders. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2018*, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2018/6241017>
- Eskandrani, A. A. (2021). Effect of supplementing fava bean (*Vicia faba* L.) on ulcerative colitis and colonic mucosal DNA content in rats fed a high-sucrose diet. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *28*(6), 3497–3504. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.03.017>
- Espinoza Silva, C. R. (2019). Evaluación invitro de la citotoxicidad de extractos fenólicos de pétalos de flores anaranjadas de *Tropaeolum majus* L en líneas celulares cancerígenas de mama. In *Universidad Peruana Los Andes*. Universidad Peruana Los Andes.
- European Cancer Information System. (2021). *Colorectal cancer burden in*

EU-27. <https://ecis.jrc.ec.europa.eu/>

- Famurewa, A. C., Asogwa, N. T., Aja, P. M., Akunna, G. G., Awoke, J. N., Ekeleme-Egedigwe, C. A., Maduagwuna, E. K., Folawiyo, A. M., Besong, E. E., Ekpono, E. U., and Nwoha, P. A. (2019). Moringa oleifera seed oil modulates redox imbalance and iNOS/NF- κ B/caspase-3 signaling pathway to exert antioxidant, anti-inflammatory and antiapoptotic mechanisms against anticancer drug 5-fluorouracil-induced nephrotoxicity in rats. *South African Journal of Botany*, *127*, 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.08.038>
- Fan, D., Parhira, S., Zhu, G. Y., Jiang, Z. H., and Bai, L. P. (2016). Triterpenoids from the stems of *Tripterygium regelii*. *Fitoterapia*, *113*, 69–73. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.07.006>
- Fan, X. H., Zhang, Q. A., Yan, Y. Y., and Tian, C. R. (2017). Las propiedades fisicoquímicas y la capacidad antioxidante in vitro del vino de Semen Astragali Complanati. *CYTA - Journal of Food*, *15*(1), 81–90. <https://doi.org/10.1080/19476337.2016.1215350>
- Farag, M. A., Sharaf El-Din, M. G., Aboul-Fotouh Selim, M., Owis, A. I., and Abouzid, S. F. (2021). Mass spectrometry-based metabolites profiling of nutrients and anti-nutrients in major legume sprouts. *Food Bioscience*, *39*, 100800. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100800>
- Fernandes, M. S., Sanches, J. M., and Seruca, R. (2019). Targeting the PI3K Signalling as a Therapeutic Strategy in Colorectal Cancer. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1110, pp. 35–53). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-02771-1_4

- Foster, K., Oyenih, O., Rademan, S., Erhabor, J., Matsabisa, M., Barker, J., Langat, M. K., Kendal-Smith, A., Asemota, H., and Delgoda, R. (2020). Selective cytotoxic and anti-metastatic activity in DU-145 prostate cancer cells induced by *Annona muricata* L. bark extract and phytochemical, annonacin. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20(1), 375. <https://doi.org/10.1186/s12906-020-03130-z>
- Gao, P., Bian, J., Xu, S., Liu, C., Sun, Y., Zhang, G., Li, D., and Liu, X. (2020). Structural features, selenization modification, antioxidant and anti-tumor effects of polysaccharides from alfalfa roots. *International Journal of Biological Macromolecules*, 149, 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.239>
- Gill, B. S., Navgeet, and Kumar, S. (2016). Ganoderic acid targeting multiple receptors in cancer: in silico and in vitro study. *Tumor Biology*, 37(10), 14271–14290. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5291-8>
- Gogenur, I., and Qvortrup, C. (2021). Colorectal cancer screening in Europe: what are the next steps? *The Lancet Oncology*, 22(7), 898–899. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(21\)00276-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(21)00276-X)
- Govindarasu, M., Ganeshan, S., Ansari, M. A., Alomary, M. N., AlYahya, S., Alghamdi, S., Almeahadi, M., Rajakumar, G., Thiruvengadam, M., and Vaiyapuri, M. (2021). In silico modeling and molecular docking insights of kaempferitrin for colon cancer-related molecular targets. *Journal of Saudi Chemical Society*, 25(9), 101319. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2021.101319>

- Grela, E. R., Samolińska, W., Rybiński, W., Kiczorowska, B., Kowalczuk-Vasilev, E., Matras, J., and Wesołowska, S. (2020). Nutritional and Anti-Nutritional Factors in *Vicia sativa* L. Seeds and the Variability of Phenotypic and Morphological Characteristics of Some Vetch Accessions Cultivated in European Countries. *Animals*, 11(1), 44. <https://doi.org/10.3390/ani11010044>
- Gupta, S., and Gupta, P. (2020). The genus *Calophyllum*: Review of ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacology. *Bioactive Natural Products in Drug Discovery*, 215–242. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1394-7_5
- Hahn, S., and Hermeking, H. (2014). ZNF281/ZBP-99: a new player in epithelial–mesenchymal transition, stemness, and cancer. *Journal of Molecular Medicine*, 92(6), 571–581. <https://doi.org/10.1007/s00109-014-1160-3>
- Hammond, W. A., Swaika, A., and Mody, K. (2016). Pharmacologic resistance in colorectal cancer: a review. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 8(1), 57–84. <https://doi.org/10.1177/1758834015614530>
- Hankey, W., Frankel, W. L., and Groden, J. (2018). Functions of the APC tumor suppressor protein dependent and independent of canonical WNT signaling: implications for therapeutic targeting. *Cancer and Metastasis Reviews*, 37(1), 159–172. <https://doi.org/10.1007/s10555-017-9725-6>
- Haykal, T., Nasr, P., Hodroj, M. H., Taleb, R. I., Sarkis, R., Moujabber, M.

- N. El, and Rizk, S. (2019). Annona cherimola seed extract activates extrinsic and intrinsic apoptotic pathways in leukemic cells. *Toxins*, *11*(9), 506. <https://doi.org/10.3390/toxins11090506>
- Henc, I., Kokotkiewicz, A., Łuczkiwicz, P., Bryl, E., Łuczkiwicz, M., and Witkowski, J. M. (2017). Naturally occurring xanthone and benzophenone derivatives exert significant anti-proliferative and proapoptotic effects in vitro on synovial fibroblasts and macrophages from rheumatoid arthritis patients. *International Immunopharmacology*, *49*, 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.05.034>
- Herrero de la Parte, B., Rodeño-Casado, M., Iturrizaga Correcher, S., Mar Medina, C., and García-Alonso, I. (2021). Curcumin reduces colorectal cancer cell proliferation and migration and slows in vivo growth of liver metastases in rats. *Biomedicines*, *9*(9), 1183. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9091183>
- Hnatyszyn, A., Hryhorowicz, S., Kaczmarek-Ryś, M., Lis, E., Słomski, R., Scott, R. J., and Pławski, A. (2019). Colorectal carcinoma in the course of inflammatory bowel diseases. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*, *17*(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s13053-019-0118-4>
- Hodges, R. E., and Minich, D. M. (2015). Modulation of Metabolic Detoxification Pathways Using Foods and Food-Derived Components: A Scientific Review with Clinical Application. *Journal of Nutrition and Metabolism*, *2015*, 1–23. <https://doi.org/10.1155/2015/760689>
- Holch, J. W., Demmer, M., Lamersdorf, C., Michl, M., Schulz, C., von

