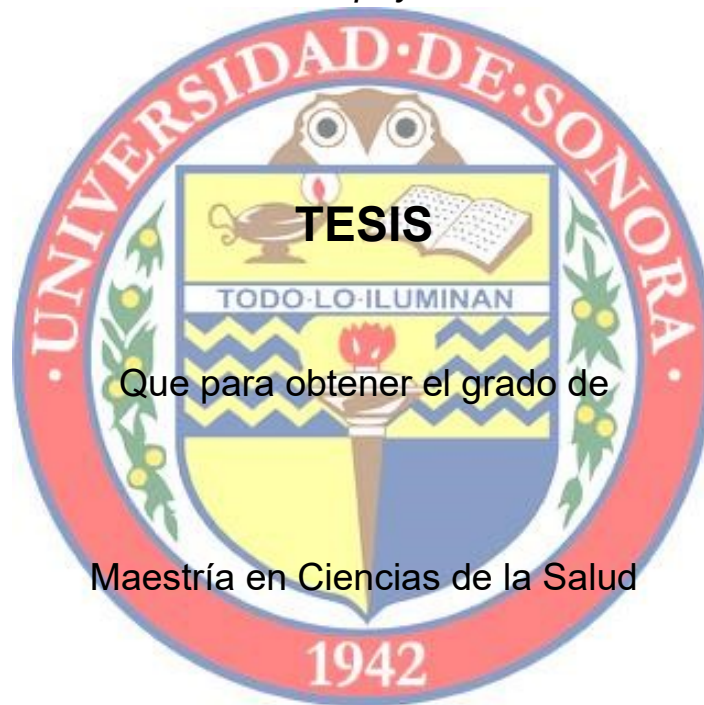


UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

“Determinación de los mecanismos moleculares de compuestos con actividad antiproliferativa aislados de la resina de *Bursera microphylla*”



Que para obtener el grado de
Maestría en Ciencias de la Salud

Presenta

Francisco Humberto González Gutiérrez

Hermosillo, Sonora

Septiembre de 2017

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

Agradecemos el apoyo económico para la realización de este trabajo de tesis al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto: “Identificación y caracterización química y biológica de compuestos con actividad anticancerígena de plantas de la etnofarmacopea sonoreNSE” (Clave Conacyt 83462).

DEDICATORIAS

Dedico mi trabajo a toda **mi familia** en especial a mi **Madre y Abuela**; por siempre apoyarme incondicionalmente y estar presente en todos los momentos de mi vida.

“La familia es la brújula que nos guía. Son la inspiración para llegar a grandes alturas y nuestro consuelo cuando ocasionalmente fallamos”.

Brad Henry.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primera instancia a Dios por permitirme realizar una etapa más en mi vida profesional. A mi familia gracias por su apoyo y comprensión durante este tiempo, a los consejos y momentos de alegría que me brindaban para poder salir adelante en mis estudios.

Agradezco a mi director de tesis Dr. Ramón Robles por su apoyo y confianza brindada en estos dos años de trabajo; a mis sinodales Dra. Luisa Rascón; Dra. Olivia Antelo y Dr. Sergio Medina; por sus consejos y apoyo brindado; ser un ejemplo a seguir y convertirse en mis grandes maestros.

*“Un maestro es una brújula que activa los imanes de la curiosidad,
conocimiento y sabiduría en sus pupilos”*

Ever Garrison.

A mis Amigos, les doy las gracias por siempre estar ahí para darme sus consejos y ánimos.

*“Si quieréis formar juicio acerca de un hombre, observad quiénes son sus
amigos.”*

Fénelon.

“Vive como si fueras a morir mañana. Aprende como si fueras a vivir siempre.”

Mahatma Gandhi.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABLAS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
OBJETIVOS	IX
Objetivo general	IX
Objetivos particulares	IX
RESUMEN	X
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Cáncer	3
Causas y proceso del cáncer	3
Estadísticas	4
Mecanismos de Inducción de Apoptosis	6
Caspasas	7
Ruta intrínseca de apoptosis o Vía Mitocondrial	8
Ruta extrínseca de apoptosis	9
Tratamientos Contra el Cáncer	12
<i>Bursera microphylla</i>	13
Terpenos	17
MATERIALES Y MÉTODOS	20
Moléculas	20
Línea celular	20
Eventos Apoptóticos	22
Fosfatidilserina	22
Potencial de Membrana Mitocondrial	23
Activación de las Caspasas	23
Arresto Celular	24

	Página
Análisis Estadístico	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
Eventos Apoptóticos	25
Potencial de Membrana Mitocondrial	29
Activación de las Caspasas	32
Arresto Celular	37
Mecanismo de inducción de apoptosis	39
CONCLUSIONES	41
RECOMENDACIONES	42
BIBLIOGRAFÍA	43
ANEXOS	48

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Compuestos de la resina de <i>Bursera microphylla</i> y su actividad antiproliferativa	16

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Proceso de carcinogénesis	5
2	Vías de apoptosis intrínseca e extrínseca	11
3	<i>Bursera microphylla</i>	15
4	Principales rutas de inducción de apoptosis por terpenos y derivados	19
5	Compuestos aislados de la resina de <i>Bursera microphylla</i>	21
6	Externalización de la fosfatidilserina en células A549 tratadas con los compuestos aislados de la resina de <i>B. microphylla</i> externalización.	26
7	Porcentajes de células apoptóticas inducidas por el tratamiento con compuestos aislados de <i>B. microphylla</i>	28
8	Despolarización del potencial de membrana mitocondrial en células A549 tratadas con compuestos aislados de resina de <i>B. microphylla</i>	31
9	Actividad de la caspasa-3 en la línea A549 tratadas con compuestos aislados de resina de <i>B. microphylla</i> .	34
10	Actividad de la caspasa-8 en la línea A549 tratadas con compuestos aislados de resina de <i>B. microphylla</i> .	35
11	Actividad de la caspasa-9 en la línea A549 tratadas con compuestos aislados de resina de <i>B. microphylla</i> .	36
12	Detención del ciclo celular en células A549 tratadas con compuestos aislados de resina de <i>B. microphylla</i> .	38
13	Mecanismo propuesto de inducción de apoptosis por los compuestos extraídos de la resina de <i>Bursera microphylla</i> .	40

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar los mecanismos moleculares de muerte celular inducidos por compuestos derivados de la resina de *Bursera microphylla* que presentan actividad antiproliferativa en la línea celular A549.

Objetivos Particulares

- Determinar el tipo de muerte celular inducida por compuestos malabaricatrienol, acetato de dihidroclusina, β -cariofileno, ariensina, microfilanina y ácido betulónico extraídos de la resina de *Bursera microphylla*.
- Determinar el arresto celular inducido por compuestos extraídos de la resina de *Bursera microphylla*.
- Determinar la vía de apoptosis inducida por compuestos extraídos de la resina de *Bursera microphylla*.

RESUMEN

El cáncer de pulmón es la principal causa de mortalidad relacionada con el cáncer en todo el mundo. Debido a la baja eficacia terapéutica y los efectos secundarios graves de los fármacos quimioterapéuticos actuales, la investigación reciente sobre el cáncer se ha centrado en la posibilidad de encontrar nuevos fármacos que nos ayuden a mejorar la calidad de vida de los pacientes con cáncer y logren superar este mal. Estudios en la composición de la resina de *Bursera microphylla* mostraron la presencia de varios terpenoides y lignanos. Algunos de estos compuestos demostraron ser activos contra diferentes líneas celulares de cáncer. En este trabajo se estudió el mecanismo implicado en la actividad antiproliferativa de los compuestos malabaricatrienol, acetato de dihidroclusina, β -cariofileno, ariensina, microfilanina y ácido betulónico aislados de la resina de *B. microphylla*. La actividad apoptótica se determinó por tinción con anexina V y yoduro de propidio (PI). La despolarización del potencial de membrana mitocondrial se midió usando JC-1. La actividad de las caspasas se midió usando tinción con anticuerpo de caspasa activa. La detención celular se evaluó mediante la cuantificación de ADN por medio de tinción con PI. Los compuestos malabaricatrienol, acetato de dihidroclusina, β -cariofileno, ariensina, microfilanina y ácido betulónico indujeron apoptosis en la línea celular A549 en un 30%; 25%, 10.5%, 10.5% 2% y 4% respectivamente; al igual que demostraron inducir la por pérdida de potencial de membrana mitocondrial de hasta 96% por tratamiento con malabaricatrienol y diacetato de dihidroclusina, activación de las caspasas-3 (3.1 veces respecto al control), -8 (2.3 veces respecto al control) y -9 (2.5 veces respecto al control) por parte de diacetato de dihidroclusina e interrupción del ciclo celular en fase G2/M por β -cariofileno y fase S por diacetato de dihidroclusina. Los resultados obtenidos en el presente estudio revelaron que los compuestos aislados de la

resina de *B. microphylla* generaron la muerte celular por un proceso de apoptosis que es dependiente de caspasas y fue activo, preferentemente, por vía mitocondrial.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón o carcinoma broncopulmonar es la principal causa de muerte por cáncer en todo el mundo (Siegel y col., 2013). La mayoría de los cánceres de pulmón pertenecen a cáncer de pulmón de células pequeñas (80% de todos los cánceres de pulmón) (NSCLC) (Nagappan y col., 2016). La tasa de supervivencia de los pacientes con NSCLC es pobre, más del 85% de los pacientes sucumben a la enfermedad dentro de los primeros 5 años después del diagnóstico esto debido a la baja eficacia terapéutica y efectos secundarios ocasionados por fármacos quimioterapéuticos actuales. En este contexto, la investigación reciente sobre el cáncer se ha centrado en la posibilidad de encontrar nuevos medicamentos de origen natural (plantas, microorganismos, etc.) (Lin y col., 2016 y Nagappan y col., 2016).

