

Evaluación *In vitro* de la combinación de extracto de *Crotón malambo* con fármacos quimioterapéuticos

In vitro evaluation the combination of *Crotón malambo* extract with chemotherapeutic drugs

Luis José Rodríguez Mier y Teran¹, Samuel Alejandro Rodríguez López²,
Izaskun Urdanibia Ascanio³, Alirica Isabel Suarez⁴

- ¹. Clínica RedSalud Providencia-Chile. <https://orcid.org/0000-0009-7793-2111>
- ². Escuela de Medicina Dr. Witremundo Torrealba, Universidad de Carabobo-Venezuela. <https://orcid.org/0000-0002-2964-6492>
- ³. Instituto de Investigación Biomédica de Lleida, Fundación Dr. Pifarre (IRBLleida). Grupo de Biomarcadores en Cáncer. España. <https://orcid.org/0000-0003-1261-3181>
- ⁴. Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. <https://orcid.org/0000-0002-3317-5179>

Recibido: Agosto 10 de 2024

Aceptado: Octubre 20 de 2024

*Correspondencia del autor: Luis José Rodríguez Mier

E-mail: siuljoseluis@hotmail.com

<https://doi.org/10.47499revistaaccb.v1i36.296>

Resumen

Los agentes quimioterapéuticos Doxorubicina y Paclitaxel han sido objeto de controversia debido a los efectos adversos observados en algunos pacientes cuando se administran en concentraciones elevadas, lo que ha limitado su aplicación clínica. Ante esta problemática, el presente estudio se propuso investigar el efecto *in vitro* del extracto de la corteza del *Crotón malambo* en líneas celulares de cáncer humano y su posible interacción con dichos fármacos. Para evaluar los efectos citotóxicos del extracto y los fármacos sobre las líneas celulares se empleó la Sulforodamina B. Además, se analizó la naturaleza de las interacciones entre el extracto de corteza y los fármacos quimioterapéuticos mediante el cálculo del índice de combinación (CI). Los resultados indicaron que el extracto de *C. malambo* no presenta efectos citotóxicos, pero sí un efecto citostático en las líneas celulares analizadas. Las combinaciones de Doxorubicina con *C. malambo* permitieron reducir la concentración del fármaco entre 3,9 y 4,8 veces para inhibir la viabilidad celular en un 50% en la línea PC3, mientras que en la línea MCF-7 se observó un índice de reducción de la dosis de 2,29. En cuanto a la combinación con Paclitaxel, solo se evidenció un efecto sinérgico en la viabilidad celular de la línea PC3. Estos hallazgos destacan el potencial farmacológico del aceite esencial de *C. malambo* y sugieren la necesidad de realizar estudios adicionales tanto *in vitro* como *in vivo* para confirmar su capacidad de sinergismo y su potencial para reducir las concentraciones terapéuticas de ambos fármacos.

Palabras clave: *Crotón malambo*, índice de combinación, terapia antitumoral, antraciclinas, sinergismo.

Abstract

The chemotherapeutic agents Doxorubicin and Paclitaxel have been the subject of controversy due to the adverse effects observed in some patients when administered in high concentrations, which has limited their clinical application. In view of this problem, the present study aimed to investigate the *in vitro* effect of *Croton malambo* bark extract on human cancer cell lines and its possible interaction with these drugs. Sulforhodamine B was used to evaluate the cytotoxic effects of the extract and the drugs on the cell lines. In addition, the nature of the interactions between the bark extract and the chemotherapeutic drugs was analyzed by calculating the combination index (CI). The results indicated that *C. malambo* extract shows no cytotoxic effects, but a cytostatic effect on the cell lines tested. Combinations of Doxorubicin with *C. malambo* allowed a 3.9- to 4.8-fold reduction in drug concentration to inhibit cell viability by 50% in the PC3 line, while a dose reduction index of 2.29 was observed in the MCF-7 line. As for the combination with Paclitaxel, only a synergistic effect on cell viability was evident in the PC3 line. These findings highlight the pharmacological potential of *C. malambo* essential oil and suggest the need for further studies both *in vitro* and *in vivo* to confirm its capacity for synergism and its potential to reduce the therapeutic concentrations of both drugs.

Keywords: *Croton malambo*, combination index, antitumor therapy, anthracyclines, synergism.

