



Artículo Original

EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DEL LATEX DE CROTON URUCURANA SOBRE CÉLULAS DE CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS

Preliminary assessment of the cytotoxic activity of *Croton urucurana* latex on Clear Cell renal carcinoma cells.

Cabañas Ortiz, Carlos*¹, Melana Colavita, J. P.¹, Rodríguez, J. P.¹, Ferrini, L. A.¹, Todaro, J. S., Torres², A. M., Aguirre, M. V.¹.

¹Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes, Argentina.

²Laboratorio de Productos Naturales "Prof. Armando Ricciardi". Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes, Argentina.

*Contacto: cd.cabanasortiz@gmail.com

Título abreviado: Actividad citotóxica del látex de *Croton urucurana* sobre células renales

Fecha de recepción: 12/11/2024

Fecha de aceptación: 14/11/2024

RESUMEN

Desde la antigüedad, el hombre ha utilizado plantas y sus derivados para tratar diferentes dolencias. Recientemente, numerosos estudios científicos han confirmado la validez química de estas hierbas medicinales y es así que la mayoría de los fármacos son de origen natural. En consonancia con esto, se ha demostrado que los extractos y compuestos de *Croton urucurana* (Sangre de drago), una especie que crece en nuestra región, posee actividades antimicrobiana, antiviral, antitumoral, citotóxica, inmunomoduladora, analgésica, antioxidante, antiinflamatoria, hemostática y antitrombótica. Así, en este trabajo se evaluó la actividad citotóxica del látex de *Croton urucurana* sobre células de origen tumoral como las Caki-1 (carcinoma renal de células claras) y células no tumorales como las Hek-293 (células embrionarias renales). Para ello, se realizaron experimentos de tiempo de duplicación y ensayos de viabilidad celular. Los resultados demostraron curvas diferentes comportamientos, incluyendo distintas curvas de duplicación, concordantes con la naturaleza celular en cada caso. Asimismo, se observó la existencia de una relación concentración-tiempo de exposición a *Croton urucurana* de las células, que genera mayor citotoxicidad en las células tumorales a 48 horas de tratamiento en comparación con la línea celular control. Estos hallazgos preliminares abren la posibilidad de profundizar



el estudio del látex de esta planta, particularmente su composición, a fin de encontrar un compuesto antitumoral renal de aplicación en el futuro mediato.

Palabras clave: carcinoma renal, *Croton urucurana*, cultivo celular.

SUMMARY

Since ancient times, humans have used plants and their derivatives to treat various ailments. Recently, numerous scientific studies have confirmed the chemical validity of these medicinal herbs, and thus most pharmaceuticals are of natural origin. In line with this, it has been demonstrated that the extracts and compounds from *Croton urucurana* (Sangre de drago), a species that grows in our region, possess antimicrobial, antiviral, antitumoral, cytotoxic, immunomodulatory, analgesic, antioxidant, anti-inflammatory, hemostatic, and antithrombotic activities. In this study, the cytotoxic activity of the latex obtained from *Croton urucurana* was evaluated on tumor-derived cells such as Caki-1 (Clear Cell renal carcinoma) and non-tumor cells such as Hek-293 (Renal Embryonic cells). To this purpose, duplication time experiments and cell viability assays were conducted. The results showed different duplication curves and distinct behaviors, consistent with the cellular nature in each case. Additionally, a concentration-exposure time relationship to *Croton urucurana* in the cells was observed, which generates greater cytotoxicity in tumor cells after 48 hours of treatment compared to the control cell line.

Yes, your sentence is correct and clearly conveys the intended message. However, for improved clarity and flow, you might consider a slight rephrasing. These preliminary findings open the possibility for further study of the latex of this plant, particularly its composition, to identify a renal antitumoral compound for potential future application.

Key words: renal carcinoma, *Croton urucurana*, cell culture.