Bursera microphylla A. Gray (Burseraceae), comúnmente conocido como "árbol de elefante" o "Torote blanco", se distribuye ampliamente en el desierto de Sonora en México. Es utilizada por la etnia "Seri" para el tratamiento de varias enfermedades, tales como dolor de garganta, dolor de cabeza, y para la curación de heridas; usando diferentes partes de la planta. Se ha reportado que las resinas *Bursera microphylla* están constituidas principalmente por lignanos y terpenoides (malabaricatrienol, diacetato de dihidroclusina, β -cariofileno, ariensina, microfilanina y ácido betulónico); los cuales demostraron ser activos frente a diferentes líneas celulares de cáncer (Messina y col., 2015). Sin embargo, el proceso molecular, por el cual, estas sustancias inducen su efecto antiproliferativo aún es desconocido.

Las células pueden morir por tres principales procesos, la apoptosis, la necrosis y la autofagia (Boroda y col., 2016). La apoptosis es uno de los procesos de muerte celular mejor caracterizado y es muy importante en el tratamiento del cáncer, ya que es un proceso celular altamente organizado y evolutivamente conservado que se produce en condiciones fisiológicas normales y es acompañada por la expresión de genes de *novo*, de las caspasas y otras enzimas

responsable de la muerte controlada de las células (Boroda y col., 2016). El desarrollo de nuevas estrategias para activar la apoptosis, específicamente en células cancerosas sería valiosa para el tratamiento de diversos tipos de cáncer (Zhang y col., 2016). Dado que los programas apoptóticos pueden ser manipuladas para producir cambios masivos en la muerte celular, los genes y las proteínas que controlan la apoptosis son objetivos potenciales para fármacos contra el cáncer. Por lo tanto, hay un creciente interés en la identificación de nuevos fármacos con propiedades inductoras de apoptosis en cánceres de diversos orígenes (Rascón y col., 2015 a).

El objetivo del trabajo fue determinar los mecanismos moleculares de los compuestos aislados de la resina de *B. microphylla* que mostraron actividad antiproliferativa en la línea celular A549.

ANTECEDENTES

Cáncer

Causas y Proceso del Cáncer

El cáncer es un padecimiento que presenta como consecuencia del crecimiento descontrolado de las células al alterarse los mecanismos de división y muerte celular, lo que genera el desarrollo de tumores o masas anormales, las cuales se pueden presentar en cualquier parte del organismo, dando lugar a más de 100 tipos de cáncer que se denominan según la zona de desarrollo, por ejemplo: cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de colon, tumor cerebral, etc. (INEGI, 2017).

La OMS reporta que las principales causas de cáncer entre la población mundial son: tabaquismo, índice de masa corporal elevado, falta de actividad física, alcoholismo e infecciones oncogénicas (OMS, 2017), mientras que Reynoso (2015) publicó que las principales causas del cáncer en México son: tabaquismo, alcoholismo, sobrepeso y falta de actividad física.

Independientemente del tipo de causa, el proceso por el cual se desarrolla el cáncer es llamado “carcinogénesis” y consta de cuatro etapas (figura 1). La primera etapa es la iniciación, en ella una célula normal se ve sujeta a diversas clases de estrés interno y externo que provocan daños en su código genético. Una vez iniciadas, las células retiran la estrecha comunicación con sus vecinas y pierden los controles regulatorios de su comunidad, proliferando con ayuda de agentes promotores en su entorno (hormonas, procesos inflamatorios) y dividiéndose a una velocidad ligeramente superior a la normal, lo que constituye la fase de promoción. En cierto momento, las inestabilidades genéticas heredadas de generación en generación finalmente dan como resultado una célula capaz de autoestimularse y es cuando nace una célula cancerosa, fenómeno correspondiente a la fase de transformación. Esta célula cancerosa, entonces, se

divide descontroladamente generando descendientes que desarrollan características malignas, como la capacidad de invadir y diseminarse a otros tejidos; además adquieren otras propiedades que aseguran su supervivencia, como la capacidad para evadir al sistema inmune, para mutar cuando se enfrenten a condiciones adversas e inducir el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. Esto marca la cuarta etapa, la progresión (Rascón, 2015a). Debido a esto la cifra de defunciones por cáncer a nivel mundial aumentan cada año.

Estadísticas

Una de las enfermedades de mayor incidencia en la población mundial es el cáncer (INEGI, 2017) los últimos datos reportados señalan que en el 2012 hubo aproximadamente 14 millones de casos nuevos y 8.2 millones de defunciones por esta causa. África, Asia, América Central y Sudamérica concentran más del 60% de los casos nuevos y el 70% de las defunciones por cáncer (OMS, 2017). La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta en el 2012 que los tipos de cáncer diagnosticados con mayor frecuencia son los de pulmón, hígado, estómago, colon-recto, mama y esófago (OMS, 2017). El impacto económico del cáncer es sustancial y va en aumento, según las estimaciones, el costo total atribuible a la enfermedad en 2010 ascendió a US\$ 1,16 mil millones (OMS, 2017).

En México se estima que existen 698,908 casos de cáncer y se estima que para el 2020 se duplique el número de casos (Reynoso y col., 2015) además es considerada como una de las principales causas de muerte en el país. En 2012, las principales neoplasias entre la población masculina mexicana se ubicaron en órganos digestivos (25.4%); órganos genitales (11.5%) y órganos hematopoyéticos (9.9%); mientras que en mujeres se ubican en mama (30.8%); órganos genitales (16.5%) y órganos digestivos (13.8%) (INEGI, 2017).

Entre los tipos de canceres, el de pulmón es el más común llegando a representar alrededor del 14% de los nuevos diagnósticos de cáncer (American Cancer Societ, 2017). La cuarta parte de las muertes por cáncer son de cáncer de