Introducción

Según la Organización Panamericana de la Salud, el cáncer representa una de las principales causas de muerte en todo el territorio americano; para el año de 2012, causó aproximadamente 1,4 millones de muertes, siendo el grupo más numeroso aquel que incluía personas de 69 años o más jóvenes, lo que representa un 45,1% (1). Actualmente existen diferentes protocolos y tratamientos definidos para combatir esta enfermedad, lo que ha mejorado las expectativas de vida de los pacientes. Adicionalmente existe un espectro amplio de fármacos anticancerosos que han demostrado durante años ser buenos agentes quimioterapéuticos, entre ellos destacan la Doxorubicina y el Paclitaxel. Sin embargo, se ha demostrado que las antraciclinas como la Doxorubicina pueden generar cardiotoxicidad a altas concentraciones (como resultado del efecto citotóxico irreversible) ($> 500 \text{ mg/m}^2$). (2,3,4). En lo que respecta al Paclitaxel el uso de concentraciones elevadas ($> 0,05 \text{ } \mu\text{mol/L}$) puede estar asociadas con el desarrollo de neuropatías en pacientes con cáncer avanzado (5). Estos resultados han alertado a la comunidad científica, lo que ha limitado su uso en algunos países.

La disminución de la eficacia de algunos fármacos y/o su asociación con efectos secundarios que comprometen la salud de los pacientes, a motivados la búsqueda de nuevas moléculas que puedan ejercer efectos terapéuticos con un impacto mínimo en el individuo. La explo-

ración de nuevas moléculas con potencial quimioterapéutico ha impulsado a los investigadores a considerar alternativas derivadas de productos naturales. Newman y Cragg (2020) (6) mencionan que durante el periodo comprendido entre 1981 y 2014, aproximadamente un 52% de las moléculas en la industria farmacéutica provenían de productos naturales o sus derivados. De las 131 moléculas con potencial antitumoral aprobadas en ese mismo periodo, 85 eran de productos naturales y sus derivados, lo que representó un 49%. Los productos medicinales de este origen tienen la ventaja de tener efectos secundarios mínimos o nulos, en comparación con las drogas sintéticas (7).

Entre las plantas con mayor potencial farmacológico para combatir el cáncer destacan la Lima (*Citrus limetoides*), el Orégano (*Origanum onites*), el Tomillo (*Artemisia campestris*), el Romero (*Rosmarinus officinalis*), la Bofalaga (*Thymelaea hirsute*), algunas especies de *Croton* (8) y el muérdago europeo (*Viscum álbium* L.) el cual ha sido ampliamente usado para el tratamiento contra el cáncer (9). En Latinoamérica están diseminadas diferentes especies del género *Croton* de la subfamilia Crotonoideae (Euphorbiaceae) que han mostrado diferentes propiedades terapéuticas (10).

En Venezuela se han realizado estudios de caracterización y determinación de propiedades farmacológicas en varias especies vegetales pertenecientes al género

Croton, en los que se ha demostrado que muchas de ellas tienen propiedades farmacológicas; el látex de *C. gossypifolius* mostró un potente efecto antimicrobiano frente a diferentes bacterias patógenas (11), de las flores del *C. caracasana*, se aislaron dos seco-ent-kaurenos (el ácido caracasina y la caracasina) con efecto citotóxico sobre las líneas celulares HeLa, MCF-7, PC3, LoVo, X-17, Jurkat E6.1 y Jurkat JCaM1.6 (12), la corteza del *C. malambo* mostró un efecto antimicrobiano significativo sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y antimicrobiano sobre la *Candida tropicalis*; así como también mostró actividad citotóxica sobre las líneas celulares de cánceres humanos MCF-7, PC3 y LoVo (13,14). De los tallos y hojas de la especie *C. micans* se han aislado compuestos con capacidad antiinflamatoria, antihistamínica, analgésica y con efecto citotóxico sobre diferentes líneas celulares tumorales (HeLa, MCF-7, PC3, LoVo, jurkat E6.1 y jurkat jCaM1.6) (15,16).

Teniendo en cuenta la actividad citotóxica demostrada por el *C. malambo* y considerando el potencial farmacológico de la Doxorubicina y el Paclitaxel, se propuso en este estudio combinar un extracto de la corteza *C. malambo* con bajas concentraciones de los fármacos antes mencionados, sobre las líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7) y de cáncer de próstata (PC3) para observar si la combinación fármaco/extracto produce un efecto sobre la proliferación celular.