RESUMO

Desde a antiguidade, o homem tem utilizado plantas e seus derivados para tratar diferentes enfermidades. Recentemente, numerosos estudos científicos confirmaram a validade química dessas ervas medicinais e assim, a maioria dos fármacos é de origem natural. Em consonância com isso, foi demonstrado que os extratos e compostos de *Croton urucurana* (Sangre de dragão), uma espécie que cresce em nossa região, possui atividades antimicrobiana, antiviral, antitumoral, citotóxica, imunomoduladora, analgésica, antioxidante, anti-inflamatória, hemostática e antitrombótica. Assim, neste trabalho foi avaliada a atividade citotóxica do látex de *Croton urucurana* sobre células de origem tumoral, como as Caki-1 (carcinoma renal de Células Claras) e células não tumorais, como as Hek-293 (células embrionárias renais). Para isso, foram realizados experimentos de tempo de duplicação e ensaios de viabilidade celular. Os resultados mostraram curvas de duplicação diferentes e comportamentos distintos, concordantes com a natureza celular em cada caso. Ademais, foi observada a existência de uma relação concentração-tempo de exposição a *Croton urucurana* das células, que gera maior citotoxicidade nas células tumorais a 48 horas de tratamento em comparação com a linha celular controle. Essas descobertas preliminares abrem a possibilidade de aprofundar o estudo do látex desta planta, particularmente sua composição, a fim de encontrar um composto antitumoral renal de aplicação no futuro imediato.

Palavras-chave: carcinoma renal, *Croton urucurana*, cultivo celular.



INTRODUCCIÓN

Desde los inicios de la civilización el hombre ha utilizado tanto plantas como sus derivados para tratar distintos tipos de dolencias. Mediante estudios científicos acerca de las rutas metabólicas y metabolitos vegetales es que ahora entendemos la validez química de estas hierbas medicinales tradicionalmente utilizadas. Estudios recientes concluyeron que el 60% de las drogas contra el cáncer y el 75% de las drogas contra enfermedades infecciosas aprobadas en el período 1981-2002 tienen origen natural. A pesar de ello hubo una disminución en el uso de productos naturales como materia prima para el descubrimiento de nuevas drogas [1].

El género *Croton* (Euphorbiaceae) comprende alrededor de 1300 especies de hierbas, arbustos y árboles distribuidos en regiones tropicales y subtropicales [2], y tradicionalmente ha sido utilizado por sus diversas propiedades terapéuticas [3], entre las que se citan la actividad antimicrobiana y antiviral [4] [5], la actividad antitumoral y citotóxica de *Croton lechleri* [6] y de *Croton urucurana* [5] [7], inmunomoduladora [8], analgésica [5], antioxidante [9], antiinflamatoria [10] [8], hemostática y antitrombótica [11].

Respecto a su actividad contra células neoplásicas se ha demostrado la actividad citotóxica de *Croton urucurana* contra distintas líneas celulares cancerosas humanas tales como HT-29 (carcinoma de colon humano), NCI-ADR/RES (adenocarcinoma de ovario), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), PC-03 (carcinoma de próstata humano) y Hep-G2 (carcinoma hepatocelular) [12].

Dado que hasta el presente no se tiene información sobre su uso en cáncer de riñón, en este trabajo se realizó una comparación en el comportamiento experimental in vitro de células embrionarias control (Hek-293) y de carcinoma renal de Células Claras (Caki-1) exponiéndolas a la acción biológica del látex obtenido de *Croton urucurana*.

Objetivos

Evaluar la actividad biológica citotóxica del látex de *Croton urucurana* (Sangre de drago) sobre las líneas celulares Caki-1 y Hek-293.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se desarrollaron cultivos celulares de las líneas Hek-293 (ATCC CRL-1573), provenientes de riñón de embrión humano y Caki-1 (ATCC HTB-46), proveniente de carcinoma renal de células claras, según técnicas y procedimientos puestos a punto en nuestro laboratorio [13] [14].

