

# **Potencial antitumoral de propóleos colombianos: caracterización química y mecanismos involucrados en la citotoxicidad *in vitro* contra osteosarcoma canino**

**Dolly Patricia Pardo Mora**



Universidad Antonio Nariño  
Doctorado en Ciencia Aplicada  
Bogotá, Colombia  
2018

# **Potencial antitumoral de propóleos colombianos: caracterización química y mecanismos involucrados en la citotoxicidad *in vitro* contra osteosarcoma canino**

**Dolly Patricia Pardo Mora**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Doctor en Ciencia Aplicada**

Codirectores:  
Ph.D., Orlando Torres García  
Ph.D., Jose Mauricio Sforcin  
Ph.D., Rafael María Gutiérrez

Universidad Antonio Nariño  
Doctorado en Ciencia Aplicada  
Bogotá, Colombia  
2018

*La preocupación por el hombre y su destino siempre debe ser el interés primordial de todo esfuerzo técnico. Nunca olvides esto entre tus diagramas y ecuaciones.*

*Albert Einstein*

# Agradecimientos

Para el desarrollo del siguiente proyecto fue necesario del apoyo de diversas personas e instituciones, por ello agradezco a todos los que de alguna forma contribuyeron a la ejecución del mismo:

A mi familia, por el apoyo incondicional desde el inicio del proceso.

A los codirectores por sus enseñanzas y el apoyo desinteresado durante todo el desarrollo del doctorado en Ciencia Aplicada, al Dr. Orlando Torres, al Dr. Jose Mauricio Sforcin y al Dr. Rafael Gutierrez.

A los doctores y profesores de la Universidad Antonio Nariño (UAN) que contribuyeron con su conocimiento, trabajo y especialmente su amistad; dentro de ellos, agradecimientos a los profesores Mauricio Rey, Jaime Fabian Cruz, doctoras María Luisa Muñoz, Monica Losada y Dr. Diego Forero, al equipo de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UAN en cabeza del Dr. Andres Correa por su amistad y apoyo. A profesores y personal del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia por facilitar la realización de pruebas de laboratorio con el acompañamiento del profesor Mauricio Rey y la colaboración de Oscar Julian Murillo.

Al grupo de investigación en Inmunomodulación por Productos Naturales del Instituto de Biociencias de la Universidad Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Campus Botucatu dirigido por el profesor y Dr. José Mauricio Sforcin, por la confianza, apoyo, colaboración y acompañamiento durante la fase experimental y hasta el presente por su invaluable amistad.

Finalmente al programa de formación de alto nivel (PFAN) de la UAN por el apoyo financiero.

# Resumen

El propóleo es un material producido por las abejas a partir de resinas y bálsamos de plantas, caracterizado por su compleja composición química. Las abejas lo utilizan como medio de protección, sellando espacios y adicionalmente para evitar procesos infecciosos que puedan afectar la salud de la colmena. El humano ha usado el propóleo desde tiempos ancestrales con fines medicinales y en la época moderna ha sido posible demostrar su efecto como antimicrobiano, inmunomodulador, antiparasitario y antitumoral, entre otros.

En Colombia son limitados los estudios que presentan la composición química del propóleo, y es menos conocido su potencial de actividad biológica, por lo menos en lo que se refiere a su potencial antitumoral. A su vez, el osteosarcoma es un tumor primario de hueso que se presenta en caninos y humanos con características anatómicas, histológicas y moleculares similares, por lo que se ha considerado al canino como un modelo para el estudio del cáncer en humanos. Es por ello que se planteó como objetivo determinar la composición química de muestras de propóleos colombianos y evaluar su potencial de actividad antitumoral en modelo de Osteosarcoma (OSA) canino *in vitro*.

Fueron seleccionadas nueve muestras de propóleo de diferentes municipios del país: San Carlos, Antioquia (Ant), Usme, Bogotá Distrito Capital (Usm), Rivera, Huila (Hui), Puerto López, Meta (Met), Fusagasuga, Cundinamarca (Fus), Cajibío (Caj) y Silvia Cauca (Sil), Zetaquirá, Boyaca (Boy) y Sevilla Valle (Val). Las muestras de propóleo fueron analizadas por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC – MS) para determinar su composición química. Luego, se seleccionaron células de OSA y fibroblastos caninos para evaluar el efecto de los extractos de propóleos sobre la viabilidad celular y citotoxicidad. Posteriormente, se utilizó citometría de flujo para evaluar apoptosis y mecanismos asociados a muerte celular como la producción de peróxidos intracelulares y cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial en las células de osteosarcoma canino expuestas a propóleo. Por último, se determinaron los cambios en la expresión de genes asociados a apoptosis como *BAX*, *BCL-2*, *CASPASA 8*, *CASPASA 9* y *TNFR1* en células de Osteosarcoma canino expuestas a tres extractos etanólicos de propóleo. Fueron utilizadas pruebas paramétricas y no paramétricas para el análisis estadístico de los resultados.

Los componentes más abundantes en los propóleos fueron diterpenos, triterpenos y benzofenonas, un porcentaje variable de los componentes no han sido identificados totalmente. Cinco muestras tuvieron características similares en su composición y pertenecieron a un solo grupo (Ant, Fus, Val, Met y Boy), otras dos pertenecieron a un segundo grupo (Caj y Hui) y dos muestras se comportaron como valores atípicos (Usm y Sil) debido a sus diferencias en composición.

Los propóleos utilizados redujeron la viabilidad celular de acuerdo al tiempo y concentración de los extractos utilizados. Se seleccionaron cinco extractos de propóleo (Usm, Fus, Met, Caj y Sil) teniendo en cuenta el efecto sobre la viabilidad celular y la composición química para la evaluación del efecto apoptótico, la producción de peróxidos intracelulares y los cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial en células de OSA canino. Todos los extractos indujeron marcada apoptosis, redujeron la producción de peróxidos y solamente un extracto disminuyó significativamente la población fluorescente a rodamina 123. Para los análisis de expresión génica se seleccionaron tres muestras de propóleo (Usm, Met y Sil) de las que presentaron mayor actividad apoptótica y se encontró un incremento en los niveles de expresión especialmente de *CASPASA 8* y de *CASPASA 9*. Sin embargo, la razón de expresión *BCL-2/BAX* fue mayor a uno en las células expuestas a propóleo.

Las muestras de propóleo evaluadas contienen componentes no reportados previamente en otros tipos de propóleos, como el caso del eicosil cumarato, y poseen otros que los diferencian de propóleos ya caracterizados químicamente en otros lugares del mundo, generando un potencial para el desarrollo de nuevos componentes activos de importancia biológica. Se demostró por primera vez que propóleos de origen colombiano reducen la viabilidad celular, inducen apoptosis en células de OSA canino y estimulan la expresión génica de *CASPASA 8*, sugiriendo un efecto asociado a la vía extrínseca de apoptosis.

**Palabras clave: Propóleo, Osteosarcoma, Apoptosis, Expresión génica.**

# Abstract

Propolis is produced by honeybees from the resins and balsams of plants and characterized by its complex chemical composition. Bees use propolis to protect the hive, to seal holes and to avoid infectious diseases that may affect bee health. Humans have used propolis for medicinal purposes since ancient times, and its effectiveness as an antimicrobial, immunomodulatory, antiparasitic, and antitumor agent has been demonstrated recently.

In Colombia, studies regarding the chemical composition of propolis are scarce and its biological potential is not well known, specifically in terms of its antitumor potential. Therefore, our objective was to determine the chemical composition of Colombian propolis samples, and to evaluate the potential antitumor activity of such propolis, as tested on *in vitro* canine osteosarcoma (OSA) cells.

Propolis samples were collected in nine municipalities: San Carlos Antioquia (Ant), Usme Bogotá, Capital District (Usm), Huila, Rivera (Hui), Puerto López, Meta (Met), Fusagasuga, Cundinamarca (Fus), Cajibío (Caj) and Silvia, Cauca (Sil), Zetaquirá, Boyacá (Boy) and Sevilla, Valle (Val). The samples were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) to determine their chemical composition. Osteosarcoma cells and canine fibroblasts were used to evaluate the effect of propolis extracts on cell viability and cytotoxicity. Subsequently, flow cytometry was used to evaluate apoptosis as well as the mechanisms involved in cell death, such as the production of reactive oxygen species and changes in mitochondrial membrane potential. Finally, changes in the expression of apoptosis-related genes such as *BAX*, *BCL-2*, *CASPASE 8*, *CASPASE 9* and *TNFR1* in canine osteosarcoma cells exposed to three propolis ethanolic extracts, were determined. Parametric and non-parametric tests were used to statistically analyze the results.

The most abundant components in the propolis sample were diterpenes, triterpenes, and benzophenones, but a variable percentage of the components were not identified. Five samples had similar characteristics in their composition and belonged to a single group

(Ant, Fus, Val, Met, and Boy), while two others belonged to a second group (Hui and Caj) and two samples behaved as outliers (Usm and Sil).

Propolis reduced cell viability according to time and concentration. Five propolis extracts (Usm, Fus, Met, Caj and Sil) were selected according to their effect on cell viability and chemical composition, in order to evaluate their apoptotic effect, intracellular peroxides production and mitochondrial membrane permeability changes in canine OSA cells. All five propolis induced marked apoptosis in OSA cells. A decreased hydrogen peroxide production was seen in propolis-treated cells and only one extract significantly reduced the fluorescent population of rhodamine 123. To determine gene expression, three propolis samples were selected. An increased expression of *CASPASE 8* and *CASPASE 9* was observed, however, the *BCL-2/BAX* expression ratio was greater than one in the samples exposed to propolis.

Colombian propolis contain components not previously reported, such as eicosil coumarate, and contain components that differentiate them from other chemically characterized propolis. This indicates the presence of new active components with biological importance. This research demonstrated, for the first time, that Colombian propolis samples reduced cell viability and induced apoptosis in canine OSA cells, and stimulated gene expression of *CASPASE 8*, suggesting that they have an effect on the apoptosis extrinsic pathway.

**Keywords: Propolis, Osteosarcoma, Apoptosis, Gene Expression**



# Contenido

<b>1. Introducción</b>	<b>11</b>
<b>2. Estado del arte</b>	<b>20</b>
<b>3. Justificación</b>	<b>30</b>
<b>4. Producción</b>	<b>32</b>
<b>5. Conclusiones y recomendaciones</b>	<b>93</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>96</b>

## **Prefacio**

Dentro del marco del Doctorado en Ciencia Aplicada, la investigación fue desarrollada en varias fases: inicialmente se realizó un estudio del estado del arte que generó la base científica y tecnológica para soportar la viabilidad y pertinencia del estudio y que estará descrita en el capítulo correspondiente al estado del arte. Posteriormente, se llevaron a cabo los experimentos y pruebas biológicas para determinar el efecto de los propóleos en células de osteosarcoma canino. Las pruebas de laboratorio que serán descritas en la metodología fueron desarrolladas durante la pasantía en el Instituto de Biociencias de la Universidad Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho” (UNESP) Campus de Botucatu, Brasil y luego se realizó una segunda etapa de experimentación en las universidades Antonio Nariño y Nacional de Colombia.

Como producto del proceso de investigación, desarrollo e innovación se generaron artículos de investigación y una propuesta de patente, todos incluidos en la presente tesis doctoral. Dichos resultados hacen parte de la contribución tangible al conocimiento del propóleo de origen colombiano en conjunto con su actividad biológica asociada a su potencial antitumoral en modelo de osteosarcoma canino.

# 1. Introducción

El propóleo cuenta con gran potencial para el desarrollo de productos farmacológicos debido a la presencia de compuestos como flavonoides, ácidos fenólicos y terpenos, entre otros (Shahidi y Ambigaipalan, 2015). Dado que la composición del propóleo es altamente dependiente de la flora disponible en cada región de donde es colectado, no es posible extrapolar directamente los resultados de estudios previos a muestras de propóleos de diferente origen. Por eso, conocer la diversidad de sus componentes asociados a su fuente botánica puede contribuir a la estandarización química (Bankova, et al., 2000). Los propóleos pueden contener de manera general un 55% de resinas y bálsamos, 30% de cera, 10% aceites aromáticos y esenciales, 5% de polen y 5% de otros compuestos orgánicos (Gomez-Caravaca et al., 2006). Además la amplia aplicación del propóleo en la medicina moderna ha incrementado el interés de conocer su composición química y muchos estudios han revelado que los efectos observados pueden ser el resultado de la acción sinérgica de sus complejos componentes (Huang et al., 2014).

El propóleo es un producto promisorio por su acción antitumoral, actividad muy importante teniendo en cuenta que el cáncer se ha reportado como una de las 10 principales causas de muerte a nivel mundial (Lozano et al., 2012) y en los Estados Unidos, ha sido la segunda causa de muerte (Heron, 2016). En Colombia, las neoplasias contribuyeron con un 17.99% de las muertes entre el 2005 y el 2014, según un estudio de la dirección de epidemiología y demografía del Ministerio de Salud y Protección Social (Moreno 2016); en las mujeres fue la segunda causa de muerte y la tercera en los hombres, con una tendencia estable entre el 2003 y el 2012 (Instituto Nacional de Cancerología ESE, 2017).

En el estudio de la biología del cáncer se ha venido utilizando el ratón como modelo, no obstante, este no representa adecuadamente varias de las características que definen el cáncer humano como los períodos de latencia, la compleja biología de la recurrencia, la metástasis y el resultado de nuevas terapias. Es por esto que se ha propuesto al perro (*Canis lupus familiaris*) como un modelo de estudio del cáncer humano, debido a que se han encontrado similitudes en los rasgos histológicos, períodos de crecimiento tumoral, heterogeneidad intratumoral e inter individual, desarrollo de recurrencia o resistencia a la enfermedad y sitios distantes relevantes para metástasis; el osteosarcoma canino es un claro ejemplo de ello. Sin mencionar que los perros comparten factores de riesgo

ambientales con sus propietarios humanos sugiriéndose así el valor potencial que tiene el perro como centinela de la enfermedad para los humanos (Al-Khan et al., 2017; Simpson et al., 2017; Ranieri et al., 2013).

El propóleo ejerce actividad antitumoral por mecanismos como inducción de apoptosis, arresto en el ciclo celular, inmunomodulación, angiogénesis y efecto sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), entre otros. La inducción de apoptosis en las células tumorales se ha convertido en un blanco de interés para el desarrollo de estrategias terapéuticas para el cáncer (Chan et al., 2013; Yaacoub et al., 2016). Propóleos de diferentes orígenes geográficos como México, Brasil, Turquía, Irak, China, Japón y Tailandia han reportado un efecto apoptótico en células tumorales (Alday et al., 2015; Czyzewska, 2016; Khacha-ananda et al., 2016; Motomura et al., 2008; Novak et al., 2014; Seda Vatansever et al., 2010; Sulaiman et al., 2012; Szliszka et al., 2013; Xuan et al., 2014). Los mecanismos asociados involucran la inducción de las vías intrínseca y extrínseca de apoptosis, incluyendo la activación de las Caspasas 3, 6, 8, 9 (Alday et al., 2015; Czyzewska et al., 2016; Seda Vatansever et al., 2010), de Bax (Sulaiman et al., 2012), generando cambios en el potencial de la membrana mitocondrial (Alday et al., 2015) y también se ha encontrado disminución en los niveles de expresión de Bcl-2 (Motomura et al., 2008; Sulaiman et al., 2012).

Teniendo en cuenta la escasa información sobre la composición química del propóleo colombiano y su potencial de actividad antitumoral, fueron seleccionadas y caracterizadas nueve muestras de diferentes municipios del país, y además, fue evaluada su actividad sobre la viabilidad de células de osteosarcoma canino, posteriormente, las muestras fueron utilizadas en las pruebas de citotoxicidad y citometría de flujo para analizar su efecto como inductores de apoptosis y finalmente fue evaluada la expresión de genes asociados a apoptosis.

## **Planteamiento del problema**

Las abejas juegan un papel fundamental en la naturaleza debido a su función polinizadora y también se destacan los beneficios en nutrición y salud que son atribuidos ancestralmente a los productos que generan. La apicultura es una actividad altamente sustentable que aprovecha los recursos naturales sin generar efectos negativos sobre el medio ambiente. Por ello es necesario el desarrollo de productos en los que se evidencie una evolución y

trascendencia del conocimiento al contexto actual y real de aplicación del propóleo, en pro del bienestar y salud de humanos y animales. Se propone que el propóleo colombiano puede tener una gama de componentes activos interesante, debido a la diversidad botánica presente en el país y que este aspecto puede convertirse en una oportunidad para el desarrollo de alternativas terapéuticas para el tratamiento del cáncer.

Además del incremento en la demanda del uso de productos naturales dentro de la vida cotidiana, también ha crecido el interés por reducir el uso de medicamentos farmacológicos convencionales y particularmente sus efectos adversos. El cáncer es un claro ejemplo de ello, pues los tratamientos con estos fármacos convencionales a menudo producen efectos colaterales adversos que varían de un individuo a otro. Es así, que en el afán de disminuirlos o eliminarlos, se ha incrementado el uso de productos naturales como el propóleo, que por su acción moduladora sobre el sistema inmune minimiza esos efectos (Farré 2004).

En este sentido, los estudios realizados con extractos de propóleo tanto *in vitro* como *in vivo* documentan el potencial terapéutico en medicina humana y veterinaria (Alday et al., 2015; Watanabe et al., 2011). Sin embargo, algunos autores afirman que faltan revisiones críticas concernientes a la utilidad de estos estudios en el contexto del uso clínico de los productos (Sforcin y Bankova, 2011). Por ello, se propuso realizar la caracterización química de muestras de propóleos colombianos y luego realizar una comparación directa entre los perfiles de expresión de células de osteosarcoma canino tratadas con los extractos de propóleo para identificar dianas tumorales asociadas a apoptosis.

# Objetivos

## Objetivo general

Determinar la composición química y el potencial antitumoral de muestras de propóleos colombianos evaluando los mecanismos involucrados en la citotoxicidad contra Osteosarcoma (OSA) canino *in vitro*.

## Objetivos específicos

- A. Determinar el perfil de componentes químicos de nueve muestras de propóleos colombianos y asociarlo con el origen geográfico.
- B. Evaluar el efecto de extractos etanólicos de propóleo sobre viabilidad celular y citotoxicidad en células de osteosarcoma y fibroblastos caninos.
- C. Determinar el efecto de los extractos de propóleo sobre apoptosis y mecanismos asociados a muerte celular como producción de peróxidos intracelulares y cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial en células de OSA canino.
- D. Analizar el perfil de expresión de genes asociados a apoptosis como *BAX*, *BCL-2*, *CASPASA 8*, *CASPASA 9* y *TNFR1* en células de osteosarcoma canino expuestas y no expuestas a extractos de propóleo.
- E. Proponer una combinación de extractos de propóleo con actividad apoptótica en modelo de osteosarcoma canino.

## Metodología

A continuación se presenta una descripción general de la metodología utilizada para el logro de los objetivos propuestos y detalles de la misma se encuentran en cada uno de los artículos.

### A. Determinación de la composición química de los propóleos

**Selección de muestras de propóleo:** Se obtuvieron nueve muestras en total de aproximadamente 400g de propóleo de las siguientes zonas: Rivera (Huila), Usme (Bogotá Distrito Capital), Fusagasugá (Cundinamarca), San Carlos (Antioquia), Puerto López (Meta), Cajibío y Silvia (Cauca), Sevilla (Valle del Cauca) y Zetaquirá (Boyaca). El muestreo se realizó por conveniencia y se contó con la colaboración de apicultores que facilitaron la

colecta de los propóleos provenientes de diferentes ecosistemas y alturas sobre el nivel del mar.

**Perfil de componentes activos:** Con la cooperación internacional lograda con la Dra. Vassya Bankova y el laboratorio "Institute of Organic Chemistry with Center of Phytochemistry" de Bulgaria que cuentan con una gran experiencia científica en el estudio de propóleos de diferentes lugares del mundo se realizó la identificación del perfil de componentes activos utilizando el equipo de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS).

## **B. Efecto del propóleo sobre viabilidad celular y citotoxicidad en células de osteosarcoma y fibroblastos caninos**

**Cultivo de células de osteosarcoma canino:** Las células de Osteosarcoma (OSA) fueron obtenidas en el Departamento de Patología de la facultad de medicina veterinaria y zootecnia de la UNESP, campus de Botucatu, Brasil. Para el mantenimiento de las células se usó medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), penicilina (100 UI/mL), estreptomycin (100 µg/mL) y anfotericina B (3 µg/mL). También fue utilizada una línea comercial establecida de Osteosarcoma canino OSCA 8® (Kerafast Inc.) manejada en condiciones similares y fibroblastos caninos obtenidos a partir de cultivo primario.

**Obtención de extractos etanólicos:** Las muestras de propóleo fueron colectadas usando malla plástica y por medio de raspado de las superficies de la colmena entre julio y diciembre de 2015. Las muestras fueron pulverizadas, 4.5 g de propóleo fueron disueltos en 15 mL de etanol al 70%, luego la mezcla fue almacenada en la oscuridad bajo agitación moderada y a temperatura ambiente. Después de 24 horas, los extractos fueron filtrados y el peso seco (mg/mL) fue calculado para cada extracto.

**Evaluación de la viabilidad celular:** Las células se cultivaron en placas de 96 pozos, fueron expuestas a los nueve extractos de propóleo (5, 10, 25, 50 and 100 µg/mL) por 24, 48 and 72 horas. El efecto del etanol (solvente) y de la doxorubicina (Dox) usada como control positivo fue evaluado en condiciones similares a la de los propóleos. Se utilizó la solución 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), también el kit

Cytoselect™ MTT Cell Proliferation Assay (Cell Biolabs, Inc.) y la producción de formazan fue evaluada midiendo la absorbancia en un lector de placa a 540nm.

**Efecto citotóxico del propóleo:** La citotoxicidad fue evaluada por la liberación de lactato deshidrogenasa en el medio de cultivo (Fotakis and Timbrell, 2006). Las células de OSA canino y fibroblastos fueron cultivadas en placas de 96 pozos, luego de la adherencia fueron expuestas a cuatro concentraciones (10, 25, 50, y 100 µg/mL) de los extractos de propóleo y fueron evaluadas a las 48 y a las 72 horas. Para ello se utilizó en kit Cytoselect™ LDH Cytotoxicity Assay (Cell Biolabs, Inc.), la absorbancia fue medida en un lector automatizado de placa (Multiskan FC, Thermo Scientific) a longitud de onda de 450nm.

### **C. Evaluación el efecto de los extractos de propóleo sobre apoptosis y mecanismos asociados a muerte celular**

**Evaluación de apoptosis:** Las células en proceso de apoptosis translocan fosfatidilserina (PS) desde al interior al exterior de la membrana plasmática debido a la fragmentación del DNA. La anexina V presenta alta afinidad por la PS expuesta en el ambiente externo y por ello es un marcador de apoptosis (Shashi et al., 2006; Yan et al., 2014).

Se utilizó el kit Annexin V-FITC/PI (Apoptosis Kit Santa Cruz Biotechnology. INC.) para evaluar el efecto sobre la inducción de apoptosis del propóleo usando la técnica de citometría de flujo en células de osteosarcoma canino. La doxorubicina fue usada como control positivo inductor de apoptosis. Las células de OSA canino fueron sembradas en placas de 24 pozos y fueron expuestas a cinco extractos de propóleo (Usm, Fus, Met, Caj y Sil) a una concentración de 50 µg/mL por 48 horas, luego fueron tripsinizadas y se realizó un lavado con PBS 1X. Se adicionaron la anexina V y el yoduro de propidio siguiendo las instrucciones del fabricante y posteriormente fueron incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente. Las células se analizaron usando un citómetro de flujo BD CSampler™ BD Accuri, se registraron por lo menos 20.000 eventos, cada ensayo fue realizado por triplicado y se registraron los porcentajes de células viables (anexina V – y PI–), células en apoptosis temprana (anexina V + y PI–), en apoptosis tardía (anexina V + y PI–) y células muertas (anexina V– y PI+). Los datos fueron analizados usando el software CFlow Plus (BD Biosciences).



**Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS):** El dicloroacetato de fluoresceína (DCFH-DA) ha sido usado como un indicador de la formación de ROS intracelular. Este producto atraviesa la membrana celular, en el interior de la célula es esterificado por esterasas intracelulares y en esa forma es susceptible de la oxidación por ROS para producir diclorofluoresceína que corresponde a la forma capaz de emitir fluorescencia (Royall e Ischiropoulos, 1993; Shashi et al., 2006). La producción de ROS en células de osteosarcoma canino expuestas y no expuestas a propóleo fue evaluada por citometría de flujo.

Las células de OSA canino fueron expuestas a los extractos de propóleo a la misma concentración que en las pruebas de apoptosis; luego de tripsinizar las células y realizar lavado con PBS 1X, se adicionó el DCFH-DA a una concentración 5  $\mu$ M durante 30 minutos. La intensidad de la fluorescencia fue analizada usando un citómetro de flujo BD CSampler™ BD Accuri y se registraron por lo menos 20.000 eventos.

**Evaluación de cambios en la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial:** La rodamina 123 (Rho-123) es un producto fluorescente que detecta cambios en el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) en células vivas (Shashi et al., 2006). La pérdida de potencial de la membrana lleva a despolarización, aumento de la permeabilidad y por tanto a una baja intensidad de fluorescencia en las células. Así, las células viables sin proceso de muerte presentan alta intensidad (Yang et al., 2016).

Las células fueron tratadas con los extractos de propóleo al igual que en las pruebas de apoptosis, luego del lavado con PBS 1X se agregó Rho-123 a una concentración de 2  $\mu$ g/ml por 30 minutos, las muestras fueron analizadas en el citómetro de flujo nombrado previamente, y de nuevo fueron registrados al menos 20.000 eventos.

## **D. Análisis de la expresión de genes asociados a apoptosis**

Se evaluaron los niveles de expresión de los genes: *BAX*, *BCL.2*, *CASPASA 8*, *CASPASA 9* y *TNRF1*.

**Tratamiento con extractos de propóleo para evaluación de expresión génica:** Las células tumorales fueron tratadas con tres extractos de propóleo a una concentración 25  $\mu$ g/ $\mu$ L y un periodo de incubación de 48 horas. La concentración fue seleccionada teniendo en cuenta que estuviera por debajo de la  $CI_{50}$  de acuerdo con los resultados de viabilidad

celular y citotoxicidad. Cada experimento se realizó por triplicado en dos experimentos independientes. Los perfiles de expresión fueron comparados con el control que correspondió a las células tumorales que no recibieron tratamiento.