- Einem, J. C., Modest, D. P., and Heinemann, V. (2017). Pattern and Dynamics of Distant Metastases in Metastatic Colorectal Cancer. *Visceral Medicine*, *33*(1), 70–75. <https://doi.org/10.1159/000454687>
- Hsu, S. J., Verpoorte, R., Lin, S. M., and Lee, C. K. (2021). Fast dereplication of xanthine oxidase-inhibiting compounds in alfalfa using comparative metabolomics. *Food Research International*, *141*, 110170. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110170>
- Hu, T., Liu, Q.-M., He, X.-W., Huang, F., Zhang, M.-W., and Jiang, J.-G. (2017). Identification of bioactives from *Astragalus chinensis* L.f. and their antioxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative effects. *Journal of Food Science and Technology* 2017 *54*:13, *54*(13), 4315–4323. <https://doi.org/10.1007/S13197-017-2902-3>
- Hull, M. A., Rees, C. J., Sharp, L., and Koo, S. (2020). A risk-stratified approach to colorectal cancer prevention and diagnosis. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *17*(12), 773–780. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00368-3>
- Iriti, M., Kubina, R., Cochis, A., Sorrentino, R., Varoni, E. M., Kabała-Dzik, A., Azzimonti, B., Dziedzic, A., Rimondini, L., and Wojtyczka, R. D. (2017). Rutin, a Quercetin Glycoside, Restores Chemosensitivity in Human Breast Cancer Cells. *Phytotherapy Research*, *31*(10), 1529–1538. <https://doi.org/10.1002/ptr.5878>
- Jeevitha Priya, M., Vidyalakshmi, S., and Rajeswari, M. (2020). Study on reversal of ABCB1 mediated multidrug resistance in Colon cancer by acetogenins: An in - silico approach. *Journal of Biomolecular*

<https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1855249>

Jeun, M., Lee, H. J., Park, S., Do, E., Choi, J., Sung, Y.-N., Hong, S.-M., Kim, S., Kim, D.-H., Kang, J. Y., Son, H.-N., Joo, J., Song, E. M., Hwang, S. W., Park, S. H., Yang, D., Ye, B. D., Byeon, J.-S., Choe, J., ... Myung, S.-J. (2019). A Novel Blood-Based Colorectal Cancer Diagnostic Technology Using Electrical Detection of Colon Cancer Secreted Protein-2. *Advanced Science*, 6(11), 1802115. <https://doi.org/10.1002/advs.201802115>

Jung, Y. S., and Park, J. Il. (2020). Wnt signaling in cancer: therapeutic targeting of Wnt signaling beyond β -catenin and the destruction complex. *Experimental and Molecular Medicine*, 52(2), 183–191. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0380-6>

Justino, A. B., Franco, R. R., Silva, H. C. G., Saraiva, A. L., Sousa, R. M. F., and Espindola, F. S. (2019). B procyanidins of *Annona crassiflora* fruit peel inhibited glycation, lipid peroxidation and protein-bound carbonyls, with protective effects on glycated catalase. *Scientific Reports*, 9(1), 19183. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55779-3>

Kapavelou, G., Martínez, R., Andrade, A. M., López Chaves, C., 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>

- Kasi, A., Handa, S., Bhatti, S., Umar, S., Bansal, A., and Sun, W. (2020). Molecular Pathogenesis and Classification of Colorectal Carcinoma. *Current Colorectal Cancer Reports*, 16(5), 97–106. <https://doi.org/10.1007/s11888-020-00458-z>
- Katanić, J., Pferschy-Wenzig, E.-M., Mihailović, V., Boroja, T., Pan, S.-P., Nikles, S., Kretschmer, N., Rosić, G., Selaković, D., Joksimović, J., and Bauer, R. (2018). Phytochemical analysis and anti-inflammatory effects of *Filipendula vulgaris* Moench extracts. *Food and Chemical Toxicology*, 122, 151–162. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.10.001>
- Kedare, S. B., and Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412–422. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>
- Kesinger, N. G., and Stevens, J. F. (2009). Covalent interaction of ascorbic acid with natural products. *Phytochemistry*, 70(17–18), 1930–1939. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.09.028>
- Khalil, M., Khalifeh, H., Baldini, F., Serale, N., Parodi, A., Voci, A., Vergani, L., and Daher, A. (2020). Antitumor Activity of Ethanolic Extract from *Thymbra Spicata* L. aerial Parts: Effects on Cell Viability and Proliferation, Apoptosis Induction, STAT3, and NF-κB Signaling. *Nutrition and Cancer*, 73(7), 1–14. <https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1792517>
- Kim, B., Kim, J. M., Kang, G. H., Chang, H. J., Kang, D. W., Kim, J. H., Bae,

- J. M., Seo, A. N., Park, H. S., Kang, Y. K., Lee, K.-H., Cho, M. Y., Do, I.-G., Lee, H. S., Chang, H. K., Park, D. Y., Kang, H. J., Sohn, J. H., Chang, M. S., ... Kim, Y. W. (2020). Standardized Pathology Report for Colorectal Cancer, 2nd Edition. *Journal of Pathology and Translational Medicine*, *54*(1), 1–19.
<https://doi.org/10.4132/jptm.2019.09.28>
- Kim, I.-S., Yang, W.-S., and Kim, C.-H. (2021). Beneficial Effects of Soybean-Derived Bioactive Peptides. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(16), 8570.
<https://doi.org/10.3390/ijms22168570>
- Kim, Y., Je, Y., and Giovannucci, E. L. (2019). Association between Alcohol Consumption and Survival in Colorectal Cancer: A Meta-analysis. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, *28*(11), 1891–1901.
<https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-19-0156>
- Kobbi, S., Nedjar, N., Chihib, N., Balti, R., Chevalier, M., Silvain, A., Chaabouni, S., Dhulster, P., and Bougatef, A. (2018). Synthesis and antibacterial activity of new peptides from Alfalfa RuBisCO protein hydrolysates and mode of action via a membrane damage mechanism against *Listeria innocua*. *Microbial Pathogenesis*, *115*, 41–49.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.009>
- Kou, X., Li, B., Olayanju, J., Drake, J., and Chen, N. (2018). Nutraceutical or Pharmacological Potential of *Moringa oleifera* Lam. *Nutrients*, *10*(3), 343. <https://doi.org/10.3390/nu10030343>
- Koveitypour, Z., Panahi, F., Vakilian, M., Peymani, M., Seyed Forootan, F.,

