

1 **Interacción *in vitro* en líneas celulares de cáncer humano del extracto de *Crotón micans* con**
2 **fármacos quimioterapéuticos**

3
4 ***In vitro* interaction in human cancer cell lines of the extract of *Croton micans* with**
5 **chemotherapeutic drugs**

6
7 Luis José Rodríguez Mier y Teran¹, Samuel Alejandro Rodríguez López², Izaskun Urdanibia Ascanio³,
8 Alirica Isabel Suárez⁴

9
10 ¹Clínica RedSalud Providencia. Chile. ORCID:0000-0009-7793-2111. Autor de correspondencia:
11 siuljoseluis@hotmail.com

12
13 ²Universidad de Carabobo, Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela de Medicina Dr. Witremundo
14 Torrealba,. Venezuela. ORCID:0000-0002-2964-6492. samrolopez@gmail.com

15
16 ³Instituto de Investigación Biomédica de Lleida, Fundación Dr. Pifarre (IRBLleida). Grupo de
17 Biomarcadores en Cáncer. España. ORCID: 0000-0003-1261-3181. iurdanibia@gmail.com

18
19 ⁴Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Venezuela. ORCID: 0000-0002-3317-5179.
20 alirica1@yahoo.es

21
22 **Resumen.-** Los agentes quimioterapéuticos Doxorubicina y el Paclitaxel han sido cuestionados desde
23 hace algún tiempo, por los efectos negativos observados en algunos pacientes, cuando se usan en
24 concentraciones altas. Sin embargo, estudios han demostrado que productos de origen natural muestran
25 sinergia con estos fármacos reduciendo la dosis. En función de esa problemática se planteó determinar
26 el efecto *in vitro* del extracto del *Crotón micans*, en líneas celulares de cáncer humano, y su posible
27 interacción con ambos fármacos. Se estudiaron los dos fármacos, y el extracto de *C. micans* en las
28 líneas celulares MCF-7 y PC3. Se analizó la naturaleza de las interacciones entre los productos
29 naturales y los fármacos quimioterapéuticos calculando el correspondiente índice de combinación (CI)
30 y el índice de reducción (IDR). Se encontró que el extracto, no tiene efecto citotóxico y si un efecto
31 citostático sobre las líneas celulares estudiadas. Las combinaciones Doxorubicina/*C. micans*,
32 permitieron reducir la concentración del fármaco de 3,9 veces para inhibir la viabilidad celular en un
33 50% en la línea PC3, mientras que para MCF-7, se obtuvo un IDR de la dosis de 2,29. En lo que
34 respecta a la combinación del extracto y Paclitaxel solo mostro efecto sinérgico sobre la viabilidad
35 celular de la línea PC3 con un IDR de 2,9.

36
37 **Palabras clave:** Antraciclina, Doxorubicina, Euphorbiaceae, MCF-7, Paclitaxel, PC3,
38 Quimioterapéuticos, Sinergia

39
40
41 **ABSTRACT.-** The chemotherapeutic agents Doxorubicin and Paclitaxel have been questioned for
42 some time due to the negative effects observed in some patients when used in high concentrations.
43 However, studies have shown that products of natural origin display synergy with these drugs,
44 reducing the dose. Based on this problem, it was proposed to determine the *in vitro* effect of *Croton*
45 *micans* extract on human cancer cell lines and its possible interaction with both drugs. Doxorubicin,
46 Paclitaxel, and *C. micans* extract were studied in the MCF-7 breast cancer and PC3 prostate cancer cell
47 lines. The nature of the interactions between the natural products and the chemotherapeutic drugs was

48 analyzed by calculating the corresponding combination index (CI) and the dose reduction index (DRI).
49 It was found that the extract has no cytotoxic effect but does have a cytostatic effect on the studied cell
50 lines. The Doxorubicin/*C. micans* combinations allowed for a reduction in the drug concentration by
51 3.9 times to inhibit cell viability by 50% in the PC3 line, while for MCF-7, a DRI of 2.29 was
52 obtained. Regarding the combination of the extract and Paclitaxel, it only showed a synergistic effect
53 on the cell viability of the PC3 line with a DRI of 2.9.

54

55 **Keywords:** Anthracyclines, Doxorubicin, Euphorbiaceae, MCF-7, Paclitaxel, PC3,
56 Chemotherapeutics, Synergy

57

58

59

60 **Introducción**

61

62 El *Crotón* es el género más grande de la subfamilia Crotonoideae (Euphorbiaceae) con unas 1.300
63 especies a nivel mundial y unas 80 especies endémicas en Venezuela (Berry et al. 2005). Muchas
64 partes de las plantas (raíces, hojas, corteza, tallos y sabia) de este género son utilizadas en diversas
65 regiones de América, África y Asia por sus diferentes propiedades terapéuticas (Salatino et al. 2007).

