

EFFECTOS SOBRE EL CICLO CELULAR DE EXTRACTOS DE *Euphorbia aphylla*

CELL CYCLE EFFECTS OF *Euphorbia aphylla* EXTRACTS

Mauricio Camargo¹, Germán Ángel¹, Liliana Betancur², Jorge Ossa²

Resumen

Durante las dos últimas décadas, una gran diversidad de especies del género *Euphorbia* han sido química y biológicamente estudiadas debido a la riqueza de evidencias etnofarmacológicas reportadas en el mundo (tabla 1). En consecuencia, y teniendo en cuenta las tradiciones de medicina tradicional en Colombia, en este trabajo se evaluó la actividad biológica inhibitoria de extractos y látex de *E. aphylla* sobre la proliferación celular in vitro de células CHO(HB4-K1), con énfasis en el flujo del ciclo celular desde la fase S (tardia) hasta la fase M. Se recolectaron muestras de cuerpos basales (tallos) de *E. aphylla* (registro RC-11832, Herbario Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia). El material secado se molió y se sometió a extracción continua con éter de petróleo y etanol (200 g/l). Los extractos se rotaevaporaron y redisolviéron en agua/tween-20 (1:10) y DMSO puro, respectivamente. El látex crudo también fue disuelto en DMSO. La citotoxicidad de los dos extractos y del látex, y sus solventes, se evaluó mediante la prueba de rojo neutro, en microplatos de 96 pozuelos, 15.000 células CHO/pozo y cuatro diluciones por extracto o solvente. Posteriormente se realizaron las pruebas de ciclo celular en cultivos exponenciales de células CHO mediante el análisis de la cinética de acumulación en mitosis (función de acumulación). Las tres mezclas mostraron baja citotoxicidad, aun a concentraciones máximas. Ninguna de las tres mostró actividad bloqueadora a nivel de la fase M. Sin embargo, el análisis de las gráficas de cinética acumulativa hacia la fase M indica que el extracto etéreo bloquea el ciclo celular antes de la fase M, posiblemente al final de la fase G₂, o inhibe el tránsito G₂-M. El extracto etanólico también produce considerable inhibición o retraso del flujo de G₂ hacia M, pero no genera bloqueo total, como sí lo hace el extracto etéreo. De otro lado, el látex crudo, aunque reduce el índice mitótico (IM) durante las tres primeras horas del tratamiento, muestra recuperación posterior del IM esperado.

Palabras claves: ciclo celular, citotoxicidad, etnofarmacología, *Euphorbia aphylla*

Abstract

World wide ethnopharmacological data have revealed great diversity of *Euphorbia* species, which have been biologically and chemically studied during the last two decades (table 1). Consequently, and in view of the evidence gathered from traditional medicine in Colombia, this study evaluated chemical extracts and latex from *E. aphylla* for their potential inhibitory action on in vitro cell proliferation, with emphasis on cell cycle progression through the G₂-M phases. Stem samples from *E. aphylla* were collected (registry No. RC-11832, University of Antioquia Herbarium), dried, shredded and chemically extracted with petroleum ether and ethanol (at 200 g/l). The extracted material was rotary evaporated and redissolved with water:tween20 (1:10) or DMSO (100%). Crude latex was also dissolved in DMSO. Cytotoxicity of the three mixtures, their solvents, and four dilutions of each were evaluated with neutral-red stain, using 96-well microplates, and 15000 CHO cells/well. After these assays, cell cycle tests were performed on exponentially growing CHO cultures, through the analysis of accumulation kinetics of mitoses. Results indicated low cytotoxicity of the three extracts, even at maximum concentration. Similarly, none showed M-phase blocking activity. The analysis of cell cycle effect clearly indicated that the ether-extract blocks the cell cycle before M-phase, apparently at the end of G₂, or by inhibiting the progression from G₂ to M. The ethanolic extract also produced considerable inhibition or delay of the G₂ to M flux, but not generate a complete halt, like the ether-extract. On the contrary, crude latex decreases the mitotic index (MI) at the beginning of the treatment, but a delayed recovery of the expected MI was later observed.

Key words: cell cycle, cytotoxicity, ethnopharmacology, *Euphorbia aphylla*

Recibido: enero de 1999; aprobado para publicación: febrero de 1999

¹Laboratorio de Genética Molecular, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. E-mail: mcamargo@epm.net.co

²Laboratorio de Virología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

INTRODUCCIÓN

Basados en la abundante evidencia etnofarmacológica, durante las últimas décadas se han realizado numerosas investigaciones fitoquímicas en la familia *Euphorbiaceae*, y en particular en especies del género *Euphorbia*. Del abundante látex característico del género, y de extractos químicos de raíces, tallos, hojas y semillas, se ha descubierto una rica gama de compuestos químicos o principios activos que incluyen lectinas, terpenos, ésteres de forbol, ésteres diterpenos, ésteres ingenanos, enzimas, toxinas, etc. (tabla 1). Y como es lógico suponer, igualmente se han investigado algunas de las posibles actividades biológicas de estos compuestos o mezclas complejas. Entre otras, por ejemplo, se ha confirmado que pueden actuar como potentes irritantes y/o promotores tumorales. Otros son mitogénicos, inductores virales, e inductores de reordenamientos cromosómicos. También se han descubierto extractos o componentes con actividad moluscicida, antidiarreica, antiviral, antioxidante, antiinflamatoria y antineoplásica (tabla 1).