**Expresión génica por PCR en tiempo real (qPCR):** El RNA total fue extraído y cuantificado usando un kit comercial (InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit (Strattec molecular), posteriormente se realizó la retrotranscripción para obtener cDNA con el kit commercial ProtoScript® M-MuLV First Strand cDNA Synthesis Kit (Biolabs, Inc.), y por último se llevó a cabo el protocolo para la qPCR con el FastStart Essential DNA Green Master 2X (Roche) siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

Se evaluó la expresión de los genes *BAX*, *BCL-2*, *CASPASA 9*, *CASPASA 8* y *TNFR1*, los niveles de expresión fueron comparados entre células tratadas y no tratadas con propóleo y la doxorubicina fue utilizada como terapéutico de uso convencional en cáncer. Cada experimento fue realizado por duplicado en tres experimentos independientes.

La qPCR fue realizada utilizando 2 µL de cDNA, 500nM de cebadores y 5 µL de master mix FastStart Essential DNA Green 2X (Roche), cada reacción se llevó a un volumen final de 10 µL con agua calidad biología molecular. Los análisis fueron realizados en el termociclador LightCycler® 96 (Roche) y los oligonucleótidos fueron diseñados usando el programa BLAST del National Centre for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), también fueron tenidas en cuenta secuencias reportadas en artículos previos y fueron sintetizados por MacroGen®.

## **E. Propuesta de una combinación de extractos de propóleo con actividad apoptótica en modelo de osteosarcoma canino**

Los propóleos que tuvieron mayor actividad citotóxica fueron evaluados en combinación para determinar su efecto sobre la inducción de apoptosis con las pruebas descritas anteriormente.

## F. Análisis estadístico de los datos

Para analizar la composición química de los propóleos se realizó una normalización de los datos, seguido de un análisis de agrupamiento y de componentes principales (Bittencourt et al., 2015).

Se realizó un análisis descriptivo de los resultados obtenidos en las pruebas de viabilidad celular, citotoxicidad, producción de peróxidos intracelulares, cambios de potencial de membrana mitocondrial y apoptosis. Un ANOVA de dos vías fue utilizado para el análisis de los datos de viabilidad celular y un ANOVA de una vía para los datos obtenidos en las pruebas de citometría de flujo, seguidos de pruebas de análisis de comparación múltiple y se consideraron diferencias significativas con un  $p < 0.05$ .

Para determinar los valores de concentración inhibitoria 50% ( $IC_{50}$ ) se usaron modelos de regresión no lineal utilizando GraphPad Prism 5 software. También se utilizó un modelo lineal generalizado para datos que presentan subdispersión donde la variable de respuesta es la proporción de células viables o muertas.

Los resultados de la PCR cuantitativa fueron analizados usando el método Ct, determinando  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  y la expresión diferencial fue expresada como el número de veces que incrementa o disminuye la expresión génica (Livak y Schmittgen, 2001). Las pruebas fueron realizadas en duplicados en tres experimentos independientes. El test Kruskal Wallis fue usado para determinar diferencias entre los niveles de expresión de los genes evaluados en células tumorales expuestas y no expuestas a propóleo.

## 2. Estado del arte

El propóleo ha sido utilizado desde tiempos ancestrales, los egipcios se beneficiaban de su actividad anti – putrefacción para embalsamar sus muertos. Los griegos y romanos lo usaron como un agente antiséptico y cicatrizante, los Incas como agente antipirético y los farmacólogos de Londres lo listaron como droga oficial en el siglo XVII (Sforcin y Bankova, 2011). Ha sido usado como un ingrediente de cremas de dientes, enjuagues bucales y en productos cosméticos como cremas faciales y lociones, es comercializado en diferentes formas como cápsulas, extractos hidroalcohólicos, cremas y gomas de mascar, incluso también es usado como material para barnizar instrumentos musicales y como preservante de productos cárnicos (Chan et al., 2013). Ahora se conocen propiedades biológicas y farmacológicas como: inmunomodulador, antitumoral, antiinflamatorio, antioxidante, antibacterial, antiviral, antifúngico, antiparasitario, antiulcera, anti inflamatorio, radioprotectivo y también con el potencial de incrementar el efecto de ciertos antibióticos (Olczyk et al., 2014; Sforcin y Bankova, 2011; Salamanca, 2017). A continuación se presenta el estado del arte sobre el conocimiento actual del propóleo, el osteosarcoma canino como modelo para el estudio del cáncer en humanos y caninos y los mecanismos asociados a la actividad antitumoral del propóleo.

### Propóleo

El propóleo es un material resinoso elaborado por las abejas a partir de exudados y brotes de plantas, mezcladas con cera y enzimas propias de las abejas (Sforcin y Bankova, 2011). La composición de las plantas de origen determinan sus constituyentes químicos (Vassya Bankova, 2005; Graikou et al., 2016). Estudios desarrollados con extractos etanólicos de propóleo muestran que este puede contener 50% de resinas y bálsamos, 30% de cera, 10% aceites aromáticos y esenciales y 5% de polen (Bankova et al., 2000; Huang et al., 2014); se pueden encontrar más de 300 sustancias que en una combinación sinérgica inducen diferentes actividades biológicas, más que de forma individual (Bankova et al., 2000). Por ejemplo, se ha reportado que el efecto del extracto de propoleo presenta una actividad citotóxica contra células tumorales superior al extracto de la planta de origen o de componentes aislados (Búfalo et al., 2010), confirmando una acción sinérgica de los componentes presentes en el producto obtenido por las abejas.

El propóleo contiene compuestos fenólicos, productos naturales biológicamente activos (Erejuwa et al., 2014), estos son generalmente clasificados en al menos 10 tipos dependiendo de su estructura básica, los flavonoides constituyen la clase más importante con más de 500 componentes descritos (Gomez-Caravaca et al., 2006) que pueden clasificarse en: Flavonoles, flavonas, flavononas, isoflavonas, antocianidinas (Erejuwa et al., 2014), flavononoles y flavanoles (Shahidi y Ambigaipalan, 2015). En el propóleo colectado de regiones tropicales y de Centro América también se ha reportado la presencia de benzofenonas polifreniladas (de Castro Ishida et al., 2011) y triterpenos (Rushdi et al., 2014), y de diterpenos en propóleos de la región mediterránea (Graikou et al., 2016). Para determinar los componentes fenólicos individuales se deben seguir procedimientos analíticos que involucran la extracción desde la muestra, la separación analítica y la cuantificación (Gomez-Caravaca et al., 2006). El protocolo de extracción afecta el perfil de componentes identificado en las muestras de propóleo (Bittencourt et al., 2015). Estudios recientes confirman la evidencia científica sobre la efectividad del propóleo en un amplio campo de aplicaciones incluyendo su uso en animales de producción, sin embargo resaltan la necesidad de incluir la caracterización química y origen geográfico del producto con el fin de facilitar la repetibilidad de los experimentos y dar un valor científico real a los estudios (Bankova et al., 2016).

Teniendo en cuenta la complejidad de su composición se han realizado intentos por lograr una clasificación de los propóleos, algunos de ellos son reconocidos por su color como el caso del propóleo verde de Brasil, propóleo rojo encontrado en Centroamérica y países como Venezuela y algunas áreas de Brasil, amarillo reportado en Cuba y el de color marrón encontrado en zonas geográficas más amplias (Freires, et al., 2016; Graikou et al., 2016). Los patrones quimiogeográficos también han servido de base para agrupar los propóleos de acuerdo con su origen teniendo aquellos de zonas templadas, de zonas tropicales, del Pacífico, de tipo Mediterráneo y de Canarias (Salamanca, 2017).

En algunas regiones del mundo se ha investigado sobre el origen geográfico, botánico y perfil de componentes activos. El propóleo poplar de Europa, Norte América, áreas no tropicales de Asia y Nueva Zelanda es obtenido de *Populus spp.*, de la sección Aigeiros, principalmente de *P nigra*, los principales componentes son flavonas, flavanonas, ácido cinámico y sus esteres; el propóleo verde de Brasil es colectado de *Bracharis spp.*, y es rico en ácido p-cumarico prenilado y ácidos diterpenicos; el propóleo de abedul de Rusia es

obtenido de *Betula verrucosa Ehrh*, contiene flavonas y flavonoles (diferentes al tipo poplar); el propóleo rojo de Cuba, Brasil, México (Graikou et al., 2016) y Venezuela (Freires, et al., 2016) obtenido de *Dalbergia spp.*, contiene isoflavonoides; el propóleo mediterráneo de Sicilia, Creta y Malta es obtenido de coníferas de las familias Cupresaceae y Pinaceae y contiene diterpenos (principalmente ácidos de tipo labdano); el propóleo “pacífico” de Okinawa, Taiwan, Indonesia, obtenido de *Maracanga tanarius* contiene c-prenil- flavanonas (Graikou et al., 2016). En Chile han reportado que los componentes del propóleo son similares al tipo poplar, sin embargo resaltan una diferencia en la proporción de los compuestos presentes (Valenzuela-Barra et al., 2015).

En zonas tropicales y especialmente en Brasil se han identificado componentes con una destacada actividad biológica como flavonoides, ácido p-cumarico prenilado, acetofenonas, lignanos, di y triterpenos (Bankova et al., 2000). Los fenilados fenilpropanoides (como la artepilina C) y diterpenos son considerados los componentes químicos dominantes en propóleos de Brasil (Huang et al., 2014); mientras que el propóleo “clusia” de Cuba y Venezuela obtenido de *Clusia spp.*, es rico en benzofenonas polifreniladas (Graikou et al., 2016; Sforcin y Bankova, 2011).

En Colombia se ha reportado la presencia de diterpenos tipo labdano, agatadiol, ácido isocupresico, torusol, también lupeol un triterpeno pentacíclico y algunos componentes fenólicos (flavonoides y ácidos aromáticos) en muestras de propóleo colectadas en el departamento de Antioquia (Palomino, 2009). En el país, la oferta floral es diversa y los propóleos se han clasificado en seis grupos de acuerdo a su aspecto físico y a sus perfiles cromatográficos, que se relacionan a su vez con las características de altitud, flora y clima de cada región biogeográfica (Salamanca, 2017).

Sin embargo, la información sobre el perfil de componentes que se puede encontrar en otras regiones del país es limitada, más aún cuando el país cuenta con amplia diversidad geográfica y botánica.

## **Osteosarcoma canino**

Estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro* han determinado que los mecanismos de acción del propóleo, se encuentran enteramente relacionados con la composición química

de su origen botánico. Efectos del propóleo sobre la apoptosis, citotoxicidad tumoral y acción inmunomoduladora del cáncer, han sido demostrados en varios estudios (Alday et al., 2015; Watanabe et al., 2011).

El cáncer comprende más de 200 enfermedades que comparten dos características en común: un crecimiento incontrolado de células y la habilidad para invadir y dañar tejido normal adyacente o en un sitio distante del cuerpo (Dzivenu et al., 2003). El cáncer inicia con una serie de mutaciones y en consecuencia daño en el DNA (Bertram, 2000) en la fase de iniciación. El proceso de promoción corresponde al crecimiento del tumor a partir de una célula hasta la formación de un tumor totalmente desarrollado (Grivennikov et al., 2010). El cáncer involucra características biológicas que incluyen: una sostenida señalización proliferativa, evasión a supresores de crecimiento tumoral, resistencia a la muerte celular, inmortalidad, inducción de angiogénesis y activación de la invasión y de metástasis; se han adicionado otras características como la reprogramación del metabolismo energético y la habilidad para evadir la destrucción por el sistema inmune (Hanahan y Weinberg, 2011).

El osteosarcoma canino es una neoplasia primaria del hueso diagnosticada frecuentemente en perros, cuya biología es idéntica a la encontrada en pediatría de pacientes humanos. Por este hecho, se ha considerado al osteosarcoma canino un excelente modelo *in vivo* para estudiar el osteosarcoma humano (Cam et al., 2016; Cinegaglia et al., 2013). Los perros desarrollan osteosarcoma en los mismos sitios anatómicos que en los pacientes humanos, con histología, respuesta a protocolos de tratamiento, y capacidad metastásica idéntica. Los genes putativos involucrados en el crecimiento y progresión del osteosarcoma humano han sido caracterizados en el canino incluyendo los genes PTEN, Rb, ezrin, villin-2, c-met, ErbB-2, oncogen homologo derivado de neuro/glioblastoma y p53; de acuerdo con un análisis de cruce de especies el osteosarcoma humano y canino no se distinguen por el perfil global de expresión de genes (Ranieri et al., 2013; Gustafson et al., 2018). Se ha visto que el extracto etanólico de propóleo al 70% tiene efecto sobre la morfología de las células de osteosarcoma generando en ellas una acción citotóxica, sugiriendo en éste un potencial efecto terapéutico (Cinegaglia et al., 2013). Adicionalmente, la incidencia de osteosarcoma en perros es mayor que la observada en niños, la enfermedad es considerada más agresiva que en humanos y los perros con osteosarcoma han sido integrados en el desarrollo de nuevas aproximaciones al tratamiento de pacientes humanos (Ranieri et al., 2013).

En este tipo de cáncer las células madre mesenquimales (MSC) derivadas de médula ósea juegan un papel en la proliferación de las células tumorales a través de la IL6 y de la activación de STAT3 que contribuirían a promover el crecimiento del tumor, la angiogénesis e incluso la resistencia a medicamentos antitumorales (Tu et al., 2012). Se ha encontrado que la proteína  $\Delta Np63$ , isoforma codificada por p63 perteneciente a la familia p53 inhibe la apoptosis y promueve la metástasis considerándose también un blanco terapéutico en osteosarcoma canino y humano (Cam et al., 2016).

## **Actividad antitumoral del propóleo**

Estudios *in vivo* e *in vitro* han generado nueva información sobre su mecanismo de acción, por ejemplo, la administración de extracto de propóleo de manera profiláctica o terapéutica suprimió significativamente el desarrollo de metástasis pulmonar en ratones inoculados con células de carcinoma trasplantable mamario, reduciendo el número y tamaño de nódulos tumorales en el pulmón (Oršolić y Bašić, 2003). *In vitro* se reporta actividad citotóxica del propóleo y algunos de sus componentes aislados sobre varios tipos de células tumorales (Watanabe et al., 2011).

Los estudios *in vitro* evidencian que el propóleo produce citotoxicidad y reduce la viabilidad celular usando pruebas como 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dimethyltetrazoliumbromide (MTT) donde las células funcionales reducen sales de tetrazolium a formazan (Alday et al., 2015) y otras como lactato deshidrogenasa para determinar daño en la membrana celular (Bartolomeu et al., 2016). Los estudios indican que los extractos de propóleo producen citotoxicidad de acuerdo a la dosis y el tiempo de evaluación (Búfalo et al., 2013; Cinegaglia et al., 2013; Seda Vatansever et al., 2010), mientras que el etanol, solvente usado en los extractos, mantiene la viabilidad celular (Alday et al., 2015).

Se ha investigado la actividad del propóleo y algunos de sus componentes en los siguientes mecanismos asociados al desarrollo del cáncer:

### **Apoptosis**

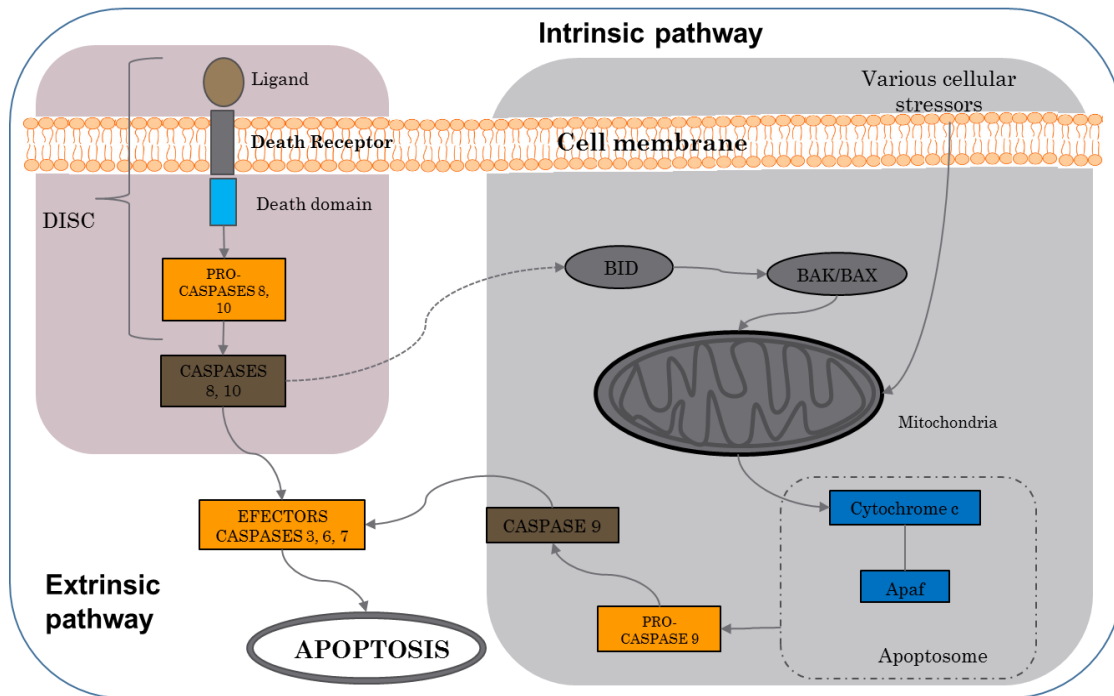
Uno de los mecanismos que generalmente se encuentra disminuido en procesos cancerígenos es el de la apoptosis o muerte celular programada (Khan, et al., 2014). Las



principales vías que desencadenan apoptosis son la extrínseca e intrínseca. La primera inicia con la activación de receptores de muerte localizados en la membrana plasmática por ligandos específicos y la vía intrínseca involucra la liberación de proteínas proapoptóticas desde la mitocondria (Sawicka et al., 2012; Yaacoub et al., 2016) (Figura 1). Una tercera vía es mediada por estrés en el retículo endoplasmático y la activación de la caspasa 4 en humanos y de la caspasa 12 en ratones (Yaacoub et al., 2016).

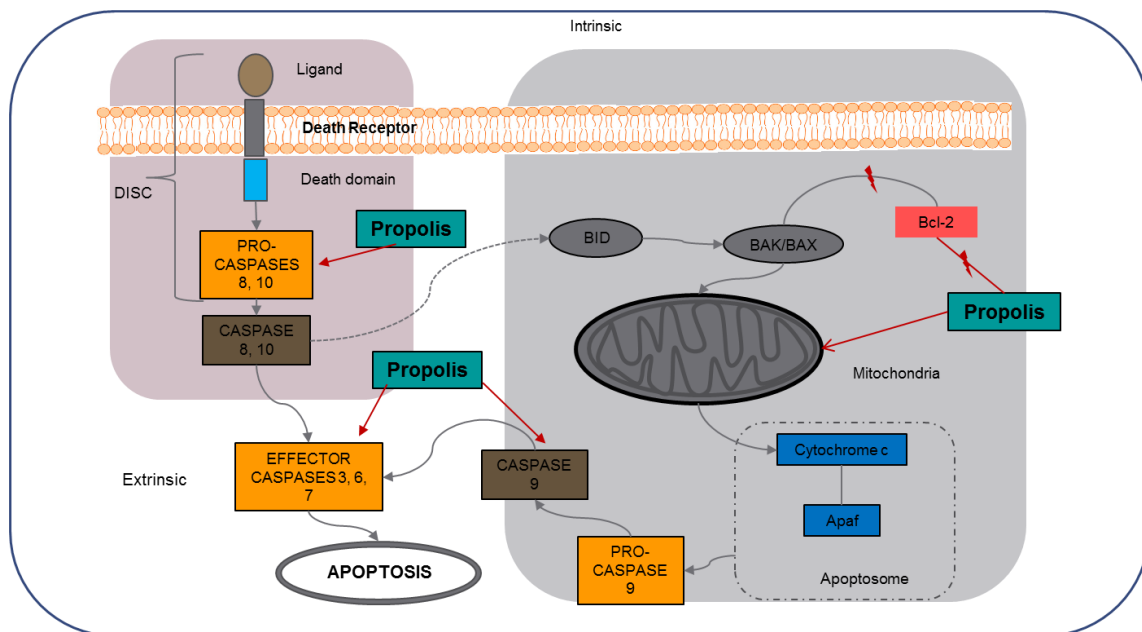
Algunos estudios intentan elucidar el mecanismo por el cual el propóleo promueve apoptosis en células de cáncer. En células de melanoma murino (B16F10) expuestas a extractos etanólicos de propóleo rojo de Brasil hubo incremento en la actividad de caspasa 3, una proteasa efectora en apoptosis (Novak et al., 2014). Se encontraron resultados similares en células de leucemia humana (U937) con propóleo de Japón (Motomura et al., 2008) y en células de cáncer mamario (MCF-7) y ER (-) MDA-MB-23 con propóleo de China (Xuan et al., 2016). En células de cáncer mamario humano (MCF-7) se presentó inmunoreactividad de las caspasas 6, 8 y 9 usando extractos de propóleo de Turquía (Seda Vatansever et al., 2010) sugiriendo estimulación de las vías intrínseca (caspasa 9) y extrínseca (caspasa 8).

**Figura 1:** Representación esquemática de las vías extrínseca e intrínseca de apoptosis.



Además de las caspasas, han encontrado una disminución en los niveles de expresión de Bcl-2, proteína anti apoptótica, en células de leucemia humana (U937) tratadas con propóleo de Japón, indicando activación de la vía intrínseca (Motomura et al., 2008). Sulaiman et al (2012) encontraron resultados similares en la expresión de Bcl-2 usando propóleo iraquí en células de leucemia promieloide humana (HL-60), sin embargo, el nivel de la proteína pro apoptótica Bax disminuyó después del tratamiento con propóleo (Sulaiman et al., 2012). En la Figura 2 se pueden observar blancos de acción del propóleo evaluados en las vías de apoptosis.

**Figura 2.** Representación esquemática de las vías de apoptosis afectadas por la acción del propóleo.



Algunos autores concluyen que el mecanismo de inducción de apoptosis del propóleo es independiente del tipo de células de cáncer, pero si es dependiente de la concentración de los extractos de propóleo utilizados (Premratanachai y Chanchao, 2014).

## Arresto en el ciclo celular

Se ha encontrado que el ester fenetil ácido cafeico (CAPE), un componente presente en el propóleo, induce arresto en el ciclo celular en la fase S en células de cáncer mamario (Wu et al., 2011). La crisina y otros fenoles como la quercetina y kaempferol han presentado

arresto celular en las fases G0/G1, G1 y G2/M en varios tipos de líneas celulares de cáncer (Erejuwa et al., 2014). Fracciones de propóleo brasileiro han inhibido la progresión del ciclo celular en la fase G2/M en células de melanoma murino (B16F10) (Novak et al., 2014). En células de cáncer mamario (MDA-MB-231) expuestas a extractos de propóleo de Portugal hubo una disminución en la población de células en las fases G0/G1 y G2/M con un incremento en las de fase S (Silva-Carvalho et al., 2014). Como un efecto antiproliferativo, el propóleo inhibe el ciclo celular por supresión de la expresión de ciclina A, ciclina B, ciclina dependiente de quinasa (Cdk2), incremento en los niveles de proteínas p21 y p27 (Motomura et al., 2008), e inhibición del efecto de la telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT) en células tumorales (Sawicka et al., 2012).

El tratamiento con galangina, otro componente reportado en el propóleo, redujó la ciclina D1 y pRb, reguladores importantes en la transición de G0/G1 a la fase S, también disminución en CDK4 y CDK6 y un incremento en p21 (inhibidor de CDK) en células de carcinoma escamoso de cabeza y cuello (HNSCC) (Zhu et al., 2014).

Otros mecanismos que han sido evaluados usando diferentes técnicas incluyen: Un incremento en la expresión de p53 en ratones inoculados con células de cáncer de colon humano (HCT-116) y tratados con propóleo iraquí (Sulaiman et al., 2012) e inhibición de la expresión de telomerasa en línea celular de leucemia linfoblástica aguda de células T (CCFR-CEM) tratadas con propóleo de Turquía (Gunduz et al., 2005).

## **Inmunomodulación**

Propóleos de Brasil, Cuba y México con diferente composición han mostrado ejercer actividad pro y antiinflamatoria dependiendo la concentración indicando un potencial para el desarrollo de medicamentos con actividad inmunomoduladora (Conti et al., 2015).

Usando extractos de propóleo de Croacia y Brasil antes y después de la aplicación de células de carcinoma mamario trasplantable a ratones encontraron una supresión en el desarrollo de metástasis, efecto que fue asociado con actividad inmunomoduladora y con la activación de macrófagos (Oršolić y Bašić, 2003). *In vivo*, proponen un efecto antitumoral atribuido a la acción inmunomoduladora por el incremento en la inmunidad antitumoral no específica debido a la activación de macrófagos que a su vez generan factores solubles que interfieren directamente sobre las células tumorales u otras células del sistema inmune

(Watanabe et al., 2011; Oršolić et al., 2006). Algunos autores sugieren que los cambios en la celularidad y peso del bazo en ratones inoculados con células tumorales puede ser consecuencia del incremento en la producción de los macrófagos con un incremento en su actividad moduladora (Oršolić et al., 2004).

Asociado al efecto sobre el sistema immune se ha encontrado que el propóleo y el ácido cafeico, que es uno de sus componentes, inhibieron la producción de óxido nítrico en macrófagos sin generar citotoxicidad, además suprimieron vías de señalización estimuladas por lipopolisacáridos como p38, MAPK, JNK1/2 y NFκB (Búfalo et al., 2013).

## **Angiogénesis**

Un mecanismo asociado al desarrollo del tumor es la formación de nuevos vasos sanguíneos, se conoce que la endostatina es un inhibidor endógeno de angiogénesis y su actividad ha sido estimulada por efecto de CAPE confirmando su actividad anti angiogénica (El-Refaei y El-Naa, 2010).

Estudios realizados *in vivo* e *in vitro* en modelo de ratón mostraron una reducción en el índice de formación de nuevos vasos sanguíneos luego del tratamiento con extracto de propóleo de Brasil, también encontraron este efecto para la Artepilina C, uno de los principales componentes de este propóleo (Ahn et al., 2007). En membrana corioalantoidea de embrión de pollo expuesta a propóleo se encontró un efecto también en la neovascularización (Silva-Carvalho et al., 2014). Efectos antiangiogénicos similares son reportados en membrana de saco vitelino de embriones de pollo usando propóleo del Sur de Brasil, estos resultados fueron confirmados con pruebas en membrana corioalantoidea donde se evidenció inhibición en la formación de vasos corioalantoideos (Meneghelli et al., 2013).

## **Asociación con terapias antitumorales convencionales**

La acción del propóleo ha sido comparada con los medicamentos antitumorales, incluso se han evaluado en asociación en orden de investigar una posible acción sinérgica (Sforcin y Bankova, 2011; Bernardino et al., 2018). Por ejemplo, en un estudio para explorar el efecto protector del extracto de propóleo en ratones a los que se les indujo daño testicular con

doxorubicina, se encontró que el propóleo protegió a los testículos de las lesiones sin afectar la eficiencia antitumoral del medicamento, sugiriendo que podría ser potencialmente usado como adyuvante protegiendo a los testículos de las lesiones que se generan por los procesos oxidativos y apoptóticos asociadas a la aplicación de la doxorubicina en la práctica clínica (Rizk et al., 2014). Un resultado similar fue reportado cuando se usó el propóleo para prevenir el daño testicular causado por el metotrexato que también es usado en quimioterapia (Sönmez et al., 2016).