Primeramente, se evaluó la capacidad proliferativa de las células determinando sus tiempos de duplicación; para ello, las células fueron sembradas en placas de cultivo en cantidades preajustadas y periódicamente, durante una semana, se realizó el procedimiento de remoción y recuento celular.

Para evaluar la actividad biológica de *Croton urucurana*, se realizaron sendos subcultivos de las células Caki-1 y Hek-293 y se adicionó solución de *C. urucurana* en concentraciones de 1 µg/mL, 5 µg/mL y 10 µg/mL. Postratamiento se realizaron recuentos a las 24 y 48 horas a fin de evaluar la cinética de crecimiento celular y la afectación por el látex de *C. urucurana*.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software GraphPad Prism.



RESULTADOS

Velocidad de duplicación de células caki-1 y hek-293: Las células Caki-1 como las Hek-293 ajustan su capacidad proliferativa a una ecuación polinómica de segundo grado del tipo $N=at^2+bt+N_0$. Analizando las curvas de proliferación resultantes, las células en cuestión exhibieron diferentes patrones de proliferación. Asimismo, el aumento en el recuento celular para las Caki-1 fue de 45 veces su número inicial, en contraste con las Hek-293 que sólo aumentaron 8 veces (Figura 1).

Evaluación de la actividad citotóxica del látex de *Croton urucurana*: Luego de 24 horas de haber iniciado el tratamiento sobre las células Caki-1 y Hek-293, se llevó a cabo el recuento en cámara de Neubauer tanto en los pocillos controles como en los pocillos tratados a diferentes concentraciones (1, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) del látex de *Croton urucurana*. No se observó disminución en el recuento celular en los pocillos tratados en comparación a los controles (sin tratamiento); tampoco se observaron diferencias entre el control y el control con DMSO (Figuras 2 y 3).

Al cumplirse 48 horas de iniciado el tratamiento con *Croton urucurana*, se repitió el proceso de recuento celular en cámara de Neubauer en las líneas Caki-1 y Hek-293. A diferencia de lo observado anteriormente para las células Caki-1, el análisis mediante microscopía óptica invertida denotó una disminución en la confluencia celular en los pocillos tratados con mayor concentración de látex en comparación con los controles (Figura 4).

Los resultados del recuento en cámara de Neubauer mostraron reducción significativa ($p<0,05$) del 38% y 66% en la viabilidad celular para los pocillos con células Caki-1 tratados a concentraciones de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente, tomando como referencia al control como 100% de viabilidad celular (Figura 5) [12]. Si bien las medias celulares parecen haber disminuido en los tratamientos de mayor concentración de *C. urucurana* para las células Hek-293, en ningún caso se observaron diferencias significativas en comparación con el control.

DISCUSIÓN

Los datos obtenidos para la velocidad de duplicación de células Caki-1 y Hek-293 respaldan la idea que las células neoplásicas, como es el caso de las Caki-1, adoptan una capacidad proliferativa significativamente más alta en comparación a las células no tumorales como las Hek-293, y estos datos se encuentran en concordancia con los hallados por Melana et. al [15], Strupp Christian [16], entre otros. Las células Caki-1 demostraron tener una fase lag más prolongada en relación a las Hek-293, cuyo recuento duplicó el inicial a las 24 horas de iniciado el ensayo. Por otra parte, las células Caki-1 no presentaron indicios de fase plateau al momento de finalización del ensayo, en contraste con lo ocurrido con las células Hek-293. Estos resultados se ajustan a lo descrito por Freshney [17], donde las células no tumorales adoptan un patrón de crecimiento estándar.

La falta de diferencia significativa entre el control y control con DMSO, demuestra que dicha concentración de DMSO (solvente usado para disolver el látex) no compromete la viabilidad celular ni afecta a los resultados [18]. Los resultados concuerdan con observaciones por microscopía invertida, mostrando confluencia y distribución celular similares. Las desviaciones estándar en el recuento podrían deberse a la distribución no homogénea inicial, desprendimiento celular deficiente por acción enzimática (despegue celular para conteo) o formación de clústers celulares (particularmente importante en células Hek-293). No obstante, el análisis estadístico en todos los casos muestra una mayor afectación de las células tumorales renales que las embrionarias control. Esto genera la posibilidad de profundizar el estudio de los componentes activos del látex de esta planta con el objeto de encontrar una fracción enriquecida de el/los compuesto/s activo/s con actividad biológica elevada.