Materiales y métodos

Material Vegetal

La especie *C. malambo*, fue colectada en Santa Bárbara del Zulia, estado Zulia en Venezuela. Una muestra representativa de esta colección, MYF 17824, se guardó en el Herbario Víctor Manuel Ovalles, de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

Extracción de los compuestos bioactivos

Se empleó la metodología propuesta por Suarez et al. (2008) (14), con modificaciones. Se emplearon 500 g de la muestra fueron sometidas a un proceso de hidrodestilación por 3 h (usando un aparato tipo Clevenger). El aceite fue secado con Sulfato de Sodio anhídrido y almacenado a 5°C. El aceite esencial fue disuelto en Dimetil sulfoxido (DMSO).

Fármacos

La Doxorubicina (D5220) y el Paclitaxel (580555) ambos de la casa comercial Sigma Aldrich, USA.

Líneas celulares

Línea celular MCF-7 de cáncer de mamá humano y la línea celular PC3 de cáncer de próstata humano. Los experimentos se hicieron bajo un diseño completamente al azar con siete tratamientos (concentraciones) y un grupo control, la unidad experimental fueron los pocillos con las células.

Cultivo de las líneas celulares

Se cultivó la línea MCF-7 de acuerdo con el protocolo propuesto por Gupta et al. (2017) (16), usando el medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma Aldrich, USA) (pH 7,4), 3,7 g/L de NaHCO₃, (Merck, Alemania), suplementado con 5% suero fetal bovino (Gibco, BRL, USA), 2 mM de L-glutamina (Sigma Aldrich, USA), 5 mM de HEPES (Sigma Aldrich, USA), 100 U/ml de antibióticos (penicilina/estreptomicina, Sigma Aldrich, USA) y 2,5 g/L de glucosa (Sigma Aldrich, USA). Para la línea celular de PC3 se empleó la metodología propuesta por Raesi et al. (2019) (17) usando el medio HAM-F12 (Nutrient Mixture F-12 Ham, Sigma Aldrich, USA), 1,2 g/L de NaHCO₃ (Merck, Alemania), suplementado con 10% SFB, 2 mM de L-glutamina, 5 mM de HEPES (Sigma Aldrich, USA) y 100 U/ml de 100 U/ml de antibióticos (penicilina/estreptomicina, Sigma Aldrich, USA). Ambos cultivos se incubaron a 37°C en una atmosfera humificada de 5% CO₂.

Ensayo de citotoxicidad *in vitro*

Ensayo de Sulforrodamina B (SRB) usando la metodología propuesta por Vichai y Kirtikara (2006) (18). Se ajustó el número de células/ml (10 x 10³ células/100 µl por pozo) para cada ensayo y se sembraron en placas de 96 pozos a un volumen 100 µl de medio específico por pozo. Para el ensayo se tomaron dos placas una placa T = "0" y otra T = "48 h". En la placa T=0 se colocaron 6 pozos con la suspensión celular, y en otros 6 pozos medio de cultivo, pero sin células para usar como blanco. Las placas se incubaron sin tratamiento por 24 h. Transcurrido el tiempo, se agregaron 25 µl de ácido tricloroacético 1% a cada pozo, incluyendo los pozos blancos y se incubaron por 1 h a 4 °C para la fijación. Luego se descartó el medio, se hicieron 5 lavados con 200 µl de agua bidestilada desionizada, se secó y se guardó protegida de la luz. A la placa T = 48 h, se le descartó el sobrenadante de los pozos en condiciones estériles, y se agregó en un volumen de 100 µl los tratamientos a las diferentes concentraciones. Se incubó por 48 h y se agregaron 25 µl de ácido tricloroacético 1% y se incubó por 1 h a 4 °C, de la misma manera que se hizo con la

placa T=0. En ambas placas se agregaron 50 µl/pozo de SRB al 4%, se incubó por 20 min a temperatura ambiente (protegiendo de la luz), se descartó el colorante, se hicieron 5 lavados con ácido acético 1%, se agregaron 100 µl/pozo de trizma base 10 mM, se dejó por 5 min y se leyó la absorbancia a 510 nm en un lector de placas ELISA.

Ensayo de combinación del extracto de *C. malambo* con los fármacos quimioterapéuticos.