Adicionalmente, se ha evaluado la actividad antitumoral de algunos componentes activos del propóleo. Por ejemplo, el ester fenetil ácido cafeico (CAPE) es un inhibidor del factor nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) (Natarajan et al., 1996), tiene efecto sobre angiogénesis, arresto en ciclo celular y es capaz de sub-regular la expresión del gen *mdr-1* en células de cáncer mamario (MCF-7) (Wu et al., 2011). La crisina, una flavona presente en el propóleo incrementa apoptosis, suprime proliferación celular, inhibe metástasis, angiogénesis y la vía NF $\kappa$ B (Kasala et al., 2015); la crisina incrementa la apoptosis inducida por TRAIL y produce activación de la caspasa 8 (Li et al., 2011). Actividades similares a las de la crisina han sido reportadas para el kaempferol, un flavonoide presente en el propóleo (Rajendran et al., 2014). La galangina (3,5,7-trihydroxyflavone), otro flavonoide se ha reportado por su actividad en regulación del ciclo celular, generando arresto en G0/G1, sub-regulando Bcl-2 y Bcl-xL y sobre-regulando Bax y caspasa 3 clivada en líneas de carcinoma escamoso celular humano de cabeza y cuello (Zhu et al., 2014).

### 3. Justificación

En el mundo actual se observa una megatendencia por el consumo de alimentos naturales cuya producción se haya realizado en condiciones sostenibles ambientalmente, lo que hace que los productos y servicios de la apicultura se encuentren en una dinámica de mercado en crecimiento. La apicultura colombiana es una actividad económica en consolidación, caracterizada por la presencia de un gran número de productores, que generan productos de interés para los mercados, principalmente miel de abejas, polen, cera, propóleos y la jalea real entre otros. Sin embargo, no es sólo su actividad productiva lo interesante desde la perspectiva económica, sino los potenciales servicios complementarios que la industria apícola puede prestar, como la polinización (Laverde et al., 2010). Actualmente, a nivel mundial hay gran preocupación para conservar las especies de abejas teniendo en cuenta su función de polinizadora, por ello los avances en el desarrollo de los productos apícolas que puedan generar un valor agregado a los apicultores contribuye a mantener e incentivar la cría de abejas.

Aunque en Colombia no se cuenta con información oficial actualizada sobre el volumen de producción de propóleos, en el Diagnóstico Apícola elaborado por el Ministerio de Agricultura en el año 2006 se reporta que los apicultores están desperdiciando este producto que puede tener un gran valor en mercados nacionales como internacionales (Martínez, 2006). Por ello se hace necesario conocer cuál es el potencial que pueden tener los propóleos producidos por las abejas en Colombia con base en la identificación de sus componentes activos, ya que hasta ahora en el país hay reportes de sus características fisicoquímicas y microbiológicas pero no se han estudiado en detalle estos constituyentes (Viloria et al., 2012). En cuanto a la identificación de productos activos se reporta un estudio en Antioquia en el 2009 en el que se evalúan sólo los dos grandes grupos flavonoides y fenoles (Palomino, 2009) pero no se determinan las sustancias específicas de cada grupo.

La comercialización del propóleo ha sido relegada a la venta de tinturas en tiendas naturistas, como componente de algunos productos cosméticos, y como suplemento dietario en la industria de los alimentos (Viloria et al., 2012). No obstante, el uso de propóleos en productos para el cuidado de la salud y la alimentación exige su normalización. Pese a que algunos estudios preliminares (Talero et al., 2012) indican que el este producto colombiano posee una actividad biológica importante, la poca divulgación ha limitado su

aprovechamiento, haciéndose imperiosa su caracterización en Colombia, con el fin de establecer medidas de calidad y de clasificación del propóleo crudo obtenido de diferentes regiones apícolas (Viloria et al., 2012).

El propóleo, además de contar con una base científica que demuestra su potencial farmacológico ha sido usado desde tiempos ancestrales para tratamientos de diversas afecciones, como su composición es compleja cada estudio debe ir acompañado de la caracterización química y del origen geográfico del propóleo utilizado (Sforcin y Bankova 2011). En ese sentido, el grupo de investigación en Inmunomodulación por Productos Naturales del Instituto de Biociencias de la UNESP, dirigido por el Dr. Jose Mauricio Sforcin presenta grandes avances sobre la actividad biológica del propoleo brasilero que ha sido ampliamente estudiado y caracterizado (Búfalo et al., 2010; Watanabe et al., 2011; Cinegaglia et al., 2013, Búfalo et al., 2013; Conti et al., 2015). En Colombia su aprovechamiento y comercialización es limitado, esto se debe principalmente al desconocimiento de su composición y a la falta de estudios que lo evalúen en conjunto con su actividad biológica.

Por ello, los avances logrados en la investigación favorecen el reconocimiento del propóleo colombiano a nivel internacional por su actividad biológica contribuyendo también al proceso de estandarización de este producto subaprovechado a nivel local. Los resultados de este proyecto podrán ser utilizados como herramienta en la búsqueda de compuestos de origen natural con potencial farmacológico que contribuyan a desarrollar estrategias terapéuticas para el cáncer basados en el modelo *in vitro* de osteosarcoma canino; favorecerán el reconocimiento a nivel internacional de la actividad biológica y composición química de los propóleos de origen colombiano y adicionalmente contribuirá mejorar e incentivar la producción apícola a nivel nacional.

## 4. Producción

En este capítulo se presentan inicialmente los resultados generales y a continuación la información detallada se encuentra en cada uno de los artículos.

En el artículo 1 sometido a la revista *Phytotherapy Research* y titulado: **The chemical composition and mechanisms involved in the cytotoxic effects of propolis on osteosarcoma cells: a comparative assessment of Colombian samples**, una vez realizada la caracterización química de las nueve muestras de propóleo se estableció que los componentes predominantes son triterpenos, diterpenos y benzofenonas, los propóleos presentaron diferencias en cuanto al tipo de componente perteneciente a cada grupo y a la proporción presente, adicionalmente se encontró una alta proporción de compuestos no identificados. El efecto de los nueve extractos sobre la viabilidad celular fue determinado, encontrado un efecto significativo incrementando de acuerdo a la concentración y tiempo de evaluación. Se seleccionaron cinco de las muestras de propóleo que presentaron mayor efecto sobre la viabilidad celular y que tuvieron diferencias en la composición, estas fueron utilizadas para la evaluación de la producción de ROS, cambios en el potencial de membrana mitocondrial y apoptosis. Las cinco muestras de propóleo a 50µg/mL por 48 h generaron un incremento en la apoptosis tardía y temprana. La producción de peróxidos intracelulares disminuyó en células tratadas con propóleo y solamente la muestra de propóleo et redujó significativamente la población fluorescente a rodamina 123.

El segundo documento corresponde a la información obtenida de la experimentación realizada en la Universidad Antonio Nariño y en la Universidad Nacional de Colombia en la que se utilizó una línea celular establecida de osteosarcoma canino. Los propóleos fueron evaluados para determinar su efecto sobre la viabilidad celular, citotoxicidad, apoptosis y expresión de genes asociados a apoptosis. De este trabajo experimental se generó el artículo 3 sometido a la revista *Journal of Pharmacy and Pharmacology* y titulado **Apoptosis-related gene expression induced by Colombian propolis samples in canine osteosarcoma cell line (OSCA-8)**.

Seguido de los artículos se puede ver la patente que se encuentra radicada en la Superintendencia de Industria y Comercio en la que se protege una combinación de



propóleos con actividad apoptótica en el modelo *in vitro* de osteosarcoma canino, esta se denomina **Composición que contiene triterpenos, diterpenos, benzofenonas y/o flavonoides con actividad antitumoral**. La patente fue radicada en la Superintendencia de Industria y Comercio, bajo el expediente No. NC2017/0007981 en el 2017 y se encuentra en etapa de evaluación.

Durante el desarrollo del doctorado fue necesaria la participación en varias convocatorias para la búsqueda de financiación para el proyecto de doctorado, en la siguiente tabla se describen algunas de estas actividades (Tabla 1).

Tabla 1: Listado de convocatorias en las que participo el proyecto de doctorado y los resultados obtenidos.

No.	Nombre	Año	Datos generales	Observaciones
1	Actividad apoptótica de propóleos de <i>Apis mellifera</i> sobre explantes de osteosarcoma extraídos de pacientes caninos	2017	Convocatoria interna UAN para proyectos de investigación 2017	Aprobado y en ejecución
2	Análisis de los cambios en el perfil de expresión de ARN mensajero de células de osteosarcoma canino después del tratamiento con extractos de propóleo.	2016	Convocatoria interna UAN para proyectos de investigación 2016	Aprobado y en ejecución

Como se mencionó en los primeros capítulos se realizó una pasantía en el Instituto de Biociencias de la Universidad Estadual Paulista Campus de Botucatu Brasil, allí fue posible realizar una fase experimental, a partir de la cual surgieron las primeras propuestas de artículos científicos.

Tabla 2: Descripción de pasantía realizada durante el doctorado en Ciencia Aplicada.

No.	Institución	Año	Actividades realizadas
1	Instituto de Biociencias de la Universidad Estadual Paulista Campus de Botucatu Brasil	2017	Elaboración de extractos etanólicos de propóleo Cultivo celular de Osteosarcoma canino Realización de pruebas de viabilidad celular Evaluación del efecto apoptótico y mecanismos asociados a muerte celular de muestras de propóleo en células de osteosarcoma canino, por citometría de flujo.

La producción científica generada en el desarrollo del doctorado se resume en artículos de investigación que se encuentran en diferentes procesos de evaluación, estos se encuentran completos a continuación y son listados en la siguiente tabla:

Tabla 3: Listado de artículos científicos generados y descripción del estado actual.

No.	Nombre	Año	Datos generales	Observaciones
1	<b>The chemical composition and mechanisms involved in the cytotoxic effects of propolis on osteosarcoma cells: a comparative assessment of Colombian samples</b>	2018	Artículo sometido a Journal of Phytotherapy Research	El artículo se encuentra en revisión
2	<b>Apoptosis-related gene expression induced by Colombian propolis samples in canine osteosarcoma cell line (OSCA-8)</b>	2018	Artículo sometido a Journal of Pharmacy and Pharmacology	El artículo se encuentra en revisión

Los resultados asociados al efecto citotóxico del propóleo en células tumorales OSCA-8 y no tumorales (fibroblastos de cultivo primario) mostraron diferencias significativas. Los propóleos Met y Caj redujeron en mayor medida la viabilidad de células OSCA-8 comparada con la de fibroblastos caninos, después de 48 horas de exposición. A las 72 horas de exposición, los propóleos Usm y Sil, mostraron una mayor inhibición en la proliferación de las células tumorales OSCA-8. Cuando se evaluó el efecto citotóxico, el propóleo también presentó mayor actividad sobre células de OSA en comparación con los fibroblastos. Se determinó un índice de selectividad del propóleo hacia las células tumorales mayor a 4.69 con los extractos Usm, Caj y Sil. Estos hallazgos están siendo incluidos en un documento que se encuentra en construcción, junto con resultados de pruebas adicionales que están en proceso de análisis.

A continuación se presentan los artículos 1 y 2 y la propuesta de patente.

## **The chemical composition and mechanisms involved in the cytotoxic effects of propolis on osteosarcoma cells: a comparative assessment of Colombian samples**

Dolly Patricia Pardo Mora<sup>1</sup>, Karina Basso Santiago<sup>2</sup>, Bruno José Conti<sup>2</sup>, Eliza de Oliveira Cardoso<sup>2</sup>, Fernanda Lopes Conte<sup>2</sup>, Lucas Pires Garcia Oliveira<sup>2</sup>, Marjorie de Assis Golim<sup>3</sup>, Jaime Fabian Cruz Uribe<sup>1</sup>, Rafael María Gutiérrez<sup>1</sup>, Mauricio Rey Buitrago<sup>1</sup>, Milena Popova<sup>4</sup>, Boryana Trusheva<sup>4</sup>, Vassya Bankova<sup>4</sup>, Orlando Torres García<sup>1</sup>, José Maurício Sforcin<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidad Antonio Nariño, Bogotá, Colombia.

<sup>2</sup> São Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences, Campus Botucatu, Brazil.

<sup>3</sup> Botucatu Blood Center, School of Medicine, UNESP, Botucatu, SP, Brazil.

<sup>4</sup> Institute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria.

### **Correspondence**

José Maurício Sforcin, Department of Microbiology and Immunology, São Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences, Campus Botucatu, Brazil.

E-mail: sforcin@ibb.unesp.br

### **Abstract**

Osteosarcoma (OSA) is a type of bone cancer showing an aggressive biological behavior with metastatic progression. Since propolis potential for the development of new antitumoral drugs has been indicated, the aim of this study was to evaluate the chemical composition of Colombian propolis samples and the mechanisms involved in their cytotoxic effects on OSA cells. The chemical composition was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry GC-MS and the DPPH free radical scavenging activity was measured. Cluster and principal components analysis (PCA) were used to establish an association with their inhibitory concentration 50% (IC<sub>50</sub>). Cell viability was analyzed by MTT assay, annexin V/propidium iodide was used to determine apoptosis by flow cytometry; DCFH-DA to evaluate the production of reactive oxygen species, and rhodamine 123 to determine mitochondrial

membrane permeability. Transwell assay was used to evaluate the invasiveness of propolis-treated cells. Samples were grouped: Cluster 1 contained mainly diterpenes and benzophenones and showed the highest antiradical activity; Cluster 2 was characterized by high levels of triterpenes, and fatty acid and diterpenes. P-2 Usm contained diterpenes and triterpenes different of the other samples, and P-6 Sil contained mainly triterpenes and flavonoids. The IC<sub>50</sub> of all samples ranged from 19.61 to 50.39 µg/mL at 72 h. Apoptosis, mitochondrial membrane alteration and suppression of cell invasion were the main mechanisms involved in the inhibition of OSA cells *in vitro*, suggesting the potential of Colombian propolis to discover new antitumor drugs. Further studies are still needed to evaluate their potential antitumor activity *in vivo*.

**Keywords** Propolis; Osteosarcoma; Chemical composition; Cytotoxicity; Apoptosis; Mitochondrial membrane potential

## INTRODUCTION

Osteosarcoma (OSA) is a bone neoplasm showing an aggressive biological behavior initially restricted to the bone microenvironment, with metastatic progression. Children and adolescents diagnosed with OSA in 2017 received medical therapies that remain essentially unchanged since the introduction of methotrexate, doxorubicin, and cisplatin in the late 1970s (Saraf, Fenger & Roberts, 2018). Outcomes have improved very little since the advent of chemotherapy. Therefore, this tumor is still a challenge for the development of new therapeutic alternatives, since chemotherapy is often limited by multidrug resistance mechanisms, resulting in poor prognosis and unsuccessful treatment (Yang et al., 2014). Canine OSA has similar characteristics to human cancer, being an excellent model to evaluate the efficiency of antitumor drugs *in vitro* (Mueller, Fuchs & Kaser-Hotz, 2007).

Natural products and their dietary constituents have attracted researchers' attention because of their antitumor properties and lower toxicity (Wu & Li, 2017). Propolis potential for the development of new antitumoral drugs has been pointed out (Sforcin & Bankova, 2011; Sforcin, 2016). Propolis is a resinous material produced by *Apis mellifera* bees from

plants and displays a bunch of biological properties due its complex chemical composition (Bankova, 2005; Graikou et al., 2016).

Propolis composition depends on the phytogeographical origin and the profile of active components related to the botanical and geographical origin has been investigated. Poplar propolis from Europe, North America, non-tropic regions of Asia and New Zealand are obtained from *Populus spp.*, and the major constituents are flavones, flavanones, cinnamic acids and their esters. Birch propolis from Russia is obtained from *Betula verrucosa* Ehrh and contains flavones and flavonols (different from the poplar type); mediterranean propolis from Sicily, Greece, Crete and Malta is obtained from Conifers trees and contains diterpenes; “pacific” propolis from Okinawa, Taiwan, Indonesia, obtained of *Macaranga tanarius*, contains C-prenyl-flavanones (Graikou et al., 2016; Sforcin & Bankova, 2011).

In Brazil, green propolis is collected mainly from *Baccharis dracunculifolia* and is rich in prenylated *p*-coumaric acids and diterpenic acids, while red propolis from Cuba, Brazil, Mexico (Graikou et al., 2016) and Venezuela comes from *Dalbergia spp.* and contains isoflavonoids; propolis from Cuba and Venezuela is rich in polyprenylated benzophenones (Graikou et al., 2016; Sforcin & Bankova, 2011). In Colombian samples, labdane type diterpenes, agathadiol, isocupressic acid and torulosol, as well as lupeol – a pentacyclic triterpene, and some phenolic compounds (flavonoids and aromatic acids) were found (Palomino, 2010). However, there is limited information about the chemical composition in other regions in Colombia, where a wide botanical and geographical diversity may be seen.

Propolis antitumor activity against several types of tumor cells has been reported and the mechanisms included mainly apoptosis or necrosis, cell cycle arrest and antiangiogenic effects (Tsuchiya et al., 2013; Alday et al., 2015; Motomura et al., 2008; Novak et al., 2014). Apoptosis suppression is recognized as a hallmark of cancer and may be a novel approach for the development of new antitumor drugs (Khan, Blanco-Codesido & Molife 2014; Yaacoub et al., 2016). Propolis samples from Mexico, Brazil, Poland, Turkey, Iraq, China, Japan and Thailand have shown apoptotic effects on cancer cells through activation of caspases 3, 6, 8, 9 and Bax, changes in the mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) and *Bcl-2* expression (Alday et al., 2015; Frión-Herrera et al., 2015; Khacha-ananda et al., 2016; Motomura et al., 2008; Novak et al., 2014; Seda Vatansever et al., 2010; Sulaiman et al., 2012; Xuan et al., 2016). In addition, reactive oxygen species (ROS) production may be

involved in the effects of natural products on tumor cells (Shashi et al., 2006; Yan et al., 2014).

Since little is known concerning the composition of Colombian propolis samples and its cytotoxic activity, the goal of this work was to characterize the chemical constituents of nine samples collected in different Colombian zones: Antioquia, Bogotá Capital District, Huila, Meta, Cundinamarca, Cauca, Valle del Cauca, and Boyacá, and to investigate for the first time their free radical scavenging activity and their cytotoxic potential against canine OSA cells *in vitro*. The mechanisms involved in their cytotoxic action was evaluated assessing apoptosis, ROS generation, changes in the  $\Delta\Psi_m$ , and cell invasion capacity.

## **Materials and methods**

### *Propolis samples*

Nine samples were collected in Colombia: San Carlos, Antioquia (P-1 Ant); Usme, Bogotá District Capital (P-2 Usm); Rivera, Huila (P-3 Hui); Puerto Lopez, Meta (P-4 Met); Fusagasuga, Cundinamarca (P-5 Fus); Silvia, Cauca (P-6 Sil); Cajibío, Cauca (P-7 Caj); Sevilla, Valle del Cauca (P-8 Val), and Zetaquirá, Boyacá (P-9 Boy). Samples were collected using plastic nets and scrapings from July until December 2015. Samples were ground; 4.5 g of propolis were dissolved in 15 mL of 70% ethanol, stored in the absence of bright light, under occasional shaking, at room temperature. Each extract was filtered after 24 h and the dry weight (mg/mL) was obtained.

### *Propolis chemical composition analysis by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)*

Ten grams of pulverized crude propolis were extracted with a 10-fold volume of 70% ethanol solution extensively for 24 h at room temperature. GC-MS analysis was performed using a Hewlett-Packard gas chromatograph 5890 series II Plus linked to a Hewlett-Packard 5972 mass spectrometer system equipped with a 23 m-long, 0.25 mm id, 0.5 mm film thickness

HP5–MS capillary column. The temperature was programmed from 100 to 300 °C at a rate of 5 °C/min. Helium was used as a carrier gas, flow rate 0.7 mL/min. Split ratio 1:20, injector temperature 280 °C, ionization voltage 70 eV. The identification of the compounds was performed using NIST98 and Wiley mass spectral databases and comparison of mass spectra and retention time of reference compounds as well as by using literature (Bankova et al., 2016).

#### *DPPH free radical scavenging activity*

DPPH free radical scavenging activity was measured by colorimetric procedures. In brief, the extracts were dissolved in ethanol (0.36 mg/mL), and 100 µL of the analyzed solution was added to 2 mL DPPH solution (0.1 mM in ethanol). The resulting solution was mixed, kept in the dark and after 20 min the absorbance was measured at 517 nm. The scavenging activity was determined by comparison of the absorbance with blank (100%), containing only DPPH and solvent. Caffeic acid (Merck & Co. Inc. – Kenilworth, NJ, USA), was used as positive control.

#### *Viability of osteosarcoma cells*

Canine OSA cells were obtained from the Department of Pathology, FMVZ, UNESP, Campus of Botucatu. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (Cultilab – Campinas, SP, Brazil), penicillin (100 UI/mL), streptomycin (100 µg/mL) and amphotericin B (3 µg/mL) (Gibco – Grand Island, NY, USA) were used for cells maintenance.

Canine OSA cells ( $1 \times 10^5$  cells/mL) were seeded in 96 wells plates. Cells were allowed to adhere overnight and then exposed to propolis extracts (5, 10, 25, 50 and 100 µg/mL) for 24, 48 and 72 h. The effect of 70% ethanol (propolis solvent) in the same concentration found in the highest propolis concentration (0.34%) was also evaluated. Control cells were incubated with medium alone and Doxorubicin 4µM was used as a positive control. After treatment, cells were incubated with 100 µL of 3-(4,5,-dimethylthiazole-2-

yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma Aldrich – St. Louis, MO, USA) (1 mg/mL) for 3 h. Afterwards, cells were lysed in DMSO (100 µL/well). Assays were performed in quadruplicate for each propolis sample. The absorbance was read at 540 nm on a plate reader, and percentage of cell viability was calculated by the formula: [O.D. test/O.D. control] x 100. The median inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) was determined by interpolation of the graph of propolis concentration vs cell viability.

#### *Apoptosis analysis by flow cytometry*

Five propolis samples (P-2 Usm, P-4 Met, P-5 Fus, P-6 Sil and P-7 Caj) belonging to the clusters and outliers were chosen to continue the assays. P-Met and P-Fus were grouped in the same cluster and showed the highest antiradical activity. In addition, the five samples displayed a cytotoxic activity using 50 µg/mL for 48 h. OSA cells (1 x 10<sup>5</sup> cells/mL) were treated with propolis extracts (50 µg/mL) for 48 h. Cells incubated only with culture medium were used as control. Annexin V/propidium iodide apoptosis kit (Santa Cruz Biotechnology Inc. – Santa Cruz, CA, USA) was performed according to manufacturer's instructions. Cells were analyzed using a flow cytometer FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) and 20000 events were acquired. The results were presented as viable cells (annexin V<sup>-</sup> and PI<sup>-</sup>), early apoptosis (annexin V<sup>+</sup> and PI<sup>-</sup>), late apoptosis (annexin V<sup>+</sup> and PI<sup>+</sup>) and cell death (annexin V<sup>-</sup> and PI<sup>+</sup>).

#### *Reactive oxygen species (ROS) production*

Canine OSA cells (1 x 10<sup>5</sup> cells/mL) were treated with propolis (50 µg/mL) for 48 h. Cells were harvested, centrifuged and washed with PBS. 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate DCFH-DA (Santa Cruz Biotechnology Inc. – Santa Cruz, CA, USA) (5 µM) was added and after 30 min cells were washed with PBS and centrifuged. The supernatant was removed and cells were suspended in sheath fluid. DCF fluorescence intensity was analyzed using a flow cytometer (FACSCalibur) and 20000 events were recorded.

#### *Mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) assay*



OSA cells ( $1 \times 10^5$  cells/mL) were treated with propolis extracts (50  $\mu\text{g/mL}$ , 48 h) or with culture medium alone (control). Cells were harvested and incubated at 37 °C with rhodamine 123 (Rho-123) (Santa Cruz Biotechnology Inc. – Santa Cruz, CA, USA) (2  $\mu\text{g/mL}$ ) for 30 min. Cells were washed with PBS and centrifuged, the supernatant was removed and cells were suspended in Isoton. Rho-123 fluorescence intensity was analyzed using a flow cytometer (FACSCalibur) and 20000 events were recorded.

#### *Cellular invasion assay*

Canine OSA cells ( $7 \times 10^5$  cells/mL) were treated with propolis (50  $\mu\text{g/mL}$ ) in serum-free DMEM. Cells incubated only with serum-free culture medium were used as control. CytoSelect 24 -well cell invasion kit (Cell Biolabs Inc. – San Diego, CA, USA) was performed according to manufacturer's instructions.

#### *Statistic analysis*

To analyze the composition of propolis samples, data were normalized, cluster analysis and principal components analysis (PCA) were used. Analysis results and graphics were made using GraphPad Prism 5 software (Graph Pad – San Diego, CA, USA). Analysis of variance (ANOVA) and Dunnett test were employed for multiple comparison and differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

## **Results**

#### *Chemical composition of Colombian samples*

The major chemical groups found in Colombian samples were triterpenes, benzophenones, diterpenes, flavonoids, alkylresorcinols, sugar and fatty acids (Table 1). Triterpenes were present in 8 out of 9 samples, with relative values per sample ranging from 2.5% to 71.9%;

benzophenones were detected in 6 samples (traces up to 39.7%), and diterpenes were present in all samples (0.7% – 15.4%).

PCA was used to reduce the number of dimensions and to determine the factors that explain better the variance of group data. The relative amounts of the main groups of chemical constituents of propolis, including also the major unidentified constituent (m/z 658, 296), found in 5 samples in amounts over 15% were selected (Fig. 1). The application of PCA produced a plot, which covered 76.3% of the total variation and two distinct groups of samples with two outliers were formed.

#### *Propolis antioxidant activity*

The highest antiradical activity was exerted by the samples P–5 Fus > P–4 Met > P–8 Val > P–9 Boy > P–1 Ant, and all of them belonged to the larger group obtained by PCA (Table 2).

#### *Propolis cytotoxic activity*

Propolis affected OSA cell viability over time. After 24 h, all propolis samples reduced cell viability and the most efficient ones using 100 µg/mL were P–2 Usm, P–6 Sil and P–7 Caj. After 48 h using 50 µg/mL, P–4 Met, P–5 Fus, P–6 Sil and P–9 Boy exerted the best inhibitory activity against OSA cells. After 72 h using 50 µg/mL, P–4 Met, P–6 Sil, P–7 Caj and P–9 Boy were the most efficient samples. A low cytotoxic activity was observed using propolis (5 and 10 µg/mL) after 24, 48 and 72 h, whereas a significant inhibitory action was seen using 100 µg/mL comparing to control in all periods of time. The IC<sub>50</sub> ranged from 20.31 – 49.62 µg/mL after 48 h and 19.61– 50.39 µg/mL after 72 h (Table 3).