CONCLUSIONES

En el presente trabajo, se logró evaluar de forma general y preliminar la actividad biológica citotóxica del látex de *Croton urucurana* (Sangre de drago) sobre líneas celulares tumorales y no tumorales renales. Estos hallazgos sugieren la presencia de componentes con posible actividad antitumoral renal en el látex de *Croton urucurana*. Estudios más específicos en el futuro mediano podrían proporcionar una comprensión más completa de este fenómeno y avanzar hacia el diseño de un fármaco antitumoral renal específico en base a productos naturales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gupta R, Gabrielsen B, Ferguson S. Natures medicines: Traditional knowledge and intellectual property management. Case studies from the national institutes of health (NIH), USA. *Curr Drug Discov Technol* [Internet]. 2005; 2(4):203–19. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2174/157016305775202937>
2. Webster GL. A provisional synopsis of the sections of the genus *Croton* (*Euphorbiaceae*). *Taxon* [Internet]. 1993; 42(4):793–823. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2307/1223265>
3. Gupta D, Bleakley B, Gupta RK. Dragon's blood: Botany, chemistry and therapeutic uses. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2008; 115(3):361–80. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2007.10.018>
4. Chen Z-P, Cai Y, Phillipson J. Studies on the anti-tumour, anti-bacterial, and wound-healing properties of dragon's blood. *Planta Med* [Internet]. 1994; 60(06):541–5. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1055/s-2006-959567>
5. Peres MTL, Delle Monache F, Pizzolatti MG, Santos ARS, Beirith A, Calixto JB, Yunes RA. Analgesic compounds of *Croton urucurana* Baillon. *Pharmacochemical criteria used in their isolation. Phytother Res.* 1998; 12:209–11.
6. Guerrero RO, Guzman AL. Bioactivities of latexes from selected tropical plants. *Rev Cubana Plantas Med.* 2004; 9.
7. de Matos Cândido-Bacani P, Ezan F, de Oliveira Figueiredo P, Matos M de FC, Rodrigues Garcez F, Silva Garcez W, et al. [1–9-NaC]-crouorb A1 isolated from *Croton urucurana* latex induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocarcinoma cells. *Toxicol Lett* [Internet]. 2017; 273:44–54. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.03.020>
8. Immunomodulatory activity and chemical characterisation of sangre de Drago (dragon's blood) from *Croton lechleri*. *Planta Med* [Internet]. 2003; 69(9):785–94. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1055/s-2003-43208>
9. Desmarchelier C, Schaus FW, Coussio J, Cicca G. Effects of Sangre de Drago from *Croton lechleri* Muell.-Arg. on the production of active oxygen radicals. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 1997; 58(2):103–8. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-8741\(97\)00087-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-8741(97)00087-1)
10. Miller MJS, Vergnolle N, McKnight W, Musah RA, Davison CA, Trentacosti AM, et al. Inhibition of neurogenic inflammation by the amazonian herbal medicine sangre de Grado. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2001; 117(3):725–30. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01446.x>
11. Tsai W-J, Hsieh H-T, Chen C-C, Kuo Y-C, Chen C-F. Characterization of the antiplatelet effects of (2S)-5-methoxy-6-methylflavan-7-ol from *Draconis Resina*. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 1998; 346(1):103–10. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0014-2999\(98\)00011-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0014-2999(98)00011-9)
12. Cândido-Bacani P de M, Figueiredo P de O, Matos M de FC, Garcez FR, Garcez WS. Cytotoxic orbitide from the latex of *Croton urucurana*. *J Nat Prod* [Internet]. 2015; 78(11):2754–60. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00724>
13. Melana Colavita, J.P., Todaro, J.S., de Sousa, M., May, M., Gómez, N., Yaneff, A., Di Siervi, N., Aguirre, M.V., Guijas, C., Ferrini, L., Davio, C., Rodríguez, J.P., 2020. Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) is overexpressed in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) and is essential to regulate cell proliferation. *Int. J. Biol. Macromol.* 161, 836–847.
14. Melana JP, Mignolli F, Stoyanoff T, Aguirre MV, Balboa MA, Balsinde J, Rodríguez JP. The Hypoxic Microenvironment Induces Stearoyl-CoA Desaturase-1 Overexpression and Lipidomic Profile Changes in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2021 Jun 13; 13(12):2962. doi: 10.3390/cancers13122962
15. Melana Colavita JP, Rodríguez JP, Stoyanoff TR, Espada J, Todaro J, Aguirre MV. Optimización de cultivos primarios de células de carcinoma renal de células claras como modelo vitro para estudios metabólicos y determinantes de progresión neoplásica. *Rev Fac Med UNNE.* 2016; 6.
16. Strupp C, Corvaro M, Cohen SM, Corton JC, Ogawa K, Richert L, et al. Increased cell proliferation as a key event in chemical carcinogenesis: Application in an integrated approach for the testing and assessment of non-genotoxic