- Nasr Esfahani, M. H., and Ghaedi, K. (2019). Signaling pathways involved in colorectal cancer progression. *Cell & Bioscience*, 9(1), 97. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0361-4>
- Kubina, R., Iriti, M., and Kabała-Dzik, A. (2021). Anticancer potential of selected flavonols: Fisetin, kaempferol, and quercetin on head and neck cancers. *Nutrients*, 13(3), 1–20. <https://doi.org/10.3390/nu13030845>
- Kuete, V., Dzutam, J. K., Voukeng, I. K., Fankam, A. G., and Efferth, T. (2016). Cytotoxicity of methanol extracts of *Annona muricata*, *Passiflora edulis* and nine other Cameroonian medicinal plants towards multi-factorial drug-resistant cancer cell lines. *SpringerPlus*, 5(1), 1666. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3361-4>
- 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(1), 15065. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.65>
- Kuppusamy, P., Yusoff, M. M., Maniam, G. P., Ichwan, S. J. A., Soundharrajan, I., and Govindan, N. (2014). Nutraceuticals as potential therapeutic agents for colon cancer: a review. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 4(3), 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2014.04.002>
- Kuruppu, A. I., Paranagama, P., and Goonasekara, C. L. (2019). Medicinal plants commonly used against cancer in traditional medicine formulae in Sri Lanka. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27(4), 565–

573. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2019.02.004>

- Lanza, A., Tava, A., Catalano, M., Ragona, L., Singuaroli, I., Robustelli Della Cuna, F. S., and Robustelli Della Cuna, G. (2004). Effects of the Medicago scutellata Trypsin Inhibitor (MsTI) on Cisplatin-induced Cytotoxicity in Human Breast and Cervical Cancer Cells. *Anticancer Research*, 24(1), 227–233. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15015601/>
- Lee, D. Y., Song, M. Y., and Kim, E. H. (2021). Role of oxidative stress and nrf2/keap1 signaling in colorectal cancer: Mechanisms and therapeutic perspectives with phytochemicals. *Antioxidants*, 10(5), 743. <https://doi.org/10.3390/antiox10050743>
- Li, B., Tao, W., Zheng, C., Shar, P. A., Huang, C., Fu, Y., and Wang, Y. (2014). Systems pharmacology-based approach for dissecting the addition and subtraction theory of traditional Chinese medicine: An example using Xiao-Chaihu-Decoction and Da-Chaihu-Decoction. *Computers in Biology and Medicine*, 53, 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.compbimed.2014.05.007>
- Li, K., Luo, H., Huang, L., Luo, H., and Zhu, X. (2020). Microsatellite instability: a review of what the oncologist should know. *Cancer Cell International*, 20(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-1091-8>
- Li, P., Jia, J., Zhang, D., Xie, J., Xu, X., and Wei, D. (2014). In vitro and in vivo antioxidant activities of a flavonoid isolated from celery (*Apium graveolens* L. var. dulce). *Food Funct.*, 5(1), 50–56. <https://doi.org/10.1039/C3FO60273G>

- Li, Y., Lu, X., Tian, P., Wang, K., and Shi, J. (2021). Procyanidin B2 induces apoptosis and autophagy in gastric cancer cells by inhibiting Akt/mTOR signaling pathway. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 21(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12906-021-03225-1>
- Lin, T.-C., Chien, W.-C., Hu, J.-M., Tzeng, N.-S., Chung, C.-H., Pu, T.-W., Hsiao, C.-W., and Chen, C.-Y. (2020). Risk of colorectal cancer in patients with alcoholism: A nationwide, population-based nested case-control study. *PLOS ONE*, 15(5), e0232740. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232740>
- Lin, X., Wu, L., Wang, X., Yao, L., and Wang, L. (2021). Ultrasonic-assisted extraction for flavonoid compounds content and antioxidant activities of India *Moringa oleifera* L. leaves: Simultaneous optimization, HPLC characterization and comparison with other methods. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 20, 100284. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2020.100284>
- Liu, L.-F., Li, W.-H., Li, M.-Y., Wu, X.-Z., Yang, F., Xu, J.-N., and Yuan, C.-S. (2020). Chemical constituents from common vetch (*Vicia sativa* L.) and their antioxidant and cytotoxic activities. *Natural Product Research*, 34(22), 3205–3211. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1560282>
- Liu, X., Jiang, Q., Liu, H., and Luo, S. (2019). Vitexin induces apoptosis through mitochondrial pathway and PI3K/Akt/mTOR signaling in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Biological Research*, 52(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0214-y>

- Malki, A., ElRuz, R. A., Gupta, I., Allouch, A., Vranic, S., and Al Moustafa, A.-E. (2021). Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 130.
<https://doi.org/10.3390/ijms22010130>
- Mao, R., Krautscheid, P., Graham, R. P., Ganguly, A., Shankar, S., Ferber, M., and Hegde, M. (2021). Genetic testing for inherited colorectal cancer and polyposis, 2021 revision: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genetics in Medicine*, 23(10), 1807–1817.
<https://doi.org/10.1038/s41436-021-01207-9>
- Marathe, S. A., Rajalakshmi, V., Jamdar, S. N., and Sharma, A. (2011). Comparative study on antioxidant activity of different varieties of commonly consumed legumes in India. *Food and Chemical Toxicology*, 49(9), 2005–2012.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.04.039>
- Martínez, R., López-Jurado, M., Wanden-Berghe, C., Sanz-Valero, J., Porres, J. M., and Kapravelou, G. (2016). Beneficial effects of legumes on parameters of the metabolic syndrome: a systematic review of trials in animal models. *British Journal of Nutrition*, 116(3), 402–424.
<https://doi.org/10.1017/S0007114516001963>
- Mayer Labba, I.-C., Frøkiær, H., and Sandberg, A.-S. (2021). Nutritional and antinutritional composition of fava bean (*Vicia faba* L., var. minor) cultivars. *Food Research International*, 140, 110038.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110038>

Mbaveng, A. T., Ndontsa, B. L., Kuete, V., Nguekeu, Y. M. M., Çelik, İ., Mbouangouere, R., Tane, P., and Efferth, T. (2018). A naturally occurring triterpene saponin ardisiacrispin B displayed cytotoxic effects in multi-factorial drug resistant cancer cells via ferroptotic and apoptotic cell death. *Phytomedicine*, *43*, 78–85.

<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.03.035>

Meng, L., Lozano, Y., Bombarda, I., Gaydou, E. M., and Li, B. (2009). Polyphenol extraction from eight *Perilla frutescens* cultivars. *Comptes Rendus Chimie*, *12*(5), 602–611.