66

67 Varias especies venezolanas pertenecientes al género *Croton* han sido caracterizadas y se ha estudiado
68 sus propiedades farmacológicas. Extracto acuoso del *C. cuneatus* posee efecto antiinflamatorio (Suárez
69 et al., 2006), la corteza de *C. malambo* se utiliza para tratar enfermedades tales como: diabetes, diarrea,
70 reumatismo, úlceras gástricas, así como también por sus efectos antiinflamatorios, antimicrobiana,
71 anticonceptivo (Suárez et al. 2003; Suárez et al. 2008). Extractos de la especie *C. caracasana*
72 mostraron tener actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer humano (Suárez et al., 2009). Por
73 otra parte, de la especie *C. micans* se aislaron compuestos, los cuales mostraron efecto citotóxico sobre
74 diferentes tipos diferentes de células tumorales humanas (Mateu et al., 2012; Vivas et al., 2013;
75 Martínez et al. 2019) y del látex de *C. gossypifolius* se encontró un potente efecto antimicrobiano
76 frente a diferentes bacterias patógenas (Godoy et al. 2020).

77

78 Ese efecto en la proliferación en células tumorales mostrado por el *C. micans*, resulta relevante para la
79 comunidad científica, ya que, según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), el cáncer
80 representa una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Según datos que posee esta
81 institución para el año de 2022 en territorio americano causó aproximadamente 1,4 millones de
82 muertes, siendo el grupo más numeroso aquel que incluía desde los jóvenes hasta los 69 años de edad,
83 representando un 45,1% (OPS, 2014). Estos números han motivado a la comunidad científica a buscar
84 nuevas moléculas con potencial quimioterapéutico en productos de origen natural. Los productos
85 medicinales de origen natural tienen la ventaja de tener efectos secundarios mínimos o nulos en
86 comparación con las drogas sintéticas (Suárez y Chávez, 2018). Entre las plantas con más potencial
87 fitofarmacológico para combatir el cáncer destacan, *Citrus limettioides*, *Origanum onites*, *Artemisia*
88 *campestris*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymelaea hirsute*, *Croton matourensis* y *Croton micans* (Sharma
89 et al. 2023). Es tal la importancia de los productos naturales que un estudio publicado por Alves et al.
90 (2021) menciona que durante el periodo comprendido entre 1981 y 2014, aproximadamente un 52% de
91 las moléculas aprobadas para su uso en la industria farmacéutica derivaron de productos naturales o
92 sus derivados. El reporte estima que de las 131 moléculas con potencial antitumoral aprobadas en ese
93 mismo período 85 eran de origen naturales, lo que representa un 64,88%.

94

95

96 El otro problema asociado con el tratamiento de cáncer es que algunos fármacos presentan respuestas
97 negativas en algunos pacientes cuando se usan altas concentraciones. Estudios han demostrado que las
98 antraciclinas pueden ser tóxicas cuando se emplean en altas concentración, en el caso de la
99 Doxorubicina ($> 500\text{mg/m}^2$) (Velásquez et al. 2016; Madonna et al. 2017; Mattioli et al. 2023). En lo
100 que respecta al Paclitaxel el uso de concentraciones elevadas ($> 0,05 \mu\text{mol/L}$) puede estar asociadas con
101 el desarrollo de neuropatías (Mielke et al. 2005). Estudios como estos han alertado a la comunidad
102 científica, lo que ha limitado su uso en algunos países.

103
104 En vista de que el *C. micans* posee un alto potencial farmacológico (Suárez et al. 2012) y tomando en
105 consideración que las altas concentraciones de Doxorubicina y la Paclitaxel están contraindicada, se
106 propuso en este estudio combinar un extracto del *C. micans* con los fármacos antes mencionados,
107 frente a líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7) y cáncer de próstata (PC3) para observar si
108 existía algún efecto en la proliferación celular.

111 **Materiales y Métodos**

112
113 **Material Vegetal.-** Las hojas de *C. micans* en periodo de floración fueron colectadas en Ocumare de la
114 Costa, estado Aragua, Venezuela. El género fue confirmado por el Dr. Stephen Tillett Botánico de la
115 Universidad Central de Venezuela (Caracas-Venezuela).

116
117 **Extracción de los compuestos bioactivos.-** Se empleó la metodología propuesta por Compagnone et
118 al. (2010), con modificaciones. El extracto obtenido (aceite esencial) fue disuelto en Dimetil sulfoxido
119 (DMSO) y las concentraciones evaluadas fueron 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30 y 100 $\mu\text{g/ml}$.

120
121 **Fármacos.-** La Doxorubicina (D5220) y el Paclitaxel (580555) ambos de la casa comercial Sigma
122 Aldrich, USA.