Five samples were chosen to continue the assays using 50 µg/mL at 48 h: P–2 Usm, P–4 Met, P–5 Fus, P–6 Sil and P–7 Caj. These samples presented a cytotoxic activity significantly lower than control at 50 µg/mL and Met was the most efficient one (Fig. 2).

Propolis solvent (70% ethanol) had no significant cytotoxic effect against OSA cells. Doxorubicin reduced significantly OSA cell viability to 75.56%; 86.08% and 84.21% after 24, 48 and 72 h ( $p < 0.05$ ), respectively (data not shown).

### *Apoptosis analysis*

Control cells presented 81.17% of viability, 9.61% late apoptosis, 8.30% early apoptosis and 0.93% of dead cells. All propolis samples (50 µg/mL) induced apoptosis significantly after 48 h ( $p < 0.05$ ). Met induced the highest apoptotic level in OSA cells (Fig. 3a). P-2 Usm, P-6 Sil and P-7 Caj induced mainly early apoptosis, while P-4 Met induced mainly late apoptosis (Fig. 3b).

### *Reactive oxygen species production*

Colombian samples but P-7 Caj decreased ROS generation compared to control cells. Furthermore, P-4 Met sample exhibited the lower ROS production (Fig. 4a and 4b).

### *Mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) assay*

Colombian propolis extracts led to similar Rho-123 positive OSA cells compared to control, and only Met sample increased the mitochondrial membrane permeability, affecting significantly the its potential (Fig. 5a).

### *Cell invasion assay*

Four Colombian propolis samples (P-2 Usm, P-4 Met, P-5 Fus and P-7 Caj) decreased significantly canine OSA cells invasion ability (Fig. 5b). P-2 Usm and P-5 Fus were more efficient to prevent OSA cell invasion.

## **Discussion**

Propolis cytotoxic activity against tumor cells has been widely reported and its chemical composition is responsible for such effects (Alday et al., 2015; Búfalo et al., 2013; Cinegaglia et al., 2013; Pardo-Andreu et al., 2015; Seda Vatansever et al., 2010; Yilmaz et al., 2016). This is the first detailed investigation on the chemical composition of Colombian propolis.

Thus, samples from different geographic regions, such as Antioquia, Cundinamarca, Bogotá D.C., Huila, Meta, Valle del Cauca, Boyacá and Cauca were collected and analyzed by GC-MS. Samples reduced the viability of canine OSA cells, and P-4 Met was the most efficient one. The samples shared some specific chemical features, although their composition was not fully comparable with previous findings related to other propolis samples. Thus, new types of propolis could be reported in this country. In addition, unknown compounds should be explored to determine their biological activity.

PCA produced a plot which covered 76.3% of the total variation and two distinct groups of samples with two outliers were formed. One large group contained samples P-1 Ant, P-4 Met, P-5 Fus, P-8 Val and P-9 Boy; all characterized by the presence of significant amounts of one of the unknown compounds ( $m/z$  658, 296); the relative concentration of prenylated benzophenones, mainly nemorosone, was also significant. In addition, the total amount of triterpenes in these samples was lower than 10% of the TIC. Nemorosone was the main polyisoprenylated benzophenone obtained from *Clusia rosea* in Cuban brown propolis (Cuesta-Rubio et al., 2007). Scrobiculatones A and B were identified in Venezuelan propolis, originating from *Clusia scrobiculata* (Trusheva et al., 2004). Based on these chemical characteristics and especially on the presence of prenylated benzophenones, it is reasonable to assume that the major source plant of all these samples is the flower resin of some *Clusia* species.

The second group consists of only two samples, P-3 Hui and P-7 Caj. They contain significant amounts of triterpenes, although these triterpenes are not completely identical in the two samples. Triterpenes were found to be the major constituents of yellow Cuban propolis (Cuesta-Rubio et al., 2007). Triterpenoids are also the major active components in Ethiopian propolis and were found in Brazilian and Egyptian samples, what indicates that such compounds can be dominant in propolis samples of tropical and semi-tropical regions. Triterpenoids such as  $\beta$ -amyrins,  $\beta$ -amyrenone, lupeol and lupenone were reported in Manaus propolis near Colombia (Ishida et al., 2011).  $\beta$ -amyrine and lupeol were also identified in our samples, however, other triterpenes such as lanosterol, cycloartenol, amyryne acetate, lupeol acetate, oleanolic acid, maslinic acid and nonidentified triterpenes were also found, suggesting differences comparing to the botanical origin of Manaus propolis. In addition, a

small but well visible amount of alkylresorcinols, typical for *Mangifera* resins, was observed only in sample P-3 Hui.

The outliers P-2 Usm and P-6 Sil were different from all other samples. Sample P-2 Usm lacked benzophenones, it contained substantial amounts of fatty acids, together with di- and triterpenes, and however, all of these terpenes remained unidentified and were different from the di- and triterpenes in the other samples (Table 1). A very specific feature of this sample was the presence of the eicosyl ester of *p*-coumaric acid, which was unambiguously identified by comparison of the mass spectrum of the silylated molecule with literature data (Snook et al., 1994). This compound has not been identified in propolis so far. It is known as a component of the vine latex of sweet potato, and this plant, which grows in Colombia (Roullier et al., 2013), might be considered as its possible source. In addition, one flavonoids aglycone was also detected in this sample. Higher concentration of flavonoids was found in the second outlier, sample P-6 Sil. In this sample, only traces of prenylated benzophenones were detected, but it contained substantial amounts of triterpenes, the major one being an unidentified triterpenic diol, in which it was somewhat similar to sample P-7 Caj.

The antioxidant and antiradical activity are very important characteristics of propolis (Bankova et al., 2016). In our study, the most active samples turned out to be samples P-1 Ant, P-4 Met, P-5 Fus, P-8 Val and P-9 Boy, and all of them are members of the larger group obtained by PCA, characterized by significant amounts of prenylated benzophenones, which are known to display a good antiradical activity (Trusheva et al., 2006).

Regarding propolis antitumoral activity, *in vitro* and *in vivo* studies have shown that it may be active against a huge variety of cancer cells, exerting proapoptotic, cytotoxic and immunomodulatory effects against cancer cells (Alday et al., 2015; Búfalo et al., 2013; Kasala et al., 2015). It has been reported that propolis extracts may exert cytotoxic effects towards tumor cells according to concentration and time of evaluation (Búfalo et al., 2013; Cinegaglia et al., 2013; Seda Vatansever et al., 2010). Regarding canine tumor cells, Brazilian propolis displayed an efficient cytotoxic activity *in vitro* towards OSA cells and transmissible venereal tumor (TVT) cells (Bassani-Silva et al., 2007; Cinegaglia et al., 2013).

In our study, the samples displaying a high activity at 25 µg/mL in the periods of time were P-2 Usm, P-4 Met and P-6 Sil. P-2 Usm is one of the outliers and was different from all other samples that contained mainly fatty acids, specific (different from the other samples)

diterpenes and triterpenes. Also, the presence of eicosyl coumarate makes it unique among these 9 samples. The identification of this ester seems to be of interest, considering the recent publication of Menezes et al. (2017), reporting that long chain alkyl esters of hydroxycinnamic acids selectively induce apoptosis in cancer cells. P-6-Sil is the second outlier. It contained mainly triterpenes and was distinguished by the presence of flavonoid aglycones. Both compound classes are known for their anticancer activities (Chahar et al., 2011; Peron et al., 2017). P-4 Met contained the highest concentration of benzophenones (mainly nemorosone) among all samples. The cytotoxic activity of nemorosone against different cancer cell lines is well documented (Diaz-Carballo et al., 2008a; Popolo et al., 2010). It has also been found to block proliferation and induce apoptosis in leukemia cells (Diaz-Carballo et al., 2008b).

Regarding the  $IC_{50}$ , Colombian propolis exhibited similar values to Cuban brown propolis, which is rich in nemorosone and displayed a cytotoxic activity against hepatic carcinoma cells (Pardo- Andreu et al., 2015). Sample P-2 Usm was again among the most potent ones. The other three most active samples belonged to the major group (Fig.1) characterized by the presence of benzophenones. Nemorosone was the main benzophenone found in this group and may be associated to the cytotoxic activity against canine OSA cells.

Other studies reported the antitumor activity of propolis against different tumor cells. Propolis from Turkey exhibited a cytotoxic action against lymphoblastic leukemia cell line (Yilmaz et al., 2016). In adenocarcinoma epithelial cell lines, a comparison of the  $IC_{50}$  values of propolis from different provinces of Thailand showed that the sample from Nan exerted the highest cytotoxicity against both A549 and HeLa cells (Khacha-ananda et al., 2016). Although Cinegaglia et al. (2013) investigated the effects of Brazilian propolis against OSA cells, little is known regarding propolis cytotoxic activity against such cells. Taken together, all propolis samples reduced cell viability of canine OSA cells mainly after 48 h using 50 and 100  $\mu\text{g/ml}$ . However, P-2 Usm, P-4 Met and P-6 Sil (25  $\mu\text{g/mL}$ ) presented a significant cytotoxic effect after 24 h, leading to better results.

Propolis solvent (70% ethanol) had no effects on OSA cell viability, which is in agreement with previous findings using this vehicle to dilute propolis (Alday et al., 2015; Búfalo et al., 2013), suggesting that propolis action was exclusively due to its constituents. Doxorubicin 4  $\mu\text{M}$  led to 24.44% of cell death at 24 h, whereas Naruse et al. (2007) observed

IC<sub>50</sub> for human OSA cells at 3.3  $\mu$ M. One may speculate that canine OSA cells were resistant to doxorubicin.

In order to inhibit tumor promotion and progression, many anticancer therapies have targeted apoptosis induction (Lopez and Tait 2015). Propolis from several geographic regions induced apoptosis in different cancer cells, such as: propolis from China (20  $\mu$ g/mL) (Ishihara et al., 2009), Thailand (125  $\mu$ g/mL) (Khacha-ananda et al., 2016), Brazil (20  $\mu$ g/mL) (Novak et al., 2014) and Mexico (50  $\mu$ g/mL) (Alday et al., 2015). Our findings are in agreement with such data, since Colombian propolis samples induced apoptosis in canine OSA cells using a concentration within this range (50  $\mu$ g/mL).

Mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi$ m) dissipation and ROS generation may be implicated in cell necrosis and/or apoptosis, and different natural compounds may affect such events (Pardo-Andreu et al., 2011). Here, data indicated a decrease in ROS generation in canine OSA cells treated with Colombian propolis for 48 h. P-4 Met sample showed the lowest percentage of ROS production and, since this sample contains mainly diterpenes and benzophenones in its composition, these compounds may be responsible for the higher apoptotic induction and, consequently, cell death.

As above mentioned, apoptosis may be induced due to  $\Delta\Psi$ m changes and rhodamine 123 (Rho-123) has been used to measure mitochondria function. Data indicated that only P-4 Met increased significantly the mitochondrial permeability, leading to a higher apoptotic effect. Propolis lipophilic compounds may reach the mitochondrial membrane and induce cell death by mitochondrial mechanisms. Nemorosone is the main benzophenone present in P-4 Met, which may act in the mitochondria of cancer cells, causing membrane permeabilization and, consequently, inducing apoptosis via cytochrome c release, what may be involved in its toxicity on cancer cells (Pardo-Andreu et al., 2015).

Tumor cell migration is important for cancer cells dissemination to others sites leading to metastasis (Zhao et al., 2013; Islam, 2017). We further investigated the potential antimetastatic activity of Colombian propolis in OSA cells, demonstrating that the invasiveness of OSA cells was significantly suppressed after treatment with P-2 Usm, P-4 Met, P-5 Fus, and P-7 Caj propolis samples. Different diterpenes may act in migration and invasion of tumor cell lineages (Islam 2017), what may explain the effects of Colombian propolis on cell invasion.

The search of new drugs affecting mitochondria function is important for cancer treatment (Huang et al., 2017) and here we show the mechanisms underlying the cytotoxic activity of Colombian propolis against OSA cells *in vitro*. Further studies are still needed to evaluate their potential antitumor activity *in vivo*.

## Conclusions

This study showed for the first time the cytotoxic effect of Colombian propolis samples against canine OSA cells associated to their chemical composition. Samples were grouped in 2 clusters and the highest antiradical activity was demonstrated by the samples belonging to cluster 1. Apoptosis, mitochondrial membrane alteration and suppression of cell invasion were the main mechanisms involved in the inhibition of OSA cells *in vitro*, suggesting that Colombian propolis samples seem to be an interesting approach to discover new antitumor drugs.

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest to disclose.

**Funding** This work was supported by Universidad Antonio Nariño (number grant: 2016-211).

**Ethical approval** This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

**Informed consent** For this type of study, formal consent is not required.

## References

- Alday, E., Valencia, D., Carreño, A. L., Picerno, P., Piccinelli, A. L., Rastrelli, L., Robles-Zepeda, R., Hernandez, J., & Velazquez, C. (2015). Apoptotic induction by pinobanksin and some of its ester derivatives from Sonoran propolis in a B cell lymphoma cell line. *Chemico-Biological Interactions*, 242, 35-44.



- Bankova, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, *100*, 114-117.
- Bankova, V., Bertelli, D., Borba, R., Conti, B. J., da Silva Cunha, I. B., Danert, C., Eberlin, M. N., Falcão, S. I., Isla, M. I., Moreno, M. I. N., Papotti, G., Popova, M., Santiago, K. B., Salas, A., Sawaya, A. C. H. F., Schwab, N. V., Sforcin, J. M., Simone-Finstrom, M., Spivak, M., Trusheva, B., Vilas-Boas, M., Wilson, M., & Zampini, C. (2016). Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. *Journal of Apicultural Research*, DOI: 10.1080/00218839.2016.1222661.
- Bassani-Silva, S., Sforcin, J. M., Amaral, A. S., Gaspar, L. F. J., & Rocha, N. S. (2007). Propolis effect in vitro on canine transmissible venereal tumor cells. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, *102*, 261-265.
- Búfalo, M. C., Ferreira, I., Costa, G., Francisco, V., Liberal, J., Cruz, M. T., Lopes, M. C., Batista M. T., & Sforcin, J. M. (2013). Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS stimulated proinflammatory response by blocking NFκB and MAPK activation in macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, *149*, 84-92.
- Chahar, M. K., Sharma, N., Dobhal, M. P., & Joshi, Y. C. (2011). Flavonoids: a versatile source of anticancer drugs. *Pharmacognosy Reviews*, *5*, 1-12.
- Cinegaglia, N. C., Bersano, P. R., Búfalo, M. C., & Sforcin, J. M. (2013). Cytotoxic action of Brazilian propolis in vitro on canine osteosarcoma cells. *Phytotherapy Research*, *27*, 1277-1281.
- Cuesta-Rubio, O., Piccinelli, A. L., Fernandez, M. C., Hernández, I. M., Rosado, A., & Rastrelli, L. (2007). Chemical Characterization of Cuban Propolis by HPLC–PDA, HPLC–MS, and NMR: the Brown, Red, and Yellow Cuban Varieties of Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 7502-7509.
- Díaz-Carballo, D., Malak, S., Bardenheuer, W., Freistuehler, M., & Reusch, H. P. (2008a). Cytotoxic activity of nemorosone in neuroblastoma cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *12*, 2598-2608.
- Díaz-Carballo, D., Malak, S., Freistühler, M., Elmaagacli, A., Bardenheuer, W., & Reusch, H. P. (2008b). Nemorosone blocks proliferation and induces apoptosis in leukemia cells. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, *46*, 428-439.

- Frión-Herrera, Y., Díaz-García, A., Ruiz-Fuentes, J., Rodríguez-Sánchez, H., Sforcin, J. M. (2015). Brazilian green propolis induced apoptosis in human lung cancer A549 cells through mitochondrial-mediated pathway. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67, 1448-1456.
- Graikou, K., Popova, M., Gortzi, O., Bankova, V., & Chinou, I. (2016). Characterization and biological evaluation of selected Mediterranean propolis samples. Is it a new type? *LWT - Food Science and Technology*, 65, 261-267.
- Huang, S. T., Huang, C. C., Huang, W. L., Lin, T. K., Liao, P. L., Wang, P. W., Liou, C. W., & Chuang, J. H. (2017). Tanshinone IIA induces intrinsic apoptosis in osteosarcoma cells both in vivo and in vitro associated with mitochondrial dysfunction. *Scientific Reports*, 7, 1-14.
- Ishida, V. F. C., Negri, G., Salatino, A., & Bandeira, M. F. C. L. (2011). A new type of Brazilian propolis: prenylated benzophenones in propolis from Amazon and effects against cariogenic bacteria. *Food Chemistry*, 125, 966-972.
- Ishihara, M., Naoi, K., Hashita, M., Itoh, Y., & Suzui, M. (2009). Growth inhibitory activity of ethanol extracts of Chinese and Brazilian propolis in four human colon carcinoma cell lines. *Oncology Reports*, 22, 349-354.
- Islam, M. T. (2017). Diterpenes and their derivatives as potential anticancer agents. *Phytotherapy Research*, 31, 691-712.
- Kasala, E. R., Boddulurum L. N., Madana, R. M., V, A. K., Gogoi, R., & Barua, C. C. (2015). Chemopreventive and therapeutic potential of chrysin in cancer: mechanistic perspectives. *Toxicology Letters*, 233, 214-225.
- Khacha-ananda, S., Tragoolpua, K., Chantawannakul, P., & Tragoolpua, Y. (2016). Propolis extracts from the northern region of Thailand suppress cancer cell growth through induction of apoptosis pathways. *Investigational New Drugs*, 34, 707-722.
- Khan, K. H., Blanco-Codesido, M., & Molife, L. R. (2014). Cancer therapeutics: Targeting the apoptotic pathway. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 90, 200-219.
- Lopez, J., & Tait, S. W. G. (2015). Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *British Journal of Cancer*, 112, 957-962.

- Menezes, J. C. J. M. D. S., Edraki, N., Kamat, S. P., Khoshneviszadeh, M., Kayani, Z., Mirzaei, H. H., Miri, R., Erfani, N., Nejati, M., Cavaleiro, J. A. S., Silva, T., Saso, L., Borges, F., & Firuzi, O. (2017). Long chain alkyl esters of hydroxycinnamic acids as promising anticancer agents: selective induction of apoptosis in cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*, 7228-7239.
- Motomura, M., Kwon, K. M., Suh, S. J., Lee, Y. C., Kim, Y. K., Lee, I. S., Kim, M. S., Kwon, D. Y., Suzuki, I., & Kim, C. H. (2008). Propolis induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemic U937 cells through Bcl2/Bax regulation. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *26*, 61-67.
- Mueller, F., Fuchs, B., & Kaser-Hotz, B. (2007). Comparative biology of human and canine osteosarcoma. *Anticancer Reserach*, *27*, 155-164.
- Naruse, T., Nishida, Y., & Ishiguro, N. (2007). Synergistic effects of meloxicam and conventional cytotoxic drugs in human MG-63 osteosarcoma cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *61*, 338-346.
- Novak, E. M., Silva, S. M. C., Marcucci, M. C., Sawaya, A. C. H. F., López, B. G. C., Fortes, M. A. H. Z., Giorgi, R. R., Marumo, K. T., Rodrigues, R. F., & Maria, D. A. (2014). Antitumoural activity of Brazilian red propolis fraction enriched with xanthochymol and formononetin: An in vitro and in vivo study. *Journal of Functional Foods*, *11*, 91-102.
- Palomino García, L. R., Martínez Galán, J. P., García Pajón, C. M., Gil González, J. H., & Durango Restrepo, D. L. (2010). Caracterización Fisicoquímica y Actividad Antimicrobiana del Propóleos en el Municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* *63*, 5373- 5383.
- Pardo-Andreu, G. L., Nuñez-Figueredo, Y., Tudella, V. G., Cuesta-Rubio, O., Rodrigues, F. P., Pestana, C. R., Uyemura, S. A., Leopoldino, A. M., Alberici, L. C., & Curti, C. (2011). The anti-cancer agent nemorosone is a new potent protonophoric mitochondrial uncoupler. *Mitochondrion*, *11*, 255-263.
- Pardo-Andreu, G. L., Reis, F. H., Dalalio, F. M., Nuñez Figueredo, Y., Cuesta Rubio, O., Uyemura, S. A, Curti, C., & Alberici, L. C. (2015). The cytotoxic effects of brown Cuban propolis depend on the nemorosone content and may be mediated by mitochondrial uncoupling. *Chemico- Biological Interactions*, *228*, 28–34.

- Peron, G., Marzaro, G., & Dall'Acqua, S. (2017). Known triterpenes and their derivatives as scaffolds for the development of new therapeutic agents for cancer. *Current Medicinal Chemistry*, 24, 1-11.
- Popolo, A., Piccinelli, A. L., Morello, S., Sorrentino, R., Osmany, C. R., Rastrelli, L., & Pinto, A. (2010). Cytotoxic activity of nemorosone in human MCF-7 breast cancer cells. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 89, 50-57.
- Roullier, C., Duputié, A., Wennekes, P., Benoit, L., Fernández Bringas, V. M., Rossel, G., Tay, D., McCay, D., & Lebot, V. (2013). Disentangling the origins of cultivated sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). *PLoS One*, 8, 1-12.
- Saraf, A. J., Fenger, J. M., & Roberts, R. D. (2018). Osteosarcoma: accelerating progress makes for a hopeful future. *Frontiers in Oncology*, 8, 1-7.
- Seda Vatansever, H., Sorkun, K., Ismet Delilöglu Gurhan, S., Ozdal-Kurt, F., Turkoz, E., Gencay, O., & Salih, B. (2010). Propolis from Turkey induces apoptosis through activating caspases in human breast carcinoma cell lines. *Acta Histochemica*, 112, 546-556.
- Sforcin, J. M., & Bankova, V. (2011). Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 253–260.
- Sforcin, J. M. (2016). Biological properties and therapeutic applications of propolis. *Phytotherapy Research*, 30, 894-905.
- Tsuchiya, I., Hosoya, T., Ushida, M., Kunimasa, K., Ohta, T., & Kumazawa, S. (2013). Nymphaeol-A isolated from Okinawan propolis suppresses angiogenesis and induces caspase-dependent apoptosis via inactivation of survival signals. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1-9.
- Shashi, B., Jaswant, S., Madhusudana, R. J., Kumar, S. A., & Nabi, Q. G. (2006). A novel lignan composition from *Cedrus deodara* induces apoptosis and early nitric oxide generation in human leukemia Molt-4 and HL-60 cells. *Nitric Oxide*, 14, 72-88.
- Snook, M., Data, E., & Kays, S. (1994). Characterization and quantitation of hexadecyl, octadecyl, and eicosyl esters of p-coumaric acid in the vine and root latex

of sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *42*, 2589-2595.

- Sulaiman, G. M., Ad'hiah, A. H., Al-Sammarrae, K. W., Bagnati, R., Frapolli, R., Bello, E., Uboldi, S., Romano, M., Panini, N., Scanziani, E., Pezzolato, M., Erba, E., & D'Incalci, M. (2012). Assessing the antitumour properties of Iraqi propolis in vitro and in vivo. *Food and Chemical Toxicology*, *50*, 1632-1641.
- Wu, Z., & Li, Y. (2017) Grifolin exhibits anti-cancer activity by inhibiting the development and invasion of gastric tumor cells. *Oncotarget*, *8*, 21454-21460.
- Xuan, H., Wang, Y., Li, A., Fu, C., Wang, Y., & Peng, W. (2016). Bioactive components of Chinese propolis water extract on antitumor activity and quality control. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2016*, 1-9.
- Yaacoub, K., Pedeux, R., Tarte, K., & Guillaudeus, T. (2016). Role of the tumor microenvironment in regulating apoptosis and cancer progression. *Cancer Letters*, *378*, 150-159.
- Yan, H., Wang, X., Niu, J., Wang, Y., Wang, P., & Liu, Q. (2014). Anti-cancer effect and the underlying mechanisms of gypenosides on human colorectal cancer SW-480 cells. *PLoS One*, *9*, 1-10.
- Yang, X., Yang, P., Shen, J., Osaka, E., Choy, E., Cote, G., Harmon, D., Zhang, Z., Mankin, H., Hornicek, F. J., & Duan Z. (2014). Prevention of multidrug resistance (MDR) in osteosarcoma by NSC23925. *British Journal of Cancer*, *110*, 2896-2904.
- Yilmaz, U. C., Bagca, B. G., Karaca, E., Durmaz, A., Durmaz, B., Aykut, A., Kayalar, H., Avci, C. B., Susluer, S. Y., Gunduz, C., & Cogulu, O. (2016). Evaluation of the miRNA profiling and effectiveness of the propolis on B-cell acute lymphoblastic leukemia cell line. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *84*, 1266–1273.
- Zhao, J., Zhang, J., Yu, M., Xie, Y., Huang, Y., Wolff, D. W., Abel, P. W., & Tu, Y. (2013). Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene*, *32*, 4814-4824.

**Table 1** Chemical compounds identified in Colombian propolis samples by GC-MS (percent of Total Ion Current, TMS derivatives).