<https://doi.org/10.1016/j.crci.2008.04.011>

Mesas, C., Martínez, R., Ortíz, R., Galisteo, M., López-Jurado, M., Cabeza, L., Perazzoli, G., Melguizo, C., Porres, J. M., and Prados, J. (2021). Antitumor Effect of the Ethanolic Extract from Seeds of *Euphorbia lathyris* in Colorectal Cancer. *Nutrients*, *13*(2), 566.

<https://doi.org/10.3390/nu13020566>

Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., and Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, *84*(4), 407–412.

<https://doi.org/10.1042/cs0840407>

Moghadamtousi, S. Z., Fadaeinasab, M., Nikzad, S., Mohan, G., Ali, H. M., and Kadir, H. A. (2015). *Annona muricata* (Annonaceae): A review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities.

- International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), 15625–15658.
<https://doi.org/10.3390/ijms160715625>
- Mohd Fisall, U. F., Ismail, N. Z., Adebayo, I. A., and Arsad, H. (2021). Dichloromethane fraction of *Moringa oleifera* leaf methanolic extract selectively inhibits breast cancer cells (MCF7) by induction of apoptosis via upregulation of Bax, p53 and caspase 8 expressions. *Molecular Biology Reports*, 48(5), 4465–4475.
<https://doi.org/10.1007/s11033-021-06466-y>
- Müller, A., Ganzera, M., and Stuppner, H. (2006). Analysis of phenolic glycosides and saponins in *Primula elatior* and *Primula veris* (primula root) by liquid chromatography, evaporative light scattering detection and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1112(1–2), 218–223. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.10.067>
- Murphy, N., Moreno, V., Hughes, D. J., Vodicka, L., Vodicka, P., Aglago, E. K., Gunter, M. J., and Jenab, M. (2019). Lifestyle and dietary environmental factors in colorectal cancer susceptibility. *Molecular Aspects of Medicine*, 69, 2–9.
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.06.005>
- Nakayama, T., Suzuki, H., and Nishino, T. (2003). Anthocyanin acyltransferases: Specificities, mechanism, phylogenetics, and applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 23(2–6), 117–132. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(03\)00078-X](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(03)00078-X)
- Nugraha, A. S., Damayanti, Y. D., Wangchuk, P., and Keller, P. A. (2019). Anti-Infective and Anti-Cancer Properties of the *Annona* Species:

- Their Ethnomedicinal Uses, Alkaloid Diversity, and Pharmacological Activities. *Molecules*, 24(23), 4419.
<https://doi.org/10.3390/molecules24234419>
- Núñez-iglesias, M. J., Novio, S., García, C., Pérez-muñuzuri, M. E., Martínez, M. C., Santiago, J. L., Boso, S., Gago, P., and Freire-garabal, M. (2021). Co-adjuvant therapy efficacy of catechin and procyanidin B2 with docetaxel on hormone-related cancers in vitro. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 7178.
<https://doi.org/10.3390/ijms22137178>
- Nur, K. A., Putri, H., Cahyani, F. M., Katarina, A., Susidarti, R. A., and Meiyanto, E. (2010). Ethanolic Extract of *Moringa oleifera* L. Increases Sensitivity of WiDr Colon Cancer Cell Line Towards 5-Fluorouracil. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, 1(2), 124-128. <https://doi.org/10.14499/indonesianjcanchemopreviiss2pp124-128>
- Nuzzo, G., Gomes, B., Gallo, C., Amodeo, P., Sansone, C., Pessoa, O., Manzo, E., Vitale, R., Ianora, A., Santos, E., Costa-Lotufu, L., and Fontana, A. (2019). Potent Cytotoxic Analogs of Amphidinolides from the Atlantic Octocoral *Stragulum bicolor*. *Marine Drugs*, 17(1), 58.
<https://doi.org/10.3390/md17010058>
- Okba, M. M., Abdel Jaleel, G. A., Yousif, M. F., El Deeb, K. S., and Soliman, F. M. (2017). *Vicia ervilia* L. seeds newly explored biological activities. *Cogent Biology*, 3(1), 1299612.
<https://doi.org/10.1080/23312025.2017.1299612>

- Olatunde, O. O., Benjakul, S., Huda, N., Zhang, B., and Deng, S. (2021). Ethanolic Noni (*Morinda citrifolia* L.) leaf extract dechlorophyllised using sedimentation process: Antioxidant, antibacterial properties and efficacy in extending the shelf-life of striped catfish slices. *International Journal of Food Science and Technology*, *56*(6), 2804–2819. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14917>
- Olsson, M. E., Ekvall, J., Gustavsson, K. E., Nilsson, J., Pillai, D., Sjöholm, I., Svensson, U., Åkesson, B., and Nyman, M. G. L. (2004). Antioxidants, Low Molecular Weight Carbohydrates, and Total Antioxidant Capacity in Strawberries (*Fragaria x ananassa*): Effects of Cultivar, Ripening, and Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(9), 2490–2498. <https://doi.org/10.1021/jf030461e>
- Omar, A., Kalra, R. S., Putri, J., Elwakeel, A., Kaul, S. C., and Wadhwa, R. (2020). Soyasapogenol-A targets CARF and results in suppression of tumor growth and metastasis in p53 compromised cancer cells. *Scientific Reports*, *10*(1), 6323. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62953-5>
- Oomah, B. D., Luc, G., Leprelle, C., Drover, J. C. G., Harrison, J. E., and Olson, M. (2011). Phenolics, Phytic Acid, and Phytase in Canadian-Grown Low-Tannin Faba Bean (*Vicia faba* L.) Genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(8), 3763–3771. <https://doi.org/10.1021/jf200338b>
- Organización Panamericana de la Salud. (2021). *Perfiles de país sobre cáncer*, 2020.

https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=15716:country-cancer-profiles-2020&Itemid=72576&lang=es

- Pandurangi, R. S., Karwa, A., Sagaram, U. S., and Shah, D. (2021). Medicago Sativa Defensin 1 (MsDef1), A Natural Tumor Targeted Sensitizer for Improving Chemotherapy: Translation from Anti-Fungal Agent to Potential Anti-Cancer Agent. *BioRxiv*, 2021.02.13.431112. <https://doi.org/10.1101/2021.02.13.431112>
- Panic, N., Nedovic, D., Pastorino, R., Boccia, S., and Leoncini, E. (2017). Carotenoid intake from natural sources and colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *European Journal of Cancer Prevention*, 26(1), 27–37. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000251>
- Patel, R., McGinty, P., Cuthill, V., Hawkins, M., Moorghen, M., Clark, S. K., and Latchford, A. (2020). MUTYH -associated polyposis – colorectal phenotype and management. *Colorectal Disease*, 22(10), 1271–1278. <https://doi.org/10.1111/codi.15078>
- Pećina-Šlaus, N., Kafka, A., Salamon, I., and Bukovac, A. (2020). Mismatch Repair Pathway, Genome Stability and Cancer. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, 122. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00122>
- Plumb, G. W., Price, K. R., Rhodes, M. J. C., and Williamson, G. (1997). Antioxidant properties of the major polyphenolic compounds in broccoli. *Free Radical Research*, 27(4), 429–435. <https://doi.org/10.3109/10715769709065782>