123
124 **Líneas celulares.-** Línea celular MCF-7 de cáncer de mamá humano y la línea celular PC3 de cáncer
125 de próstata humano.

126
127 **Cultivo de las líneas celulares.-** Se utilizó para la línea MCF-7, se empleó la metodología propuesta
128 por Gupta et al. (2017), usando el medio DMEM (Dulbecco`s modified Eagle`s medium, Sigma
129 Aldrich, USA) 3,7 g/L de NaHCO_3 , (Merck, Alemania), suplementado con 5 % suero fetal bovino
130 (Gibco, BRL, USA), 2 mM de L-glutamina (Sigma Aldrich, USA), 5 mM de HEPES (Sigma Aldrich,
131 USA), 100 U/ml de antibióticos (penicilina/estreptomicina, Sigma Aldrich, USA) y 2.5 g/L de glucosa
132 (Sigma Aldrich, USA). Para la línea celular de PC3 se empleó la metodología propuesta por Raeisi et
133 al. (2019), usando el medio HAM-F12 (Nutrient Mixture F-12 Ham, Sigma Aldrich, USA), 1,2 g/L de
134 NaHCO_3 (Merck, Alemania), suplementado con 10 % SFB, 2 mM de L-glutamina, 5 mM de HEPES
135 (Sigma Aldrich, USA) y 100 U/ml de 100 U/ml de antibióticos (penicilina/estreptomicina, Sigma
136 Aldrich, USA). Ambos cultivos se incubaron a 37°C en una atmosfera humificada de 5% CO_2 .

137
138 **Ensayo de citotoxicidad *in vitro*.-** Ensayo de citotoxicidad con Sulforrodamina B (SRB) usando la
139 metodología propuesto por Vajrabhaya et al. (2018). Se ajustó el número de células/ml (10×10^3
140 células/100 μl por pozo) para cada ensayo y se sembraron en placas de 96 pozos a un volumen 100 μl
141 de medio específico por pozo. Para el ensayo se tomaron dos placas una placa T = "0" y otra T = "48
142 h". En la placa T=0 se colocaron 6 pozos con la suspensión celular, y en otros 6 pozos medio de
143 cultivo, pero sin células para usar como blanco. Las placas se incubaron sin tratamiento por 24 h.

144 Transcurrido el tiempo, se agregaron 25 µl de ácido tricloroacético 1% a cada pozo, incluyendo los
145 pozos blancos y se incubaron por 1 h a 4 °C para la fijación. Luego se descartó el medio, se hicieron 5
146 lavados con 200 µl de agua bidestilada desionizada, se secó y se guardó protegida de la luz. A la placa
147 T = 48 h, se le descartó el sobrenadante de los pozos en condiciones estériles, y se agregó en un
148 volumen de 100 µl de las diferentes concentraciones. Se incubó por 48 h y se agregaron 25 µl de ácido
149 tricloroacético 1% y se incubó por 1 h a 4 °C, de la misma manera que se hizo con la placa T=0. En
150 ambas placas se agregaron 50 µl/pozo de SRB al 4%, se incubó por 20 min a temperatura ambiente
151 (protegiendo de la luz), se descartó el colorante, se hicieron 5 lavados con ácido acético 1%, se
152 agregaron 100 µl/pozo de trizma base 10 mM, se dejó por 5 min y se leyó la absorbancia a 515 nm en
153 un lector de placas ELISA.

154

155 **Ensayo de combinación del extracto de *C. micans* con los fármacos quimioterapéuticos.** Para las
156 dos líneas celulares (MCF-7 y PC3), se evaluó el intervalo de concentraciones comprendidos entre
157 0,1 y 100 µg/ml del extracto y entre 0,07 y 50 µg/ml de los fármacos quimioterapéuticos. Para
158 examinar la posibilidad de que el extracto de *C. micans* pudieran potenciar los efectos de
159 Doxorubicina y de Paclitaxel, sobre la viabilidad de las células MCF-7 y PC3, se diseñaron sus
160 combinaciones de la siguiente manera: [droga]/[extracto] = 0,07/0,1; 0,21/0,3; 0,62/1; 1,85/3;
161 5,56/10; 16,7/30 y 50/100 (en unidades de µg/ml).