Estos hallazgos no sólo han brindado soporte científico a algunas tradiciones de la medicina tradicional y la etnofarmacología, sino que abren nuevos horizontes en farmacología y fitoquímica. En consecuencia, y motivados por evidencias de la medicina tradicional sobre la posible acción antiverrugosa del látex de *E. aphylla*, en el presente trabajo se evaluó la actividad biológica inhibitoria de extractos y látex de esta especie, sobre la viabilidad y proliferación celular *in vitro* de células CHO (HB4-K1), con énfasis en su acción sobre el ciclo celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El látex natural fue colectado en recipientes de vidrio oscuro, prelavados y pre-esterilizados. Las muestras de tallo se tomaron directamente de plantas vivas, y los trozos pequeños (2-5 cm) se lavaron con agua corriente, seguido de un lavado con hipoclorito-Na (5%) 15 min. Luego del secado al aire, el material fue secado al horno durante 1.5 días, en el taller del Herbario Universidad de Antioquia. Después del secado, el material se molió varias veces hasta obtener un producto final pulverizado.

Extractos químicos

Para la separación de componentes de la muestra sólida se utilizó extracción continua sólido/líquido, con extractor soxhlet, a partir de 200 g de muestra y un litro de éter de petróleo o etanol. Los extractos brutos fueron rotaevaporados, y las muestras se guardaron a 4 °C en frascos de vidrio oscuro como en el caso del látex natural.

Efecto citotóxico

Se utilizaron células CHO(HB4-K1) tomadas de cultivos en crecimiento exponencial, cultivados en medio Ham-F12 suplementado con 5% de suero de ternero recién nacido, 100U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin.

Los extractos etéreos se diluyeron en las proporciones de 1:0, 1:1, 1:2 y 1:4 en tween-20(90%). El látex crudo y los extractos etanólicos se diluyeron en DMSO, en las mismas proporciones mencionadas. Las concentraciones finales obtenidas en los cultivos celulares se indican en las gráficas respectivas (fig. 1).

Las pruebas de citotoxicidad se realizaron de la siguiente manera: Para probar cada dilución de cada extracto y de su respectivo solvente, se sembraron en microplatos de 96 pozuelos, 15.000 células CHO/pozuelo, por cuadruplicado. Se incubaron a 37°C, 24 hr., atmósfera CO₂ (5%), en medio Ham-F12 antes descrito. A cada pozuelo se le adicionó 50 µl de cada dilución del respectivo extracto o solvente, y los microplatos se reincubaron 13-14 hr. Cumplida esta fase *in vitro* se procedió a la fase de fijación/precipitación con TCA (12%), 25 µl/pozo, y reincubación en nevera 4 °C, 20 min. Posteriormente se procedió a la coloración y lectura consistente en dos lavados con PBS, 200 µl/pozo, coloración con solución de rojo neutro al 0.33%, 75µl/pozo, 37 °C, 30 min. El contenido total del microplato se descartó, y se lavó dos veces con PBS tibio, 200 l/pozo, que también se descartó y se reemplazó por 130 l/pozo de una solución 1:1 (50% v/v) de etanol: fosfato-Na-monobásico (0.1M), 37°C, 5 min. El microplato se agitó 30 min a temperatura ambiente y se leyó en un contador Elisa a 550 nm.

Del promedio de las cuatro lecturas de absorbancias obtenidas por tratamiento, se calculó el efecto neto de cada tratamiento (extracto) sobre la viabilidad de

Tabla 1. Resumen de las investigaciones farmacológicas modernas en el género *Euphorbia*.