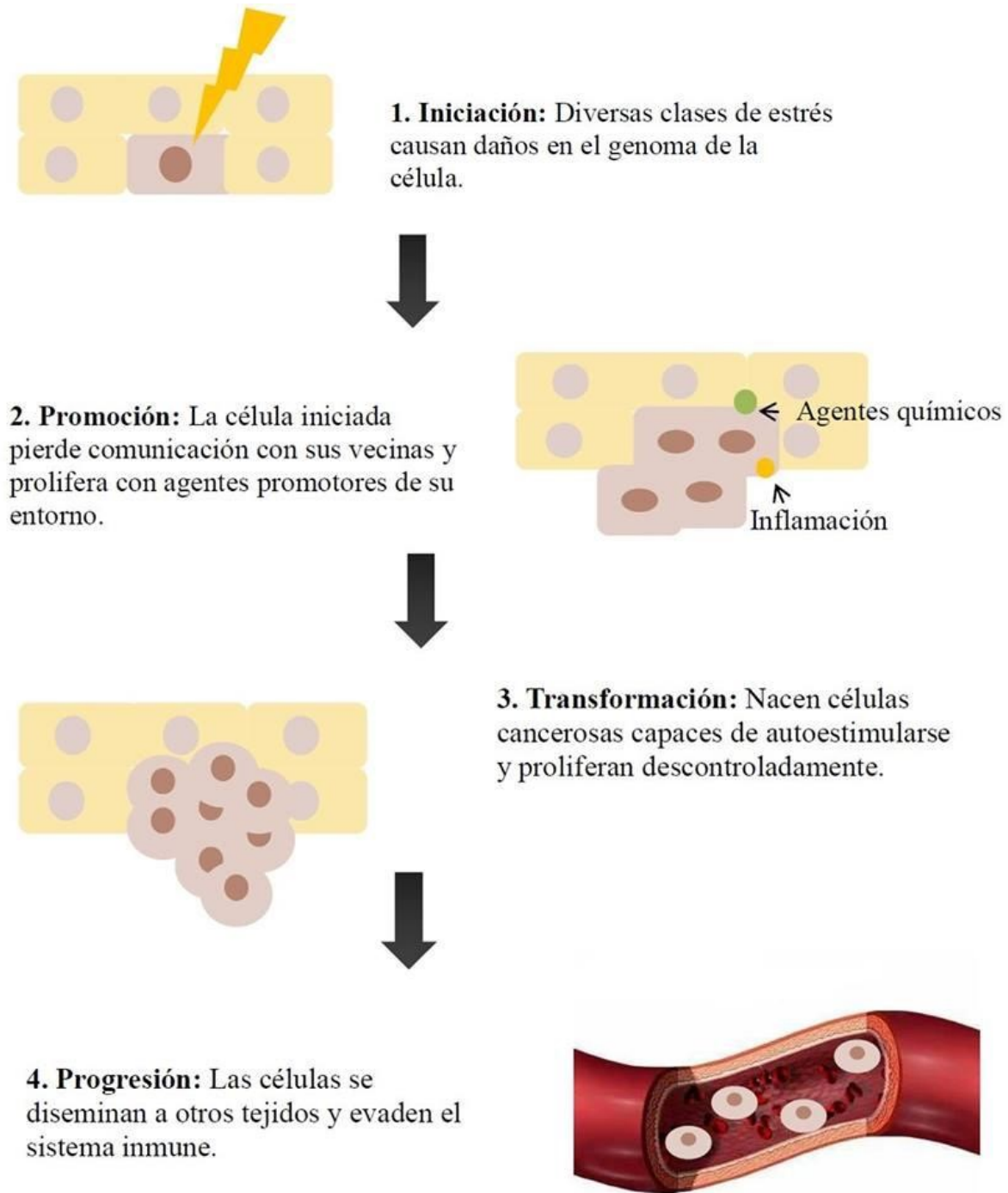


Figura 1.- Proceso de carcinogénesis (Rascón, 2015a).

pulmón, principalmente ocurre en las personas de edad avanzada, dos tercios de los diagnosticados son mayores de 65 años (American Cancer Society, 2017).

Mecanismos de Regulación de la Apoptosis

En todo organismo multicelular debe existir un equilibrio entre la proliferación y la muerte celular que lo componen (homeostasis). La alteración de este equilibrio conduce a situaciones patológicas; como el cáncer, cuando la proliferación se encuentra aumentada, o las enfermedades degenerativas, cuando los procesos de muerte celular están incrementados (Jordán, 2003). La forma para llevar a cabo la muerte de las células deterioradas o células que ya no son necesarias es la apoptosis.

La apoptosis es uno de los procesos de muerte celular más altamente regulados en el desarrollo normal y la homeostasis de organismos multicelulares (Lu y col., 2016) está involucrada en el desarrollo embrionario, respuesta inmune, regeneración celular entre muchos otros procesos (Reyes, 2007). Existen otros casos en que la célula normal activa la apoptosis en respuesta a una posible patología, como por ejemplo, errores en la duplicación del material genético durante la mitosis. Toda célula posee la maquinaria necesaria para activar la muerte celular programada en caso de requerirse, ya que la desregularización de apoptosis está implicada en procesos de progresión de células cancerígenas (Reyes, 2007).

La apoptosis está caracterizada por distintos cambios morfológicos, que incluyen condensación de la cromatina y fragmentación nuclear (*pyknosis*), pliegues en la membrana plasmática, desensamble del citoesqueleto y contracción celular que eventualmente llevarán a la célula a fragmentarse en pequeños cuerpos rodeados de membrana (conocidos como cuerpos apoptóticos), los cuales son eliminados por fagocitosis, sin iniciar una respuesta inflamatoria. La liberación de los cuerpos apoptóticos inspiró el término de “apoptosis” (Rojas y col. 2009).

La activación y ejecución de la apoptosis, a nivel molecular, depende de la activación de las rutas extrínseca e intrínseca de muerte celular. El evento común en el punto final de ambas vías es la activación de un conjunto de proteínas cisteína proteasas también llamadas caspasas. A continuación se exponen los principales procesos de dichas rutas. A continuación se exponen los principales procesos de dichas rutas.

Caspasas

En la activación de la muerte celular programada o apoptosis las enzimas llamadas cisteinil-aspartato proteasas (caspasas) son de suma importancia, ya que desencadenan cascadas de señalización que finalizan en la muerte regulada de la célula causando un daño mínimo a los tejidos circundantes, conservando así la homeostasis (Fernald y Kurokawa, 2013).

Estas se pueden agrupar en dos diferentes grupos las caspasas iniciadoras y las caspasas efectoras: las caspasas iniciadoras (Caspasa-8, -9 y -10) poseen un dominio de muerte (DED) o un dominio de incorporación de caspasas (CARD); los cuales cumplen la función de interactuar con moléculas adaptadoras como la proteína FADD (proteína Fas asociada a dominio de muerte) caso de la caspasa-8 y -10; o Apaf-1 (factor 1 activador de proteasas apoptóticas) para el caso de la caspasa-9 promoviendo la activación en cascada de las demás caspasas efectoras. Las caspasas efectoras (caspasas-3, -6, -7) que llevarán a cabo la desintegración celular no poseen estos dominios (Reyes, 2007). Las caspasas iniciadoras se activan automáticamente por homodimerización sin la necesidad que se lleve a cabo la proteólisis, mientras que las caspasas efectoras son activadas por la proteólisis de sus zimógenos, a través de las caspasas iniciadoras. Algunas de las dianas finales de las caspasas efectoras influyen en los distintos procesos celulares de la apoptosis, como son la deformación y pérdida del volumen celular, desorganización de la membrana citoplasmática,

condensación cromosómica, fragmentación del DNA, ciclo celular y estabilización del proceso de apoptosis (Reyes, 2007).

Ruta Intrínseca de Apoptosis o Vía Mitocondrial

Entender los mecanismos de la regulación de la apoptosis es crucial y permite entender la patogénesis de su descontrol. Esto, a su vez, genera nuevos campos de acción para terapias biodirigidas. La apoptosis se produce a través de dos vías fundamentales: extrínseca e intrínseca. La ruta intrínseca de activación de apoptosis puede ser iniciada por diversos estímulos entre los que se incluyen: agentes quimioterapéuticos, radiación ultravioleta (UV), moléculas propias del estrés oxidativo ROS y NOs (especies reactivas de oxígeno y nitrógeno respectivamente), liberación de Ca^{+2} del retículo endoplasmático, así como daños en el DNA y ausencia de estímulos de crecimiento (Rascón 2015, Reyes 2007). Cuando se estimulan las mitocondrias, el citocromo C se libera en el citoplasma para activar caspasas (por ejemplo, caspasa-9 y caspasa-3), causando apoptosis intrínseca dependiente de caspasa (Lu y col. 2016).

Esta vía de apoptosis es controlada principalmente por la familia de proteínas Bcl-2, estas al activarse por los daños en la célula activan a las proteínas de la familia Bcl-2 pro-apoptóticas (Bax, Bak, etc.) las cuales a su vez inducen el declive de proteínas de la familia de Bcl-2 antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-x_L) (Rojas, 2009, Reyes, 2007). Este aumento de proteínas de la familia Bcl-2 pro-apoptóticas inicia la despolarización de la membrana mitocondrial generando la liberación de factores mitocondriales que activan a las caspasas en el citosol. El más importante de estos factores es el citocromo c el cual fomenta la formación del apoptosoma, en conjunto con Apaf-1 (proteína factor 1 activador de la proteasa apoptótica), ATP y procaspasa-9, lo cual conlleva a la activación de la caspasa-9, la cual es la clave en esta vía, ya que inicia la activación de la cascada de activación de caspasas ejecutoras como lo son la -3, -6 y -7 (figura 2) llevando a la célula a la muerte celular por fragmentación nuclear (Rascón 2015, Reyes 2007).

Ruta Extrínseca de Apoptosis

Los receptores de muerte celular, localizados preferentemente en la membrana citoplasmática, reciben continuamente señales desde el exterior. Los receptores que participan en los procesos de muerte celular se pueden clasificar en dos grupos: aquellos cuya activación siempre conduce a la muerte de la célula, conocidos como “receptores de muerte” (receptor FAS y TNF) y los que desempeñan una función fisiológica, pero la sobreactivación puede conducir también a la muerte (receptores de glutamato, de trombina y canales iónicos dependientes de voltaje) (Jordán, 2003).