162

163

164 **Análisis Estadístico.** Con los datos obtenidos se elabora una curva dosis-respuesta con un análisis de
165 regresión no lineal utilizando el algoritmo NCI. Tras la generación de la curva, se obtienen los
166 siguientes parámetros llevando a cabo una interpolación de la misma: la concentración necesaria para
167 inhibir el 50% del crecimiento celular (GI₅₀), inhibición total de crecimiento (TGI) y la citotoxicidad
168 en la forma de concentración de compuesto que causa la muerte de la mitad de la población celular
169 (LC₅₀) (GraphPadPrism 4.0., San Diego, USA). Se analizó la naturaleza de las interacciones entre el
170 extracto de *C. micans* y los fármacos quimioterapéuticos (Doxorrubicina y Paclitaxel) y se calculó el
171 correspondiente índice de combinación (CI) mediante el programa CalcuSyn versión 2.0 (Biosoft,
172 Cambridge, UK) a través de la ecuación de Chou-Taladay, el cual se fundamenta en una evaluación
173 matemática cuantitativa de la interacción farmacológica entre dos fármacos, donde valores de CI <1
174 indican sinergismo (cuanto menor es el valor, mayor es el grado de sinergismo) CI = 1 indica
175 aditividad, y CI > 1 indican antagonismo (Chou, 2006). Los resultados fueron expresados como el
176 promedio más o menos el error estándar medio (S.E.M.) de al menos 3 experimentos independientes
177 (X ± S.E.M). Los IC₅₀ fueron obtenidos mediante análisis de regresión no lineal (GraphPadPrism 4.0.,
178 San Diego, USA). Cada relación CI se representa como la media de al menos tres experimentos
179 independientes. Los valores de CI fueron analizados mediante la prueba *t* de Student.

180

181

182 **Resultados**

183

184 **Actividad citotóxica y citostática del extracto de *C. micans* y de los fármacos Doxorubicina y** 185 **Paclitaxel sobre la viabilidad de líneas celulares PC3 y MCF-7**

186

187 Para conocer si los componentes del extracto del *C. micans* eran tóxicos para la célula, se evaluó el
188 efecto citotóxico y citostático sobre ambas líneas celulares. De manera adicional también se evaluaron
189 los fármacos Doxorubicina y Paclitaxel. Los resultados se presentan en la tabla 1.

190

191

192 El extracto de *C. micans* mostró tener mayor actividad citostática observándose su efecto a
193 concentraciones menores de 29 $\mu\text{g/ml}$ en ambas líneas celulares; y a su vez se evidenció una inhibición
194 del 50% del crecimiento sobre la línea MCF-7 a concentraciones 3 veces menores que sobre PC3. El
195 extracto mostró no tener actividad citotóxica significativa a concentraciones menores de 100 $\mu\text{g/ml}$. Se
196 observó que en ambas líneas celulares la Doxorubicina inhibe totalmente el crecimiento a
197 concentraciones menores de 3 $\mu\text{g/ml}$, mientras que el Paclitaxel a concentraciones menores de 13
198 $\mu\text{g/ml}$. Se observó también, que la línea PC3 es más sensible a el Paclitaxel ($\text{LC}_{50} = 36,34 \mu\text{g/ml}$);
199 mientras que la línea MCF-7 es a la Doxorubicina ($\text{LC}_{50} = 21,72 \mu\text{g/ml}$) (Tabla 1).

201 **Efecto de la combinación del extracto de *C. micans* con los fármacos Doxorubicina y Paclitaxel** 202 **sobre las líneas celulares PC3 y la MCF-7**

203
204 En la segunda fase del estudio se evaluaron intervalos de concentraciones comprendidos entre 0,1 y
205 100 $\mu\text{g/ml}$ del extracto y de las drogas quimioterapéuticas entre 0,07 y 50 $\mu\text{g/ml}$, sobre ambas líneas
206 celulares. Los datos fueron analizados y se les determinó el valor de IC_{50} a cada uno. Los resultados
207 se muestran en la tabla 2.

208
209 El extracto mostró valores de IC_{50} muy cercanos entre sí para las dos líneas celulares, un
210 comportamiento parecido fue observado para la Doxorubicina en las dos líneas celulares. En lo que
211 respecta al Paclitaxel el comportamiento no fue el mismo que el observado para el otro fármaco,
212 mientras que para la línea PC3 se determinó un valor de 5,7 $\mu\text{g/mL}$, en la MCF-7, para todo el intervalo
213 de concentraciones ensayado se observó una inhibición prácticamente constante y cercana al 50%,
214 sugiriendo que se había alcanzado la meseta en la curva de inhibición de la viabilidad vs las
215 concentraciones de la droga.

216
217 Para determinar la posibilidad de que el extracto de *C. micans*, pudiera potenciar los efectos de
218 Doxorubicina y de Paclitaxel, sobre la viabilidad de las células PC3 y MCF-7, se evaluaron diferentes
219 combinaciones [droga]/[extracto]. La ausencia de efectos dependientes de las concentraciones de
220 Paclitaxel en las células MCF-7 (Figura 1) impidió el análisis de las combinaciones de ese fármaco
221 con el extracto, debido a las restricciones que el programa CalcuSyn®. Los resultados obtenidos
222 después del análisis de los resultados se muestran en la figura 1.