ESPECIE	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	COMPONENTE o EXTRACTO	REFERENCIA
<i>E. acaulis</i>	Antiinflamatoria	Extractos	Singh <i>et al.</i> , 1984
<i>E. aphylla</i>	inhibidor del ciclo celular	Extractos	Angel <i>et al.</i> , 1996
<i>E. atoto</i>	promotor tumoral	Extractos	Norhanom y Yadav, 1995
<i>E. australis</i>	Antiviral	Extractos	Semple <i>et al.</i> , 1998
<i>E. biglandulosa</i>	inhibidor mitocondrial	Látex	Noack <i>et al.</i> , 1980
<i>E. canariensis</i>	vascular arterial	Diterpenos	Miranda <i>et al.</i> , 1998
<i>E. canariensis</i>	Vascular	Ingol (DBI)	Miranda <i>et al.</i> , 1997
<i>E. cooperi</i>	irritante dérmico	Látex	Gschwendt y Hecker, 1973
<i>E. cooperi</i>	Dermatitis	Diterpenos	Gundidza <i>et al.</i> , 1992
<i>E. cyparissias</i>	Citotóxica	Diterpenos	Oksuz <i>et al.</i> , 1994
<i>E. characias</i>	Lipásica	Lipasa (látex)	Moulin <i>et al.</i> , 1994
<i>E. characias</i>	Mitogénica	Lectinas (látex)	Barbieri <i>et al.</i> , 1983
<i>E. characias</i>	diamina oxidasa	Látex	Rinaldi <i>et al.</i> , 1982
<i>E. deightonii</i>	Inflamatoria	Diterpenoides	Abc, 1994
<i>E. desmondii</i>	Inflamatoria	Diterpenoides	Abc, 1994
<i>E. esula</i>	promotor tumoral	Látex	Upadhyay <i>et al.</i> , 1978
<i>E. esula</i>	Dermatitis	Extractos	Seip y Hecker, 1982
<i>E. fischeriana</i>	Antineoplásica	Extractos	Shen, 1984
<i>E. fortissima</i>	irritante dérmico	Diterpenos	Kinghorn y Evans., 1975
<i>E. hirta</i>	inhibidor de prostaglandinas	Extractos	Hiermann y Bucar, 1994
<i>E. hirta</i>	Antidiarreica	Flavonoides (quercitrin)	Galvez <i>et al.</i> , 1993
<i>E. hirta</i>	sedativa, ansiolítica	Extractos	Lanhers <i>et al.</i> , 1990
<i>E. ingens</i>	promotor tumoral	Diterpenos	Opferkuch y Hecker, 1982
<i>E. kansui</i>	promotor tumoral	Extractos	Zeng <i>et al.</i> , 1994
<i>E. kansui</i>	promotor del receptor Fc	Ingenol	Matsumoto <i>et al.</i> , 1992
<i>E. lagascae</i>	Antineoplásica	Extractos	Ferngni <i>et al.</i> , 1984
<i>E. lathyris</i>	promotor tumoral	Diterpeno (ingenol)	Adolf y Hecker, 1975
<i>E. marginata</i>	Mitogénica	Látex (lectina)	Stirpe <i>et al.</i> , 1993
<i>E. matabelensis</i>	Dermatitis	Diterpeno	Gundidza <i>et al.</i> , 1993
<i>E. milii</i>	Moluscicida	Látex	Souza <i>et al.</i> , 1997
<i>E. milii</i>	promotor tumoral	Látex	Cruz <i>et al.</i> , 1996
<i>E. milii</i>	no mutagénico	Látex	Zamith <i>et al.</i> , 1996
<i>E. myrsinites</i>	Citotóxica	Diterpenos	Oksuz <i>et al.</i> , 1995
<i>E. nematocyptha</i>	antioxidante (hepatoprotectora)	Extractos	Ito <i>et al.</i> , 1990
<i>E. parviflora</i>	irritante, citotóxica	Ingenoles	Sayed <i>et al.</i> , 1980
<i>E. pepiuis</i>	promotor tumoral	Diterpenos	Zayed <i>et al.</i> , 1998 Nawito <i>et al.</i> , 1998
<i>E. pepiuis</i>	queratoconjuntivitis	Latex	Biedner <i>et al.</i> , 1981
<i>E. poissonii</i>	citotóxica (cels.tumorales, A-498)	Diterpenos	Fatope <i>et al.</i> , 1996
<i>E. poissonii</i>	Irritante	Diterpenos (látex)	Evans y Schmidt, 1979
<i>E. poissonii</i>	Irritante	Forbol éster (candletoxinas)	Schmidt y Evans, 1977
<i>E. prolifera</i>	Dermatitis	Diterpenos	Wu <i>et al.</i> , 1995
<i>E. prostrata</i>	Antiinflamatoria	Extractos	Singla y Pathak, 1990
<i>E. prostrata</i>	Antiinflamatoria	Extractos	Singla y Pathak, 1989
<i>E. pulcherrima</i>	Dermatitis	Látex	Massmanian, 1998
<i>E. pulcherrima</i>	Citotóxica (cels.tumorales)	Triterpenos	Smith-Kjelland <i>et al.</i> , 1996
<i>E. pulcherrima</i>	Dermatitis	Extractos	Santucci <i>et al.</i> , 1985
<i>E. resinifera</i>	Receptores vaniloides	Resiniferatoxina (látex)	Appendino y Szallasi, 1997
<i>E. resinifera</i>	Promotor tumoral	Diterpenos (látex)	Hergenbahn <i>et al.</i> , 1984
<i>E. rigida</i>	Mutagénica	Extractos	Basaran <i>et al.</i> , 1996
<i>E. royleana</i>	Moluscicida anti-colinesterasa	Látex	Singh <i>et al.</i> , 1984
<i>E. segutieriana</i>	Antibacterial	Extractos	Soboliev y Honcharov, 1979
<i>E. serrata</i>	Promotor tumoral	Ingenol-3-palmitato (látex)	Upadhyay <i>et al.</i> , 1976
<i>E. splendens</i>	no mutagénica	Látex	Schall <i>et al.</i> , 1991
<i>E. splendens</i>	Moluscicida	Látex	Schall <i>et al.</i> , 1992
<i>E. splendens</i>	Moluscicida	Látex	Schall <i>et al.</i> , 1998
<i>E. spp</i>	Capsaicina (análogos)	diterpenos (resiniferatoxinas)	Szallasi y Blumberg, 1989
<i>E. tirucalli</i>	Irritante	forbol diéster	Kinghorn, 1979
<i>E. tirucalli</i>	antiviral (EBV)	deoxi-forbol éster	Imai <i>et al.</i> , 1994
<i>E. tirucalli</i>	Translocaciones cromosómicas	forfol éster	Aya <i>et al.</i> , 1991
<i>E. tirucalli</i>	promotor viral	extractos	Osato <i>et al.</i> , 1987
<i>E. tirucalli</i>	promotor viral	extractos	Mizuno <i>et al.</i> , 1986
<i>E. tirucalli</i>	Dermatitis	diterpenos	Furstenberger <i>et al.</i> , 1986
<i>E. tirucalli</i>	Dermatitis	diterpenos	Furstenberger <i>et al.</i> , 1985
<i>E. triangularis</i>	irritante dérmico	látex	Gschwendt y Hecker, 1974
<i>E. virgata</i>	promotor tumoral	diterpeno	Upadhyay <i>et al.</i> , 1981