- Pretzsch, E., Bösch, F., Neumann, J., Ganschow, P., Bazhin, A., Guba, M., Werner, J., and Angele, M. (2019). Mechanisms of Metastasis in Colorectal Cancer and Metastatic Organotropism: Hematogenous versus Peritoneal Spread. *Journal of Oncology*, 2019, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2019/7407190>
- Priego-Poyato, S., Rodrigo-Garcia, M., Escudero-Feliu, J., Garcia-Costela, M., Lima-Cabello, E., Carazo-Gallego, A., Morales-Santana, S., Leon, J., and C. Jimenez-Lopez, J. (2021). Current Advances Research in Nutraceutical Compounds of Legumes, Pseudocereals and Cereals. In *Grain and Seed Proteins Functionality*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.97782>
- Qin, J. J., Sarkar, S., Voruganti, S., Agarwal, R., Wang, W., and Zhang, R. (2016). Identification of lineariifolianoid A as a novel dual NFAT1 and MDM2 inhibitor for human cancer therapy. *Journal of Biomedical Research*, 30(4), 322–333. <https://doi.org/10.7555/JBR.30.20160018>
- Rady, I., Bloch, M. B., Chamcheu, R.-C. N., Banang Mbeumi, S., Anwar, M. R., Mohamed, H., Babatunde, A. S., Kuate, J.-R., Noubissi, F. K., El Sayed, K. A., Whitfield, G. K., and Chamcheu, J. C. (2018). Anticancer Properties of Graviola (*Annona muricata*): A Comprehensive Mechanistic Review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 1–39. <https://doi.org/10.1155/2018/1826170>
- Raeeszadeh, M., Moradi, M., Ayar, P., and Akbari, A. (2021). The Antioxidant Effect of *Medicago sativa* L. (Alfalfa) Ethanolic Extract

- against Mercury Chloride (HgCl₂) Toxicity in Rat Liver and Kidney: An In Vitro and In Vivo Study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, 1–10.
<https://doi.org/10.1155/2021/8388002>
- Ramli, A. N. M., Badruzaman, S. Z. S., Hamid, H. A., and Bhuyar, P. (2021). Antibacterial and antioxidative activity of the essential oil and seed extracts of *Artocarpus heterophyllus* for effective shelf-life enhancement of stored meat. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(1), 14993. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14993>
- Ramos, L. P. A., Justino, A. B., Tavernelli, N., Saraiva, A. L., Franco, R. R., de Souza, A. V., Silva, H. C. G., de Moura, F. B. R., Botelho, F. V., and Espindola, F. S. (2021). Antioxidant compounds from *Annona crassiflora* fruit peel reduce lipid levels and oxidative damage and maintain the glutathione defense in hepatic tissue of Triton WR-1339-induced hyperlipidemic mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 142, 112049. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112049>
- Rampado, R., Crotti, S., Caliceti, P., Pucciarelli, S., and Agostini, M. (2019). Nanovectors Design for Theranostic Applications in Colorectal Cancer. *Journal of Oncology*, 2019, 1–27. <https://doi.org/10.1155/2019/2740923>
- Rana, A., Rana, S., Majeed, R., Singh, H. P., Gulati, A., Hamid, A., Vyas, D., and Dhyani, D. (2014). Comparative studies for screening of bioactive constituents from various parts of *Incarvillea emodi*. *Natural Product*

Research, 28(8), 593–596.

<https://doi.org/10.1080/14786419.2014.886207>

Raphaelli, C. de O., Azevedo, J. G., Pereira, E. dos S., Vinholes, J. R., Camargo, T. M., Hoffmann, J. F., Ribeiro, J. A., Vizzotto, M., Rombaldi, C. V., Wink, M. R., Braganhol, E., and Nora, L. (2021). Phenolic-rich apple extracts have photoprotective and anti-cancer effect in dermal cells. *Phytomedicine Plus*, 1(4), 100112. <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2021.100112>

Rasmussen, S., Larsen, P. V., Søndergaard, J., Elnegaard, S., Svendsen, R. P., and Jarbøl, D. E. (2015). Specific and non-specific symptoms of colorectal cancer and contact to general practice. *Family Practice*, 32(4), cmv032. <https://doi.org/10.1093/fampra/cmv032>

Redondo-Blanco, S., Fernández, J., Gutiérrez-del-Río, I., Villar, C. J., and Lombó, F. (2017). New Insights toward Colorectal Cancer Chemotherapy Using Natural Bioactive Compounds. *Frontiers in Pharmacology*, 8(MAR), 109. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00109>

Ren, Y., De Blanco, E. J. C., Fuchs, J. R., Soejarto, D. D., Burdette, J. E., Swanson, S. M., and Kinghorn, A. D. (2019). Potential Anticancer Agents Characterized from Selected Tropical Plants. *Journal of Natural Products*, 82(3), 657–679. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00018>

Ruiz, R. G., Price, K., Rose, M., Rhodes, M., and Fenwick, R. (1996). A preliminary study on the effect of germination on saponin content and

- composition of lentils and chickpeas. *Zeitschrift Fur Lebensmittel - Untersuchung Und -Forschung*, 203(4), 366–369.
<https://doi.org/10.1007/BF01231075>
- Sakai, H., Kakuda, R., Yaoita, Y., and Kikuchi, M. (2007). Secoiridoid glycosides from the leaves of *Hydrangea macrophylla* subsp. *serrata*. *Journal of Natural Medicines*, 61(2), 226–228.
<https://doi.org/10.1007/s11418-006-0123-6>
- Salehi, B., Abu-Reidah, I. M., Sharopov, F., Karazhan, N., Sharifi-Rad, J., Akram, M., Daniyal, M., Khan, F. S., Abbaass, W., Zainab, R., Carbone, K., Fahmy, N. M., Al-Sayed, E., El-Shazly, M., Lucarini, M., Durazzo, A., Santini, A., Martorell, M., and Pezzani, R. (2021). Vicia plants—A comprehensive review on chemical composition and phytopharmacology. *Phytotherapy Research*, 35(2), 790–809.
<https://doi.org/10.1002/ptr.6863>
- Salsabila, I. A., Nugraheni, N., Ahlina, F. N., Haryanti, S., and Meiyanto, E. (2021). Synergistic Cotreatment Potential of Soursop (*Annona muricata* L.) Leaves Extract with Doxorubicin on 4T1 Cells with Antisenescence and Anti-reactive-oxygen-species Properties. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 20(2), 57–67.
<https://doi.org/10.22037/ijpr.2020.112485.13788>
- Salto, R. V. A., Vásquez, T. E. R., Alonso Lazo, J., Banguera, D. V., Guayasamín, P. D. R., Vargas, J. K. A., and Peñas, I. V. (2016). The use of medicinal plants by rural populations of the Pastaza province in the Ecuadorian Amazon. *Acta Amazonica*, 46(4), 355–366.