223
224
225 Como se puede observar en la figura 1, ocurrió una variación de los índices de combinación con las
226 fracciones afectadas por cada una de las combinaciones. Las gráficas que muestran los efectos de las
227 combinaciones del extracto con las células PC3 (figura 1) exhiben perfiles muy similares y claramente
228 sinérgicos para las menores fracciones afectadas mientras que la correspondiente a la figura 1C
229 muestra un perfil diferente. Este hallazgo indica que en las células MCF-7, se obtiene una mayor
230 probabilidad de alcanzar sinergia cuando las fracciones afectadas se encuentran alrededor de 0,75 (es
231 decir, cuando la inhibición de la viabilidad es del 75%) cuando se combinan la Doxorubicina con el
232 extracto en la proporción de 1/1,6. Estos resultados nos indican que, en todas las combinaciones
233 ensayadas, los índices de combinación están por debajo de la unidad cuando la fracción afectada es
234 igual 0,5 (50% de inhibición de la viabilidad).

235
236 Para poder estimar el grado en el que las dosis de uno o más agentes en la combinación pueden ser
237 reducidas para alcanzar efectos que sean comparables con aquellos alcanzados por los agentes solos, se
238 determinaron los índices de reducción de las dosis (IRD). En la tabla 3 se incluyeron los valores de

239 esos índices, además de los correspondientes índices de combinación (CI). En la siguiente tabla se
240 resume como fueron los índices determinados en este ensayo.

241
242 La Tabla 3, muestra como los co-tratamientos de Doxorubicina y Paclitaxel con el extracto de *C.*
243 *micans* indujo un efecto sinérgico afectando la viabilidad de las células PC3 comparados con las
244 drogas administradas individualmente. Todos los CI₅₀ mostrados son significativamente inferiores a la
245 unidad. Esa afirmación se basa en los valores del coeficiente de correlación lineal (que indica el ajuste
246 de los datos a la ecuación de Chou-Talalay), donde un valor de $r > 0,9$ se considera como
247 estadísticamente favorable. En lo que respecta las células MCF-7, se puede observar que la fracción
248 afectada corresponde a casi un 50% de inhibición de la viabilidad, los índices de combinación (CI₅₀) y
249 los índices de reducción de las dosis (IRD₅₀) señalan con claridad que los efectos de las combinaciones
250 del extracto y la Doxorubicina son sinérgicos. Este efecto sinérgico fue más representativo (2,29) que
251 los obtenidos con las mismas combinaciones en las células PC3.

254 **Discusión**

255
256 Los resultados encontrados con respecto a la citotoxicidad (tabla 1), sobre células cancerígenas
257 coinciden con los reportados por Campagnone et al. (2010), quienes evaluaron el aceite esencial del
258 *C. micans* y demostraron que los componentes fitoquímicos tenían citotoxicidad moderada contra
259 LoVo (carcinoma de colon), X-17 (carcinoma de colon), HeLa (cáncer de cuello uterino) y las
260 células control. Esa capacidad antiproliferativa fue confirmada por un estudio hecho por Vivas et al.
261 (2013), quienes evaluaron al ácido caracasina (monómero) y el ácido micansinoico (dímero),
262 pertenecientes al grupo de los seco-ent-kaurenos (aislados de *C. micans*) y encontraron inhibición
263 en el crecimiento de PC3 y de las células normales de una manera dependiente de la dosis después
264 de la exposición a ambos productos naturales. Estos dos seco-ent-kaurenos exhibieron
265 prácticamente una actividad citotóxica similar contra células tumorales humanas, pero no contra
266 células normales. Los hallazgos de este estudio reafirman el potencial citotóxico de los
267 componentes presentes en las hojas del *C. micans* sobre diferentes líneas celulares cancerígenas.

268
269
270 En lo que respecta al ensayo donde se evaluó el efecto de las concentraciones del extracto y de las
271 drogas Doxorubicina y Paclitaxel por separado (ver tabla 2), resalta el comportamiento de las dos
272 líneas celulares con el extracto, ya que se encontró que los IC₅₀ tuvieron valores muy cercanos, lo
273 que sugiere un mecanismo similar de inhibición en la proliferación celular. La Doxorubicina
274 mostró valores de IC₅₀ muy parecidos entre sí. Sin embargo, en la MCF-7 se encontró un valor de
275 IC₅₀ de 0,16 µg/ml, lo cual indica que esta droga tiene efectos citotóxicos más potentes que en las
276 células PC3 (2,0 µg/ml). Este resultado coincide con el reportado por Pan et al. (2017), quienes,
277 haciendo experimentos de 48h de duración, reportaron un valor aproximado de 0,20 µg/ml para el
278 IC₅₀ inhibitorio de la viabilidad para la Doxorubicina en las células MCF-7. Por otra parte, los
279 resultados obtenidos en las células MCF-7 tratadas con Paclitaxel son muy diferentes a los
280 observados en las PC3, en el intervalo de concentraciones ensayado con Paclitaxel (entre 0,07 y 50
281 µg/ml) se observó una inhibición prácticamente constante y cercana al 50%, sugiriendo que se había
282 alcanzado la meseta en la curva de inhibición de la viabilidad vs las concentraciones de la droga.
283 Este comportamiento fue reportado por Haghnavaz et al. (2017), quienes empleando el ensayo del
284 MTT en células MCF-7 tratadas por 24h con concentraciones de Paclitaxel comprendidas entre
285 0,107 y 6,848 µg/ml observaron porcentajes de inhibición cercanos al 70%, con poca variabilidad
286 en el tiempo.