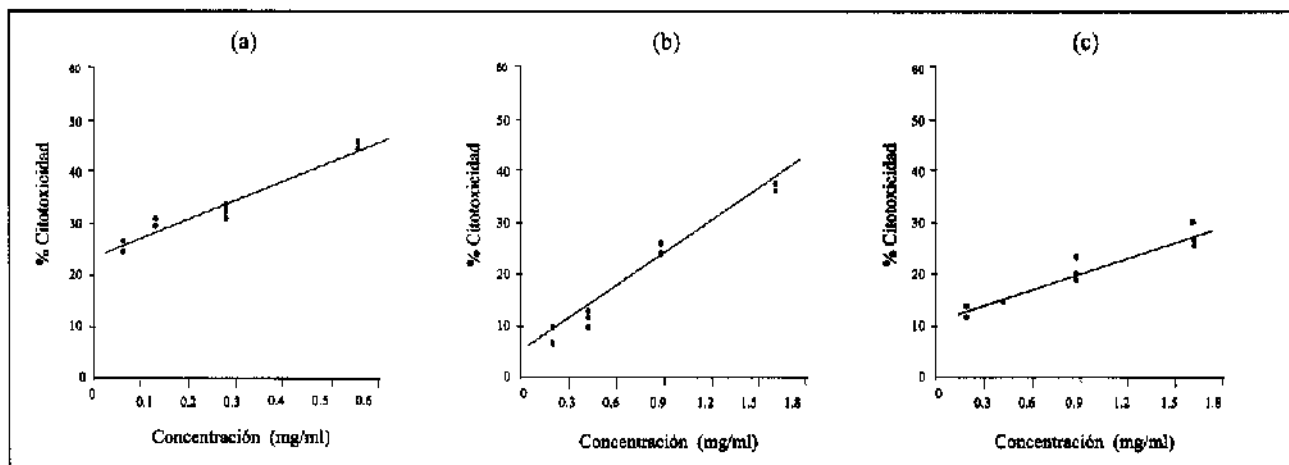


Figura 1. Cuantificación del ensayo de citotoxicidad en células CHO(HB4-K1), para los extracto etéreo (a), etanólico (b), y látex (c).

células CHO empleando la ecuación "%Citotoxicidad=100 (Le-Ls)/Lc", en la que Le=lectura del extracto, Ls=lectura del solvente, Lc=lectura del control. Los porcentajes de citotoxicidad se grafican vs. concentración del extracto (fig. 1).

Efecto en el ciclo celular

Los tratamientos se hicieron en cultivos duplicados de células CHO (HB4-K1), en fase de proliferación exponencial. Dado que los extractos mostraron baja toxicidad y que ninguno produjo una DL50 detectable (ver resultados), todos los tratamientos se hicieron con la concentración máxima de cada extracto (50 μ l de extracto por cultivo de 5 ml), y durante 1-5 hr. El grupo control se trató con el respectivo solvente puro. Además, todos los tratamientos anteriores se repitieron en presencia de colchicina (0.06 mg/ml). Este protocolo experimental permite monitorear el flujo del ciclo celular desde S-tardío hasta G₂ y M.

Después del respectivo tratamiento, de cada cultivo se obtuvo desprendimiento celular total mediante el método convencional con tripsina (0.05%). La suspensión celular obtenida se centrifugó (400 xg, 7 min), posteriormente se hipotoniza con citrato-Na (0.7%), 10 min, 37 °C, se centrifugó (400 xg, 7 min.) y el botón celular se resuspendió en fijador metanol-acético (3:1). Luego de cambiar el fijador mediante centrifugación, el precipitado celular se resuspendió en 0.2-0.4 ml de fijador fresco, a partir del cual se hicieron extendidos citogenéticos convencionales mediante goteo en placa húmeda. Finalmente, las

preparaciones citológicas se colorean con solución Giemsa (4%) 5-7 min.

Una vez calculado el índice mitótico promedio (Nm) de cada tratamiento, se elaboraron gráficas de log (Nm+1) vs. tiempo, a partir de las cuales se realizó el análisis, basado en la comparación con controles tratados con el antimitótico colchicina que genera una función de acumulación en M correspondiente a la siguiente ecuación:

$\text{Log (Nm+1)} = (0.3)(t)/T_c$, en donde:

Nm = Índice mitótico,

Tc = duración promedio del ciclo celular,

t = duración del bloqueo o del tratamiento.

Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 2 y 3.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Citotoxicidad

Los ensayos de citotoxicidad evidenciaron varios aspectos: Primero, todos los extractos mostraron baja toxicidad; de hecho, en ninguno se logró una toxicidad promedio mayor o igual al 45%, aun a la concentración máxima del extracto obtenido, razón por la cual se utilizó esta concentración en los ensayos de efectos en el ciclo celular. Segundo, el extracto etéreo resultó ser ligeramente más tóxico que el etanólico, y el látex crudo fue el menos citotóxico de los tres. Sin embargo, ninguno mostró la típica curva semi-log de toxicidad debido a dos razones: la baja toxicidad de las mezclas, y que el

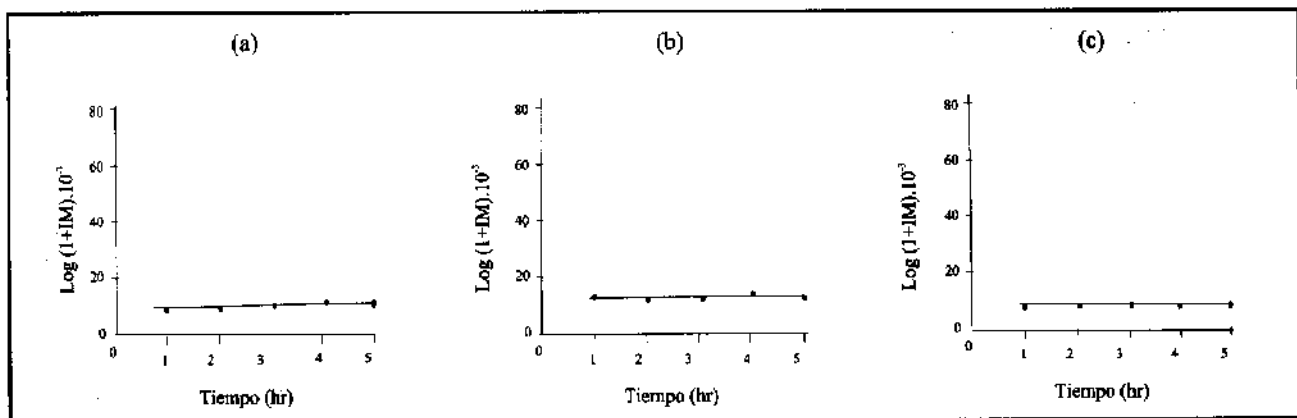


Figura 2. Ensayo de acumulación mitótica de los extractos etéreo (a), etanólico (b), y látex (c) en cultivos de células CHO(HB4-K1) en crecimiento exponencial.