carcinogenesis. Int J Mol Sci [Internet]. 2023; 24(17):13246. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms241713246>

17. Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. 6th ed. Hoboken (NJ): John Wiley & Sons; 2011.
18. Picoli T, Barbosa JS, Vargas GD, Hübner SDO, Fischer g. Toxicidade e eficiência do dimetilsulfóxido (dmsO) no congelamento de células madin-darby bovine kidney (mdbk). Sci Anim Health [Internet]. 2015; 3(2):159. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15210/sah.v3i2.6585>

Figura Nº 1: Curva de proliferación de las líneas celulares Caki-1 (izquierda) y Hek-293 (derecha).

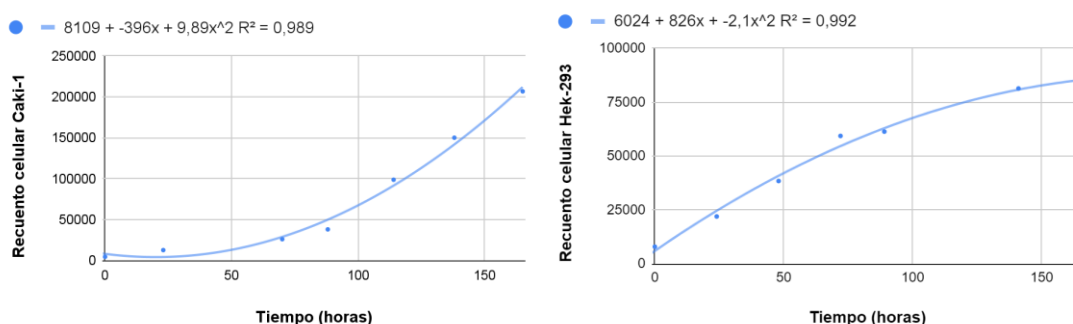


Figura Nº 2: Recuento celular en cultivo de células Caki-1 (izquierda) y Hek-293 (derecha) luego de 24 horas de tratamiento a diferentes concentraciones del látex de *Croton urucurana*. Los datos se expresan como las medias \pm SEM y son representativos de dos experimentos independientes.