La vía extrínseca se procesa mediante la combinación de ligandos de muerte y receptores, tales como el receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNF-R1) y sus ligandos afines (TNF- α). La unión ligando/receptor induce el reclutamiento de varias proteínas adaptadoras y proenzimas, que activan las caspasas, resultando en última instancia en muerte celular apoptótica (Lu y col., 2016). Las señales se transmiten clásicamente por receptores de muerte celular, este tipo de receptores, pertenecen a las familias: CD95/Fas, TRAILRs/DR4 o DR5 (death receptor), TNFRs (tumor necrosis factor receptors) y NGFRs (nerve growth factor receptors) (Rojas 2007). La unión de los receptores con sus ligandos de muerte conduce a la formación de un complejo homotrimétrico mínimo ligando-receptor, que seguidamente recluta factores citosólicos, tales como FADD (Fas-associated protein with death domain) y caspasa-8, formando al complejo DISC (complejo señalador de inducción de muerte), la caspasa-8 es la clave de esta vía al activar posteriormente a las caspasas -3, -6 y -7 (Rojas y col., 2009) (figura 2).

La ruta de apoptosis de CD95/FAS se activa cuando se le une su ligando específico induciendo su trimerización. El dominio DD de FAS recluta la proteína adaptadora proteína FAS asociada al dominio de muerte (FADD), la cual contiene un dominio de efector de muerte DED (death effector domain). FADD mediante

interacciones proteína–proteína incorpora y activa a las procaspasas-8 y -10, figura 2 (Reyes, 2007).

Los receptores TNFRs, pueden activar la inflamación, a través de la ruta Ikk, como la apoptosis a través de la ruta mediada por JNK y de la inducción de caspasa-8 (Reyes, 2007). Tras la interacción con su ligando el receptor TNFR1 se une a TRADD, complejo que une a los adaptadores secundarios: RIP1 (receptor interaction protein), TRAF2 y TRAF5, los cuales activan al complejo IKK, que a su vez activa a NFk- β (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas). Por otra parte, contiene un dominio DD pudiendo de esta manera activar simultáneamente la ruta de inducción de apoptosis a través de la caspasas-8 (Reyes, 2007). La interacción de TNFR2 se une directamente a TRAF2 lo que de esta manera podría inducir la activación de la apoptosis celular (Reyes, 2007).

Las vías de apoptosis intrínseca y extrínseca no son mutuamente excluyentes, ya que moléculas de una vía pueden influenciar en la activación de moléculas de la otra vía (Rascón, 2015a).

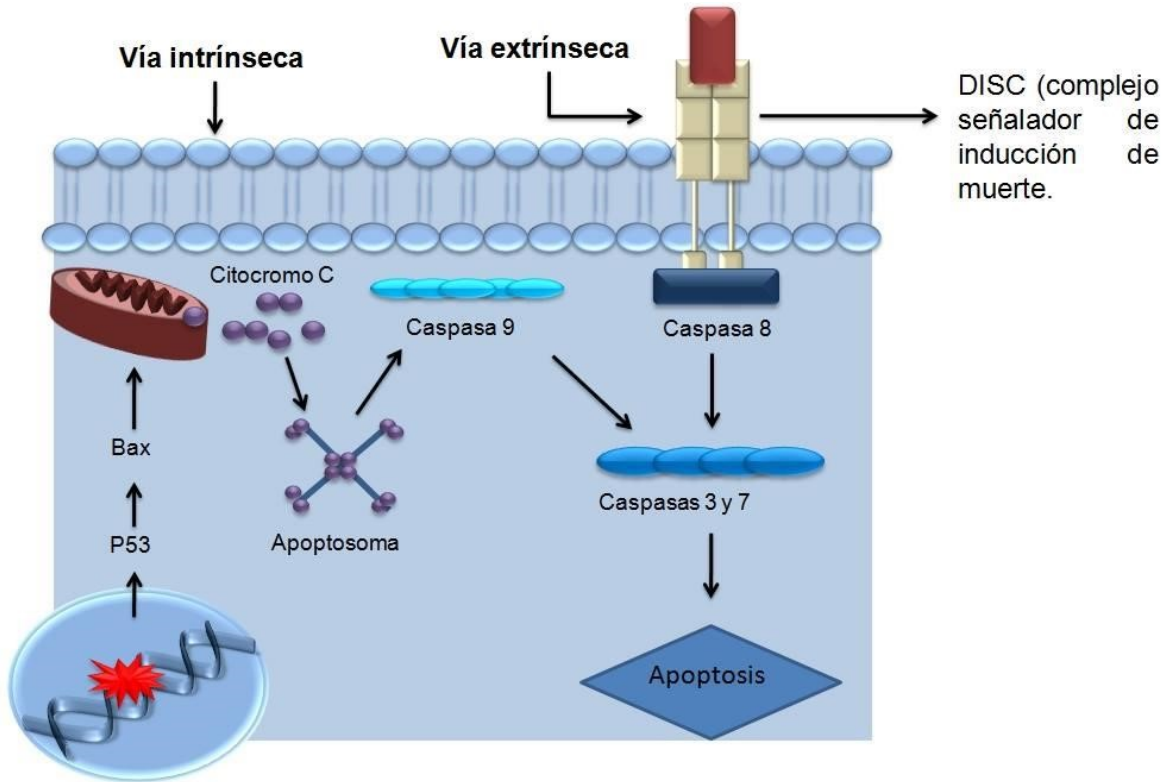


Figura 2. Vías de apoptosis intrínseca y extrínseca. Vía intrínseca: daño en el DNA, activación de p53, bax y despolarización de mitocondria; salida de citocromo c, activación de apoptosoma y activación de la cascada de señalización de caspasas (caspasa-9,-3 y -7). Vía extrínseca: unión receptor-ligando, reclutamiento de caspasa-8 y activación de señalización de caspasa (caspasa-3 y -7) (Rojas y col. 2009).

Tratamientos contra el Cáncer

En México, como en muchos otros países, el cáncer representa un problema de salud pública. La mayoría de los casos se diagnostican en etapas avanzadas para las cuales no existen tratamientos con fines curativos; y pese a que existen notables avances en el conocimiento de factores de riesgo, fisiopatología, alteraciones genéticas y tratamiento de quimioterapia citotóxica, así como el desarrollo de nuevas terapias blanco, el beneficio alcanzado en términos de supervivencia a largo plazo es poco satisfactorio (Arrieta; 2013), debido a que se calcula que en las siguientes dos décadas los casos nuevos de cáncer aumenten 70% (OMS, 2017), las acciones para su prevención y tratamiento han cobrado especial relevancia en los sistemas de salud, ya que al tratarse de una enfermedad crónico-degenerativa, los costos de la lucha contra esta patología son muy altos (INEGI, 2017).

La quimioterapia y radioterapia son los tratamientos convencionales utilizados hoy en día para el tratamiento del cáncer; sin embargo, son caros y causan efectos secundarios, incluyendo desde vómito, alopecia, diarrea, y constipación hasta mielosupresión y toxicidad neurológica, cardíaca, pulmonar y renal. Todos estos efectos secundarios reducen la calidad de vida de los pacientes, lo cual acelera el progreso del cáncer y complicaciones asociadas. Además, muchos de estos tratamientos presentan actividad anticancerígena limitada (Castro y col., 2011). Por otro lado, los procedimientos quirúrgicos, asociados al cáncer, causan deficiencias funcionales. Por tal razón, es necesaria la búsqueda de drogas anticancerígenas alternativas que superen los inconvenientes de las drogas actualmente en uso (Rascón, 2015).

En los últimos años el interés por las plantas medicinales se ha incrementado en los recolectores, productores, industrias farmacéuticas y consumidores (Juárez y col, 2013). En la búsqueda de nuevos agentes anticancerígenos los productos naturales se postulan como una alternativa adecuada. Evidencia de lo anterior es que más del 60% de las drogas usadas

actualmente contra el cáncer, son derivadas de una u otra forma de fuentes naturales, incluyendo plantas, organismos marinos y microorganismos. Sin embargo, las plantas han sido la fuente más significativa de compuestos quimioterapéuticos, aprobándose desde 1961, 9 compuestos derivados de plantas para ser utilizados en la terapia del cáncer (Rascón, 2015). Uno de los

Bursera microphylla

El género *Bursera* Jacq. Ex L. se encuentra en el suroeste de Estados Unidos, la mayor parte de México y los bosques tropicales centroamericanos hacia el noroeste de América del Sur (Espinoza, 2006). El género es endémico de los bosques secos tropicales de México, donde 70 especies están presentes, y estas se caracterizan por los exudados que surgen de un sistema de canales de resina. Recientes investigaciones químicas de los diferentes miembros de este género ha dado como resultado el aislamiento de diferentes lignanos y terpenos con actividad citotóxica y antiproliferativa (Messina y col., 2015).