287

288 La sinergia observada en este estudio para la línea PC3 coincide con la reportada por Vivas et al.
289 (2013), quienes estudiaron la combinación del ácido de caracasina y el ácido micansinoico,
290 (derivados de *C. micans*), con los fármacos Doxorrubicina y Paclitaxel, frente a línea celular de
291 cáncer de próstata (PC3) y fibroblastos de dermis humana (células control). Ellos observaron que
292 los dos ácidos en combinación con los fármacos mostraron un efecto sinérgico sobre las células
293 tumorales, resultando que la combinación de Doxorrubicina con ácido de caracasina o el ácido
294 micansinoico fue más efectiva que con Paclitaxel. En lo que respecta a la línea MCF-7, no existen
295 reportes en la literatura donde se haya evaluado la combinación del extracto con estos fármacos
296 quimioterapéuticos. Sin embargo, se observó un índice de reducción de la dosis de 2,29 en el caso de
297 las combinaciones Doxorrubicina/*C. micans*, teniendo mayor sensibilidad que la observada por la línea
298 celular de PC3. Un estudio similar fue realizado por Wang et al. (2016), quienes evaluaron si la
299 combinación de un conjugado de DDanshensu (omponente activo de la *Salvia miltiorrhiza*) con la
300 Doxorrubicina en la MCF-7. Entre lo más destacado del estudio resalta que el tratamiento conjunto de
301 DT-010 con el medicamento aumentó la apoptosis en células MCF-7 en relación con el fármaco solo,
302 se concluyó que la combinación del conjugado con la Doxorrubicina confiere el efecto sinérgico
303 antitumoral en las células de cáncer de mama MCF-7 a través de la regulación negativa de la vía
304 glucolítica y la inhibición de la expresión de GRP78.

305

306 Analizando estos resultados se pudiera presumir que, se puede disminuir las dosis de la Doxorrubicina y
307 el Paclitaxel en los tratamientos quimioterapéuticos, cuando se combina con un producto de origen
308 natural. Hacen falta más ensayos *in vitro*, con otras líneas celulares tanto cancerígenas como no
309 cancerígenas, para confirmar que el extracto es seguro y para evaluar diferentes mecanismos
310 bioquímicos de acción de los compuestos presentes en el extracto de *C. micans*, para conocer cómo
311 actúa en metabolismo celular, para de esa forma pensar en realizar ensayo *in vivo*.

312

313 Conclusiones

314

315 En el estudio no se incluyó como control una línea celular no cancerígena, que permitiera corroborar el
316 comportamiento de la moderada citotoxicidad del extracto evaluado y el posible efecto de la
317 combinación de este con los fármacos, por lo que no se puede asegurar que el comportamiento
318 observado es extrapolable a otro tipo de células. Sin embargo, se pudo observar que el extracto de *C.*
319 *micans*, posee efecto sobre la proliferación celular de cáncer de mama (MCF-7) y próstata (PC3)
320 inhibiendo su crecimiento. En todas las combinaciones ensayadas, el extracto incrementó los efectos
321 de las drogas quimioterapéuticas sobre la pérdida de la viabilidad celular, siendo las combinaciones
322 con Doxorrubicina las que mostraron el mayor efecto sinérgico. Hacen falta más ensayos *in vitro* con
323 otras líneas celulares, para poder confirmar sin son reproducibles y de esa forma planificar ensayos en
324 modelos animales.

325

326 Agradecimientos

327

328 Al laboratorio de Patología Celular y Molecular del Centro de Medicina Experimental del Instituto
329 Venezolano de Investigación Científicas (IVIC) los Teques-Venezuela y a todo el personal del
330 Herbario Dr. Víctor Manuel Ovalles de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela
331 (Caracas-Venezuela).

332

333

334 Conflicto de intereses

335
336 Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses en este estudio. El Estudio fue financiado con
337 recursos del laboratorio de Patología Celular y Molecular del Centro de Medicina Experimental del
338 Instituto Venezolano de Investigación Científicas (IVIC) los Teques-Venezuela.