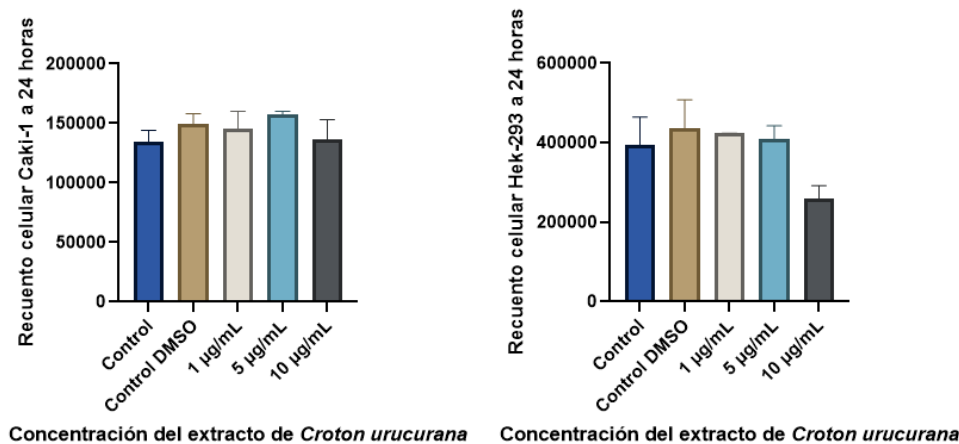


Figura Nº 3: Registro fotográfico bajo microscopía óptica invertida con aumento de 100X de los cultivos de las líneas celulares Caki-1 (fila superior) y Hek-293 (fila inferior) luego de 24 horas del tratamiento. **A:** control. **B:** tratadas con $1\mu\text{g}/\text{mL}$ de látex de *Croton urucurana*. **C:** tratadas con $5\mu\text{g}/\text{mL}$ de látex de *Croton urucurana*. **D:** tratadas con $10\mu\text{g}/\text{mL}$ de látex de *Croton urucurana*.

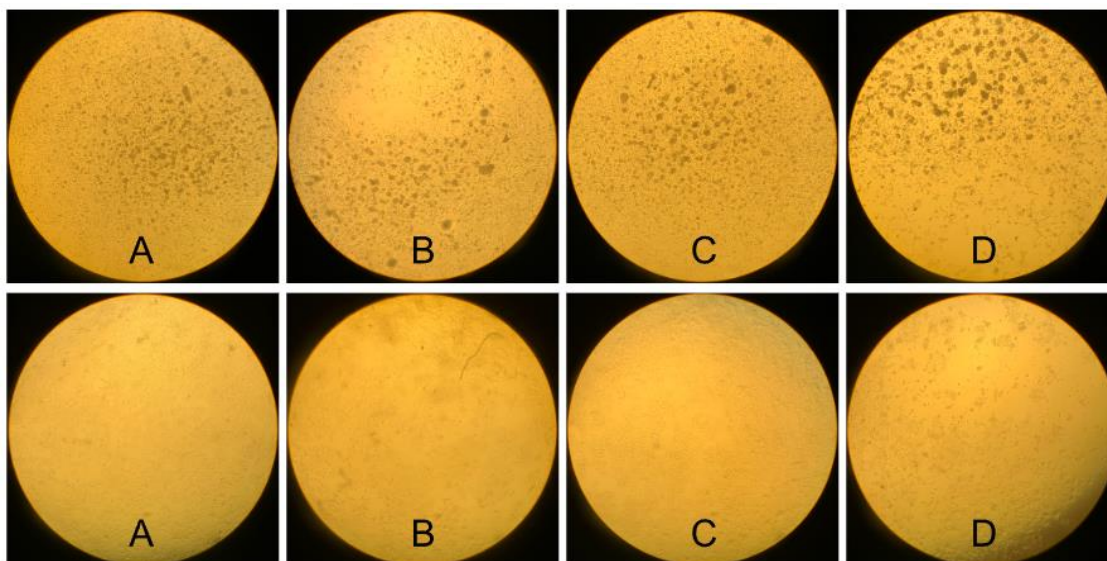


Figura Nº 4: Registro fotográfico bajo microscopía óptica invertida con aumento 100X de cultivos de las líneas celulares Caki-1 (fila superior) y Hek-293 (fila inferior) luego de 48 horas de tratamiento. **A:** control. **B:** tratadas con $1\mu\text{g}/\text{mL}$ de látex de *Croton urucurana*. **C:** tratadas con $5\mu\text{g}/\text{mL}$ de látex de *Croton urucurana*. **D:** tratadas con $10\mu\text{g}/\text{mL}$ de látex de *Croton urucurana*.