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

Análisis estadístico

Con los datos obtenidos se elabora una curva dosis-respuesta con un análisis de regresión no lineal utilizando el algoritmo NCI que utiliza como parámetros:

Tz = número de células control a tiempo t = 0

C = número de células control a tiempo t

T = número de células tratadas a tiempo t

Si $Tz < T < C$ (inhibición del crecimiento), entonces: $100 \times \frac{[T - Tz]}{[C - Tz]}$

Si $T < Tz$ (muerte celular neta), entonces: $100 \times \frac{[T - Tz]}{Tz}$

Tras la generación de la curva, se obtienen los siguientes

parámetros llevando a cabo una interpolación de la misma: la concentración necesaria para inhibir el 50% del crecimiento celular (GI_{50}), inhibición total de crecimiento (TGI) y la citotoxicidad en la forma de concentración de compuesto que causa la muerte de la mitad de la población celular (LC_{50}) (GraphPadPrism 4.0., San Diego, USA). Los resultados fueron expresados como el promedio más o menos el error estándar medio (S.E.M.) de al menos 3 experimentos independientes ($X \pm S.E.M$). Adicionalmente se analizó la naturaleza de las interacciones entre el extracto de *C. malambo* y los fármacos quimioterapéuticos (Doxorrubicina y Paclitaxel) mediante el cálculo del correspondiente índice de combinación (IC) mediante el programa CalcuSyn versión 2.0 (Biosoft, Cambridge, UK) a través de la ecuación de Chou-Taladay, el cual se fundamenta en una evaluación matemática cuantitativa de la interacción farmacológica entre dos fármacos, donde valores de $IC < 1$ indican sinergismo (cuanto menor es el valor, mayor es el grado de sinergismo) $IC = 1$ indica aditividad, y $IC > 1$ indican antagonismo (19).

Resultados

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

Para conocer si los componentes del extracto del *C. malambo* eran tóxicos para la célula, se evaluó el efecto citotóxico y citostático sobre ambas líneas celulares.

De manera adicional también se evaluaron los fármacos quimioterapéuticos Doxorubicina y Paclitaxel. Los resultados se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 1. Efecto del extracto de *C. malambo* y de los fármacos Doxorubicina y Paclitaxel sobre los parámetros de crecimiento celular de la línea celular PC3 y MCF-7

| | PC3 | | | MCF-7 | | |
|-------------------|--------------------|--------------|--------------------|--------------------|--------------|--------------------|
| | IG_{50} mg/ml | TGI mg/ml | LC_{50} mg/ml | IG_{50} mg/ml | TGI mg/ml | LC_{50} mg/ml |
| <i>C. malambo</i> | 50,34±2,02 | >100 | >100 | 52,28±3,20 | >100 | >100 |
| Doxorrubicina | 0,58±0,01 | 2,49±0,10 | >50 | 0,06±0,01 | 0,48±0,02 | 21,72±0,14 |
| Paclitaxel | 0,84±0,20 | 2,77±0,70 | 36,34± | 0,05±0,02 | 12,24±0,25 | >50 |

GI_{50} - inhibición del 50 % de crecimiento, TGI - inhibición total de crecimiento, LC_{50} - citotoxicidad del 50%. Resultados expresados en µg/ml. >100: no se observó efecto citotóxico a la mayor concentración utilizada en el ensayo (100 mg/ml). >50: no se observó efecto citotóxico a la mayor concentración utilizada en el ensayo (50 Mg/ml). Las células fueron cultivadas por 48 h y la viabilidad celular fue estimada mediante el ensayo de SRB. Los resultados corresponden a un experimento representativo de tres, con similares resultados (n=3).

Los experimentos de citotoxicidad y citostásis indican que el extracto de *C. malambo* posee un efecto citostático sobre las dos líneas celulares estudiadas a concentraciones menores de 53 µg/ml (Tabla 1). No se observó actividad citotóxica significativa a concentraciones menores de 100 µg/ml. Se observó que en ambas líneas celulares la Doxorubicina inhibe totalmente el crecimiento a concentraciones menores de 3 µg/ml, mientras que el Paclitaxel a concentraciones menores de 13 g/ml. Adicionalmente se observó también, que la línea PC3 es más sensible a el Paclitaxel ($LC_{50} = 36,34$ µg/ml); mientras que la línea MCF-7 resulto ser sensible a la Doxorubicina ($LC_{50} = 21,72$ µg/ml).