<https://doi.org/10.1590/1809-4392201600305>

Samaei, S. P., Ghorbani, M., Tagliazucchi, D., Martini, S., Gotti, R., Themelis, T., Tesini, F., Gianotti, A., Gallina Toschi, T., and Babini, E. (2020). Functional, nutritional, antioxidant, sensory properties and comparative peptidomic profile of faba bean (*Vicia faba*, L.) seed protein hydrolysates and fortified apple juice. *Food Chemistry*, *330*, 127120. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127120>

Sang, S., Wang, M., He, K., Liu, G., Dong, Z., Badmaev, V., Zheng, Q. Y., Ghai, G., Rosen, R. T., and Ho, C. T. (2002). Chemical components in noni fruits and leaves (*Morinda citrifolia* L.). *ACS Symposium Series*, *803*, 134–150. <https://doi.org/10.1021/bk-2002-0803.ch010>

Santosh Kumar, S., Priyadarsini, K. I., and Sainis, K. B. (2002). Free radical scavenging activity of vanillin and o-vanillin using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical. *Redox Report*, *7*(1), 35–40. <https://doi.org/10.1179/135100002125000163>

Sawicki, T., Ruskowska, M., Danielewicz, A., Niedźwiedzka, E., Arłukowicz, T., and Przybyłowicz, K. E. (2021). A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. *Cancers*, *13*(9), 2025. <https://doi.org/10.3390/cancers13092025>

Scott, P., Anderson, K., Singhania, M., and Cormier, R. (2020). Cystic Fibrosis, CFTR, and Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(8), 2891. <https://doi.org/10.3390/ijms21082891>

- Sharma, S. H., Rajamanickam, V., and Nagarajan, S. (2018). Antiproliferative effect of p-Coumaric acid targets UPR activation by downregulating Grp78 in colon cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 291, 16–28. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.06.001>
- Siah, S. D., Konczak, I., Agboola, S., Wood, J. A., and Blanchard, C. L. (2012). In vitro investigations of the potential health benefits of Australian-grown faba beans (*Vicia faba* L.): chemopreventative capacity and inhibitory effects on the angiotensin-converting enzyme, α -glucosidase and lipase. *British Journal of Nutrition*, 108(S1), S123–S134. <https://doi.org/10.1017/S0007114512000803>
- Singh, B., Hayes, S. C., Spence, R. R., Steele, M. L., Millet, G. Y., and Gergele, L. (2020). Exercise and colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of exercise safety, feasibility and effectiveness. *The International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity*, 17(1), 122. <https://doi.org/10.1186/s12966-020-01021-7>
- Sirerol, J. A., Rodríguez, M. L., Mena, S., Asensi, M. A., Estrela, J. M., and Ortega, A. L. (2016). Role of Natural Stilbenes in the Prevention of Cancer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2016/3128951>
- Siri, S., Zhao, Y., Maier, F., Pierce, D. M., and Feng, B. (2020). The Macro- and Micro-Mechanics of the Colon and Rectum I: Experimental Evidence. *Bioengineering*, 7(4), 130. <https://doi.org/10.3390/bioengineering7040130>
- Sluiter, N., de Cuba, E., Kwakman, R., Kazemier, G., Meijer, G., and te

- Velde, E. A. (2016). Adhesion molecules in peritoneal dissemination: function, prognostic relevance and therapeutic options. *Clinical & Experimental Metastasis*, 33(5), 401–416. <https://doi.org/10.1007/s10585-016-9791-0>
- Sociedad Española de Oncología Médica. (2021). *Cifras del cancer en españa 2020*. Red Española de Registros de Cáncer. https://seom.org/images/Cifras_del_cancer_en_Espnaha_2021.pdf
- Sridhar, N., Lakshmi, D. S., and Goverdhan, P. (2015). Effect of ethanolic extracts of Justicia neesii Ramam. against experimental models of pain and pyrexia. *Indian Journal of Pharmacology*, 47(2), 177–180. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.153425>
- Sritularak, B., Likhitwitayawuid, K., Conrad, J., Vogler, B., Reeb, S., Klaiber, I., and Kraus, W. (2002). New flavones from Millettia erythrocalyx. *Journal of Natural Products*, 65(4), 589–591. <https://doi.org/10.1021/np010513z>
- Subramaniam, S., Selvaduray, K. R., and Radhakrishnan, A. K. (2019). Bioactive Compounds: Natural Defense Against Cancer? *Biomolecules*, 9(12), 758. <https://doi.org/10.3390/biom9120758>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Surowiak, A. K., Balcerzak, L., Lochyński, S., and Strub, D. J. (2021).

- Biological activity of selected natural and synthetic terpenoid lactones. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 5036. <https://doi.org/10.3390/ijms22095036>
- Tamanna Ferdous, U., and Norhana Balia Yusof, Z. (2021). *Algal Terpenoids: A Potential Source of Antioxidants for Cancer Therapy*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.94122>
- Taroncher, M., Vila-Donat, P., Tolosa, J., Ruiz, M. J., and Rodríguez-Carrasco, Y. (2021). Biological activity and toxicity of plant nutraceuticals: an overview. *Current Opinion in Food Science*, 42, 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.05.008>
- Thai, T. H., Hai, N. T., Hien, N. T., Ha, C. T. T., Cuong, N. T., Binh, P. T., Dang, N. H., and Dat, N. T. (2017). Cytotoxic Constituents of *Mallotus Microcarpus*. *Natural Product Communications*, 12(3), 1934578X1701200. <https://doi.org/10.1177/1934578X1701200325>
- Thambiraj, S. R., Phillips, M., Koyyalamudi, S. R., and Reddy, N. (2018). Yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) polysaccharides: Antioxidant, immunomodulatory and prebiotic activities and their structural characterisation. *Food Chemistry*, 267, 319–328. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.111>
- Thummar, V. R., Parasuraman, S., Basu, D., and Raveendran, R. (2016). Evaluation of in vivo antitumor activity of cleistanthin B in Swiss albino mice. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 6(4), 383–388. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2015.08.004>
- Tinitana, F., Rios, M., Romero-Benavides, J. C., de la Cruz Rot, M., and