Compound	P-2								
	P-1 Ant	Usm	P-3 Hui	P-4 Met	P-5 Fus	P-6 Sil	P-7 Caj	P-8 Val	P-9 Boy
<b>Sugars</b>	<b>1.0</b>	<b>1.6</b>	<b>Tr</b>	<b>13.4</b>	<b>5.6</b>	<b>0.1</b>	<b>0.2</b>	<b>0.2</b>	<b>18.2</b>
Glycerol	0.4	1.2	Tr	0.5	1.0	0.1	0.2	0.2	0.8
Erythritol	-	-	-	0.2	0.3	-	-	0.1	1.4
Fructose	0.6	0.4	-	1.4	0.7	-	-	-	1.5
Fructose	-	-	-	3.7	2.5	-	-	-	4.3
Sorbose	-	-	-	1.9	0.4	-	-	-	4.0
Glucose	-	-	-	2.2	0.4	-	-	-	2.8
Glucose	-	-	-	2.9	0.3	-	-	-	3.4
Sucrose	-	-	-	0.6	-	-	-	-	Tr
<b>Fatty acids</b>	<b>-</b>	<b>29.5</b>	<b>7.1</b>	<b>3.9</b>	<b>10.6</b>	<b>5.2</b>	<b>9.1</b>	<b>1.3</b>	<b>1.2</b>
Palmitic acid	-	4.2	2.4	0.5	0.5	1.3	1.6	0.4	0.5
Oleic acid	-	8.0	3.4	0.4	1.1	1.4	1.9	0.2	0.7
Stearic acid	-	2.3	0.8	3.0	Tr	Tr	0.4	0.7	-
Arachidic acid	-	9.1	0.5	-	9.1	-	-	-	-
Behenic acid	-	3.7	-	-	-	1.3	1.8	-	-
Lignoceric acid	-	2.2	-	-	-	1.2	3.4	Tr	-
<b>Diterpenes</b>	<b>9.7</b>	<b>15.4*</b>	<b>0.7</b>	<b>10.7</b>	<b>14.9</b>	<b>1.1</b>	<b>3.6</b>	<b>8.3</b>	<b>14.0</b>
Levopimaric acid	-	-	0.7	-	-	0.4	1.0	-	-
Diterpenic diol (362)	9.7	-	-	10.7	14.9	-	-	8.3	14.0
Agathadiol	-	-	-	-	-	0.4	1.4	-	-
Diterpene	-	-	-	-	-	0.5	1.2	-	-
Diterpenes	-	15.4*	-	-	-	-	-	-	-
<b>Flavonoids</b>	<b>-</b>	<b>2.2</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>7.9</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
kaempferol Me ether	-	-	-	-	-	2.3	-	-	-
Kaempferol di-Me ether	-	2.2	-	-	-	2.7	-	-	-
Dihydroxy- methoxyflavone	-	-	-	-	-	2.9	-	-	-
<b>Benzophenones</b>	<b>10.0</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>39.7</b>	<b>14.0</b>	<b>Tr</b>	<b>-</b>	<b>29.5</b>	<b>28.2</b>
Benzophenone	-	-	-	1.9	3.1	-	-	-	1.4
Propolone A	0.9	-	-	10.2	0.6	-	-	6.8	4.9
Propolone A. isomere	-	-	-	2.0	0.1	-	-	1.7	1.3
Benzophenone (unidentified)	-	-	-	-	1.3	-	-	-	-
Nemorosone	8.4	-	-	22.0	8.4	Tr	-	20.1	16.4
Benzophenone	-	-	-	1.2	Tr	-	-	0.6	2.0
Nemorosone (isomere)	0.7	-	-	2.4	0.5	-	-	0.3	2.2
<b>Triterpenes</b>	<b>-</b>	<b>22.1*</b>	<b>71.9</b>	<b>2.7</b>	<b>5.0</b>	<b>51.4</b>	<b>49.6</b>	<b>9.9</b>	<b>2.5</b>
Lanosterol	-	-	1.1	2.7	-	1.8	2.1	7.7	2.1
Triterpene diol	-	-	-	-	0.9	9.8	8.7	-	-
Lanosterol (3-epi)	-	-	5.8	-	-	2.9	3.0	1.6	-
β-Amyrine	-	-	9.2	-	0.6	1.9	2.5	0.4	0.4
Triterpene diol	-	-	9.7	-	-	26.2	22.8	-	-
Lupeol	-	-	31.4	-	-	-	-	-	-
Cycloartenol	-	-	-	-	-	6.7	8.2	-	-
24-methylene Cycloartenol	-	-	-	-	-	2.1	2.3	-	-
Amyrin acetate	-	-	5.2	-	-	-	-	-	-
Lupeol acetate	-	-	9.5	-	-	-	-	-	-
Oleanolic acid	-	-	-	-	2.2	-	-	0.1	-

Maslinic acid	-	-	-	-	1.3	-	-	0.1	Tr
<b>Alkylresorcinols</b>	-	-	<b>1.6</b>	-	-	-	-	-	-
Heptadecadienyl resorcinol	-	-	1.1	-	-	-	-	-	-
Heptadecenyl resorcinol	-	-	0.5	-	-	-	-	-	-
<b>Unknowns [m/z 582, 567; m/z 542, 527]</b>	<b>0.4</b>	-	<b>1.2</b>	<b>1.2</b>	<b>7.1</b>	<b>10.4</b>	-	<b>1.7</b>	<b>0.9</b>
<b>Unknown (base peak 570))</b>	<b>11.8</b>	-	-	<b>5.9</b>	<b>15.4</b>	<b>5.7</b>	-	<b>0.2</b>	<b>1.9</b>
<b>Unknown (m/z 658, 296)</b>	<b>63.2</b>	-	-	<b>15.1</b>	<b>18.5</b>	-	-	<b>30.9</b>	<b>16.4</b>
<b>OTHERS</b>									
Benzoic acid	-	-	Tr	2.0	-	0.1	0.2	-	Tr
Eicosyl coumarate	-	3.4	-	-	-	-	-	-	-

\* Unidentified and different from other samples.

Tr: Traces

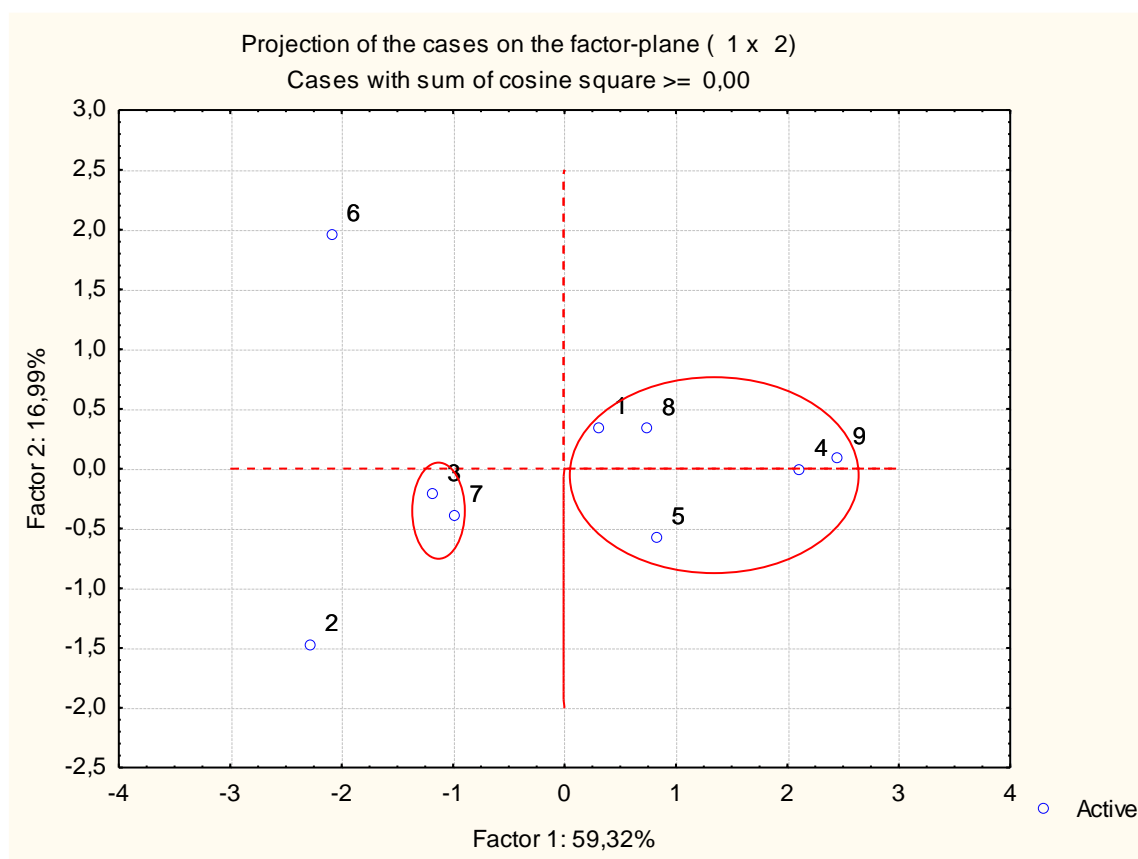
**Table 2** DPPH radical scavenging activity of Colombian propolis samples.

<b>Propolis Sample</b>	<b>DPPH radical scavenging activity, % inhibition<sup>a</sup></b>
P-1 Ant	32.7 ± 0.1
P-2 Usm	8.5 ± 0.3
P-3 Hui	2.8 ± 0.1
P-4 Met	36.8 ± 1.0
P-5 Fus	40.1 ± 1.1
P- 6 Sil	4.5 ± 0.3
P-7 Caj	12.4 ± 0.1
P-8 Val	35.9 ± 0.7
P-9 Boy	33.7 ± 1.2
Caffeic acid	91.9 ± 0.0

<sup>a</sup> Mean value of three measurements ± SD. Propolis solutions used in the test: 0.36 mg/mL.

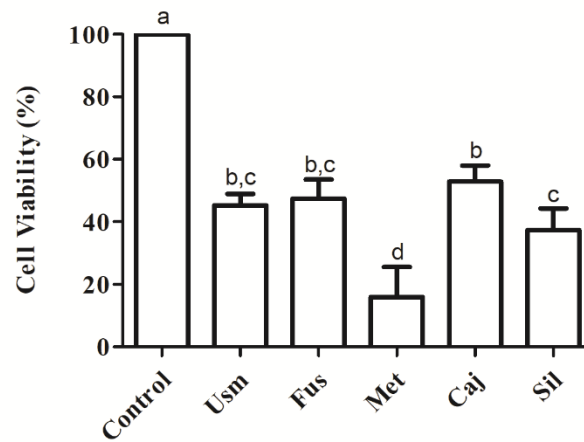
**Table 3** Median inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) and confidence interval (CI) after incubation with propolis (P) samples for 48 and 72 h.

	IC <sub>50</sub> (µg/mL) at 48 h	CI	IC <sub>50</sub> (µg/mL) at 72 h	CI
P-1 Ant	49.36	38.6 - 63.0	50.39	47.50 - 53.50
P-2 Usm	20.31	13.66 - 30.21	28.24	24.30 - 32.82
P-3 Hui	29.22	23.67 - 36.07	37.72	32.06 - 44.39
P-4 Met	25.84	19.54 - 34.18	26.27	24.97 - 27.63
P-5 Fus	26.28	19.77 - 34.92	31.19	27.60 - 35.23
P-6 Sil	36.25	31.38 - 41.87	21.48	19.41 - 23.78
P-7 Caj	-	-	40.28	36.86 - 44.01
P-8 Val	49.62	44.50 - 55.33	38.42	32.02 - 46.09
P-9 Boy	25.16	23.61 - 26.81	19.61	17.59 - 21.86

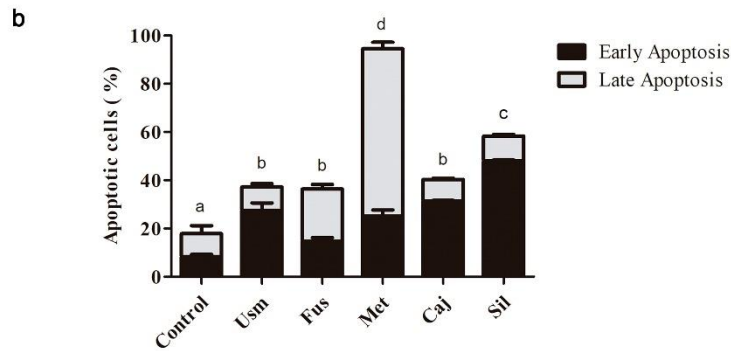
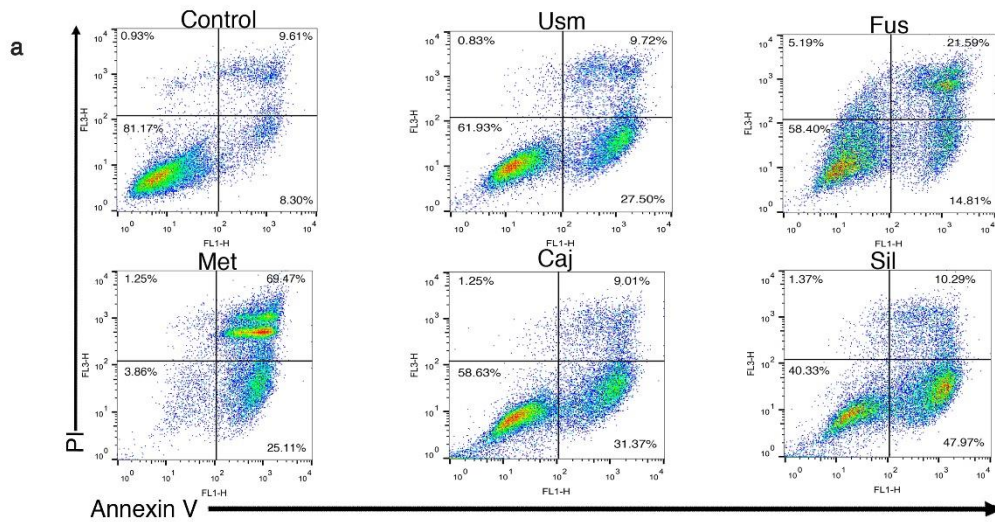


**Fig. 1** Principle component analysis (PCA) of propolis secondary metabolite profiles

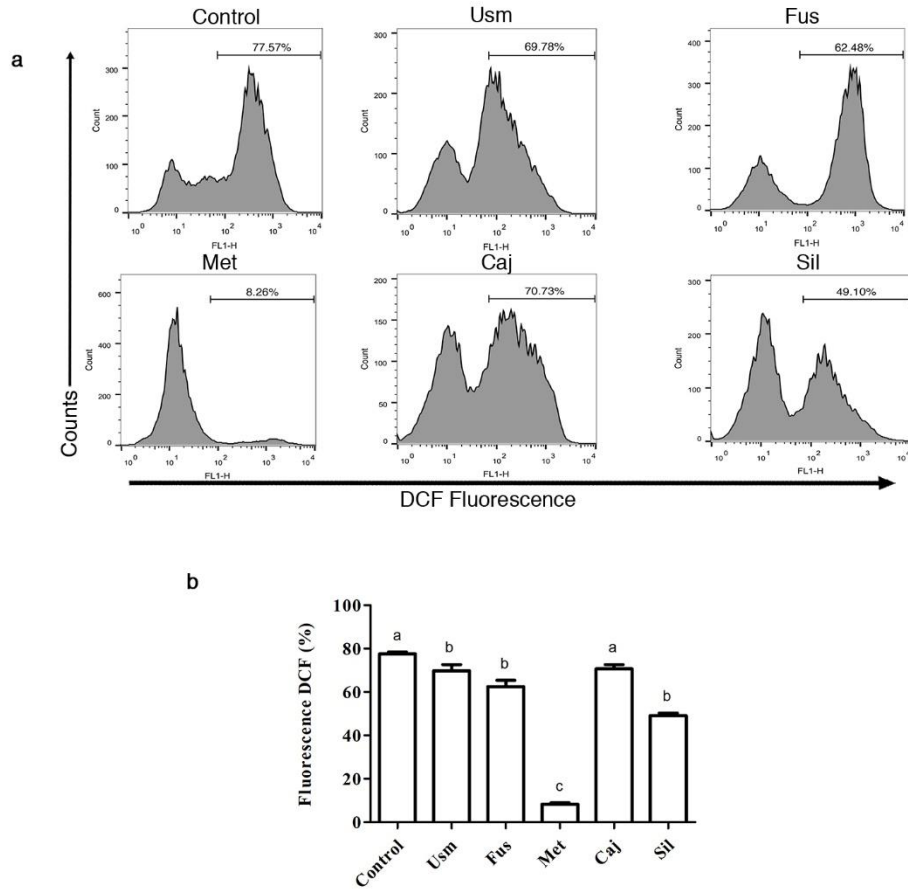




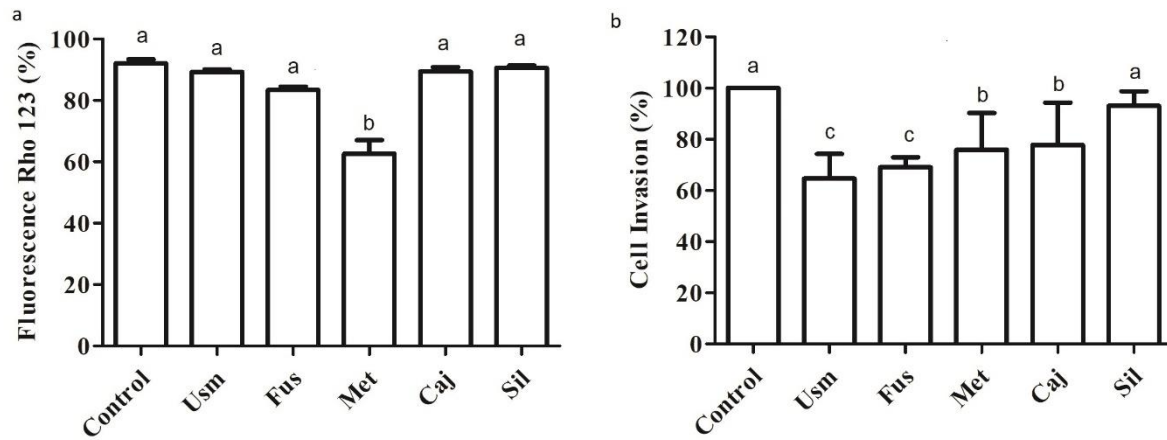
**Fig. 2** Viability (%) of canine OSA cells treated with 5 different Colombian propolis samples (Usme, Bogotá Capital District: Usm; Fusagasuga, Cundinamarca: Fus; Puerto Lopez, Meta: Met; Cajibío, Cauca: Caj; Silvia, Cauca: Sil – 50  $\mu\text{g/mL}$ ) or medium alone (control) for 48 h (mean  $\pm$  S.D.,  $n = 4$ ). Different letters indicate statistical differences ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 3** Percentage (%) of apoptotic OSA cells treated with Colombian propolis extracts (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or medium alone (control) for 48 h and stained with annexin V/PI. **(a)** Dotplot: lower left quadrant (Annexin V $-$ /PI $-$ ) = viable cells; lower right quadrant (Annexin V $+$ /PI $-$ ) = early apoptosis; upper right quadrant (Annexin V $+$ /PI $+$ ) = late apoptosis and upper left quadrant (Annexin V $-$ /PI $+$ ) = dead cells. **(b)** Graph bars represent the percentage of cells in early and late apoptotic stages (mean  $\pm$  S.D.,  $n = 4$ ). Different letters indicate statistical differences ( $p < 0.05$ )



**Fig. 4** Percentage (%) of DCF labeled cells treated with Colombian propolis extracts (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or medium alone (control) for 48 h. **(a)** Histogram representative of ROS production by canine OSA cells. **(b)** Graph bars represent the percentage of cells DCF positive (mean  $\pm$  S.D.,  $n = 4$ ). Different letters indicate statistical differences ( $p < 0.05$ )



**Fig. 5 (a)** Percentage (%) of rhodamine (Rho) 123 positive cells after 48 h incubation with Colombian propolis samples (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or medium alone (control) **(b)** Percentage (%) of canine OSA cells invasion after incubation with Colombian propolis samples (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or medium alone (control) for 24 h (mean  $\pm$  S.D.,  $n = 4$ ). Different letters indicate statistical differences ( $p < 0.05$ )

## **Apoptosis-related gene expression induced by Colombian propolis samples in canine osteosarcoma cell line (OSCA-8)**

Dolly Patricia Pardo Mora<sup>a</sup>, Oscar Julián Murillo<sup>b</sup>, Mauricio Rey Buitrago<sup>a,b</sup>, Mónica Losada<sup>a</sup>, Jaime Fabian Cruz Uribe<sup>a</sup>, Karina Basso Santiago<sup>c</sup>, Bruno José Conti<sup>c</sup>, Eliza de Oliveira Cardoso<sup>c</sup>, Rafael María Gutiérrez<sup>a</sup>, Orlando Torres García<sup>a</sup>, José Maurício Sforcin<sup>c\*</sup>

<sup>a</sup> Universidad Antonio Nariño, Bogotá, Colombia

<sup>b</sup> Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

<sup>c</sup> São Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences, Campus Botucatu, Brazil

\*Corresponding author: [jose.m.sforcin@unesp.br](mailto:jose.m.sforcin@unesp.br)

Tel.: +55 14 3880 0445

### **Abstract**

Osteosarcoma (OSA) is a primary bone tumor and canine OSA cells have been used as a model to study cancer in dogs and humans. Propolis is a bee product with a potential antitumor activity against several cancer cell lines. Chemically-characterized samples of propolis from Colombia exerted a cytotoxic effect on canine OSA cells. Since apoptosis may be dysregulated in cancer cells, the aim of this work was to determine the apoptotic effects of Colombian propolis samples and *BCL2*, *BAX*, *CASPASE 9*, *CASPASE 8*, and *TNFR1* gene expression in canine osteosarcoma cell line (OSCA-8). Cells were treated with five Colombian propolis samples (Usm, Met, Fus, Sil and Caj). Cell viability and lactate dehydrogenase (LDH) release were evaluated, and the annexin V/propidium iodide was used

to determine early and late apoptosis by flow cytometry. The effects of three propolis samples on *BAX*, *BCL-2*, *CASPASE 9*, *CASPASE 8*, and *TNFR1* on gene expression were analyzed by real time PCR. Doxorubicin was used as a positive control and the effect of ethanol (propolis solvent) was evaluated. Colombian propolis samples reduced OSCA-8 cell viability and increased LDH release by these cells. All propolis samples induced apoptosis significantly and upregulated *BCL-2* and *CASPASE 8* expression. Usm and Sil increased *BAX* expression, Met and Sil induced *CASPASE 9* expression and Usm increased *TNFR1*. We demonstrated that Colombian propolis samples were cytotoxic to canine OSA cells and were able to induce apoptosis. An upregulated *CASPASE 8* expression indicated apoptosis induction by the extrinsic pathway.

**Keywords:** Osteosarcoma, Propolis, Apoptosis, *CASPASE 8*

## **Introduction**

Osteosarcoma (OSA) is the third most common cause of cancer in adolescents, diagnosed less frequently than other neoplasms in this age group (Al-Khan et al., 2017; Luetke et al., 2014; Zhang et al., 2015). OSA is the most common bone tumor in dogs and humans, although its prevalence is higher in dogs than in humans, but the prognosis is relatively poor in both species.

Similar morphological, physiological characteristics and gene expression may be seen in dogs and humans, indicating that the canine OSA is a suitable model to study this disease in humans (Al-Khan et al., 2017). Moreover, due to the development of multidrug resistance to chemotherapy (Luetke et al., 2014), canine OSA cell lines can also be used to evaluate resistance mechanisms and gene expression for predicting drug response (Fowles et

al, 2016). Hence, novel treatment strategies can be investigated with the aid of animal models to improve the therapeutic response in humans.

Apoptosis is a programmed cell death that maintains a healthy survival/death balance (Hassan et al., 2014). Apoptosis induction is a strategy used for the treatment of OSA and other neoplasms, and the apoptotic pathways may be regulated at several levels (Luetke et al., 2014). Extrinsic and intrinsic pathways may trigger apoptosis: the extrinsic pathway is activated by specific ligands in death receptors present in the cell membrane, while the intrinsic pathway involves the release of proapoptotic proteins from the mitochondria (Zhang et al., 2015). The extrinsic pathway may be induced by members of the tumor necrosis factor (TNF) family receptors such as TNFR1 and FAS. The ligation to such receptors leads to the recruitment of several intracellular proteins, including certain procaspases, to the cytosolic domains of these receptors, forming a death-inducing signaling structure that triggers CASPASES 8 and 10 activation (Hassan et al., 2014; Rios and Recio, 2006). Proteins of the BCL-2 family such as BCL-2 and BAX regulate the intrinsic pathway (Hata et al., 2015), and the BCL-2/BAX ratio is considered an indicator of cells undergoing apoptosis or surviving (Begnini et al., 2014; Keskin-Aktan et al, 2018). Therefore, both pathways can be seen as a target to develop new drugs with antitumor effects (Hata et al., 2015).

Propolis is a resinous material made by the bees worldwide from different botanical sources. Propolis displays plenty of pharmacological properties, including its antitumor activity both in vitro and in vivo. In Colombia, propolis samples collected in different regions have been chemically characterized, presenting similar components to those found in samples from *Clusia*, which is found in other tropical countries such as Cuba and Venezuela (Sforcin and Bankova, 2011). However, Colombian propolis contains components such as diterpenes

and triterpenes, that have not yet been completely identified, and components not reported in other types of propolis such as eicosil coumarate (Pardo Mora et al., 2018a, submitted).

Propolis may affect both intrinsic and extrinsic apoptosis pathways (Seda Vatansever et al., 2010; Sulaiman et al., 2012). Propolis increased the activity of CASPASE 3 in cancer cells (Motomura et al., 2008; Xuan et al., 2016) as well as the immunoreactivity of CASPASES 6, 8 and 9 in human breast cell line MCF-7 (Seda Vatansever et al., 2010), whereas a decreased *BCL-2* expression was seen in human leukemic U937 cells (Motomura et al., 2008; Sulaiman et al., 2012).

The potential cytotoxicity of Colombian propolis samples have been evaluated previously, showing the ability to induce apoptosis in canine OSA cells (Pardo Mora et al., 2018b submitted). However, the effects of these samples on the expression of genes involved in the apoptosis pathways have not been investigated so far. Therefore, the aim of this work was to evaluate the effects of different Colombian propolis extracts on canine osteosarcoma cell line (OSCA-8) viability, lactate dehydrogenase (LDH) leakage, and apoptosis induction, analyzing *BAX*, *BCL-2*, *CASPASE 9*, *CASPASE 8*, and *TNFR* gene expression.

## **Material and Methods**

### *Cell line maintenance*

Canine osteosarcoma cell line (OSCA-8) (Kerafast Inc.) was maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Santa Cruz Biotechnology®) supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotic-antimycotic (100x) Gibco®. Cells were maintained at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.



### *Propolis ethanolic extracts*

Five propolis samples were collected in different regions from Colombia, as follows: Usme, Bogotá District Capital (Usm); Puerto Lopez, Meta (Met); Fusagasuga, Cundinamarca (Fus); Silvia, Cauca (Sil); and Cajibío, Cauca (Caj). Samples were collected using plastic nets and scraping the hives from July until December 2015. The propolis samples were characterized chemically, previously (Pardo Mora et al., 2018, submitted). Samples were ground, and 4.5 g of propolis was dissolved in 15 mL of 70% ethanol. Extracts were kept under moderate shaking and stored in the absence of bright light, at room temperature. After 24 h, extracts were filtered and the dry weight (mg/mL) of each extract was calculated.

### *Cell viability determination by MTT assay*

OSCA-8 cells were cultured in 96 well plates ( $1 \times 10^5$  cells/mL), and 100  $\mu$ l was placed in each well. OSCA-8 cells were incubated overnight for adherence and exposed to propolis extracts (10, 25, 50 and 100  $\mu$ g/mL) for 24, 48, and 72 h. The effect of 70% ethanol (propolis solvent) on cell viability in the same concentration found in the highest propolis concentration (0.48 %) was also evaluated. The formazan formation was evaluated using Cytoselect™ MTT Cell Proliferation Assay (Cell Biolabs, Inc.) and measuring the absorbance in an automated plate reader (Multiskan FC, Thermo Scientific) at 540 nm. The absorbance of untreated cells was considered as 100% cell viability. Assays were performed in quadruplicate for each propolis samples.