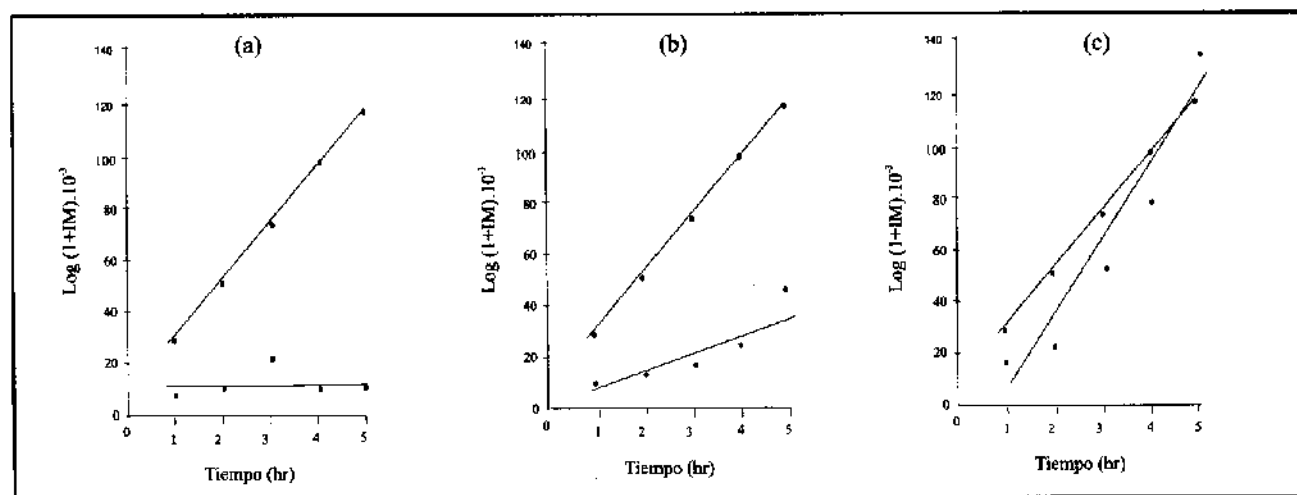


Figura 3. Ensayo de acumulación mitótica del extracto etéreo + colchicina (a), etanólico + colchicina (b), y látex + colchicina (c). Nótese que cada gráfica incluye el control (colchicina), que evidencia la típica función de acumulación en mitosis, lo cual indica flujo continuo del ciclo desde S-tardío hacia M.

rango de concentraciones probadas sólo abarca un orden de magnitud, y no los dos o tres ordenes de magnitud típicos de una curva de toxicidad semi-log.

Las pruebas de citotoxicidad realizadas en este trabajo, contrastan aparentemente con las evidencias etnofarmacológicas, que indican que *E. aphylla*, y en particular el látex crudo, es altamente irritante produciendo dermatitis y queratoconjuntivitis. Sin embargo, ello podría explicarse en parte por el hecho de que uno de los componentes más comunes y/o abundantes en el látex y extractos de tallos de especies de este género, son ésteres de forbol que ejercen efecto tisular irritante o inflamatorio, en tejidos (o células) con receptores membranales apropiados, y en particular de origen neurogénico.

En consecuencia, es muy probable que las células CHO (HB4-K1) empleadas en estas pruebas, carezcan de esta clase de receptores ya que son células originalmente extraídas de estroma ovárico de hamster.

Ciclo celular

Se han desarrollado varias metodologías para investigar el efecto de agentes químicos sobre el ciclo celular en células de mamíferos. Una de ellas consiste en estudiar la cinética proliferativa en el ciclo celular. Y una forma de hacerlo es cuantificando la cinética de entrada de la población celular a una fase del ciclo. Dado que la fase M es fácilmente detectable a nivel citológico, en el

presente trabajo se estudió el efecto de las tres mezclas complejas mencionadas, sobre la cinética de flujo hacia la fase M.

Conociendo previamente la distribución temporal de las fases del ciclo celular de las células en estudio CHO(HB4-K1), se diseñó un protocolo experimental para investigar el efecto de los extractos etéreo, etanólico y del látex, sobre las fases S-tardía, G₂ y M.

En ausencia de bloqueador mitótico (colchicina), los resultados (fig. 2) indican que ninguno de los extractos, ni sus respectivos solventes, son inhibidores de la fase M. En presencia de bloqueador mitótico (colchicina), los resultados (fig.33) indican que el extracto etéreo bloquea el ciclo celular antes de la fase M, ya sea al final de G₂ o inhibiendo el tránsito G₂-M. Lo anterior se deduce de la ausencia de acumulación mitótica, a pesar de la presencia de colchicina. Si el bloqueo o inhibición fuera antes de G₂, se debería presentar un incremento del IM durante las 2-3 primeras horas del tratamiento. Y se deduce que es antes de M, ya que durante las 5 hr. de tratamiento, todos los cultivos presentan un IM promedio equivalente al índice mitótico espontáneo encontrado en cultivos control,

De otro lado, el extracto etanólico evidencia considerable inhibición o retraso del flujo de G₂ a M, pero no genera bloqueo total, como sí lo hace el extracto etéreo. Lo anterior se deduce de las pendientes de acumulación en M, siendo menor la del tratamiento que la del control (no tratadas). En este caso, una pendiente menor indica retraso o prolongación del ciclo celular. Y dado que el retraso se da desde la hora 1, se deduce que el efecto inhibitorio se ejerce desde el borde M/G₂ hacia atrás.