- Pardo-de-Santayana, M. (2016). Medicinal plants sold at traditional markets in southern Ecuador. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 12(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s13002-016-0100-4>
- Topolska, K., Florkiewicz, A., and Filipiak-Florkiewicz, A. (2021). Functional Food—Consumer Motivations and Expectations. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(10), 5327. <https://doi.org/10.3390/ijerph18105327>
- Truong, D.-H., Nguyen, D. H., Ta, N. T. A., Bui, A. V., Do, T. H., and Nguyen, H. C. (2019). Evaluation of the Use of Different Solvents for Phytochemical Constituents, Antioxidants, and In Vitro Anti-Inflammatory Activities of *Severinia buxifolia*. *Journal of Food Quality*, 2019, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2019/8178294>
- Tundis, R., Loizzo, M. R., Bonesi, M., Menichini, F., Statti, G. A., and Menichini, F. (2008). In vitro cytotoxic activity of *Salsola oppositifolia* Desf. (Amaranthaceae) in a panel of tumour cell lines. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 63(5–6), 347–354. <https://doi.org/10.1515/znc-2008-5-607>
- Valente, I. M., Maia, M. R. G., Malushi, N., Oliveira, H. M., Papa, L., Rodrigues, J. A., Fonseca, A. J. M., and Cabrita, A. R. J. (2018). Profiling of phenolic compounds and antioxidant properties of European varieties and cultivars of *Vicia faba* L. pods. *Phytochemistry*, 152, 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.05.011>

- Van Kiem, P., Tri, M. D., Tuong, L. V. D., Tung, N. H., Hanh, N. N., Quang, T. H., Cuong, N. X., Van Minh, C., Choi, E. M., and Kim, Y. H. (2008). Chemical constituents from the leaves of *Manglietia phuthoensis* and their effects on osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 56(9), 1270–1275. <https://doi.org/10.1248/cpb.56.1270>
- Veettil, S. K., Wong, T. Y., Loo, Y. S., Playdon, M. C., Lai, N. M., Giovannucci, E. L., and Chaiyakunapruk, N. (2021). Role of Diet in Colorectal Cancer Incidence. *JAMA Network Open*, 4(2), e2037341. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.37341>
- Viet Thanh, N. T., Minh, T. T., Thu Hien, D. T., Cuong, H. D., Seo, Y., Park, S., Namkung, W., Nhiem, N. X., Yen, P. H., Kim, S. H., and Kiem, P. Van. (2019). Chemical Constituents of *Phoebe poilanei* and Their Cytotoxic Activity. *Natural Product Communications*, 14(5), 1934578X1985096. <https://doi.org/10.1177/1934578X19850969>
- Vioque, J., Girón-Calle, J., Torres-Salas, V., Elamine, Y., and Alaiz, M. (2020). Characterization of *Vicia ervilia* (bitter vetch) seed proteins, free amino acids, and polyphenols. *Journal of Food Biochemistry*, 44(7), e13271. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13271>
- Vodenkova, S., Buchler, T., Cervena, K., Veskrnova, V., Vodicka, P., and Vymetalkova, V. (2020). 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *Pharmacology and Therapeutics*, 206, 107447. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.107447>

- Vodicka, P., Urbanova, M., Makovicky, P., Tomasova, K., Kroupa, M., Stetina, R., Opattova, A., Kostovcikova, K., Siskova, A., Schneiderova, M., Vymetalkova, V., and Vodickova, L. (2020). Oxidative Damage in Sporadic Colorectal Cancer: Molecular Mapping of Base Excision Repair Glycosylases in Colorectal Cancer Patients. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2473. <https://doi.org/10.3390/ijms21072473>
- Wagner, A., Aretz, S., Auranen, A., Bruno, M. J., Cavestro, G. M., Crosbie, E. J., Goverde, A., Jelsig, A. M., Latchford, A. R., van Leerdam, M. E., Lepisto, A. H., Puzzono, M., Winship, I., Zuber, V., and Möslein, G. (2021). The Management of Peutz–Jeghers Syndrome: European Hereditary Tumour Group (EHTG) Guideline. *Journal of Clinical Medicine*, 10(3), 473. <https://doi.org/10.3390/jcm10030473>
- Wang, J., Fang, X., Ge, L., Cao, F., Zhao, L., Wang, Z., and Xiao, W. (2018). Antitumor, antioxidant and anti-inflammatory activities of kaempferol and its corresponding glycosides and the enzymatic preparation of kaempferol. *PLOS ONE*, 13(5), e0197563. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197563>
- Wang, J., Su, B., Jiang, H., Cui, N., Yu, Z., Yang, Y., and Sun, Y. (2020). Traditional uses, phytochemistry and pharmacological activities of the genus *Cinnamomum* (Lauraceae): A review. *Fitoterapia*, 146, 104675. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104675>
- Wang, X., Zhong, X. J., Zhou, N., Cai, N., Xu, J. H., Wang, Q. B., Li, J. J., Liu, Q., Lin, P. C., and Shang, X. Y. (2020). Rapid Characterization of

- Chemical Constituents of the Tubers of *Gymnadenia conopsea* by UPLC–Orbitrap–MS/MS Analysis. *Molecules*, 25(4), 898. <https://doi.org/10.3390/molecules25040898>
- Wani, T. A., Bakheit, A. H., Zargar, S., Alanazi, Z. S., and Al-Majed, A. A. (2021). Influence of antioxidant flavonoids quercetin and rutin on the in-vitro binding of neratinib to human serum albumin. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 246, 118977. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118977>
- Waseem, Y., Hasan, C. A., and Ahmed, F. (2018). Artemisinin: A Promising Adjunct for Cancer Therapy. *Cureus*, 10(11), e3628. <https://doi.org/10.7759/cureus.3628>
- West, N. P., Langman, G., Haboubi, N., Carey, F., Henry, J., Morgan, M., and Sheahan, K. (2019). Significant polyps and early colorectal cancer: the importance of high-quality standardized histopathology. *Colorectal Disease*, 21, 53–56. <https://doi.org/10.1111/CODI.14506>
- Wu, C. Y., Hsu, C. C., Chen, S. T., and Tsai, Y. C. (2001). Soyasaponin I, a potent and specific sialyltransferase inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 284(2), 466–469. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5002>
- Wu, J. J., Cheng, K. W., Zuo, X. F., Wang, M. F., Li, P., Zhang, L. Y., Wang, H., and Ye, W. C. (2010). Steroidal saponins and ecdysterone from *Asparagus filicinus* and their cytotoxic activities. *Steroids*, 75(10), 734–739. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2010.05.002>