Bursera microphylla A. Gray (Burseraceae) Figura 3, comúnmente conocida como “pata de elefante” o “torote blanco”, se distribuye en gran medida en el desierto de Sonora, México. El grupo étnico Seri utiliza diferentes partes de la planta (hojas, frutas, corteza y exudado) para tratar varias enfermedades, como dolor de garganta y dolor de cabeza, y para la cicatrización de heridas. Messina y col., 2015 demostraron que la resina de *Bursera microphylla* está constituida principalmente por terpenoides y lignanos los cuales demostraron ser activos contra diferentes líneas celulares cancerosas.

En la tabla 1, se muestran los compuestos de la resina de *Bursera microphylla* y su actividad antiproliferativa hacia diversas líneas celulares (cancerosas); se destaca la actividad antiproliferativa presentada por los compuestos: diacetato de dihidroclusina, malabaricatrienol, β -cariofileno, ariesina, ácido betulónico y microfílanina. Los compuestos mencionados anteriormente son

metabolitos secundarios de la planta que pertenecen al grupo de terpenos, fácilmente encontrados en resinas, cortezas de árboles y en el látex (Rojas, 2007). Este grupo de terpenos ha despertado gran interés en el estudio del descubrimiento de nuevos compuestos de uso farmacológico, por su fácil absorción en el cuerpo y baja toxicidad frente a células normales (Legards y col., 2014).

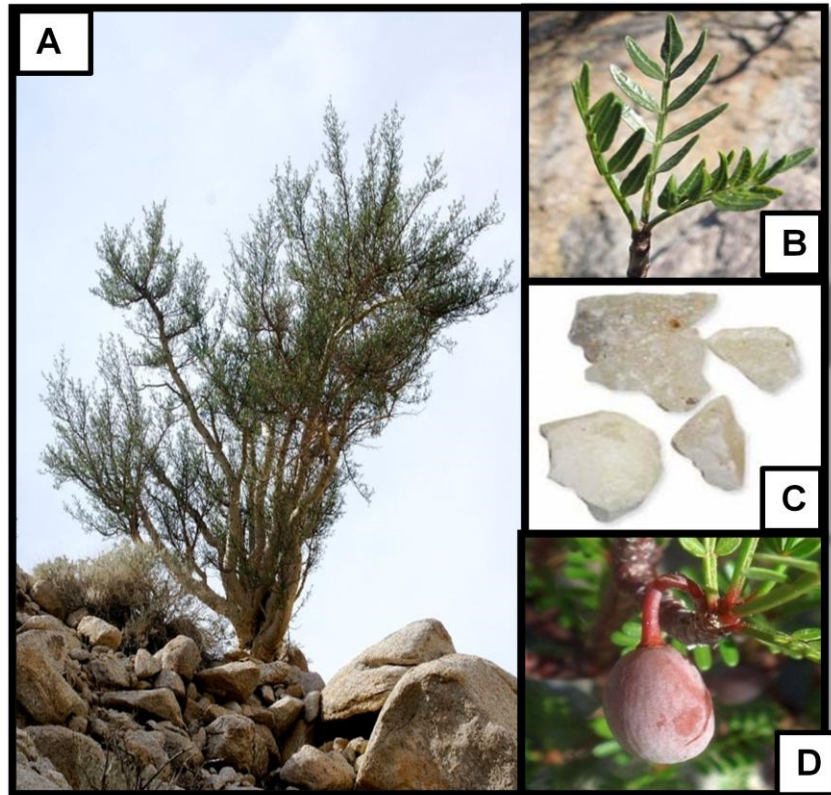


Figura 3.- *Bursera microphylla*. A.- Arbusto completo de 4 metros. B. Hojas pequeñas. C. Resina color banca (producto de la planta). D. Fruto pequeño (3 cm) color rojo característico de la planta.

Tabla I. Compuestos de la resina de *Bursera microphylla* y su actividad antiproliferativa.

Compuestos	Líneas Celulares (IC ₅₀ µM)				
	M12.C3.F6	A549	HeLa	RAW 264.7	PC-3
Ariensina	13.8±1.1	32.4 ± 1.6	26.9 ± 1.3	9.8 ± 1.2	102.5 ± 1.1
Burseran	36.3± 1.1	ND	147.9 ± 1.2	0.4 ± 1.1	143.8 ± 1.1
Diacetato de Dihidroclusina	2.5 ±1.2	40.7 ± 3.4	87.1 ± 1.7	0.2 ± 1.2	131.1 ± 1.2
Ácido Betulónico	13.2± 1.1	12.6 ± 1.1	13.6 ± 1.1	10.2 ± 1.0	18.6 ± 1.1
5-epi-ent-verticillol	17.8± 1.0	17.4 ± 1.1	24.0 ± 1.0	15.2 ± 1.0	22.4 ± 1.0
Microfilanina	24.0± 1.1	46.8 ± 1.2	37.3 ± 1.1	27.9 ± 1.0	42.2 ± 1.1
Mansumbinone	22.9± 1.1	51.3 ± 1.3	57.8 ± 1.1	27.2 ± 1.1	69.5 ± 1.0
β-cariofileno	51.3± 1.1	102.3 ± 1.4	70.1 ± 1.1	43.3 ± 1.1	ND
Malabaricatrienol	51.1 ± 1.0	70.8 ± 1.1	61.0 ± 1.1	43.7 ± 1.1	66.4 ± 1.0
Malabaricatrienona	45.7 ± 1.1	67.6 ± 1.0	72.0 ± 1.1	53.0 ± 1.1	82.1 ± 1.0
Cembren	134.9 ± 1.2	ND	180.0 ± 1.2	101.4 ± 1.1	ND

IC₅₀: Concentración inhibitoria del 50%. ND: No detectada a la máxima concentración estudiada. M12.C3.F6 (linfoma de células, A549 (cáncer de pulmón); HeLa (Carcinoma humano de cérvix); RAW 264.7 (Macrófagos transformados del virus de la leucemia de Abelson); PC-3 (Cáncer de próstata) (Messina y col., 2015).

Terpenos

Constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios, en él se encuentran las hormonas, carotenoides, quinonas y esteroides; los cuales derivan de la fusión repetitiva de unidades ramificadas de cinco carbonos basadas en el isopentenilo (Rascón, 2015a). Estas sustancias ejercen funciones importantes en las plantas, como hormonas (citokininas, y brasinoesteroides), pigmentos fotosintéticos (carotenoides), acarreadores electrónicos (quinonas y clorofilas) y componentes de las membranas (esteroides); además participan en la defensa, como es el caso de los aceites esenciales (monoterpenos) y los colores de las flores (carotenoides) como atrayentes de insectos, y las fitoalexinas (sesqui-, di-, tri-terpenos) como agentes antimicrobianos (Rascón 2015a). Los terpenos se pueden clasificar fácilmente por medio del número de cadenas de isopreno que poseen en mono-, sesqui-, di-, sester-, tri-, tetra- y politerpenos y su asociación con esteroides forma el grupo de los isoprenos (Rojas, 2007, Rascón 2015). Los terpenos cuentan con múltiples efectos biológicos en los humanos, entre los cuales destacan las actividades antitumoral, antiviral, antimicrobiana, antiinflamatoria y anestésica (Rascón 2015a).

El interés de los investigadores en estudiar la actividad antineoplásica de los terpenoides y sus derivados ha aumentado considerablemente en los últimos años. Este grupo incluye más de 100 compuestos que son prometedores candidatos antineoplásicos (Pokrovskii y col; 2005). Su interés no se debe solo a su actividad antineoplásica, si no a su amplio espectro de actividades biológicas que presentan: anticancerígena, anti-angiogénica, citotóxica, anti-inflamatoria, antioxidante, hepatoprotectora, analgésica, cardiovascular, antialérgica, antimicrobiana, antidiabética, bactericida, fungicida, antiviral, entre otras (Rojas 2007).

Dentro de los terpenos más estudiados tenemos al α -bismol el cual es un sesquiterpenico monocíclico, se le atribuye las capacidades antimicrobial, antiinflamatoria, anti-irritante y antifúngico. Esta reportada que su IC₅₀ (mínima

concentración inhibitoria) de 2 μM es capaz de inducir la apoptosis en las líneas de glioma humano y ratón como U87, T67 Y C6 (Cavalier y col., 2009). Zou y colaboradores en 2015 reportaron que el β -Elemene induce la apoptosis en la línea A549 con una IC_{50} 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

β -cariofileno es un sesquiterpeno ampliamente distribuido en aceites esenciales de varias plantas, posee actividades antimicrobianas, anti-inflamatorias, antioxidante y antiproliferativo. Legault y Pichette en 2007 reportaron como el β -cariofileno potencializa la capacidad inhibitoria del α -Humulene y paclitaxel en la línea celular MCF-7 (adenocarcinoma de colón).