REFERENCIAS

- Abo KA. 1994. Characterization of ingenol: an inflammatory diterpene from some Nigerian *Euphorbia* and *Elaeophorbia* species. *Afr J Med Sci* 23:161-163.
- Adolf W, Hecker E. 1975. On the active principles of the spurge family. III. Skin irritant and cocarcinogenic factors from the caper spurge. *Z Krebsforsch Klin Onkol Cancer Res Clin Oncol* 84:325-344.

En cambio, el látex crudo, aunque reduce el IM durante las 2-3 primeras horas de tratamiento, muestra posterior recuperación hacia el índice mitótico esperado. Este comportamiento es típico de compuestos o mezclas que ejercen un efecto inhibitorio temporal, ya sea porque es metabólicamente superado por las células tratadas, o por la inestabilidad química o vida media reducida del compuesto o compuestos de la mezcla.

Los anteriores resultados, y en particular los obtenidos con los extractos etéreos, son alentadores en el sentido de muestran la presencia de principios activos que inhiben el ciclo en una línea celular de mamífero. Además, abren la posibilidad de una exploración química sistemática para detectar principios activos potencialmente útiles, como ha ocurrido con otras especies del género *Euphorbia* (tabla 1).

Finalmente cabe resaltar dos aspectos : (1) El presente trabajo constituye la primera investigación realizada en esta especie (*E.aphylla*) sobre la citotoxicidad y los efectos en el ciclo celular de extractos y/o látex ; (2) La aplicación de esta sencilla pero informativa metodología de análisis de cinética de flujo proliferativo, combinada con estudios fitoquímicos, abre nuevas alternativas para el tamizaje rápido de actividad biológica antineoplásica de sustancias o extractos de origen vegetal.

AGRADECIMIENTOS

A Isabel Cristina Ortiz, a los grupos del GIEM y del Laboratorio de Virología de la Universidad de Antioquia, por su colaboración y gran apoyo en los ensayos citogenéticos, citotóxicos y de extracción química. Y a Olga Lucía Zea por su apoyo técnico en la elaboración de tablas, gráficas y manuscritos.

Ángel G, Camargo M, Betancur L, Ossa J. 1996. Evaluación biológica in vitro del extracto de *Euphorbia aphylla* de uso común en medicina popular. Tesis de Grado, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Appendino G, Szallasi A. 1997. *Euphorbium*: modern research on its active principles, resiniferatoxin, revives an ancient medicine. *Life Sci* 60:681-696.

- Aya T, Kinoshita T, Imai S, Koizumi S, Mizuno F, Osato T, Satoh C, Oikawa T, Kuzumaki N, Ohigashi H. 1991. Chromosome translocation and c-MYC activation by Epstein-Barr virus and *Euphorbia tirucalli* in B lymphocytes. *Lancet* 337:1190.
- Barbieri L, Falasca A, Franceschi C, Licastro R, Rossi CA, Stirpe F. 1983. Purification and properties of two lectins from the latex of the euphorbiaceous plant *Hura crepitans* L. (sandbox tree) and *Euphorbia characias* L. (Mediterranean spurge). *Biochem J* 215:433-439.
- Basaran AA, Yu TW, Plewa MJ, Anderson D. 1996. An investigation of some Turkish herbal medicines in *Salmonella typhimurium* and in the COMET assay in human lymphocytes. *Teratog Carcinog Mutag* 16:125-138.
- Biedner BZ, Sachs U, Witzum A. 1981. *Euphorbia peplus* latex keratoconjunctivitis. *Ann Ophthalmol* 13:739-740.
- Cruz CM, Kasper P, Cataldo A, Zamith HP, Paumgarten FJ. 1996. Tumor promoter-like activity of the molluscicidal latex of "Crown-of-Thorns" (*Euphorbia militi* var. *hislopii*) in the V79 metabolic cooperation assay. *Braz J Med Biol Res* 29:1519-1523.
- Evans FJ, Schmidt RJ. 1979. The succulent euphorbias of Nigeria. III. Structure and potency of the aromatic ester diterpenes of *Euphorbia poisonii* Pax. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 45:181-191.
- Fatope MO, Zeng L, Ohayaga JE, Shi G, McLaughlin JL. 1996. Selectively cytotoxic diterpenes from *Euphorbia poisonii*. *J Med Chem* 39:1005-1008.
- Ferrigni NR, McLaughlin JL, Powell RG, Smith CR Jr. 1984. Use of potato disc and brine shrimp bioassays to detect activity and isolate piceatannol as the antileukemic principle from the seeds of *Euphorbia lagascae*. *J Nat Prod* 47:347-352.
- Furstenberger G, Hecker E. 1985. On the active principles of the spurge family (Euphorbiaceae). XI. The skin irritant and tumor promoting diterpene esters of *Euphorbia tirucalli* L. originating from South Africa. *Z Naturforsch* 40:631-646.
- Furstenberger G, Hecker E. 1986. On the active principles of Euphorbiaceae. XII. Highly unsaturated irritant diterpene esters from *Euphorbia tirucalli* originating from Madagascar. *J Nat Prod* 49:386-397.
- Galvez J, Zarzuelo A, Crespo ME, Lorente MD, Ocete MA, Jimenez J. 1993. Antidiarrhoeic activity of *Euphorbia hirta* extract and isolation of an active flavonoid constituent. *Planta Med* 59:333-336.
- Gschwendt M, Hecker E. 1973. On the biologically active compounds of Euphorbiaceae. I. Skin irritant and cocarcinogenic factors from *Euphorbia cooperi* N.E.Br. *Z Krebsforsch Klin Onkol Cancer Res Clin Oncol* 80:335-350.
- Gschwendt M, Hecker E. 1974. On the active principles of the spurge family. II. Skin irritant and cocarcinogenic factors from *Euphorbia triangularis* Desf. *Z Krebsforsch Klin Onkol Cancer Res Clin Oncol* 81:193-210.
- Gundidza M, Sorg B, Hecker E. 1992. A skin irritant phorbol ester from *Euphorbia cooperi* N.E.Br. *Cent Afr J Med* 38:444-447.
- Gundidza M, Sorg B, Hecker E. 1993. A skin irritant principle from *Euphorbia matabelensis* Pax. *J Ethnopharmacol* 39:209-212.
- Herngerhahn M, Kusumoto S, Hecker E. 1984. On the active principles of the spurge family (Euphorbiaceae). V. Extremely skin-irritant and moderately tumor-promoting diterpene esters from *Euphorbia resinifera* Berg. *J Cancer Res Clin Oncol* 108:98-109.
- Hiermann A, Bucar F. 1994. Influence of some traditional medicinal plants of Senegal on prostaglandin biosynthesis. *J Ethnopharmacol* 42:111-116.
- Imai S, Sugiura M, Mizuno F, Ohigashi H, Koshimizu K, Chiba S, Osato T. 1994. African Burkitt's lymphoma: a plant, *Euphorbia tirucalli*, reduces Epstein-Barr virus-specific cellular immunity. *Anticancer Res* 14:933-936.
- Ito M, Shinura H, Watanabe N, Tamai M, Hanada K, Takahashi A, Tanaka Y, Arai K, Zhang PL, Chang R. 1990. Hepatoprotective compounds from *Cabarium album* and *Euphorbia nematocypha*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 38:2201-2203.