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

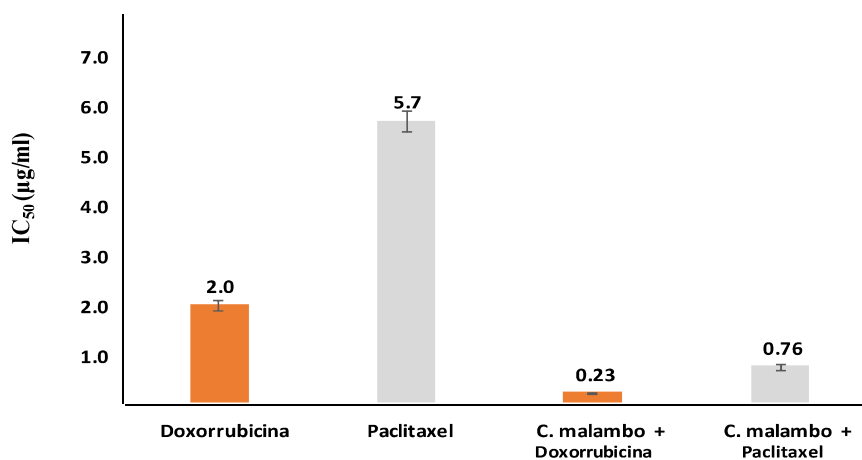
Una vez que se confirmó el efecto inhibitorio en el crecimiento celular del extracto y de las drogas, se procedió a evaluar nuevos intervalos de concentraciones comprendidos entre 0,1 y 100 µg/ml del extracto y de las drogas quimioterapéuticas entre 0,07 y 50 µg/ml, sobre ambas líneas celulares. Los datos fueron agrupados y se les determinó el valor de IC_{50} a cada uno mediante un proceso de regresión lineal. Los resultados se muestran en la siguiente figura.

Tabla 2. Efectos inhibitorios de diferentes concentraciones del extracto de *C. malambo* y de las drogas Doxorubicina y Paclitaxel sobre la viabilidad de las células PC3 y MCF-7 expresado en la forma de los IC_{50}

| | PC3 IC_{50} (µg/mL) | MCF-7 IC_{50} (µg/mL) |
|-------------------|--------------------------|----------------------------|
| <i>C. malambo</i> | 94,9±2,3 | 79,4±4,1 |
| Doxorubicina | 2,0±0,1 | 1,16±0,1 |
| Paclitaxel | 5,7±0,2 | N.D. |

Tanto el extracto como el fármaco Doxorubicina mostraron valores de IC_{50} muy cercanos entre sí para las dos líneas celulares. En lo que respecta al Paclitaxel el comportamiento no fue el mismo que el observado para el otro fármaco, mientras que para la línea PC3 se determinó un valor de 5,7 µg/ml, en la MCF-7, para todo el intervalo de concentraciones ensayado se observó una inhibición prácticamente constante y cercana al 50%, sugiriendo que se había alcanzado la meseta en la curva de inhibición de la viabilidad vs las concentraciones de la droga.

Para determinar la posibilidad de que el extracto de *C. malambo*, pudieran potenciar los efectos de Doxorubicina y de Paclitaxel, sobre la viabilidad de las células PC3 y MCF-7, se evaluaron diferentes combinaciones [droga]/[extracto]. La ausencia de efectos dependientes de las concentraciones de Paclitaxel en las células MCF-7 (ver figura 1), limitaron su combinación por las restricciones que el programa CalcuSyn®. Para estimar el grado en el que las dosis de uno o más agentes en la combinación pueden reducirse para alcanzar efectos comparables a los alcanzados por los agentes solos, se determinaron los índices de reducción de las dosis (IRD). En la tabla 2 se incluyeron los valores de esos índices, además de los correspondientes índices de combinación (IC). En la siguiente tabla se resume como fueron los índices determinados en este ensayo.

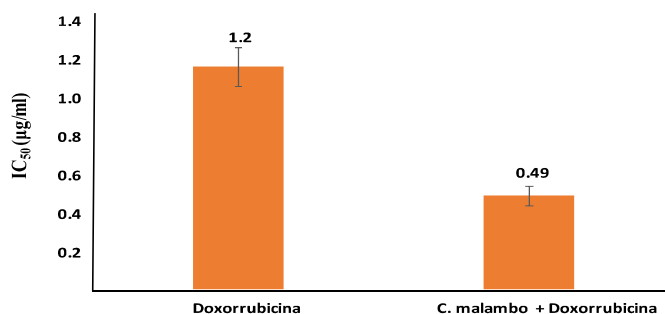


| Tratamiento | IDR ₅₀ ± SEM | r ± SEM |
|----------------------------------|-------------------------|-------------|
| <i>C. malambo</i> + Doxorubicina | 4,8 ± 0,5 | 0,98 ± 0,01 |
| <i>C. malambo</i> + Paclitaxel | 1,6 ± 0,1 | 0,93 ± 0,06 |

IC₅₀ = Índice de combinación; r = coeficiente de correlación lineal; IDR₅₀ = Índice de reducción. Se muestran los promedios ± el error medio estándar medio de 3 ensayos independiente, calculados con el programa CalcuSyn®.