### *LDH leakage assay*

OSCA-8 cells were cultured in 96 well plates ( $1 \times 10^5$  cells/mL), and 150  $\mu$ l was placed in each well. OSCA-8 cells were incubated overnight for adherence and exposed to propolis extracts (10, 25, 50, and 100  $\mu$ g/mL) for 48 and 72 h. The LDH release was evaluated measuring the absorbance in an automated plate reader (Multiskan FC, Thermo Scientific) at 450 nm. The absorbance of the positive control (Triton X-100 Solution) included in the Cytoselect™ LDH Cytotoxicity Assay Kit (Cell Biolabs, Inc.) was considered as 100% cytotoxicity. The experiments were performed in quadruplicate for each extract.

### *Annexin V/propidium Iodide Flow cytometric analysis*

Annexin V Apoptosis Kit (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) was used to determine the apoptotic effects of propolis on OSCA-8 cells. Plates of 24 wells containing  $1 \times 10^5$ /mL canine OSA cells were exposed at five propolis extracts at 50  $\mu$ g/mL for 48 h. This concentration and period of time were chosen according to previous findings of our group. This concentration was near the  $IC_{50}$  based in the MTT assay. The cells were harvested, centrifuged, and washed with PBS 1x. The buffer solution for annexin binding was used and after 0.5  $\mu$ g of annexin V and 0.35  $\mu$ g of propidium iodide (PI) were added. Cells were incubated for 15 minutes at room temperature and analyzed using a flow cytometer BD CSampler™ BD Accuri, where at least 20.000 events were recorded for each analysis and performed independently at least three times. The data were analyzed using the CFlow Plus software (BD Biosciences).

### *RNA extraction, cDNA synthesis and quantitative real time PCR (qPCR)*

Propolis samples (Usm, Met and Sil) were selected for molecular assays according to cytotoxic effect and chemical composition. Such samples were chosen because Fus exerted a cytotoxic effect (LDH assay) only at 100 µg/mL, and Caj exhibited a similar chemical composition to Sil. Flasks 25cm<sup>2</sup> with 5 x10<sup>5</sup> (1 X 10<sup>5</sup>/mL) canine OSA cells were treated with propolis extracts (25 and 50 µg/mL). These concentrations were selected taking into account they were near the inhibitory concentration 25% (IC<sub>25</sub>), according to the results of cell viability and cytotoxicity. *BAX*, *BCL 2*, *CASPASE 9*, *CASPASE 8* and *TNFR1* gene expression by propolis-treated OSA cells was compared to untreated ones. Doxorubicin 0.5µM was used as a positive control and each experiment was done in triplicate.

Cells were treated for 48 h and harvested for total RNA extraction using the commercial kit (InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit (Molecular Stratec), following the manufacturer's protocol. RNA was qualitatively evaluated by electrophoresis in 2% agarose gel and spectrophotometrically quantitated in a Nanodrop 2000 spectrophotometer Thermo Scientific. The index purity (A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>) of all RNA samples was higher than 2.10. The cDNA synthesis was performed with the ProtoScript® M-MuLV First Strand cDNA Synthesis Kit (Biolabs, Inc.) kit. Finally, 400 ng of total RNA were reverse transcribed into the cDNA to obtain cDNA at 8 ng/µL.

The quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR) analysis was performed using 2 µL of cDNA, primers forward and reverse at 500 nM, and 5 µL FastStart Essential DNA Green Master 2x (Roche) were used, at a final volume of 10 µl. All analyzes were performed in triplicate using the LightCycler® 96 equipment (Roche). The oligonucleotide primers sequences were obtained using the BLAST program of the National Centre for

Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), in accordance with previous studies (Zhang et al, 2014) and synthesized by Macrogen®. The primers sequences are shown in Table 1.

The reaction conditions were: 95 °C for 300 s, 45 cycles at 95 °C for 10 s and 56-57 °C for 30 s, followed by a melting curve analyzes at 95 °C for 10 s, 65 °C for 60 s and 97 °C for 1 s. The *B2-MICROGLOBULIN (B2M)* was used as an endogenous control to normalize the expression of the target genes, since it possesses a high stability and has been recommended previously (Brinkhof et al., 2006). Negative controls without cDNA template were included for each gene. The specificity of qPCR products was confirmed by melting curves and 2% agarose gel electrophoresis.

#### *Statistics analysis*

Data was expressed as means and standard deviation using GraphPad Prism 5 software. One-way and two-way analysis of variance followed by Newman Keuls multiple comparison tests and Bonferroni tests, respectively, were used to determine differences between treatments and control groups. Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

The results of qPCR were analyzed using the comparative CT method, determining  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , and the different expressions were calculated as fold change (Livak and Schmittgen, 2001). This method determines the relative quantification, comparing the normalized Ct values ( $\Delta\Delta Ct$ ) of treated and untreated samples. The assays were performed in duplicate in three independent experiments. The Kruskal Wallis test were used to determine statistical differences between *BAX*, *BCL2*, *CASPASE 9*, *CASPASE 8*, and *TNFR1* expressions from exposed and non-exposed tumor cells to propolis extracts.

## Results

### *Cell viability*

After 24 h, Met sample did not affect OSCA-8 viability; Usm exerted a cytotoxic effect using 50 and 100  $\mu\text{g/mL}$ , and Fus, Caj and Sil only affected cell viability at 100  $\mu\text{g/mL}$ . After 48 h, Caj and Sil exhibited an inhibitory effect using 50 and 100  $\mu\text{g/mL}$ , while Usm, Fus and Met were efficient using 10, 50 and 100  $\mu\text{g/mL}$ . The highest effects of all samples on cellular viability occurred after 72 h incubation: Usm (50 and 100  $\mu\text{g/mL}$ ), Fus (10, 50 and 100  $\mu\text{g/mL}$ ), Met, Caj and Sil at all concentrations (Fig. 1).

70% ethanol (propolis solvent) did not show significant effects on cell viability, whereas doxorubicin (4  $\mu\text{M}$ ) reduced cell viability to  $62.06\% \pm 3.61$  after 48 h, and to  $46.85\% \pm 6.85$  after 72 h, respectively.

### *LDH release by OSCA-8 cells*

Propolis samples exerted a cytotoxic action in a time-concentration dependent manner. Fus showed the lowest cytotoxicity. Usm, Met, Caj, and Sil presented more than 50% of cytotoxicity with concentrations higher than 10  $\mu\text{g/mL}$  after 72 h (Fig. 2). Cytotoxicity of doxorubicin 4 $\mu\text{M}$  was 37.45% and 88.91% at 48 and 72 h, respectively.

### *Apoptosis induction*

Propolis extracts markedly increased apoptosis in OSCA-8 cells. Total apoptosis in untreated cells was  $10.77 \pm 2.22\%$  and between  $51.43\% \pm 6.05$  to  $95.97 \pm 2.14\%$  in treated

cells. Propolis from Usm, Caj and Sil exerted the highest apoptotic effects on OSCA-8 cells. Doxorubicin exhibited 99.4% apoptosis induction (Fig. 3).

The rate of early/late apoptosis and the total apoptosis increased after incubation with propolis samples after 72 h (Fig. 4).

#### *BAX, BCL-2, CASPASE 9, CASPASE 8 and TNFR1 gene expression*

Using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method, one may verify that *BAX* expression increased nonsignificant in cells exposed to propolis Usm ( $2.36 \pm 1.14$ ) and Sil ( $1.89 \pm 0.25$ ) with respect to control. Although the differences were not statistically significant, the treatments with propolis affected the expression level of several genes. *BCL-2* expression increased in all cells treated with propolis and decreased in doxorubicin-treated cells. The expression level of *CASPASE 9* was upregulated in treatments with propolis from Met ( $1.80 \pm 0.60$ ), and Sil ( $1.79 \pm 0.68$ ). The ratio *BCL-2/BAX* was higher than one in cells treated with all propolis samples, indicating major stimulation antiapoptotic of the intrinsic pathway by *BCL-2* effect.

Propolis from Usm, Met, and Sil increased *CASPASE 8* expression in  $9.70 \pm 1.77$ ;  $7.87 \pm 3.83$ ;  $4.44 \pm 1.56$  folds, respectively. Only propolis from Usm upregulated *TNFR1* to  $1.94 \pm 1.08$  folds. Doxorubicin ( $0.5\mu\text{M}$ ) increased *CASPASE 8* gene expression and downregulated *BCL-2* (Fig. 5).

## **Discussion**

In order to investigate the potential cytotoxic activity of Colombian propolis samples on canine osteosarcoma cells, OSCA-8 cells were incubated with different concentrations of

propolis collected in Usme, Bogotá District Capital (Usm); Puerto Lopez, Meta (Met); Fusagasuga, Cundinamarca (Fus); Silvia, Cauca (Sil); and Cajibío, Cauca (Caj).

Colombian propolis samples reduced the viability of canine OSA cells as observed by the enzymatic conversion of MTT to formazan in the mitochondria. Overall, all the samples exhibited a similar activity in OSCA-8 cell viability, with no influence of propolis solvent (70% ethanol), what is in agreement with previous findings suggesting that propolis action is exclusively due to its constituents (Alday et al., 2015; Búfalo et al., 2013).

Doxorubicin, used as a positive control, decreased cell viability, as expected. Doxorubicin reduced OSA cell viability and induced apoptosis (Gonçalves et al., 2015, Sharifi et al., 2015). Besides, propolis samples induced a cytotoxic effect towards OSA cells, that was correlated to the LDH leakage into the culture medium after cell membrane rupture.

Works have revealed that propolis biological effects are a consequence of a synergistic action of its components (Huang et al., 2014). It is also necessary to investigate the chemical composition of a give sample and its geographical origin in order to ensure the reproducibility of data and the scientific value of the research (Sforcin and Bankova 2011). Therefore, we used here propolis samples characterized previously. Propolis Usm contained approximately 37% of diterpenes and triterpenes not fully identified, 2.2% of flavonoids (kaempferol), and 3.4% of eicosyl coumarate. Fus and Met propolis contained diterpenes, benzophenones, triterpenes, and above of 22% of the unknown compounds. Met propolis had 22% of nemorosone. Caj and Sil propolis were the samples richest in triterpenes (49.6% and 51.4% respectively). Sil contained 7.9% of flavonoids (Pardo Mora et al., 2018 submitted for publication).

Colombian propolis samples induced apoptosis in canine OSCA-8 cells. Additionally, some genes involved in the apoptosis pathways such as *BAX*, *BCL2*, *CASPASE 8* and *9*, and *TNFR1* were upregulated by the samples. AnnexinV/IP was used to determine early and late apoptosis. All Colombian propolis extracts increased the total apoptosis significantly. The propolis samples inducing the highest number of cells undergoing apoptosis were Usm, Met, Caj, and Sil. The Colombian propolis increased the total apoptosis more than other propolis used at the same concentration as found in other studies (Alday et al., 2015; Khacha-Ananda et al., 2016; Motomura et al., 2008). Since the chemical composition of the propolis samples investigated by these authors was different, the biological activity of eicosyl coumarate, diterpenes, triterpenes, and flavonoids present in the Usm, Met, Caj, and Sil propolis types should be further investigated, especially because some components were different from those reported for propolis from other regions around the world.

Genes involved in the intrinsic pathway such as *BAX* was upregulated in cells exposed to the Usm and Sil propolis; *CASPASE 9* was also upregulated in cells treated with Met and Sil propolis. However, *BCL-2*, which presents anti-apoptotic activity was also upregulated in the cells treated with all samples propolis. Similar results regarding the expression of *BAX* and *BCL-2* were presented in human bladder carcinoma cells exposed to Brazilian red propolis (Begnini et al., 2014). Sulaiman et al. (2012) observed an increased *BAX* expression and a reduction in *BCL-2* in human leukemia cells treated with propolis from Iraq. In contrast, Japanese propolis did not change the expression of *BAX*, but decreased the expression levels of *BCL-2* (Motomura et al., 2008). *CASPASE 9* was upregulated in a bladder carcinoma cell line exposed to 50 µg/mL of Brazilian red propolis, but its expression was downregulated using 100 µg/mL, suggesting that independent-caspase apoptosis



pathways could be activated by propolis (Begnini et al., 2014). Mexican propolis also induced the activation of *CASPASE 3* and *9* in lymphoma cells (Alday et al., 2015).

Chrysin is a flavone present in some types of propolis, and it increased the apoptosis induced by TRAIL and activated the *CASPASE 8* in human cell lines (Li et al., 2011). Curcumin, a bioactive component isolated from *Curcuma longa*, upregulated *FAS* and *FASL* and increased *CASPASE 3* and *8* activities in chondrosarcoma cells (Lee et al., 2012). These findings are similar to the action of Colombian propolis samples, which increased *CASPASE 8* expression. *TNFR1* is involved in the extrinsic apoptosis pathway, however only propolis Usm increased the expression level in canine OSA cells. Propolis Usm contains eicosyl coumarate, an ester that is able to induce apoptosis selectively in cancer cells (Menezes et al., 2017), and kaempferol that exerts apoptotic effects on human OSA cells (Huang et al., 2010). Both, eicosyl coumarate and kaempferol were present in propolis from Usm and can be associated with the apoptotic effect observed in our study.

Propolis Sil contains mainly triterpenes and flavonoid aglycones. Both chemical groups are known for their anticancer activities (Chahar et al., 2011; Peron et al., 2017), and may be involved in the apoptotic effect and *BAX*, *CASPASE 8*, and *CASPASE 9* expression in canine OSA cells. Propolis Met mainly stimulated the *CASPASE 8* gene expression, and its activity may be associated with a high concentration of benzophenones (mainly nemorosone). Nemorosone displays a cytotoxic activity against cancer cell lines (Diaz-Carballo et al., 2008; Popolo et al., 2010).

Doxorubicin led to the highest level of total apoptosis, the lowest *BCL2/BAX* ratio, and the highest *CASPASE 8* expression level, similar results were reported by Sharifi, et al., (2015) previously.

Finally, some components found in the Colombian propolis should be isolated and their cytotoxic effect should be evaluated on tumor cells. Moreover, the action of Colombian propolis samples in other genes involved in apoptosis extrinsic and extrinsic pathways should be investigated.

## **Conclusion**

Colombian propolis samples reduced the viability of OSCA-8 cells, induced cytotoxic effects and consequently the release of LDH, induced apoptosis and the expression of apoptosis-related genes.

## **Funding sources**

This work was supported by the Universidad Antonio Nariño [2017-220].

## **Acknowledgements**

Authors are thankful to Universidad Antonio Nariño for the grant.

## **References**

Alday E., Valencia D., Carreño A., Picerno P., Piccinelli A., Rastrelli L., Robles-Zepeda R., Hernandez J., Velazquez C. (2015). Apoptotic induction by pinobanksin and some of its ester derivatives from Sonoran propolis in a B-cell lymphoma cell line. *Chem Biol Interact.* 242, 35-44.

- Al-Khan A., Gunn H.J., Day M.J., Tayebi M., Ryan S.D., Kuntz C.A., Saad E.S., Richardson S.J., Danks J.A. (2017). Immunohistochemical Validation of Spontaneously Arising Canine Osteosarcoma as a Model for Human Osteosarcoma. *J Comp Pathol.* 157 (4), 256-265.
- Begnini K.R., Moura de Leon P.M., Thurow H., Schultze E., Campos V.F., Martins Rodrigues F., Borsuk S., Dellagostin O.A., Savegnago L., Roesch-Ely M., Moura S., Padilha F.F., Collares T., Pêgas Henriques J.A., Seixas F.K. (2014). Brazilian red propolis induces apoptosis-like cell death and decreases migration potential in bladder cancer cells. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014 (639856), 1-13.
- Brinkhof B., Spee B., Rothuizen J., Penning L. (2006). Development and evaluation of canine reference genes for accurate quantification of gene expression. *Anal Biochem.* 356 (1), 36-43.
- Búfalo, M., Ferreira, I., Costa, G., Francisco, V., Liberal, J., Cruz, M., Lopes, M., Batista, M., Sforcin, J. (2013). Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS stimulated proinflammatory response by blocking NF $\kappa$ B and MAPK activation in macrophages. *J Ethnopharmacol.* 149, 84-92.
- Chahar, M., Sharma, N., Dobhal, M., Joshi, Y. (2011). Flavonoids: a versatile source of anticancer drugs. *Pharmacogn Rev.* 5, 1-12.
- Díaz-Carballo, D., Malak, S., Bardenheuer, W., Freistuehler, M., Reusch, H. (2008). Cytotoxic activity of nemorosone in neuroblastoma cells. *J Cell Mol Med.* 12, 2598-2608.
- Fowles, J. S., Brown, K. C., Hess, A. M., Duval, D. L., Gustafson, D. L. (2016). Intra- and interspecies gene expression models for predicting drug response in canine osteosarcoma. *BMC Bioinformatics.* 17, 93.

- Gonçalves C., Martins-Neves S., Paiva-Oliveira D., Oliveira V, Fontes-Ribeiro C, Gomes C. (2015). Sensitizing osteosarcoma stem cells to doxorubicin-induced apoptosis through retention of doxorubicin and modulation of apoptotic-related proteins. *Life Sci.* Volume 130: 47-56,
- Hassan M., Watari H., AbuAlmaaty A., Ohba Y., Sakuragi N. (2014). Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. *Biomed Res Int.* 2014, 1-23.
- Hata, A. N., Engelman, J. A., Faber, A. C. (2015). The BCL-2 family: key mediators of the apoptotic response to targeted anti-cancer therapeutics. *Cancer Discov.* 5(5), 475–487.
- Huang, S., Zhang, C., Wang, K., Li, G., Hu, F. (2014). Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules.* 19, 19610-19632.
- Huang W.-W., Chiu Y.-J., Fan M.-J., Lu H.-F., Yeh H.-F., Li K.-H., Chen P.-Y., Chung J.-G., Yang J.-S. (2010). Kaempferol induced apoptosis via endoplasmic reticulum stress and mitochondria-dependent pathway in human osteosarcoma U-2 OS cells. *Mol Nutr Food Res.* 54 (11), 1585-1595.
- Khacha-ananda, S., Tragoolpua, K., Chantawannakul, P., Tragoolpua, Y. (2016). Propolis extracts from the northern region of Thailand suppress cancer cell growth through induction of apoptosis pathways. *Invest New Drugs.* 34(6), 707-722.
- Keskin-Aktan A., Gonca Akbulut K., Yazici-Mutlu C., Sonugur G., Ocal M., Akbulut H. (2018). The effects of melatonin and curcumin on the expression of SIRT2, Bcl-2 and Bax in the hippocampus of adult rats. *Brain Res Bull.* 137, 306-310.
- Lee H., Li T., Tsao J., Fong Y., Tang C. (2012). Curcumin induces cell apoptosis in human chondrosarcoma through extrinsic death receptor pathway. *Int Immunopharmacol.* 13 (2), 163-169.

- Li, X., Wang, J. N., Huang, J. M., Xiong, X. K., Chen, M. F., Ong, C., Shen, H., Yang, X. (2011). Chrysin promotes tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induced apoptosis in human cancer cell lines. *Toxicol In Vitro*. 25 (3), 630-635.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta C(T)) Method. *Methods*. 25, 402-408.
- Luetke A., Meyers P., Lewis I, Juergens H. (2014). Osteosarcoma treatment – Where do we stand? A state of the art review. *Cancer Treat Rev*. 40 (4), 523-532.
- Menezes, J., Edraki, N., Kamat, S., Khoshneviszadeh, M., Kayani, Z., Mirzaei, H., Miri, R., Erfani, N., Nejati, M., Cavaleiro, J., Silva, T., Saso, L., Borges, F., Firuzi, O. (2017). Long chain alkyl esters of hydroxycinnamic acids as promising anticancer agents: selective induction of apoptosis in cancer cells. *J Agric Food Chem*. 65, 7228-7239.
- Motomura, M., Kwon, K.M., Suh, S.J., Lee, Y.C., Kim, Y.K., Lee, I.S., Kwon D.Y., Suzuki I., Kim, C.H. (2008). Propolis induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemic U937 cells through Bcl-2/Bax regulation. *Environ Toxicol Pharmacol*. 26(1), 61-67.
- Peron, G., Marzaro, G., Dall'Acqua, S. (2017). Known triterpenes and their derivatives as scaffolds for the development of new therapeutic agents for cancer. *Curr Med Chem*. 24, 1-11.
- Popolo, A., Piccinelli, A., Morello, S., Sorrentino, R., Osmany, C., Rastrelli, L., Aldo, P. (2010). Cytotoxic activity of nemorosone in human MCF-7 breast cancer cells. *Can J Physiol Pharmacol*. 89, 50-57.
- Ríos J., Recio C. (2006). Natural Products as Modulators of Apoptosis and their Role in Inflammation. *Studies in Natural Products Chemistry*. 33 (M), 141-192.

- Sharifi, S., Barar, J., Hejazi, M. S., Samadi, N. (2015). Doxorubicin Changes Bax /Bcl-xL Ratio, Caspase-8 and 9 in Breast Cancer Cells. *Adv Pharm Bull.* 5(3), 351–359.
- Seda Vatansever, H., Sorkun, K., İsmet Deliloğlu Gurhan, S., Ozdal-Kurt, F., Turkoz, E., Gencay, O., Salih, B. (2010). Propolis from Turkey induces apoptosis through activating caspases in human breast carcinoma cell lines. *Acta Histochem.* 112(6), 546-556.
- Sforcin, J., Bankova, V. (2011). Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol.* 133, 253-260.
- Sulaiman, G. M., Ad'hiah, A. H., Al-Sammarræ, K. W., Bagnati, R., Frapolli, R., Bello, E., Uboldi S., Romano M., Panini N., Scanziani E., Pezzolato M., Erba E., D'Incalci, M. (2012). Assessing the anti-tumour properties of Iraqi propolis in vitro and in vivo. *Food Chem Toxicol.* 50(5), 1632-1641.
- Xuan, H. Z., Zhang, J. H., Wang, Y. H., Fu, C. L., Zhang, W. (2016). Anti-tumor activity evaluation of novel chrysin-organotin compound in MCF-7 cells. *Bioorg Med Chem Lett.* 26(2), 570-574.
- Zhang J., Yu X, Yan Y, Wang C, Wang W. (2015). PI3K/Akt signaling in osteosarcoma. *Clin Chim Acta.* 444, 182-192.
- Zhang F., Ding Y., Shah Z., Xing D., Gao Y., Liu D, Ding M. (2014). TNF/TNFR1 pathway and endoplasmic reticulum stress are involved in ofloxacin-induced apoptosis of juvenile canine chondrocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 276 (2), 121-128.

Table 1. Sequences of the primers for qPCR.

	Primers sequence forward (5' to 3')	Primers sequence Reverse (5 to 3')	Product length (bp)
<i>B2M</i>	GTTTCCTGGCCTTGCTCCTC	ACCCTGACACGTAGCAGTTC	158
<i>BAX</i>	GTTGCAGAGGATGATCGCAG	TGATGGTCCTGATCAGCTCGG	185
<i>BCL-2</i>	GGGGTCATGTGTGTGGAGAG	CAAACAGAGGCTGCATGGTG	169
<i>CASPASE 9</i>	GGGAAGCCCAAGCTCTTCTT	AGTGGGCAAAGTACACCGG	183
<i>CASPASE 8</i>	GATGCGGATGCGTTGAGTAA	AGCCATAGATGATGCCCTTGT	181
<i>TNFR1</i>	GCCTCTTTGGTATTTGCGTTT	CTCTTTCGTCGGTGTGGTTT	113

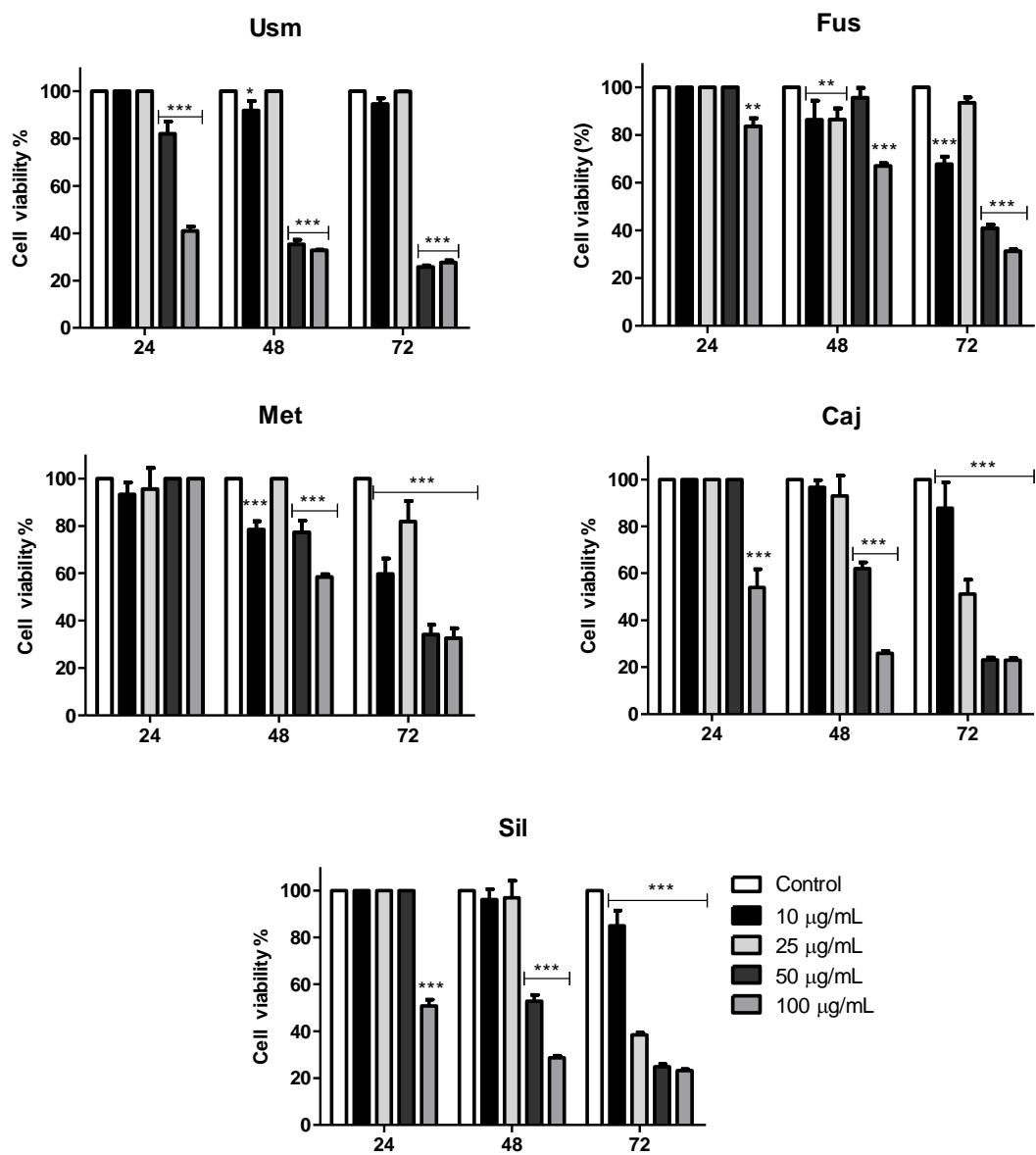
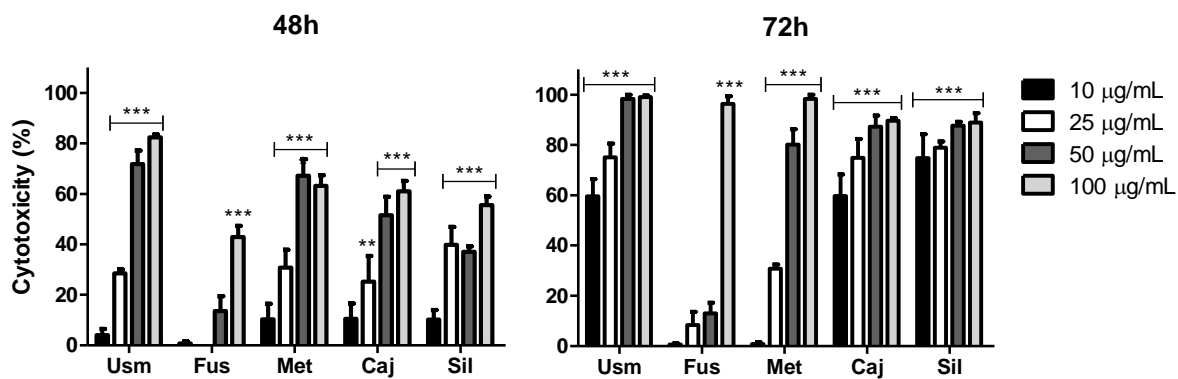