- Kinghorn AD, Evans FJ. 1975. Skin irritants of *Euphorbia fortissima*. *J Pharm Pharmacol* 27:329-333.
- Kinghorn AD. 1979. Characterization of an irritant 4-deoxyphorbol diester from *Euphorbia tirucalli*. *J Nat Prod* 42:112-115.
- Lanthers MC, Fleurentin J, Cabalion P, Rolland A, Dorfman P, Misslin R, Pelt JM. 1990. Behavioral effects of *Euphorbia hirta* L.: sedative and anxiolytic properties. *J Ethnopharmacol* 29:189-198.
- Massmanian A. 1998. Contact dermatitis due to *Euphorbia pulcherrima* Willd, simulating a phototoxic reaction. *Contact Dermatitis* 38:113-114.
- Matsumoto T, Cyong JC, Yamada H. 1992. Stimulatory effects of ingenols from *Euphorbia kansui* on the expression of macrophage Fc receptor. *Planta Med* 58:255- 258.
- Miranda FJ, Alabai JA, Perez P, Orti M, Centeno JM, Yuste A, Sanz-Cervera JF, Marco JA, Alborch E. 1997. Analysis of rabbit vascular responses to DBI, an ingol derivative isolated from *Euphorbia canariensis*. *J Pharm Pharmacol* 49:573-576.
- Miranda FJ, Alabai JA, Orti M, Centeno JM, Pinon M, Yuste A, Sanz-Cervera JF, Marco JA, Alborch E. 1998. Comparative analysis of the vascular actions of diterpenes isolated from *Euphorbia canariensis*. *J Pharm Pharmacol* 50:237-241.
- Mizuno F, Osato T, Imai S, Koizumi S, Aya T, Kinoshita T, Hirai N, Hirota M, Ohigashi H, Koshimizu K. 1986. Epstein-Barr virus-enhancing plant promoters in east Africa. *AIDS Res* 2:S151-S155.
- Moulin A, Teissere M, Bernard C, Pieroni G. 1994. Lipases of the euphorbiaceae family: purification of a lipase from *Euphorbia characias* latex and structure-function relationships with the B chain of ricin. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:11328-11332.
- Nawito M, Ahmed YF, Zayed SM, Hecker E. 1998. Dietary cancer risk from conditional cancerogens in produce of livestock fed on species of spurge (Euphorbiaceae). II. Pathophysiological investigations in lactating goats fed on the skin irritant herb *Euphorbia peplus* and in their milk-raised kids. *J Cancer Res Clin Oncol* 124:179-185.
- Noack EA, Crea AE, Falsone G. 1980. Inhibition of mitochondrial oxidative phosphorylation by 4-deoxyphorbol triester, a poisonous constituent of the latex sap of *Euphorbia biglandulosa* Desf. *Toxicol* 18:165-174.
- Norhanom AW, Yadav M. 1995. Tumor promoter activity in Malaysian Euphorbiaceae. *Br J Cancer* 71:776-779.
- Oksuz S, Gil RR, Chai H, Pezzuto JM, Cordell GA, Ulubelen A. 1994. Biologically active compounds from the Euphorbiaceae; 2. Two triterpenoids of *Euphorbia cyparissias*. *Planta Med* 60:594-596.
- Oksuz S, Gurek F, Gil RR, Pengsuparp T, Pezzuto JM, Cordell GA. 1995. Four diterpene esters from *Euphorbia myrsinites*. *Phytochemistry* 38:1457-1462.
- Opferkuch HJ, Hecker E. 1982. On the active principles of the spurge family (Euphorbiaceae). IV. Skin irritant and tumor promoting diterpene esters from *Euphorbia ingens* E.Mey. *J Cancer Res Clin Oncol* 103:255-268.
- Osato T, Mizuno F, Imai S, Aya T, Koizumi S, Kinoshita T, Tokuda H, Ito Y, Hirai N, Hirota M. 1987. African Burkitt's lymphoma and an Epstein-Barr virus-enhancing plant *Euphorbia tirucalli*. *Lancet* 8544:1257-1258.
- Rinaldi A, Floris G, Finazzi-Agro A. 1982. Purification and properties of diamine oxidase from *Euphorbia latex*. *Eur J Biochem* 127:417-422.
- Santucci B, Picardo M, Cristaudo A. 1985. Contact dermatitis from *Euphorbia pulcherrima*. *Contact Dermatitis* 12:285-286.
- Sayed MD, Risz A, Hammounda FM, El-Missiry MM, Williamson EM, Evans FJ. 1980. Constituents of Egyptian Euphorbiaceae. IX. Irritant and cytotoxic ingenane esters from *Euphorbia paralias* L. *Experientia* 36:1206-1207.
- Schall VT, Vasconcellos MC, Valent GU, Sato MI, Furlan EV, Sanchez PS. 1991. Evaluation of the

genotoxic activity and acute toxicity of *Euphorbia splendens* latex, a molluscicide for the control of schistosomiasis. *Braz J Med Biol Res* 24:573-582.