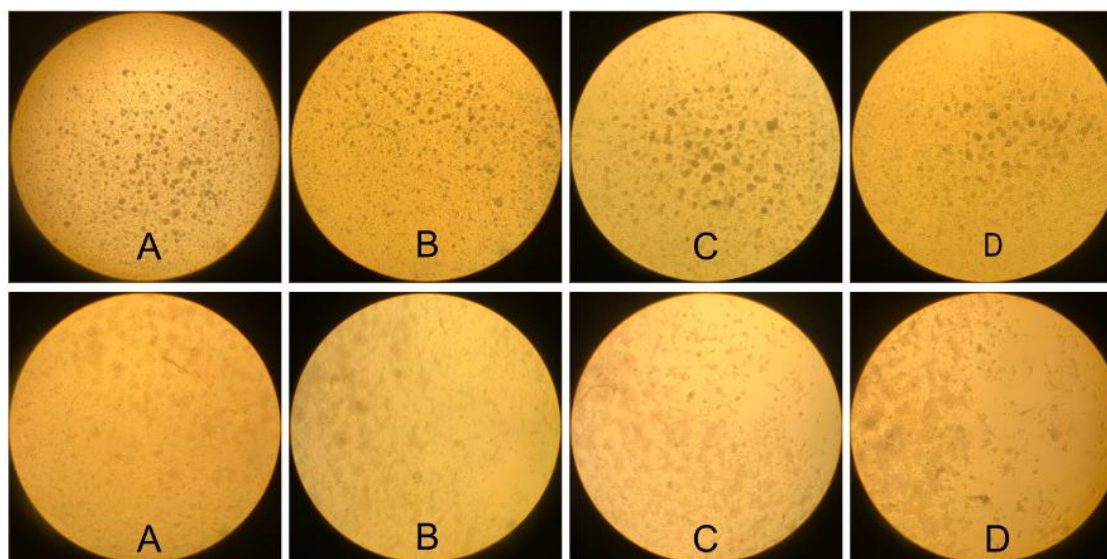
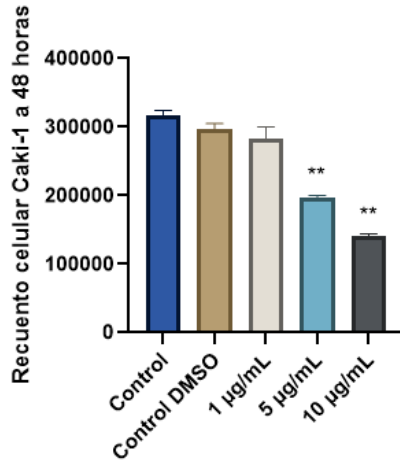
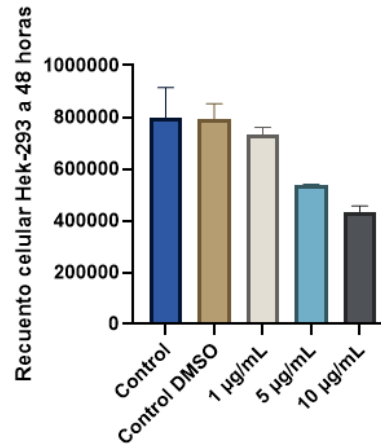


Figura Nº 5: Recuento celular de las líneas Caki-1 y Hek-293 luego de 48 horas de tratamiento a diferentes concentraciones del látex de *Croton urucurana*. Los datos se expresan como las medias \pm SEM y son representativos de dos experimentos independientes. Referencia: * $p < 0,05$ vs grupo control. ** $p < 0,01$ vs grupo control.



Concentración del extracto de *Croton urucurana*



Concentración del extracto de *Croton urucurana*