340 341 **Contribución de los autores**

342 IUA: diseño de los experimentos, análisis de los resultados y revisión de la redacción. SAR: desarrollo
343 experimental, redacción, traducción del abstract. LJR: desarrollo experimental, redacción y análisis de
344 los resultados.

347 348 **Referencias**

349
350
351 Alves M, De Sousa Cabral L, De Oliveira T, Oliveira T, Hernández M, Medina J, María D. 2021.
352 Medicinal applications of *Euphorbia umbellata*, as an antitumor agent, antiulcerogenic and other
353 applications. *Journal of Pharmacognosy of Phytochemistry.*, 10(2), 29-35.
354 doi.org/10.22271/phyto.2021.v10.i2a.13669.

355
356 Berry EP, Hipp AL, Kenneth J, Wurdack KJ, Van Ee B, Riina R. 2005. Molecular phylogenetics of the
357 giant genus *Croton* and tribe Crotonae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS AND TRNL-TRNF
358 DNA sequence data. *American Journal of Botanical.* 92, 1520-1534. doi.org/10.3732/ajb.92.9.1520.

359
360 Chou T. 2006. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and
361 antagonism in drug combination studies. *Pharmacology Reviews.* 58(3), 621-681.
362 doi.org/10.1124/pr.58.3.10

363
364 Compagnone RS, Chávez K, Mateu E, Orsini G, Arvelo F, Suárez, A I. 2010. Composition and
365 cytotoxic activity of essential oils from *Croton matourensis* and *Croton micans* from Venezuela.
366 *Records of Natural Products*, 4(2).

367
368 Gupta E, Kaushik S, Purwar S, Sharma R, Balapure A, Sundaram S. 2017. Anticancer potential of
369 steviol in MCF-7 human breast cancer cells. *Pharmacognosy of Magazine.* 13(51):345-350.
370 doi.org/10.4103/pm.pm_29_17.

371
372 Godoy G, Ojeda L, León V, Escalona F, Mansilla D, Brewer M, Noguera-Machado N. 2020.
373 Antimicrobial potential of *Croton gossypifolius* (Euphorbiaceae) latex on species associated with
374 human infections. *Arnaldoa*, 27(1), 247-255. doi.org/10.22497/arnaldoa.271.27115.

375
376 Haghnavaz N, Asghari F, Elieh K, Shanehbandi D, Baradaran B, Kazemi T. 2017. HER2 positivity
377 may confer resistance to therapy with Paclitaxel in breast cancer cell lines. *Artificial Cells*
378 *Nanomedicine and Biotechnology.* 16,1-6. doi.org/10.1080/21691401.2017.1326927.

379
380 Madonna R. 2017. Diagnóstico y prevención de la cardiotoxicidad inducida por fármacos
381 antineoplásicos: de la imagen a las tecnologías «ómicas». *Revista Española de Cardiología* 70(7), 576-
382 582. doi.org/10.1016/j.recesp.2016.12.032

383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428

Martínez GP, Mijares MR, Chávez K, Suárez AI, Compagnone RS, Chirinos P, De Sanctis JB. 2019. Caracasine acid, an ent-3,4-seco-kaurene, promotes apoptosis and cell differentiation through NFκB signal pathway inhibition in leukemia cells. *European Journal of Pharmacology* 862(1). doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172624.

Mateu E, Chavez K, Riina R, Compagnone RS, Delle-Monache F, Suárez A. 2012. New 3,4-seco-ent-kaurene dimmers from *Croton micans*. *Natural Products Communications*. 7, 5-8.

Mattioli R, Ilari A, Colotti B, Mosca L, Fazi F, Colotti G. 2023. Doxorubicin and other anthracyclines in cancers: Activity, chemoresistance and its overcoming. *Molecular Aspects of Medicine* 93, 101205. doi.org/10.1016/j.mam.2023.101205.

Mielke S, Sparreboom A, Steinberg S, Gelderblom H, Unger C, Behringer D, Mross K. 2005. Association of Paclitaxel pharmacokinetics with the development of peripheral neuropathy in patients with advanced cancer. *Clinical Cancer Research*, 11(13), 4843-4850. doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0298.

Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2014. El Cáncer en la Región de las Américas, 2014. Enlace: OPS-Nota-Informativa-Cancer-2014.pdf. Disponible en: <https://www.paho.org/es/temas/cancer>.

Pan Y, Zhang F, Zhao Y, Shao D, Zheng X, Chen Y, He K, Li J, Chen L. 2017. Berberine enhances chemosensitivity and induces apoptosis through dose-orchestrated AMPK signaling in breast cancer. *Journal of Cancer*. 8(9),1679-1689. doi.org/10.7150/jca.19106

Raeisi F, Raeisi E, Heidarian E, Shahbazi-Gahrouri D, Lemoigne Y. 2019. Bromelain inhibitory effect on colony formation: an: in vitro: study on human AGS, PC3, and MCF7 cancer cells. *Journal of Medical Signals and Sensors*. 9(4), 267-273. doi.org/10.4103/jmss.JMSS_42_18.