Figura 1. Comparación del efecto de la combinación de extracto *C. malambo* con los fármacos Doxorubicina y Paclitaxel con respecto al efecto de las drogas solas en la línea celular PC3. Los resultados corresponden a un experimento representativo de tres, con similares resultados (n=3).

La figura 1, muestra como los co-tratamientos de Doxorubicina y Paclitaxel con el extracto de *C. malambo* indujeron un efecto sinérgico afectando la viabilidad de las células PC3 comparados con las drogas administradas individualmente. Todos los IC₅₀ mostrados son significativamente inferiores a la unidad. Esa afirmación se basa en los valores del coeficiente de correlación lineal (que indica el ajuste de los datos a la ecuación de Chou-Talalay), donde un valor de r >0,9 se considera como estadísticamente favorable.



| Tratamiento | IDR ₅₀ ± SEM | r ± SEM |
|----------------------------------|-------------------------|-------------|
| <i>C. malambo</i> + Doxorubicina | 2,06 ± 0,04 | 0,94 ± 0,03 |

IC₅₀ = Índice de combinación; r = coeficiente de correlación lineal; IDR₅₀ = Índice de reducción. Se muestran los promedios ± el error medio estándar medio de 3 ensayos independiente, calculados con el programa CalcuSyn®.

Figura 2. Comparación del efecto de la combinación de extracto *C. malambo* con el fármaco Doxorubicina y con respecto al efecto de las drogas sola en la línea celular MCF-7. Los resultados corresponden a un experimento representativo de tres, con similares resultados (n=3).

En cuanto a las células MCF-7, se observa (Figura 2) que la fracción afectada corresponde a un 50 % de inhibición de la viabilidad, los índices de combinación (IC_{50}) y los índices de reducción de dosis (IRD_{50}) señalan que los efectos de las combinaciones del extracto y la doxorrubicina son sinérgicos. No obstante, estos efectos sinérgicos fueron más moderados que los obtenidos con las mismas combinaciones en las células PC3.

Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio sobre el aceite esencial de *Croton malambo* corroboran la actividad citotóxica reportada en investigaciones previas. Como se muestra en la Tabla 1, el aceite esencial de *C. malambo* exhibe una notable actividad citotóxica contra células cancerosas, consistente con los hallazgos de Suárez *et al.* (2008), quienes caracterizaron los extractos de *C. malambo* y documentaron efectos significativos en la proliferación de células cancerosas (19). De manera similar, Caro-Fuentes *et al.* (2019) encontraron que los extractos de *C. malambo* inhiben efectivamente la viabilidad de las células de cáncer de pulmón, con valores de IC_{50} inferiores a 100 $\mu\text{g/ml}$ (20). En otro estudio se demostró que *C. malambo* tiene efectos moderadamente tóxicos en linfocitos humanos, con valores de LC_{50} entre 100 $\mu\text{g/ml}$ y 1000 $\mu\text{g/ml}$ (21). Estos hallazgos sugieren que, aunque el extracto puede presentar cierta toxicidad en células no cancerosas, su potencial terapéutico en el contexto de células cancerosas es prometedor. Esta toxicidad moderada es comparable a la observada en estudios anteriores sobre aceites esenciales derivados de otras especies del género *Croton* (22).

En el análisis del efecto del extracto en combinación con Doxorrubicina y Paclitaxel (ver Tabla 2), observamos que el extracto de *C. malambo* potencia la actividad citotóxica de estos fármacos. La combinación con Doxorrubicina permitió reducir la concentración necesaria para inhibir la viabilidad celular, con una reducción de dosis de 3,9 a 4,8 veces en células PC3 y un índice de reducción de dosis de 2,29 en células MCF-7. Estos resultados están alineados con estudios previos que documentan la sinergia entre extractos vegetales y quimioterapéuticos (23). La interacción sinérgica observada sugiere un potencial para la combinación del extracto con Doxorrubicina como una estrategia para mejorar la eficacia del tratamiento y reducir efectos adversos asociados con concentraciones más altas de fármacos quimioterapéuticos.

Por otro lado, el efecto sinérgico observado con Paclitaxel en la línea celular PC3, pero no en MCF-7 indica una especificidad en la interacción entre el extracto y los diferentes fármacos y líneas celulares. Este fenómeno también se ha documentado en estudios que investigan la eficacia de combinaciones de extractos vegetales con fármacos antitumorales (24). La inhibición casi constante observada con Paclitaxel en células MCF-7 puede sugerir la necesidad de ajustar las concentraciones del extracto o explorar otras combinaciones para optimizar la respuesta terapéutica.