Schall VT, Vasconcellos MC, Villaca-Coelho AL, Ferreira-Lopes FE, DaSilva IP. 1992. Evaluation of temporal, seasonal and geographic stability of the molluscicidal property of *Euphorbia splendens* latex. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 34:183-191.

Schall VT, Vasconcellos MC, DeSouza CP, Baptista DF. 1998. The molluscicidal activity of Crown of Christ (*Euphorbia splendens* var. *hislopilii*) latex on snails acting as intermediate host of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*. *Am J Trop Med Hyg* 58:7-10.

Schmidt RJ, Evans FJ. 1977. Candletoxins A and B, two new aromatic esters of 12-deoxy-16-hydroxy-phorbol, from the irritant latex of *Euphorbia poissonii* Pax. *Experientia* 33:1197-1198.

Seip EH, Hecker E. 1982. Skin irritant ingenol esters from *Euphorbia esula*. *Planta Med* 46:215-218.

Semple SJ, Reynolds GD, O'Leary MC, Flower RL. 1998. Screening of Australian medicinal plants for antiviral activity. *J Ethnopharmacol* 60:163-172.

Shen TJ. 1984. Antineoplastic effect of *Euphorbia fischeriana* Steud on mice with implanted tumor. *Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih* 4:46-47.

Singh GB, Kaur S, Satti NK, Atal CK, Maheshwari JK. 1984. Antiinflammatory activity of *Euphorbia acaulis* Roxb. *J Ethnopharmacol* 10:225-233.

Singh DK, Agarwal RA. 1984. Correlation of the anticholinesterase and molluscicidal activity of the latex of *Euphorbia royleana* on the snail *Lymnaea acuminata*. *J Nat Prod* 47:702-705.

Singla AK, Pathak K. 1989. Antiinflammatory studies on *Euphorbia prostrata*. *J Ethnopharmacol* 27:55-61.

Singla AK, Pathak K. 1990. Topical antiinflammatory effects of *Euphorbia prostrata* on carrageenan-induced footpad oedema in mice. *J Ethnopharmacol* 29:291-294.

Smith-Kielland I, Dornish JM, Malterud KE, Hviestendahl G, Romming C, Bockman OC, Kolsaker P, Stenstrom Y, Nordal A. 1996. Cytotoxic triterpenoids from the leaves of *Euphorbia pulcherrima*. *Planta Med* 62:322-325.

Sobolieva VO, Honcharov OI. 1979. Antibacterial activity of preparations from the spurge, *Euphorbia seguieriana* Neck., *virgultosa* Klok. and *E. semivilliosa* Prokh. *Farm Zh* 3:28-34.

Souza CA, DeCarvalho RR, Kuriyama SN, Araujo IB, Rodrigues RP, Vollmer RS, Alves EN, Paumgarten FJ. 1997. Study of the embryofetotoxicity of Crown-of-Thorns (*Euphorbia militi*) latex, a natural molluscicide. *Braz J Med Biol Res* 30:1325-1332.

Stirpe F, Licastro F, Morini MC, Parente A, Savino G, Abbondanza A, Bolognesi A, Falasca AI, Rossi CA. 1993. Purification and partial characterization of a mitogenic lectin from the latex of *Euphorbia marginata*. *Biochem Biophys Acta* 1158:33-39.

Szallasi A, Blumberg PM. 1989. Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, the irritant constituent in red pepper. *Neuroscience* 30:515-520.

Upadhyay RR, Ansarin M, Zarintan MH, Shakui P. 1976. Tumor promoting constituent of *Euphorbia serrata* L. latex. *Experientia* 32:1196-1197.

Upadhyay RR, Bakhtavar F, Ghaisarzadeh M, Tilabi J. 1978. Cocarcinogenic and irritant factors of *Euphorbia esula* L. latex. *Tumori* 64:99-102.

Upadhyay R, Samiyeh R, Tafazulli A. 1981. Tumor promoting and skin irritant diterpene esters of *Euphorbia virgata* latex. *Neoplasma* 28:555-558.

Wu D, Sorg B, Hecker E. 1995. New myrsinol-related polyfunctional pentacyclic diterpene esters from roots of *Euphorbia prolifera*. *J Nat Prod* 58:408-413.

Zamith HP, Paumgarten FJ, Speit G. 1996. Evaluation of the mutagenicity of molluscicidal latex of Christ's Crown (*Euphorbia militi* var. *hislopilii*) in mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *Mutation Res* 368:15-20.

Zayed SM, Farghaly M, Taha H, Gminski R, Hecker E. 1998. Dietary cancer risk from conditional cancerogens in produce of livestock fed on species of spurge (Euphorbiaceae). III. Milk of lactating goats fed on the skin irritant herb *Euphorbia peplus* is polluted by tumor promoters of the ingenane diterpene ester type. *J Cancer Res Clin Oncol* 124:301-306.

Zeng Y, Zhong JM, Ye SQ, Ni ZY, Miao XQ, Mo YK, Li ZL. 1994. Screening of Epstein-Barr virus early antigen expression inducers from Chinese medicinal herbs and plants. *Biomed Environ Sci* 7:50-55.