El ácido betulínico, triterpeno pentacíclico se encuentra en plantas de la familia *Betulaceae* y especies del género *Alnus*. Es un compuesto especialmente prometedor debido a su aparente especificidad por las células del melanoma, siendo efectivo frente a líneas de células de melanoma humano (Mel-1, -2 y -4) con un rango de IC_{50} entre 0.5-1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$; al igual que se ha demostrado su actividad frente a otras líneas celulares de glioblastomas (LN-229/ IC_{50} = 20 μM ; U87MG y T98G / IC_{50} = 25 μM , para la línea LN-18 un IC_{50} de 70 μM). En cuanto a su toxicidad en ensayos *in vivo*, se han realizado estudios en ratón demostrando que es efectivo frente a tumores de cáncer de ovario y melanoma (Reyes, 2007).

Harmand y col. (2005) demostraron que la inducción de la apoptosis por el ácido betulínico se debe a través de una vía interna mitocondrial, mediada por el colapso de la membrana mitocondrial y la alteración en el balance de Bax/Bcl-2, con el resultado de la activación de la caspasa-3 (Harmand y col., 2005).

Dentro de las vías de inducción de apoptosis de los terpenos documentadas a la fecha, se encuentran: la inhibición de la inflamación, estrés oxidativo, incremento de ROS, modificación del potencial de membrana mitocondrial, activación de caspasas y activación de proteínas proapoptóticas (Cavalieri y col., 2011, Kim y col., 2011 y Legards y col., 2014).

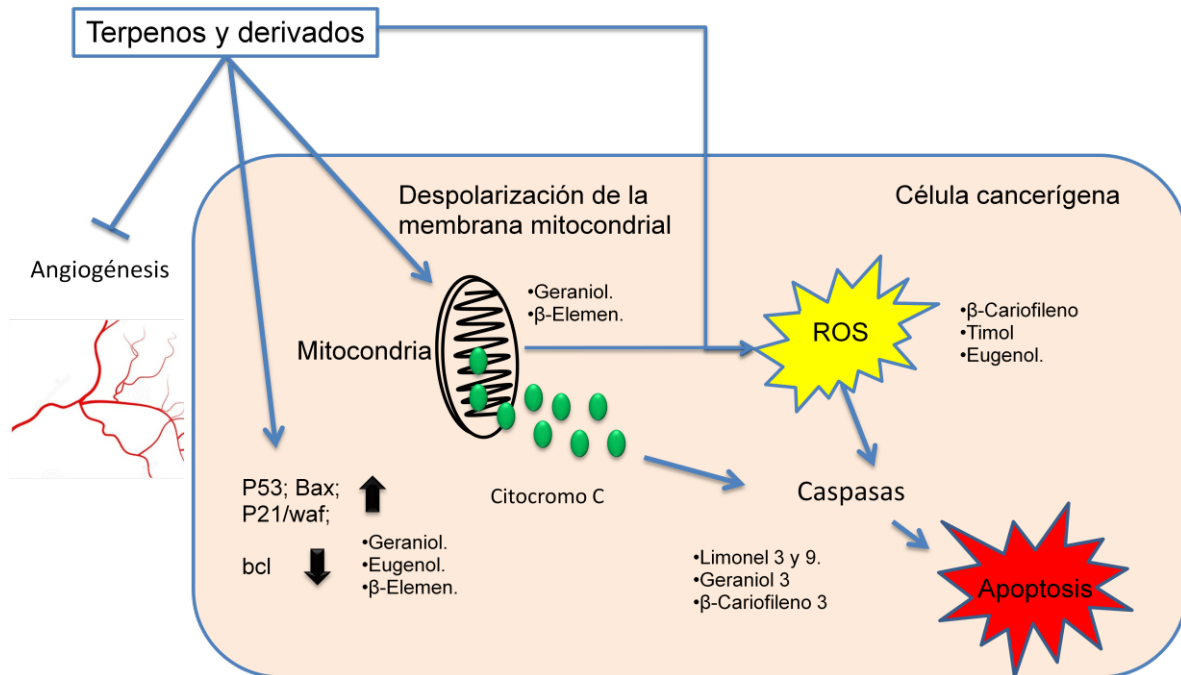


Figura 4. Principales rutas de inducción de apoptosis por terpenos y derivados (modificado). Bloqueo de angiogénesis; activación de proteínas pro-apoptóticas y declive de proteínas antiapoptóticas; despolarización de membrana mitocondrial, salida de citocromo c, activación de caspasas y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Lesgards y col., 2014).

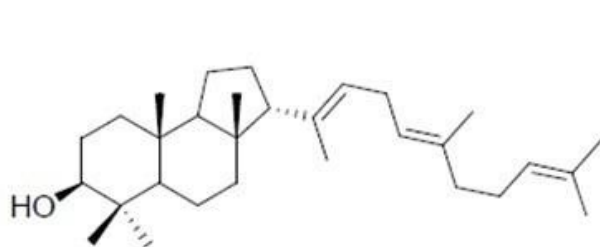
MATERIALES Y MÉTODOS

Moléculas

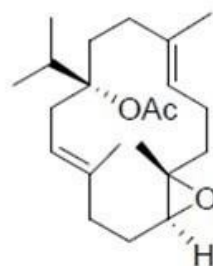
Los compuestos utilizados malabaricatrienol, acetato de dihidroclusina, β -cariofileno, ariensina, microfilanina y ácido betulónico, fueron aislados y caracterizados de la resina de *B. microphylla*, en un trabajo previo entre la Universidad de Perugia, Italia y la Universidad de Sonora, México (figura 5) (Messina, 2015).

Línea Celular

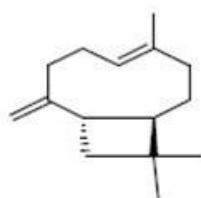
Se adquirieron células de Adenocarcinoma Alveolar Humano A549 (número ATCC: CCL-185) de American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, EE.UU.). La línea celular se mantuvo en medio de crecimiento enriquecido con glucosa DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino, solución de penicilina-estreptomicina al 1% (v/v) (10.000 unidades de penicilina y 10 mg de estreptomicina/mL), 0,75% (v/v) L-glutamina 200 mM y solución de piruvato sódico al 1% (v/v) 100 mM. Las células se hicieron crecer en una caja de 75 cm² y se incubaron a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5%. Las células fueron pasadas a medio fresco cuando alcanzaron la confluencia y fue utilizada solución de tripsina-EDTA (0,25%) para separar las células.



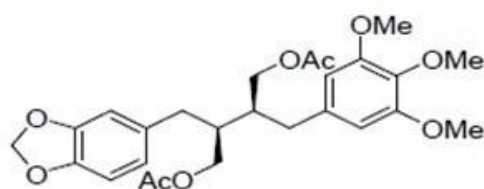
Acetato de dihidroclusina



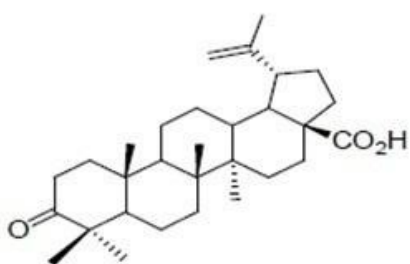
Microfilanina



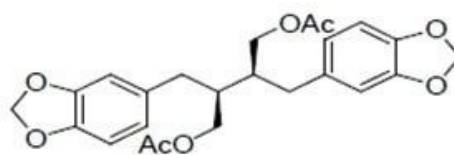
β -cariofileno



Malabaricatrienol



Ácido betulónico



Ariensina

Figura 5. Compuestos aislados de la resina de *Bursera microphylla* (Messina y col., 2015).

Eventos Apoptóticos

Fosfatidilserina

Para analizar el efecto de los compuestos aislados de la resina de *B. microphylla* sobre la inducción de apoptosis en células A549 se determinó por fluorescencia a fosfatidilserina en la membrana externa empleando tinción doble con anexina V-FITC y PI mediante citometría de flujo (Rascón 2015a). Se sembraron células A549 (200.000/pozo) en placas de 12 pocillos por 24 h. Las células se trataron con malabaricatrienol (98.6 μM), diacetato de dihidroclusina (60 μM), β -cariofileno (171.5 μM), ariensina (50 μM), microfilanina (100 μM) y ácido betulónico (40 μM) durante 24 h. Se usó éster fenílico de ácido cafeico (CAPE, 70 mM) y como control positivo doxorubicina (0.2 μM). Después de un período de incubación, las células se retiraron de las placas por tripsinización y se transfirieron a tubos de poliestireno de fondo redondo de 5 ml. Las células se lavaron dos veces en 1ml de PBS frío (200 μg , 4 °C, 7 min) y el sedimento se resuspendió en 50 μl de tampón de unión a anexina V-FITC (concentración final de 1 mg/ml) permitiendo incubar durante 10 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Posteriormente, se añadió 2.5 μl de solución de tinción de yoduro de propidio (concentración final de 0.5 mg/ml) y las células se incubaron en las condiciones mencionadas. Después de este periodo de tiempo, las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en 300 μl de PBS frío. Las muestras se midieron inmediatamente utilizando citómetro de flujo FACS Canto II (BDSystems, San José, CA, EE.UU.). Los resultados se analizaron mediante el software FACS DIVA 6.0 (BDSystems, San José, CA, EE.UU.).