Salatino A, Faria-Salatino M, Negri G. 2007. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *Journal of Brazilian Chemistry of Society*. 18, 11-33. doi.org/10.1590/S0103-50532007000100002.

Suárez AI, Salazar-Bookaman MM, Compagnone RS, Tillett S, Delle-Monache F, Di Giulio, C, Bruges G. 2003. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton malambo* aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 88,11-14.

Suárez AI, Blanco Z, Compagnone RS, Salazar-Bookaman MM, Zapata V, Alvarado C. 2006. Anti-inflammatory activity of *Croton cuneatus* aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 105, 99-101.

Suárez AI, Vásquez LJ, Taddei A, Arvelo F, Compagnone RS. 2008. Antibacterial and cytotoxic activity of leaf essential oil of *Croton malambo*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 11(2), 208–213. doi.org/10.1080/0972060X.2008.10643622.

- 429 Suárez AI, Chávez K, Mateu E, Compagnone R, Muñoz A, Sojo F, Arvelo F, Mijares M, De Sanctis J.
 430 2009. Cytotoxic activity of seco-ent-kaurenes from *Croton caracasana* on human cancer cell lines.
 431 Natural Products Communications. 4, 1547-1550.
 432
- 433 Suárez AI, Mateu E, Chávez K, Compagnone R, Orsini G, Tillett S. 2012. Perfil fitoquímico y
 434 farmacológico de *Croton micans*, Una visión general. Revista de la Facultad de Farmacia UCV. 75, 1-
 435 13.
 436
- 437 Suárez AI, Chávez K. 2018. Appraisal of medicinal plants with anticancer properties in south America.
 438 in: Akhtar, M., Swamy, M. (eds) Anticancer plants: Properties and Application. Springer, Singapore.
 439 doi.org/10.1007/978-981-10-8548-2_11
 440
- 441 Vajrabhaya L., Korsuwannawong, S. (2018). Cytotoxicity evaluation of a Thai herb using tetrazolium
 442 (MTT) and sulforhodamine B (SRB) assays. Journal of analytical science and technology, 9(1), 1-6.
 443 doi.org/10.1186/s40543-018-0146-0
 444
- 445 Sharma V, Kumar D, Dev K, Sourirajan A. 2023. Anticancer activity of essential oils: Cell cycle
 446 perspective. South African Journal of Botany. 157(1) :641-647. doi.org/10.1016/j.sajb.2023.04.031.
 447
- 448 Velásquez C, González, M, Berrouet M, Jaramillo N. 2016. Cardiotoxicidad inducida por la
 449 quimioterapia desde las bases moleculares hasta la perspectiva clínica. Revista Colombiana de
 450 Cardiología., 23(2), 104-111. doi.org/10.1016/j.rccar.2015.10.002
 451
- 452 Vivas J, Sojo F, Chávez K, Suárez AI, Arvelo, F. 2013. Cytotoxic effects of the monomer and dimer of
 453 3, 4-seco-ent-kaurene from *Croton micans* and their interaction with antitumoral drugs on cellular line
 454 of human prostate cancer. Letters in Drug Design & Discovery, 10(8), 683-688.
 455 doi.org/10.2174/15701808113109990021
 456
- 457 Wang L, Chan JY, Zhou Xi, Cui, Yan Z, Wang, Yan R, Di Li, Wang Y, Hoi MP, Shan L, Lee SM.
 458 2016. A Novel Agent Enhances the Chemotherapeutic Efficacy of Doxorubicin in MCF-7 Breast
 459 Cancer Cells. Frontiers in Pharmacology. 7 (1). doi.org/10.3389/fphar.2016.00249
 460
 461
 462
 463
 464
 465
 466
 467
 468
 469
 470
 471
 472

473 **Figura 1.** Valores de los índices de combinación (CI) graficados como una función de las fracciones afectadas
 474 en las combinaciones binarias indicadas en los títulos de cada gráfica. Las curvas con líneas sólidas son gráficas
 475 simuladas por computadora y los círculos negros representan valores experimentales de los CI. Las líneas
 476 punteadas por encima y por debajo de las curvas sólidas corresponden a los CI (multiplicados por $\pm 1,96$ veces

477 las desviaciones estándar) calculados con el programa CalcuSyn® y representan los límites (superior e inferior)
478 de los CI que permanecen dentro del intervalo de confianza del 95%. Los valores de CI <1 indican sinergia.
479

Manuscrito aceptado REMCB