Un aspecto crítico de nuestra investigación es el uso del ensayo de Sulforodamina B (SRB), que proporciona una medida precisa y reproducible de la viabilidad celular y permite la evaluación de efectos citotóxicos de manera más efectiva que otros métodos como el ensayo de MTT. La investigación sobre plantas con actividad anticancerosa destaca que la elección del método de evaluación puede influir significativamente en los resultados obtenidos y en la interpretación de la eficacia de los extractos vegetales (25). El ensayo de SRB es útil para superar limitaciones del ensayo de MTT, como la interferencia de extractos vegetales en la coloración, evaluando más precisamente el impacto del extracto en la viabilidad celular y facilitando la comparación con otros estudios.

La relevancia clínica de nuestros hallazgos radica en el potencial del extracto de *C. malambo* para reducir la dosis efectiva de fármacos quimioterapéuticos, minimizando así los efectos adversos y el desarrollo de resistencia a la quimioterapia. Este efecto sinérgico podría ofrecer una estrategia valiosa para mejorar el tratamiento del cáncer, aunque se requieren más estudios *in vivo* y ensayos clínicos para confirmar estos resultados y evaluar la seguridad y eficacia en contextos clínicos.

Conclusiones

En conclusión, el aceite esencial de *Croton malambo* muestra un efecto citotóxico significativo sobre células cancerosas, con una notable capacidad para potenciar la actividad de Doxorrubicina y, en menor medida, de Paclitaxel. Los resultados indican un efecto sinérgico significativo, especialmente en combinación con Doxorrubicina, lo que sugiere una estrategia prometedora para mejorar la eficacia de los tratamientos quimioterapéuticos y reducir sus efectos adversos. La aplicación del ensayo de Sulforodamina B en esta investigación refuerza la validez de nuestros resultados al proporcionar una medida precisa de la viabilidad celular. Estos

hallazgos subrayan el potencial farmacológico del extracto de *C. malambo* como agente auxiliar en la terapia contra el cáncer, destacando la necesidad de futuras investigaciones para validar estos efectos y explorar su aplicación clínica.

Agradecimientos

Al laboratorio de Patología Celular y Molecular del Centro de Medicina Experimental del Instituto Venezolano de Investigación Científicas (IVIC) los Teques-Ve-

nezuela y al Laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela

Conflictos de intereses y financiación

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

Referencias

1. 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>.
2. Velásquez, C., González, M., Berrouet, M. & Jaramillo, N. (2016). Cardiotoxicidad inducida por la quimioterapia desde las bases moleculares hasta la perspectiva clínica. *Rev Colomb Cardiol.*, 23(2), 104-111.
3. Madonna, R. (2017). Diagnóstico y prevención de la cardiotoxicidad inducida por fármacos anti-neoplásicos: de la imagen a las tecnologías «ómicas». *Rev Española Cardiol.*, 70(7), 576-582.
4. Mattioli, R., Ilari, A., Colotti, B., Mosca, L., Fazi, F. & Colotti, G. (2023). Doxorubicin and other anthracyclines in cancers: Activity, chemoresistance and its overcoming. *Mol Asp Med.*, 93, 101205. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2023.101205>.
5. 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. *Clin Cancer Res.*, 11(13), 4843-4850. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0298>.
6. Newman, D. & Cragg, G. (2020). Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod.* 2020 Mar 27;83(3):770-803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>.
7. Suárez, A. & Chávez, K. (2018). Appraisal of Medicinal Plants with Anticancer Properties in South America. En M. S. Akhtar & M. K. Swamy (Eds.), *Anticancer plants: Properties and Application: Volume 1* (pp. 229-283). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8548-2_11
8. Sharma, V., Kumar, D., Dev, K., & Sourirajan, A. (2023). Anticancer activity of essential oils: Cell cycle perspective. *South African Journal of Botany*, 157, 641-647. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.04.031>
9. Thronicke, A., Schad, F., Debus, M., Grabowski, J., & Soldner, G. (2022). *Viscum album* L. Therapy in Oncology: An Update on Current Evidence. *Complementary Medicine Research*, 29(4), 362-368. <https://doi.org/10.1159/000524184>
10. Salatino, A., Faria-Salatino, M. & Negri, G. (2007). Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *J Braz Chem Soc.* 18, 11-33. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532007000100002>
11. Godoy, G., Ojeda, L., León, V., Escalona, F., Mansilla, D., Brewer, M. & Noguera-Machado, N. (2020). Antimicrobial potential of *Croton gossypifolius* (Euphorbiaceae) latex on species associated with human infections. *Arnaldoa*, 27(1), 247-255. <http://dx.doi.org/10.22497/arnaldoa.271.27115>
12. Suárez, A., Chavez, K., Mateu, E., Compagnone, R., Muñoz, A., Sojo, F., Arvelo, F., Mijares, M. & De Sanctis, J. (2009). Cytotoxic activity of seco-entkaurenes from *Croton caracasana* on human cancer cell lines. *Nat Prod Commun.* 4, 1547-1550.
13. Suárez, A. (2023). An update on phytochemistry and pharmacology of *Croton malambo* H. Karst. *Rev Facul Farma UCV.*, 86,1-2.