- Wu, Q., Kroon, P. A., Shao, H., Needs, P. W., and Yang, X. (2018). Differential Effects of Quercetin and Two of Its Derivatives, Isorhamnetin and Isorhamnetin-3-glucuronide, in Inhibiting the Proliferation of Human Breast-Cancer MCF-7 Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(27), 7181–7189. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02420>
- Wysocki, P. J. (2021). Postęp w zakresie leczenia systemowego raka jelita grubego. *Oncology in Clinical Practice*, 17(4), 157–163. <https://doi.org/10.5603/OCP.2020.0044>
- Xie, J., Peng, L., Yang, M., Jiang, W., Mao, J., Shi, C., Tian, Y., and Sheng, J. (2021). Alkaloid Extract of *Moringa oleifera* Lam. Exerts Antitumor Activity in Human Non-Small-Cell Lung Cancer via Modulation of the JAK2/STAT3 Signaling Pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2021/5591687>
- Xie, Y.-H., Chen, Y.-X., and Fang, J.-Y. (2020). Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2020 5:1, 5(1), 1–30. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0116-z>
- Xu, F., Liu, Y., Zhu, X., Li, S., Shi, X., Li, Z., Ai, M., Sun, J., Hou, B., Cai, W., Sun, H., Ni, L., Zhou, Y., and Qiu, L. (2019). Protective Effects and Mechanisms of Vaccarin on Vascular Endothelial Dysfunction in Diabetic Angiopathy. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4587. <https://doi.org/10.3390/ijms20184587>

- Xu, Y., Chen, G., and Guo, M. (2021). Correlations between phytochemical fingerprints of *Moringa oleifera* leaf extracts and their antioxidant activities revealed by chemometric analysis. *Phytochemical Analysis*, 32(5), 698–709. <https://doi.org/10.1002/pca.3016>
- Xu, Y., Xu, M., Zhang, L., Zhu, Z., Guo, S., Su, S., Guo, J., Che, C.-T., Lin, Z.-X., Zhao, M., and Duan, J.-A. (2019). Pharmacokinetic study on bruceoside A revealed the potential role of quassinoid glycosides for the anticancer properties of Fructus Bruceae. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 170, 264–272. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.03.052>
- Ye, P., Xi, Y., Huang, Z., and Xu, P. (2020). Linking Obesity with Colorectal Cancer: Epidemiology and Mechanistic Insights. *Cancers*, 12(6), 1408. <https://doi.org/10.3390/cancers12061408>
- Ye, W. J., Huang, X. J., Fan, C. L., Xu, L., Wang, Y., and Ye, W. C. (2018). Two new flavonoid glycosides from leaves of *Moringa oleifera*. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, 43(15), 3150–3156. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcmm.20180423.002>
- Yin, L., Li, J., Ma, D., Li, D., and Sun, Y. (2020). Angiogenesis in primary colorectal cancer and matched metastatic tissues: Biological and clinical implications for anti-angiogenic therapies. *Oncology Letters*, 19(5), 3558–3566. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11450>
- Yong-Bing, X., Gui-Lin, C., and Ming-Quan, G. (2019). Antioxidant and anti-inflammatory activities of the crude extracts of *moringa oleifera* from kenya and their correlations with flavonoids. *Antioxidants*, 8(8),

296. <https://doi.org/10.3390/antiox8080296>

- Zagórska-Dziok, M., Ziemlewska, A., Nizioł-Lukaszewska, Z., and Bujak, T. (2020). Antioxidant Activity and Cytotoxicity of *Medicago sativa* L. Seeds and Herb Extract on Skin Cells. *BioResearch Open Access*, 9(1), 229–242. <https://doi.org/10.1089/biores.2020.0015>
- Zhang, H., Huang, L., Tao, L., Zhang, J., Wang, F., Zhang, X., and Fu, L. (2019). Secalonic acid D induces cell apoptosis in both sensitive and ABCG2-overexpressing multidrug resistant cancer cells through upregulating c-Jun expression. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 9(3), 516–525. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.12.006>
- Zhang, L., and Shay, J. W. (2017). Multiple Roles of APC and its Therapeutic Implications in Colorectal Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 109(8). <https://doi.org/10.1093/jnci/djw332>
- Zhang, N., Yin, Y., Xu, S.-J., and Chen, W.-S. (2008). 5-Fluorouracil: Mechanisms of Resistance and Reversal Strategies. *Molecules*, 13(8), 1551. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES13081551>
- Zhang, Q., Di, Y. T., He, H. P., Fang, X., Chen, D. L., Yan, X. H., Zhu, F., Yang, T. Q., Liu, L. L., and Hao, X. J. (2011). Phragmalin- and mexicanolide-type limonoids from the leaves of *Trichilia connaroides*. *Journal of Natural Products*, 74(2), 152–157. <https://doi.org/10.1021/np100428u>
- Zhang, S.-L., Yang, Z.-N., He, C., Liao, H.-B., Wang, H.-S., Chen, Z.-F., and Liang, D. (2018). Oleanane-type triterpenoid saponins from

- Lysimachia fortunei Maxim. *Phytochemistry*, 147, 140–146.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.12.022>
- Zhang, X., Zhang, W., and Cao, P. (2021). Advances in CpG Island Methylator Phenotype Colorectal Cancer Therapies. *Frontiers in Oncology*, 11, 193. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.629390>
- Zhang, Y. S., Wang, F., Cui, S. X., and Qu, X. J. (2018). Natural dietary compound naringin prevents azoxymethane/dextran sodium sulfate-induced chronic colorectal inflammation and carcinogenesis in mice. *Cancer Biology and Therapy*, 19(8), 735–744.
<https://doi.org/10.1080/15384047.2018.1453971>
- Zhang, Y., Yan, G., Sun, C., Li, H., Fu, Y., and Xu, W. (2018). Apoptosis effects of dihydrokaempferol isolated from bauhinia championii on synoviocytes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018(6), 7. <https://doi.org/10.1155/2018/9806160>
- Zhao, L., Chen, S., Liu, T., Wang, X., Huang, H., and Liu, W. (2019). Callistephin enhances the protective effects of isoflurane on microglial injury through downregulation of inflammation and apoptosis. *Molecular Medicine Reports*, 20(1), 802–812.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10282>
- Zhu, J., Lu, X., Fan, X., Wu, R., Diao, H., Yu, R., Xu, H., and Zi, J. (2018). A new cytotoxic salannin-class limonoid alkaloid from seeds of Azadirachta indica A. Juss. *Chinese Chemical Letters*, 29(8), 1261–1263. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2017.11.042>
- Zou, Y., Zhang, M., Zhang, T., Wu, J., Wang, J., Liu, K., and Zhan, N.

(2018). Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Cynaroside from *Elsholtzia bodinieri*. *Natural Product Communications*, 13(11), 1934578X1801301. <https://doi.org/10.1177/1934578X1801301122>

Anexo- Publicación