Potencial de Membrana Mitocondrial

El potencial de membrana mitocondrial se evaluó usando el colorante fluorescente JC-1 (5,5',6,6'-tetracloro-1, 1',3,3'-tetraetilbenzamidazolocarbo Cianina yoduro) por citometría de flujo como se describe en Rascón 2015a. Las células A549 (200.000 células por pocillo, placas de 12 pocillos) con soluciones de malabaricatrienol (98.6 μM), diacetato de dihidroclusina (60 μM), β -cariofileno (171.5 μM), ariensina (50 μM), microfilanina (100 μM) y ácido betulónico (40 μM) por 24 h. Se usaron éster fenético de ácido caféico (CAPE, 120 μM) y doxorubicina (0.2 μM) como controles positivos. Después de la tripsinización y lavado con PBS, las células se incubaron durante 15 minutos en una solución JC-1 recién preparada (1.25 $\mu\text{g/ml}$ en medio de cultivo) a 37 °C en la oscuridad. Las células se lavaron dos veces con PBS para eliminar el colorante de repuesto y el sedimento se resuspendió en medio de cultivo fresco. Las células se analizaron por citometría de flujo lo antes posible. La citometría de flujo se realizó en citómetro de flujo FACS Canto II.

Activación de las Caspasas

Para determinar la vía apoptótica que pueden desencadenar los compuestos, se midió la actividad de caspasa-8 (caspasa iniciadora de la vía extrínseca), caspasa-9 (caspasa iniciadora de la vía intrínseca) y caspasa-3 (caspasa verdugo de ambas vías). Se evaluó usando los kits comerciales Fluorescein Active Caspase-3, Fluorescein Active Caspase- 8 y Fluorescein Active Caspase-9. Después del tratamiento durante 24 h con malabaricatrienol (98.6 μM), β -cariofileno (171.5 μM), ariensina (50 μM), diacetato de dihidroclusina (60 μM), microfilanina (100 μM) y ácido betulónico (40 μM), se separaron las células y se lavaron dos veces con PBS frío (200 Xg, 4°C, 7 min). A continuación, el sedimento se resuspendió en 300 ml de medio de cultivo (DMEM 5% de FBS) que contenía 1 ml de inhibidor de caspasa-FITC (FITC-DEVD-FMK) y se incubó durante 1 h a 37°C en oscuridad. Posteriormente, las células se lavaron dos veces y se resuspendió en tampón de lavado. Las muestras se midieron inmediatamente en citómetro de flujo FACS

Canto II. Los resultados se representaron como el cambio de pliegue en la actividad de caspasa-3, caspasa-8 y caspasa-9 en comparación con las células tratadas sólo con vehículo (control de DMSO), el éster fenético de ácido cafeico (CAPE, 120 mM) y doxorubicina (0.2 mM) se usaron como control (Rascón y col. 2015a).

Arresto Celular

Para la evaluación del arresto celular inducido por los compuestos de la resina de *B. microphylla*, se utilizó una tinción simple con yoduro de propidio para marcar la cantidad de material genético (DNA) y una RNase para eliminar al RNA. Se colocaron 200,000 células/pozo en una placa de 12 pozos, se dejaron incubando por 24 horas. Se estimularon durante 24 horas con malabaricatrienol (98.6 μ M), β cariofileno (171.5 μ M), ariensina (50 μ M), diacetato de dihidroclusina (60 μ M), microfilanina (100 μ M) y ácido betulónico (40 μ M). Se recolectaron mediante tripsina y se les realizaron dos lavados con 1 mL de PBS. Se realizó una fijación con etanol al 66.6% por 24 horas a 4 °C, posteriormente, se realizó un lavado con PBS y se dejaron por 30 min en incubación en 1 mL de solución de PBS y RNase (100 μ g/mL). Para continuar con un lavado de PBS (1 mL) e incubación por 30 minutos en 1 mL de PBS y yoduro de propidio (6 μ g/mL). Por último se realizó un lavado con PBS y las células se analizaron por citometría de flujo lo antes posible. La citometría de flujo se realizó en citómetro de flujo FACS Canto II (Fallahian y col., 2016).

Análisis Estadístico

Todos los experimentos se realizaron al menos tres veces, por triplicado. Los datos se expresaron como la media \pm desviación estándar (GraphPad Prism 5, GraphPad Software, Inc., CA, EE.UU.). Las diferencias estadísticas entre los grupos de datos se evaluaron mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de prueba de Tukey (IBM, SPSS, Statistic 20).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mesina y col., 2015 nos demostraron el perfil químico de la resina *B. microphylla* logrando el aislamiento de 15 compuestos de carácter terpenoide a los cuales se les comprobó su actividad antiproliferativa sobre la línea celular A549. Algunos constituyentes terpenoides particulares han sido ampliamente estudiados *in vitro* e *in vivo* y han mostrado capacidades anticancerígenas significativas en combinación con agentes quimioterapéuticos. Los estudios sugieren que el β -cariofileno facilita el paso de paclitaxel a través de la membrana de las células cancerosas y, por lo tanto, potencia su actividad anticancerígena (Legault y Pichette, 2008). Por lo cual, fue primordial elucidar el mecanismo de acción de los compuestos, para continuar el estudio y poder formular nuevos fármacos en la lucha contra el cáncer de pulmón.

Detección de los Eventos Apoptóticos

La fosfatidilserina, la cual se encuentra localizada normalmente en la superficie citoplasmática de las membranas celulares, es expuesta sobre la superficie celular una vez que la apoptosis es inducida. La anexina V se une específicamente a la fosfatidilserina y es usada para identificar los estadios tempranos de la apoptosis; ioduro de propidio (PI), el cual no entra a las células con membrana intacta, es usado para distinguir entre los eventos tempranos (anexina V +, PI -) y tardíos (anexina V +, PI +) de la apoptosis. Las células vivas no se tiñen con los fluorocromos (Rascón, 2015a).

En la figura 6, se muestra la representación de los eventos apoptóticos tardíos y tempranos inducidos por los compuestos; todas las moléculas estudiadas desplazaron la población celular a los cuadrantes de apoptosis temprana y tardía. Malabaricatrienol fue capaz de incrementar el porcentaje de células en apoptosis temprana de 1.5% del control a 10.5%; mientras que diacetato de dihidroclusina paso a 16.4%; β -cariofileno, ariesina y ácido betulónico incrementaron a 7.4%;