14. Suarez, A., Salazar, M., Compagnone, R., Tillet, S., Delle-Monache, F., & Digiulio, (2003). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton malambo* aqueous extract, *J Ethnopharmacol.* 88 (1), 11-14. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00179-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00179-X)
15. Mateu, E., Chavez, K., Riina R., Compagnone, R., Delle-Monache, F. & Suárez A. (2012). New 3,4-seco-ent-kaurene dimmers from *Croton micans*. *Nat Prod. Commun.* 7, 5-8.
16. Gupta, E., Kaushik, S., Purwar, S., Sharma, R., Balapure, A. & Sundaram S. (2017). Anticancer Potential of Steviol in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Pharmacogn Mag.* 13(51):345-350. https://doi.org/10.4103/pm.pm_29_17.
17. Raeisi, F., Raeisi, E., Heidarian, E., Shahbazi-Gahroui, D. & Lemoigne, Y. (2019). Bromelain inhibitory effect on colony formation: an in vitro study on human AGS, PC3, and MCF-7 Cancer Cells. *J Med Signals Sens,* 9(4), 267-273. https://doi.org/10.4103/jmss.JMSS_42_18
18. Vichai V. & Kirtikara K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protoc.* 1, 1112–1116. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179>
19. Suárez, A., Vásquez, L., Taddei, A., Arvelo, F. & Compagnone, R. (2008). Antibacterial and cytotoxic activity of leaf essential oil of *Croton malambo*. *J Essent Oil Bearing Plants.* 11(2), 208–213. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2008.10643622>
20. Caro-Fuentes, D., Ocampo-Buendía, Y., Ospina-Mateus, L., Salas-Díaz, R., Díaz-Castillo, F. & Franco-Ospina, L. (2019). Extractos del Caribe Colombiano con actividad antiproliferativa frente a líneas celulares de cáncer de pulmón. *Rev Cub Farma.* Disponible en: <https://revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/283>
21. Muñoz-Acevedo, A., Carlos, E., Rodríguez, J., Aristizábal-Córdoba, S. & Kouznetsov, V. (2014). Estudio químico-biológico de los aceites esenciales de *Croton malambo* H. Karst y su componente mayoritario, metileugenol. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aroma.,* 13(4), 336-343.
22. Suárez, A., Vásquez, L., Manzano, M., & Compagnone, R. (2005). Essential oil composition of *Croton cuneatus* and *Croton malambo* growing in Venezuela. *Flavour and Fragrance Journal,* 20(6), 611-614. <https://doi.org/10.1002/ffj.1498>
23. Morales, A., Pérez, P., Mendoza, R., Compagnone, R., Suarez, A., Arvelo, F., Ramirez, J. & Galindo-Castro, I. (2005). Cytotoxic and proapoptotic activity of ent-16beta-17alpha-dihydroxykaurane on human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Cancer Lett.* 31;218(1):109-16. <https://doi: 10.1016/j.canlet.2004.07.009>.
24. Vivas, J. (2010). Efecto Citotóxico de seco-ent-kauranos de *Croton micans* en células PC3 (cáncer de próstata) y HeLa (cáncer de útero): Combinación con compuestos seco-ent-kauranos y fármacos antitumorales. Tesis Doctoral. Universidad Central de Venezuela. Disponible: <http://hdl.handle.net/10872/8490>
25. Taylor, P., Colman, L., & Bajoon, J. (2014). The search for plants with anticancer activity: Pitfalls at the early stages. *J Ethnopharmacol.* 158, 246-254. <https://doi: 10.1016/j.jep.2014.10.034>