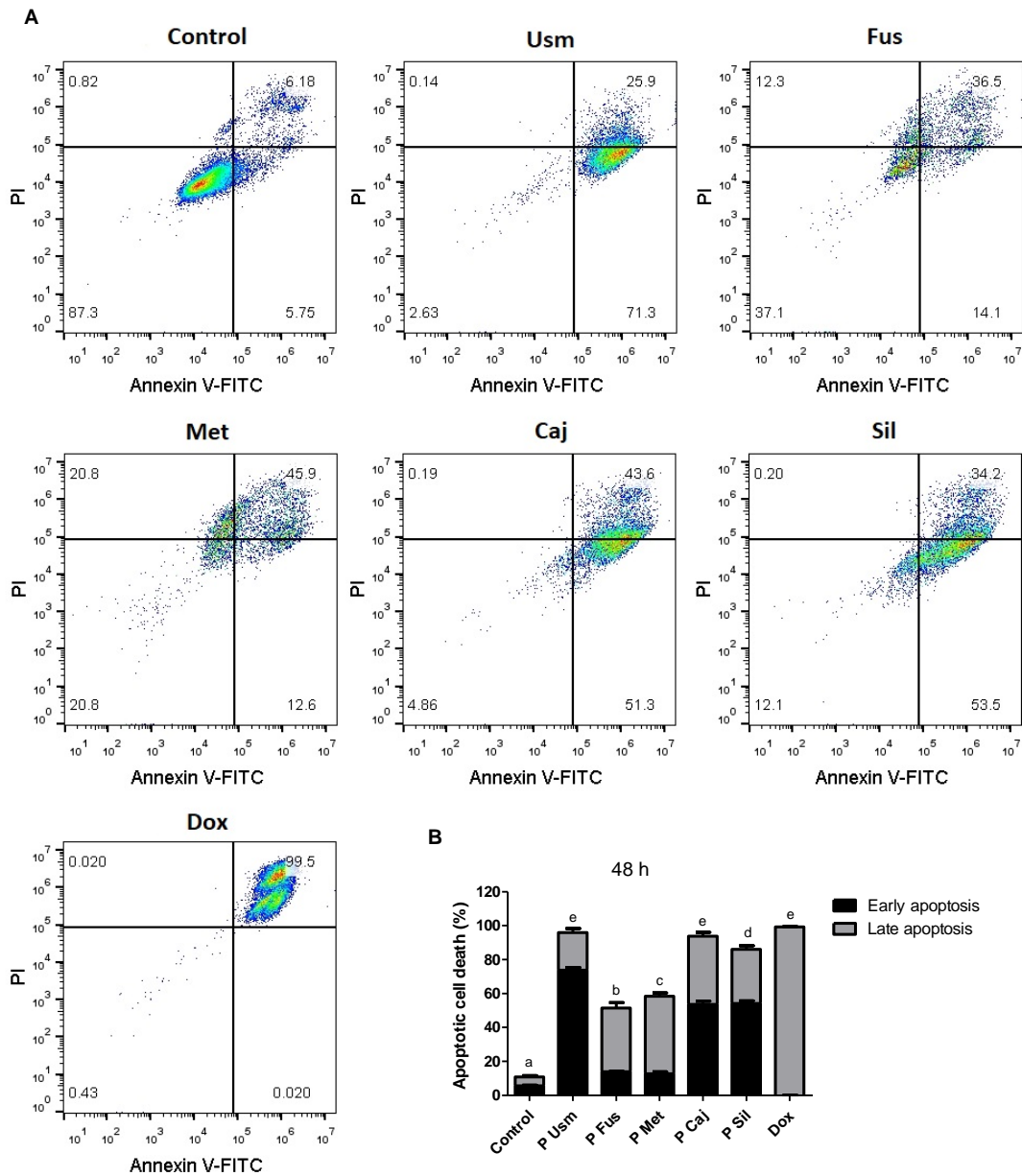
Fig. 1. Percentage (%) of OSCA-8 cell viability after incubation with different propolis samples

collected in Colombia (Usm, Fus, Met, Caj, and Sil) after 24, 48 and 72 h (mean  $\pm$  SD, n = 4, \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001 vs control).

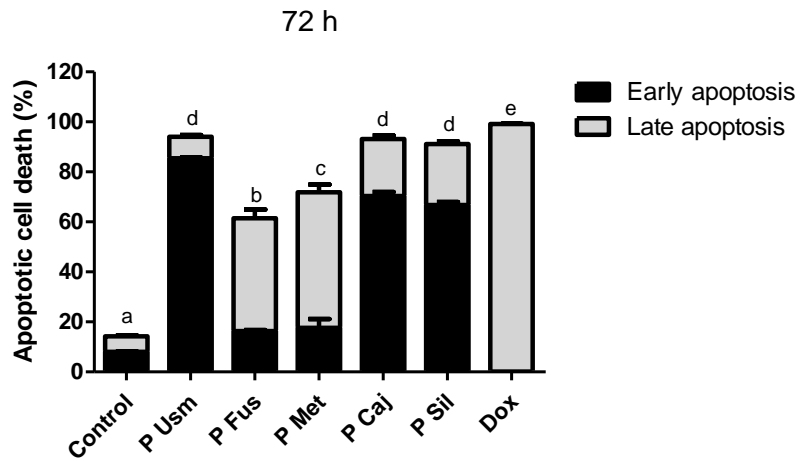


**Fig. 2.** Percentage (%) of OSCA-8 cell cytotoxicity determined by lactate dehydrogenase release after incubation with five propolis samples collected in Colombia (Usm, Fus, Met, Caj, and Sil) for 48 and 72 h (mean  $\pm$  SD, n = 4, \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001 vs control).

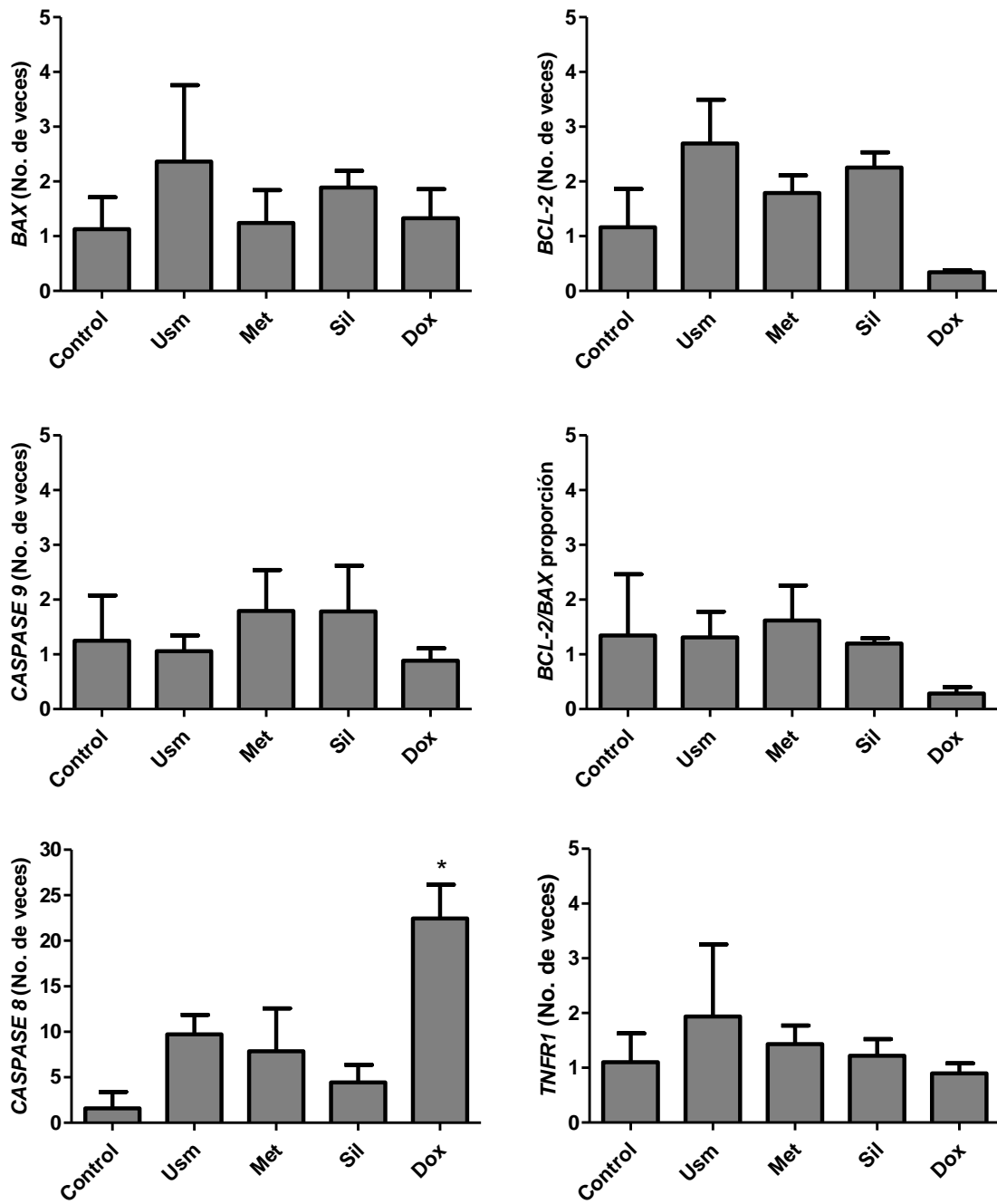




**Fig. 3.** Apoptosis induction by Colombian propolis samples in OSCA-8 cells after 48 h of treatment was determined by flow cytometry. (A) Dot plot indicating the percentages in each panel: early apoptotic (lower right quadrant), late apoptotic (upper right quadrant), and necrotic (upper left quadrant) cells. (B) Graph bars represents the percentage of cells in early and late apoptotic stages (mean  $\pm$  SD, n = 3). Different letters indicate significant differences (p<0.05).



**Fig. 4.** Apoptosis induction by Colombian propolis samples in OSCA-8 cells determined by flow cytometry. Graph bars represents the percentage of cells in early and late apoptotic stages, after 72 h (mean  $\pm$ SD, n = 3). Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 5.** Propolis effects on *BAX*, *BCL-2*, *CASPASE 9*, *CASPASE 8*, and *TNFR1* gene expression and on the ratio *BCL-2/BAX*. Doxorubicin 0.5 $\mu$ M was used as a positive control (mean  $\pm$  SD, n = 3, \* p<0.05).

## Patente

### COMPOSICIÓN QUE CONTIENE TRITERPENOS, DITERPENOS, BENZOFENONAS Y/O FLAVONOIDES CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL

#### CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención tiene aplicación en el campo de las ciencias médicas o veterinarias.

#### RESUMEN

La presente invención se refiere a una composición de triterpenos, diterpenos, benzofenonas y/o flavonoides obtenidos a partir de propóleo y su aplicación como compuesto antitumoral, la composición es evaluada en modelo canino in vitro, con aplicación potencial en seres humanos y caninos.

#### ESTADO DE LA TÉCNICA

El propóleo es un material resinoso colectado por las abejas a partir de exudados y brotes de plantas, mezcladas con cera y enzimas propias de las abejas (Sforcin & Bankova, 2011). La composición de las plantas de origen determina sus constituyentes químicos (Vassya Bankova, 2005; Graikou, Popova, Gortzi, Bankova, & Chinou, 2016). Estudios desarrollados con extractos etanólicos de propóleo muestran que este puede contener 50% de resinas y bálsamos, 30% de cera, 10% aceites aromáticos y esenciales y 5% de polen (V. S. Bankova et al., 2000; Huang et al., 2014); se pueden encontrar más de 300 sustancias que en una combinación sinérgica inducen diferentes actividades biológicas, más que de forma individual (V. S. Bankova et al., 2000). Ahora se conocen propiedades biológicas y farmacológicas como: inmunomodulador, antitumoral, antiinflamatorio, antioxidante, antibacterial, antiviral, antifúngico, antiparasitario, antiulcera, anti inflamatorio, radioprotectivo también como propiedades responsables de incrementar el efecto de ciertos antibióticos (Olczyk et al., 2014; Sforcin & Bankova, 2011).

Debido a estas propiedades, el propóleo ha sido estudiado para aplicaciones a nivel humano y animal.

El cáncer se ha reportado como una de las 10 principales causas de muerte a nivel mundial (American-Cancer-Society, 2011). Para el estudio de la biología del cáncer se ha propuesto al perro como un modelo de estudio para algunos tipos de cáncer humano, debido a que se han encontrado similitudes en los rasgos histológicos, períodos de crecimiento tumoral, heterogeneidad intra-tumoral e inter-individual, desarrollo de recurrencia o resistencia a la enfermedad y sitios distantes relevantes para metástasis; el osteosarcoma canino es un claro ejemplo de ello. Adicionalmente, los perros comparten factores de riesgo ambientales con sus propietarios humanos sugiriéndose así el valor potencial que tiene el perro como centinela de la enfermedad para los humanos (Ranieri et al., 2013).

Los efectos del propóleo y de sus componentes sobre la apoptosis, citotoxicidad tumoral y acción inmunomoduladora del cáncer, han sido demostrados en varios estudios (Alday et al., 2015; Ehara Watanabe et al., 2011). La apoptosis es un proceso de muerte celular programada que se encuentra disminuido en cáncer, por eso es un blanco para el desarrollo de nuevos productos antitumorales (Khan et al, 2014; Yaacoub et al, 2016). Los compuestos presentes en el producto obtenido a partir de propóleo han demostrado actividad proapoptótica en células tumorales (Alday et al 2015, Novak et al 2014, Czyzewska 2016, Szliska 2013, Seda et al 2010, Sulaiman et al, 2012, Xuan et al, 2016, Motomura et al, 2008, Khacha et al, 2016), el mecanismo está asociado a la activación de las vías intrínseca y extrínseca de apoptosis. La primera vía inicia con la activación de receptores de muerte localizados en la membrana plasmática por ligandos específicos y la vía intrínseca involucra la liberación de proteínas proapoptóticas desde la mitocondria (Sawicka, Car, Borawska, & Niklinski, 2012; Yaacoub, Pedeux, Tarte, & Guillaudeux, 2016). Se sabe que los flavonoides tienen un amplio espectro de propiedades biológicas y son usados como criterio para determinar la calidad del propóleo; los terpenos generan el olor característico del propóleo y contribuyen al efecto farmacológico (Huang S, et al 2014); las benzofenonas son cetonas aromáticas cuya actividad biológica también ha sido previamente reportada (Sales L, et al 2015). Es así que la composición tiene como objetivo potencializar la actividad apoptótica en células tumorales combinando triterpenos, diterpenos, benzofenonas y flavonoides, que al actuar sinérgicamente activan diferentes rutas de apoptosis en las células tumorales. Los triterpenos corresponden a lanosterol, triterpeno diol, cicloartenol y beta amirina; los diterpenos como diterpenico diol, ácido levopimarico y agatadiol; benzofenonas como propolona A y nemorosona; y flavonoides

como kaempferol y dihidroxi metoxiflavona; dichos compuestos son obtenidos a partir de la combinación de extractos hidroalcohólicos de propóleos con diferente composición química.

En el ámbito de las patentes, también se conocen investigaciones relacionadas con el propóleo, es el caso de la patente US2016051594 que enseña composiciones farmacéuticas, que incluyen composiciones para el tratamiento de cáncer gastrointestinal, que contienen entre 1 y 99% de propóleo y el resto de ciclodextrina. En la composición, el propóleo es un extracto o una fracción de éste, y está libre de cera. Además, el propóleo puede ser de tipo europeo o poplar o Green Brazilian. Por su parte, la ciclodextrina puede ser gama-ciclodextrina. Adicionalmente, se conoce la patente JP2003192603 que reporta un agente anticancerígeno que tiene menos toxicidad para las células normales y que causa efectos adversos mínimos, y un alimento sano que contiene el mismo. El agente anticancerígeno contiene al menos una cantidad mayor o igual a un tipo de materias primas alimenticias que puede ser extracto de propóleo. El agente anticancerígeno no exhibe alguna toxicidad para las células normales y tiene actividad inhibidora de la propagación de las células cancerosas y/o una función de inmuno-activación.

De otra parte, la patente JP2003238422 presenta un nuevo agente inductor de apoptosis y alimentos saludables que incluye materiales alimentarios naturales. El agente inductor de apoptosis incluye al menos uno seleccionado entre el extracto de propóleo, las cáscaras de uva y el extracto de espino, útiles de manera particular como agentes inductores de apoptosis para células de cáncer gástrico.

La patente JP2013023498 proporciona un medicamento y un suplemento nutricional que retarda el progreso del cáncer y mejora la calidad de vida de un paciente de cáncer. El medicamento para tratar el cáncer incluye el extracto de propóleo verde taiwanés o propolin.

Artículos científicos tal como Szliszka, E.; Zydowicz, G.; Janoszka, B.; Dobosz, C.; Kowalczyk-Ziomek, G.; Krol, W. (2011) "Ethanol extract of Brazilian green propolis sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis" *International Journal of Oncology* 38, 941-953 proporciona evidencia técnica en relación con propiedades inmunomoduladoras, antitumorales y quimiopreventivas de los propóleos y Sawicka, D.; Car, H.; Borawska, M.H.; Nikliński, J. (2012) "The anticancer activity of propolis" *Folia*

Histochemica et Cytobiologica 50, 25-37 proporciona un resumen de los resultados de los estudios sobre el mecanismo de actividad del propóleo y sus compuestos activos como CAPE y crisina en el proceso apoptótico y su influencia en la proliferación de células cancerosas. En el documento se muestra que el propóleo y sus compuestos inducen las vías de apoptosis en las células cancerosas. Se presenta evidencia técnica que demuestra que los componentes de los propóleos pueden inhibir la progresión de las células tumorales y pueden ser útiles como fármacos anticancerosos quimioterapéuticos o quimiopreventivos potenciales.

En este sentido, es claro que existe una necesidad de proporcionar composiciones químicas farmacéuticas a base de extractos de propóleo que tengan proporciones de compuestos extraídos del propóleo y cuya combinación presenten actividades antitumorales que puedan ser interesantes y prometedoras para el tratamiento del cáncer tanto en animales como en seres humanos.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a una composición antitumoral que contiene triterpenos, diterpenos, benzofenonas y/o flavonoides, con actividad antitumoral asociada a apoptosis en modelo de osteosarcoma canino in vitro. Tiene el potencial de ser utilizado en el campo de la medicina veterinaria y humana como terapéutico, profiláctico y acompañante de terapias convencionales y con bajo riesgo de generar efectos colaterales adversos.

Es así que la composición tiene como objetivo potencializar la actividad apoptótica en células tumorales combinando triterpenos, diterpenos, benzofenonas y/o flavonoides extraídos del propóleo, que al actuar sinérgicamente activan diferentes rutas de apoptosis en las células tumorales. Por tanto, la invención cubre mezclas binarias, terciarias y cuaternarias de posibles combinaciones de triterpenos, diterpenos, benzofenonas y flavonoides para composiciones con actividad antitumoral.

La invención comprende la combinación específica de extractos hidroalcohólicos de diferentes tipos de propóleo, en donde las proporciones de los componentes son para las benzofenonas: la cantidad está entre 10 y 40% del peso de la combinación final; para los diterpenos, la cantidad está entre 10 y 40% del peso de la combinación final, y para los

triterpenos la cantidad está entre 10 y 40% del peso de la combinación final, y/o los flavonoides que pueden estar en una cantidad de 1 y 10% del peso de la combinación final; la composición puede contener un porcentaje (5-30%) de componentes diferentes a los grupos mencionados como azúcares (glucosa, fructosa, glicerol, sorbosa, eritritol, sucrosa), ácidos grasos (ácidos palmítico, oleico, esteárico, araquídico, lignocérico, behénico), entre otros presentes en el propóleo. Se entiende que la sumatoria de los porcentajes no excede el 100% de la combinación.

Las composiciones de la presente invención comprenden extractos de propóleo de diferentes procedencias y mezclas de los mismos. Los diferentes tipos de propóleo que se pueden emplear para la obtención de extractos hidroalcohólicos son aquellos que en su composición incluyan constituyentes químicos de propóleos identificados por GC-MS (porcentaje del total de componentes), como por ejemplo los siguientes componentes identificados para tres tipos de propóleo que han sido utilizados en la presente invención pero que no se limitan a los mismos.

<b>Componente</b>	<b>Propóleo 1</b>	<b>Propóleo 2</b>	<b>Propóleo 3</b>
<b>Azúcares</b>	<b>1.6</b>	<b>13.4</b>	<b>0.1</b>
<b>Ácidos grasos</b>	<b>29.5</b>	<b>3.9</b>	<b>5.2</b>
<b>Diterpenos</b>	<b>15.4*</b>	<b>10.7</b>	<b>1.1</b>
<b>Flavonoides</b>	<b>2.2</b>		<b>7.9</b>
<b>Benzofenonas</b>		<b>39.7</b>	<b>Tr</b>
<b>Triterpenos</b>	<b>22.1*</b>	<b>2.7</b>	<b>51.4</b>
<b>Desconocidos</b>		<b>22.2</b>	<b>10.4</b>

\*Triterpenos y Diterpenos (no identificados), diferentes de las otras muestras

Los propóleos denominados propóleo 1, propóleo 2 y propóleo 3 son obtenidos en diferentes biomas de regiones tropicales de Colombia ubicadas en los departamentos de Cundinamarca, Meta y Cauca, respectivamente. Como se mencionó anteriormente, no son limitativos de la presente invención.



De acuerdo con la presente invención, las benzofenonas que pueden estar presentes en los extractos y cuya concentración puede estar enriquecida por la combinación de distintas fracciones de extractos hidroalcohólicos de propóleo son propolona A, nemorosona y mezclas de los mismos;

Los diterpenos, que pueden estar presentes en los extractos y cuya concentración puede estar enriquecida por la combinación de distintas fracciones de extractos hidroalcohólicos de propóleo son diterpenos como diterpenico diol, ácido levopimarico, agatadiol y mezclas de los mismos;

Los triterpenos que pueden estar presentes en los extractos y cuya concentración también puede estar enriquecida por la combinación de distintas fracciones de extractos hidroalcohólicos de propóleo son lanosterol, triterpeno diol, cicloartenol, beta amirina y mezclas de los mismos; y/o

Los flavonoides que pueden estar presentes en los extractos y cuya concentración también puede estar enriquecida por la combinación de distintas fracciones de extractos hidroalcohólicos de propóleo son kaempferol, dihidroxi metoxiflavona y mezclas de los mismos; en donde dichos compuestos son obtenidos a partir de la combinación de extractos hidroalcohólicos de distintos propóleos con diferente composición química.

En este sentido, la presente invención también abarca mezclas de extractos hidroalcohólicos de propóleo en donde las cantidades de los compuestos anteriormente expuestos son enriquecidas mediante la adición y reunión de diferentes extractos hidroalcohólicos de propóleo o mezclas de los mismos.

Es otro objeto de la invención, las composiciones o combinaciones de los extractos hidroalcohólicos de propóleo de acuerdo con la invención con propiedades biológicas farmacéuticas tales como inmuno-modulación, antitumoral, anti-inflamatoria, antioxidante, antibacterial, antiviral, antifúngica y/o antiparasitaria.

Es otro objeto de la invención, las composiciones o combinaciones de los extractos hidroalcohólicos de propóleo de acuerdo con la invención con las propiedades biológicas farmacéuticas anteriormente indicadas para la fabricación de medicamentos para el tratamiento de condiciones cancerígenas, en donde los medicamentos comprenden las

composiciones o combinaciones de la invención junto con excipientes farmacéuticamente aceptables.

Es otro objeto de la invención, las composiciones o combinaciones de los extractos hidroalcohólicos de propóleo de acuerdo con la invención con las propiedades biológicas farmacéuticas antitumorales para generar activación de genes de apoptosis.

Aún, es otro objeto de la invención, composiciones antitumorales que contienen triterpenos, diterpenos, benzofenonas, flavonoides o mezclas de los mismos, los cuales son extraídos de diferentes tipos de propóleo.

### Ejemplo

Se han encontrado estudios donde evalúan extractos de un único tipo de propoleo con efecto apoptótico, sin embargo, en la presente invención se evalúan combinaciones de varios tipos con actividad superior y usando una menor concentración efectiva en modelo in vitro, en la siguiente tabla se pueden observar algunos ejemplos, resaltando que la invención propone una actividad superior con menor concentración:

Origen de propoleo	Línea celular	Técnica de evaluación de apoptosis	Concentración con actividad significativa	Referencia
Tailandia	Adenocarcinoma	Annexin V binding assay. Flow cytometry	125ug/ml	Propolis extracts from the northern region of Thailand suppress cancer cell growth through induction of apoptosis pathways. Khacha et al, 2016.
Propoleo rojo de Brasil	Carcinoma epidermoide laríngeo	Flow cytometry TUNEL apoptosis assay: fragmenting nuclear DNA. Fluorescence microscopy using Annexin-V staining.	60-120 ug/ml	Proteomic analysis identifies differentially expressed proteins after red propolis treatment in Hep-2 cells. Silva et al, 2014.
Japón	Leucemia	Annexin V binding assay. Flow cytometry	300 y 500ug/ml	Propolis induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemic U937 cells through Bcl-2/Bax regulation. Motomura et al, 2008.
Combinación de extractos de propóleos de diferentes biomas tropicales de Colombia	Osteosarcoma	Annexin V binding assay. Flow cytometry	25 a 50ug/ml	Composición de la presente invención

Por tanto, las composiciones de acuerdo con la presente invención, evaluadas conteniendo algunas de las posibles combinaciones muestran un efecto significativo reduciendo la viabilidad celular e incrementando el porcentaje de células sufriendo apoptosis en células de osteosarcoma canino. Este efecto se determina evaluando la translocación de la fosfatidil serina como indicador de apoptosis y usando técnicas de citometría de flujo. En la figura 1 se muestra una gráfica relacionada con ejemplos del incremento del porcentaje de apoptosis usando tres posibles composiciones, la barra del control corresponde a una muestra que no recibió tratamiento.

## REIVINDICACIONES

1 Una composición con actividad antitumoral caracterizada porque comprende extractos hidroalcohólicos de diferentes tipos de propóleo.

2 La composición de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque los extractos hidroalcohólicos de propóleo comprenden triterpenos, diterpenos, benzofenonas y/o flavonoides.

3 La composición de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizada porque la combinación de extractos hidroalcohólicos de diferentes tipos de propóleo comprende benzofenonas en una cantidad entre 10 y 40% del peso de la combinación final; diterpenos, en una cantidad entre 10 y 40% del peso de la combinación final, triterpenos en una cantidad entre 10 y 40% del peso de la combinación final, y/o flavonoides una cantidad de 1 y 10% del peso de la combinación final.

4 La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque además comprende compuestos diferentes a triterpenos, diterpenos, benzofenonas y/o flavonoides y dichos compuestos diferentes se seleccionan de azúcares como glucosa, fructosa, glicerol, sorbosa, eritritol, sucrosa, y ácidos grasos como ácidos palmítico, oleico, esteárico, araquídico, lignocérico y behénico).

5 La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque las benzofenonas que están presentes son propolona A, nemorosona y mezclas de las mismas.

6 La composición de acuerdo cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque los diterpenos que están presentes son diterpenico diol, ácido levopimarico, agatadiol y mezclas de los mismos.

7 La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque los triterpenos, que están presentes son lanosterol, triterpeno diol, cicloartenol y beta amirina; y mezclas de los mismos.

8 La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque los flavonoides que están presentes son kaempferol, dihidroxi metoxiflavona y mezclas de los mismos;

## RESUMEN

La presente invención se refiere a una composición de triterpenos, diterpenos, benzofenonas y/o flavonoides obtenidos a partir de extractos hidroalcohólicos de diferentes tipos de propóleo propóleo, y su aplicación como antitumoral en modelo de osteosarcoma canino.

## 5. Conclusiones y recomendaciones

Las presentes conclusiones presentan en síntesis los hallazgos más representativos del proyecto de doctorado y son ampliados en cada uno de los artículos generados en los títulos correspondientes a la discusión.

- Nueve muestras de propóleo colombianas fueron evaluadas, en el análisis de agrupamiento de acuerdo a su composición, cinco pertenecieron a un grupo, dos a un segundo grupo y dos muestras se presentaron como valores atípicos. Los principales componentes encontrados fueron triterpenos, diterpenos y benzofenonas, se resalta un alto porcentaje de componentes no identificados que es necesario dilucidar para establecer su importancia asociada a la actividad biológica.
- Los triterpenos estuvieron presentes en ocho de las nueve muestras, las benzofenonas en seis muestras y los diterpenos estuvieron presentes en todas las muestras. Los triterpenos identificados fueron el lanosterol, triterpeno diol,  $\beta$ -amirina, lupeol, cicloartenol, amirina acetato, lupeol acetato, ácido oleanólico y ácido maslínico; las principales benzofenonas fueron propolona A, nemorosona y sus isómeros; y diterpenos como diterpeno diol, ácido levopimarico y agatadiol. Compuestos pertenecientes a cada uno de los grupos son reconocidos por su actividad biológica y potencial farmacológico.
- Se encuentra por primera vez la presencia de eicosil cumarato en una muestra proveniente de propóleo, resultado de gran importancia considerando que este tipo de compuestos es capaz de inducir apoptosis de manera selectiva en células tumorales (Menezes et al., 2017).
- Los nueve propóleos generaron una reducción de la viabilidad de células de OSA canino de cultivo primario y cinco muestras fueron seleccionadas para los primeros análisis de citometría de flujo (Usm, Sil, Met, Caj y Fus), todas incrementaron significativamente la presentación de apoptosis temprana y tardía en las células tratadas comparado con células que no fueron expuestas a los extractos. La

generación de ROS disminuyó en las células tratadas y solamente la muestra de propóleo Met afectó el potencial de membrana mitocondrial.

- Para futuras investigaciones se hace necesario la inclusión de mayor número de líneas celulares y también de experimentos adicionales que permitan avanzar hacia pruebas preclínicas. El presente trabajo corresponde al inicio de la investigación sobre el potencial de actividad antitumoral de propóleos colombianos en modelos *in vitro* en el que fue posible determinar que estos inducen un marcado efecto apoptótico con concentraciones de 50 µg/mL.
- Los propóleos Usm y Sil estimularon la expresión de *BAX*, *Met* y *Sil* la de *CASPASA 9*, *Usm* de *TNFR1* y la expresión del gen de *CASPASA 8* incrementó con la exposición a los propóleos Usm, *Met* y *Sil*, esto confirma el efecto sobre vías de apoptosis en las células de OSA canino.
- La doxorrubicina utilizada como control positivo e inductor de apoptosis presentó el mayor nivel de expresión de la *CASPASA 8* comparado con los tratamientos con propóleo y además fue el único que subreguló *BCL-2*. Estos resultados concuerdan con lo reportado para este medicamento, usado de manera convencional en el tratamiento del cáncer.
- El solvente etanólico no tuvo efectos significativos sobre la viabilidad de células de OSA canino, resultado previamente reportado por otros autores y que adicionalmente confirman que la actividad citotóxica y apoptótica se debe exclusivamente a los constituyentes del propóleo.
- El análisis de expresión génica permitió evaluar cinco genes asociados con apoptosis, tres de ellos involucrados en la vía intrínseca y dos a la extrínseca, sin embargo se hace necesaria la investigación de otros genes y otras vías de muerte celular que puedan estar asociadas al efecto citotóxico y apoptótico del propóleo.
- Fueron caracterizados químicamente nueve propóleos, es importante ampliar el número y distribución de las muestras para contar con una mayor diversidad de

componentes y poder avanzar en el proceso de caracterización y estandarización de propóleos colombianos con denominación de origen.

- La línea celular de osteosarcoma canino establecida (OSCA-8) presentó resultados similares a las células de cultivo primario, sin embargo el propóleo Met presentó menor actividad en estas últimas, se propone que este tipo de células pudo presentar menor sensibilidad a los componentes presentes en este propóleo comparado con las células de cultivo primario.
- Los extractos de propóleo utilizados Sil, Usm, Met y Caj presentaron una marcada actividad apoptótica en células de OSA canino, es necesario profundizar en su composición, identificar aquellos componentes que no han sido reconocidos en su totalidad y evaluar compuestos y/o fracciones aislados para determinar la presencia de principios activos que puedan ser de interés biológico y farmacológico.
- Con el desarrollo de la investigación fue posible elaborar una propuesta de patente que se encuentra radicada y en evaluación en la Superintendencia de Industria y Comercio. Sobre esta deberán realizarse pruebas de validación que contribuyan a la evolución de un producto innovación de alto valor agregado y con aplicación en modelos *in vitro* e *in vivo*, dando cumplimiento al objetivo del programa de doctorado en Ciencia Aplicada.

## Bibliografía

- Ahn, M. R., Kunimasa, K., Ohta, T., Kumazawa, S., Kamihira, M., Kaji, K., . . . Nakayama, T. (2007). Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: Major component artepillin C inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation. *Cancer Letters*, 252(2), 235-243. doi:10.1016/j.canlet.2006.12.039
- Al-Khan A., Gunn H.J., Day M.J., Tayebi M., Ryan S.D., Kuntz C.A., Saad E.S., Richardson S.J., Danks J.A. 2017. Immunohistochemical Validation of Spontaneously Arising Canine Osteosarcoma as a Model for Human Osteosarcoma. *Journal of Comparative Pathology*. Volume 157, Issue 4: 256-265
- Alday, E., Valencia, D., Carreno, A. L., Picerno, P., Piccinelli, A. L., Rastrelli, L., . . . Velazquez, C. (2015). Apoptotic induction by pinobanksin and some of its ester derivatives from Sonoran propolis in a B-cell lymphoma cell line. *Chemico-Biological Interactions*, 242, 35-44. doi:10.1016/j.cbi.2015.09.013
- Bankova, Castro, D., & Marcucci. (2000). Propolis: Recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31(1), 3-15.
- Bankova, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1–2), 114-117. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.004>
- Bankova, V., Popova, M., & Trusheva, B. (2016). NEW EMERGING FIELDS OF APPLICATION OF PROPOLIS. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 35(1), 1-11. doi:10.20450/mjccce.2016.864
- Bartolomeu, A. R., Frión-Herrera, Y., da Silva, L. M., Romagnoli, G. G., de Oliveira, D. E., & Sforcin, J. M. (2016). Combinatorial effects of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith with anticancer drugs against human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 81, 48-55. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.03.049>
- Bernardino, P.N., Bersano, P.R.O., Lima Neto, J.F., Sforcin, J.M. Positive effects of antitumor drugs in combination with propolis on canine osteosarcoma cells (spOS-2) and mesenchymal stem cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, in press.
- Bertram, J. S. (2000). The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, 21(6), 167-223. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0098-2997\(00\)00007-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0098-2997(00)00007-8)



- Bittencourt, M. L. F., Ribeiro, P. R., Franco, R. L. P., Hilhorst, H. W. M., de Castro, R. D., & Fernandez, L. G. (2015). Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: Use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. *Food Research International*, 76, 449-457. doi:10.1016/j.foodres.2015.07.008
- Búfalo, M., Candeias, J., Sousa, J., Bastos, J., and Sforcin, J. M. (2010). In vitro cytotoxic activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis against HEP-2 cells. *Natural Product Research*. 24: 18, 1710 – 1718.
- Búfalo, M., Ferreira, I., Costa, G., Francisco, V., Liberal, J., Cruz, M., Lopes, M., Batista, M., Sforcin, J., (2013). Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF- $\kappa$ B and MAPK activation in macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 149(1), 84-92. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.06.004>
- Cam, M., Gardner, H. L., Roberts, R. D., Fenger, J. M., Guttridge, D. C., London, C. A., & Cam, H. (2016). DeltaNp63 mediates cellular survival and metastasis in canine osteosarcoma. *Oncotarget*. doi:10.18632/oncotarget.10406
- Chan, G. C. F., Cheung, K. W., & Sze, D. M. Y. (2013). The Immunomodulatory and Anticancer Properties of Propolis. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 44(3), 262-273. doi:10.1007/s12016-012-8322-2
- Cinegaglia, N. C., Bersano, P. R. O., Bufalo, M. C., & Sforcin, J. M. (2013). Cytotoxic Action of Brazilian Propolis In Vitro on Canine Osteosarcoma Cells. *Phytotherapy Research*, 27(9), 1277-1281. doi:10.1002/ptr.4861
- Conti, B. J., Santiago, K. B., Bufalo, M. C., Herrera, Y. F., Alday, E., Velazquez, C., . . . Sforcin, J. M. (2015). Modulatory effects of propolis samples from Latin America (Brazil, Cuba and Mexico) on cytokine production by human monocytes. *J Pharm Pharmacol*, 67(10), 1431-1438. doi:10.1111/jphp.12431
- Czyzewska, U., Siemionow, K., Zareba, I., & Miltyk, W. (2016). Proapoptotic Activity of Propolis and Their Components on Human Tongue Squamous Cell Carcinoma Cell Line (CAL-27). *Plos One*, 11(6). doi:10.1371/journal.pone.0157091
- de Castro Ishida, V. F., Negri, G., Salatino, A., & Bandeir, M. F. C. L. (2011). A new type of Brazilian propolis: Prenylated benzophenones in propolis from Amazon and effects against cariogenic bacteria. *Food Chemistry*, 125(3), 966-972. doi:10.1016/j.foodchem.2010.09.089

- Dzivenu, O., Phil, D., & O'Donnell-Tormey, J. (2003). *Cancer and the Immune System: The Vital Connection*. New York: Cancer Research Institute.
- El-Refaei, M. F., & El-Naa, M. M. (2010). Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on mice bearing tumor involving angiostatic and apoptotic activities. *Chemico-Biological Interactions*, 186(2), 152-156. doi:10.1016/j.cbi.2010.04.019
- Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A., & Ab Wahab, M. S. (2014). Effects of Honey and Its Mechanisms of Action on the Development and Progression of Cancer. *Molecules*, 19(2), 2497-2522. doi:10.3390/molecules19022497
- Farré R, F. I., Sánchez A. (2004). Propolis and human health. *Ars Pharmaceutica*, 45:41; 21-43.
- Freires, I. A., de Alencar, S. M., & Rosalen, P. L. (2016). A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 110, 267-279. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.01.033>
- Gomez-Caravaca, A. M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., & Fernandez-Gutierrez, A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(4), 1220-1234. doi:10.1016/j.jpba.2006.03.002
- Graikou, K., Popova, M., Gortzi, O., Bankova, V., & Chinou, I. (2016). Characterization and biological evaluation of selected Mediterranean propolis samples. Is it a new type? *LWT - Food Science and Technology*, 65, 261-267. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.025>
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*, 140(6), 883-899. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>
- Gunduz, C., Biray, C., Kosova, B., Yilmaz, B., Eroglu, Z., Şahin, F., . . . Cogulu, O. (2005). Evaluation of Manisa propolis effect on leukemia cell line by telomerase activity. *Leukemia Research*, 29(11), 1343-1346. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2005.04.010>
- Gustafson, D.L., Duval, D., Regan, D., Thamm, D. (2018). Canine sarcomas as a surrogate for the human disease, *Pharmacology & Therapeutics*. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.01.012>
- Hanahan D., Weinberg R. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation, *Cell*, Volume 144, Issue 5: 646-674

- Heron, M. (2016). Deaths: Leading Causes for 2013. *National Vital Statistics Reports*, 65(2), 1-17.
- Huang, S., Zhang, C. P., Wang, K., Li, G. Q., & Hu, F. L. (2014). Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*, 19(12), 19610-19632. doi:10.3390/molecules191219610
- Instituto Nacional de Cancerología ESE. (2017). Análisis de la Situación del Cáncer en Colombia 2015. Primera edición. Bogotá DC: Instituto Nacional de Cancerología ESE. 1-133.
- Kasala, E. R., Bodduluru, L. N., Madana, R. M., Athira, K. V., Gogoi, R., & Barua, C. C. (2015). Chemopreventive and therapeutic potential of chrysin in cancer: mechanistic perspectives. *Toxicology Letters*, 233(2), 214-225. doi:10.1016/j.toxlet.2015.01.008
- Khacha-ananda, S., Tragoolpua, K., Chantawannakul, P., & Tragoolpua, Y. (2016). Propolis extracts from the northern region of Thailand suppress cancer cell growth through induction of apoptosis pathways. *Investigational New Drugs*, 34(6), 707-722. doi:10.1007/s10637-016-0392-1
- Khan, K. H., Blanco-Codesido, M., & Molife, L. R. (2014). Cancer therapeutics: Targeting the apoptotic pathway. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 90(3), 200-219. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.12.012>
- Laverde, J., Egea, L., Rodríguez, D., & Peña, J. (2010). Agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de las abejas y la apicultura en Colombia con énfasis en miel de abejas. In. Bogotá: MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL.
- Li, X., Wang, J. N., Huang, J. M., Xiong, X. K., Chen, M. F., Ong, C. N., . . . Yang, X. F. (2011). Chrysin promotes tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induced apoptosis in human cancer cell lines. *Toxicology in Vitro*, 25(3), 630-635. doi:10.1016/j.tiv.2010.12.013
- Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Lozano, R., et al. (2012). Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 380 (9859): 2095–2128. doi:10.1016/S0140-6736(12)61728-0
- Martínez, T. (2006). Diagnóstico de la actividad apícola y de la crianza de abejas en Colombia. In (pp. 121). Bogotá: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura IICA.

- Meneghelli, C., Joaquim, L. S. D., Félix, G. L. Q., Somensi, A., Tomazzoli, M., da Silva, D. A., . . . Maraschin, M. (2013). Southern Brazilian autumnal propolis shows anti-angiogenic activity: An in vitro and in vivo study. *Microvascular Research*, *88*, 1-11. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.mvr.2013.03.003>
- Menezes, J., Edraki, N., Kamat, S. P., Khoshneviszadeh, M., Kayani, Z., Mirzaei, H. H., . . . Firuzi, O. (2017). Long Chain Alkyl Esters of Hydroxycinnamic Acids as Promising Anticancer Agents: Selective Induction of Apoptosis in Cancer Cells. *J Agric Food Chem*, *65*(33), 7228-7239. doi:10.1021/acs.jafc.7b01388
- Moreno C. 2016. Analisis de situación de salud (ASIS) Colombia, 2016. Dirección de Epidemiología y Demografía. Imprenta Nacional de Colombia. Ministerio de Salud y Protección Social. Bogotá 163p.
- Motomura, M., Kwon, K. M., Suh, S.-J., Lee, Y.-C., Kim, Y.-K., Lee, I.-S., . . . Kim, C.-H. (2008). Propolis induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemic U937 cells through Bcl-2/Bax regulation. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *26*(1), 61-67. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2008.01.008>
- Natarajan, K., Singh, S., Burke Jr, T. R., Grunberger, D., & Aggarwal, B. B. (1996). Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(17), 9090-9095. doi:10.1073/pnas.93.17.9090
- Novak, E. M., Silva, M., Marcucci, M. C., Sawaya, A., Lopez, B. G. C., Fortes, M., . . . Maria, D. A. (2014). Antitumoural activity of Brazilian red propolis fraction enriched with xanthochymol and formononetin: An in vitro and in vivo study. *Journal of Functional Foods*, *11*, 91-102. doi:10.1016/j.jff.2014.09.008
- Olczyk, P., Komosinska-Vassev, K., Wisowski, G., Mencner, L., Stojko, J., & Kozma, E. M. (2014). Propolis modulates fibronectin expression in the matrix of thermal injury. *Biomed Res Int*, *2014*, 748101. doi:10.1155/2014/748101
- Oršolić, N., & Bašić, I. (2003). Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. *Journal of Ethnopharmacology*, *84*(2-3), 265-273. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00329-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00329-X)
- Oršolić, N., Knežević, A. H., Šver, L., Terzić, S., & Bašić, I. (2004). Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, *94*(2-3), 307-315. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2004.06.006>

- Orsolíć N, Saranović AB, Basić I. (2006). Direct and indirect mechanism(s) of antitumour activity of propolis and its polyphenolic compounds. *Planta Med.* 72(1):20-7.
- Palomino, L. (2009). Caracterización Físicoquímica y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos de Antioquia. In *Tesis de Maestría*. Antioquia, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Premratanachai, P., & Chanchao, C. (2014). Review of the anticancer activities of bee products. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(5), 337-344. doi:<http://dx.doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C1262>
- Rajendran, P., Rengarajan, T., Nandakumar, N., Palaniswami, R., Nishigaki, Y., & Nishigaki, I. (2014). Kaempferol, a potential cytostatic and cure for inflammatory disorders. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 86, 103-112. doi:10.1016/j.ejmech.2014.08.011
- Ranieri, G., Gadaleta, C. D., Patruno, R., Zizzo, N., Daidone, M. G., Hansson, M. G., . . . Ribatti, D. (2013). A model of study for human cancer: Spontaneous occurring tumors in dogs. Biological features and translation for new anticancer therapies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 88(1), 187-197. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.03.005>
- Rizk, S. M., Zaki, H. F., & Mina, M. A. M. (2014). Propolis Attenuates Doxorubicin-Induced Testicular Toxicity in Rats. *Food and Chemical Toxicology*, 67, 176-186. doi:10.1016/j.fct.2014.02.031
- Royall, J. A., & Ischiropoulos, H. (1993). Evaluation of 2',7'-Dichlorofluorescein and Dihydrorhodamine 123 as Fluorescent Probes for Intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Cultured Endothelial Cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 302(2), 348-355. doi:10.1006/abbi.1993.1222
- Rushdi, A. I., Adgaba, N., Bayaqoob, N. I., Al-Khazim, A., Simoneit, B. I., El-Mubarak, A. H., & Al-Mutlaq, K. F. (2014). Characteristics and chemical compositions of propolis from Ethiopia. *Springerplus*, 3, 253. doi:10.1186/2193-1801-3-253
- Salamanca, G. 2017. Origen, naturaleza, propiedades físicoquímicas y de valor terapéutico del propóleo. Sello editorial Universidad del Tolima. Ibagué, Colombia, 360p.
- Sawicka, D., Car, H., Borawska, M. H., & Niklinski, J. (2012). The anticancer activity of propolis. *Folia Histochemica Et Cytobiologica*, 50(1), 25-37. doi:10.5603/fhc.2012.0004
- Seda Vatansever, H., Sorkun, K., İsmet Deliloğlu Gurhan, S., Ozdal-Kurt, F., Turkoz, E., Gencay, O., & Salih, B. (2010). Propolis from Turkey induces apoptosis through

- activating caspases in human breast carcinoma cell lines. *Acta Histochemica*, 112(6), 546-556. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2009.06.001>
- Sforcin, J. M., & Bankova, V. (2011). Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2), 253-260. doi:10.1016/j.jep.2010.10.032
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. *Journal of Functional Foods*, 18, 820-897. doi:10.1016/j.jff.2015.06.018
- Shashi, B., Jaswant, S., Madhusudana, R. J., Kumar, S. A., & Nabi, Q. G. (2006). A novel lignan composition from Cedrus deodara induces apoptosis and early nitric oxide generation in human leukemia Molt-4 and HL-60 cells. *Nitric Oxide*, 14(1), 72-88. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2005.09.009>
- Silva-Carvalho, R., Miranda-Goncalves, V., Ferreira, A. M., Cardoso, S. M., Sobral, A., Almeida-Aguiar, C., & Baltazar, F. (2014). Antitumoural and antiangiogenic activity of Portuguese propolis in in vitro and in vivo models. *Journal of Functional Foods*, 11, 160-171. doi:10.1016/j.jff.2014.09.009
- Simpson, S., Dunning, M. D., de Brot, S., Grau-Roma, L., Mongan, N. P., & Rutland, C. S. (2017). Comparative review of human and canine osteosarcoma: morphology, epidemiology, prognosis, treatment and genetics. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 59, 71. <http://doi.org/10.1186/s13028-017-0341-9>
- Sönmez, M. F., Çilenk, K. T., Karabulut, D., Ünalmiş, S., Deligönül, E., Öztürk, İ., & Kaymak, E. (2016). Protective effects of propolis on methotrexate-induced testis injury in rat. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 79, 44-51. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.02.002>
- Sulaiman, G. M., Ad'hiah, A. H., Al-Sammarrae, K. W., Bagnati, R., Frapolli, R., Bello, E., . . . D'Incalci, M. (2012). Assessing the anti-tumour properties of Iraqi propolis in vitro and in vivo. *Food and Chemical Toxicology*, 50(5), 1632-1641. doi:10.1016/j.fct.2012.01.022
- Szliszka, E., Sokol-Letowska, A., Kucharska, A. Z., Jaworska, D., Czuba, Z. P., & Krol, W. (2013). Ethanolic Extract of Polish Propolis: Chemical Composition and TRAIL-R2 Death Receptor Targeting Apoptotic Activity against Prostate Cancer Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. doi:10.1155/2013/757628

- Talero, C., Hernández, D., & Figueroa, J. (2012). Calidad microbiológica de propóleo crudo y sólidos solubles de extractos de propóleos de *Apis mellifera* en Colombia. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia en Colombia*, 59(2), 109-118.
- Tu, B., Du, L., Fan, Q.-M., Tang, Z., & Tang, T.-T. (2012). STAT3 activation by IL-6 from mesenchymal stem cells promotes the proliferation and metastasis of osteosarcoma. *Cancer Letters*, 325(1), 80-88. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.06.006>
- Valenzuela-Barra, G., Castro, C., Figueroa, C., Barriga, A., Silva, X., de las Heras, B., . . . Delporte, C. (2015). Anti-inflammatory activity and phenolic profile of propolis from two locations in Región Metropolitana de Santiago, Chile. *Journal of Ethnopharmacology*, 168, 37-44. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.03.050>
- Viloria J., G. J., Durango D., and García C. (2012). Caracterización físico química del propóleo de la región del Bajo Cauca Antioqueño (antioquia, Colombia). *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10(1), 77-86.
- Watanabe, M. A. E., Amarante, M. K., Conti, B. J., & Sforcin, J. M. (2011). Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63(11), 1378-1386. doi:10.1111/j.2042-7158.2011.01331.x
- Wu, J., Omene, C., Karkoszka, J., Bosland, M., Eckard, J., Klein, C. B., & Frenkel, K. (2011). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), derived from a honeybee product propolis, exhibits a diversity of anti-tumor effects in pre-clinical models of human breast cancer. *Cancer Letters*, 308(1), 43-53. doi:10.1016/j.canlet.2011.04.012
- Xuan, H. Z., Li, Z., Yan, H. Y., Sang, Q., Wang, K., He, Q. T., . . . Hu, F. L. (2014). Antitumor Activity of Chinese Propolis in Human Breast Cancer MCF-7 and MDA-MB-231 Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. doi:10.1155/2014/280120
- Xuan, H. Z., Zhang, J. H., Wang, Y. H., Fu, C. L., & Zhang, W. (2016). Anti-tumor activity evaluation of novel chrysin-organotin compound in MCF-7 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26(2), 570-574. doi:10.1016/j.bmcl.2015.11.072
- Yaacoub, K., Pedeux, R., Tarte, K., & Guillaudeux, T. (2016). Role of the tumor microenvironment in regulating apoptosis and cancer progression. *Cancer Letters*, 378(2), 150-159. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2016.05.012>
- Yan, H., Wang, X. B., Niu, J. F., Wang, Y. Q., Wang, P., & Liu, Q. H. (2014). Anti-Cancer Effect and the Underlying Mechanisms of Gypenosides on Human Colorectal Cancer SW-480 Cells. *Plos One*, 9(4). doi:10.1371/journal.pone.0095609



- Yang, X. H., Wang, S., Mu, Y. C., & Zheng, Y. X. (2016). Schisandrin B inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human cholangiocarcinoma cells. *Oncology Reports*, 36(4), 1799-1806. doi:10.3892/or.2016.4992
- Zhu, L. P., Luo, Q. Q., Bi, J. J., Ding, J. Y., Ge, S. F., & Chen, F. X. (2014). Galangin inhibits growth of human head and neck squamous carcinoma cells in vitro and in vivo. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 149-156. doi:10.1016/j.cbi.2014.10.027