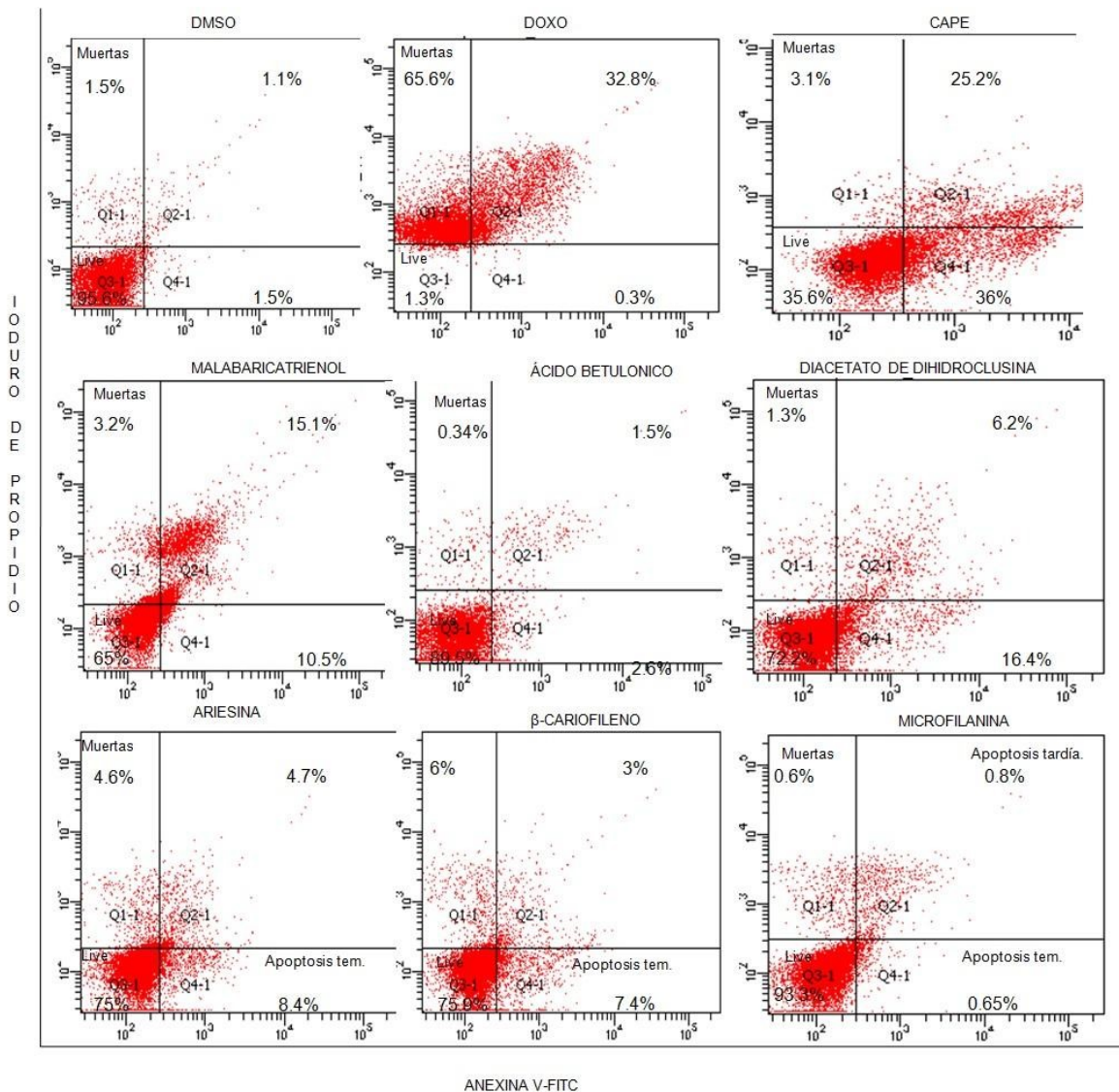


Figura 6. Externalización de la fosfatidilserina en células A549 tratadas con los compuestos aislados de la resina de *B. microphylla* externalización. Patrones de fluorescencia por citometría de flujo de la tinción anexina V-FITC/PI. Los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes.

8.4% y 2.6 % respectivamente. La apoptosis tardía se vio incrementada hasta un 1.1% del control a 15.1% por malabaricatrienol; diacetato de dihidroclusina 6.2%; β -cariofileno 3%; , ariesina 4.7% y 1.5% por, y ácido betulónico respectivamente. Esto nos indica que los compuestos inducen principalmente la apoptosis temprana a las 24 horas de estimulación.

La figura 7, nos muestran los resultados de la evaluación del efecto apoptótico de las moléculas malabaricatrienol, acetato de dihidroclusina, β -cariofileno, ariesina, microfilanina y ácido betulónico extraídos de la resina de *B. microphylla* con actividad antiproliferativa sobre células A549. La molécula con mayor actividad apoptótica fue malabaricatrienol obteniendo hasta 30% de apoptosis, seguida de diacetato de dihidroclusina con 26.5% y β -cariofileno y ariesina con 10.5%. Los compuestos microfilanina y ácido betulónico tuvieron el menor efecto apoptótico con 2% y 4% respectivamente.

Nuestros resultados se asemejan a los ya publicados, en los que se establece la capacidad que los compuestos isoprenoides inducen, principalmente la apoptosis celular como forma de muerte, Park (2011) publicó que β -cariofileno inducía la apoptosis celular en líneas de cáncer de próstata y mama; en este trabajo se estableció que la inducción de la apoptosis también se da en la línea A549, β -elemene inducen apoptosis en líneas de osteocarcinoma y de mama (Lesgards y col., 2014); el eugenol, un miembro de la familia fenilpropanoides; induce la apoptosis en diferentes tipos de cáncer como mama, leucemias, tumores gástricos y líneas de colón (Lesgards y col., 2014). Se establece que los terpenos poseen una gran capacidad de inducción de apoptosis en diferentes líneas celulares, aunque aún se sigue investigando el mecanismo por el cual estos compuestos inducen la apoptosis celular.

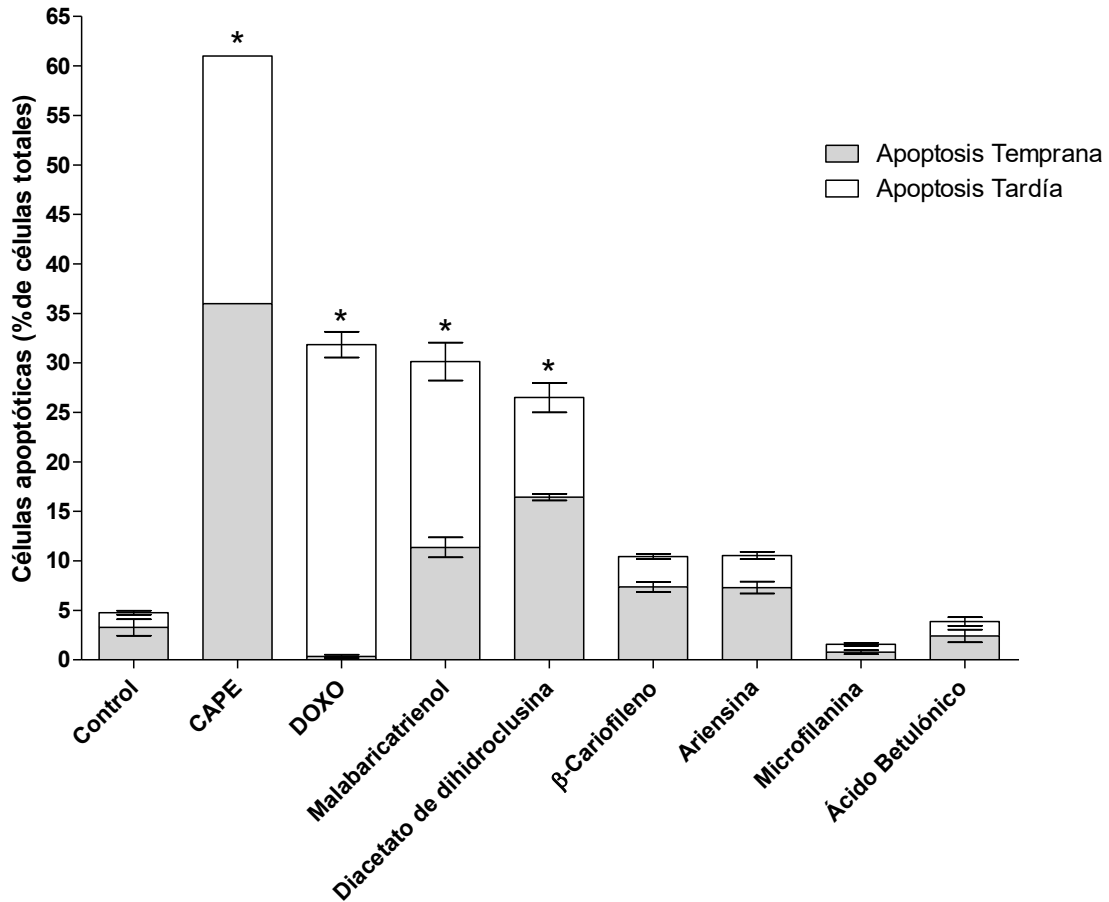


Figura 7. Efecto apoptótico en células A549 inducido por el tratamiento de compuestos aislados de *B. microphylla*. Los valores representan la media \pm SD de al menos tres experimentos independientes. * Diferencias estadísticamente significativas basadas en la comparación con células control (DMSO) para cada condición, $p < 0.01$ (prueba de Tukey).

Potencial de Membrana Mitocondrial

Para conocer más acerca del mecanismo apoptótico se evaluó la disrupción del potencial de membrana mitocondrial en células A549 utilizando la tinción con el fluorocromo catiónico lipofílico JC-1. En células vivas, JC-1 existe tanto como un monómero con fluorescencia verde a potenciales de membrana despolarizados (positivo a -100 mV) (detectado en el canal FL-1) o como JC-1-agregados en potenciales de membrana hiperpolarizados (negativo a -140 mV) (detectado en el canal FL-2). Sin embargo, en las células apoptóticas, donde el potencial mitocondrial colapsa, JC-1 no puede ser acumulado dentro de la mitocondria, permaneciendo en el citoplasma en forma monomérica emitiendo fluorescencia verde. Por lo tanto, la despolarización mitocondrial es indicada por una disminución en la razón de intensidad de fluorescencia roja/verde (Rascón, 2015a). Todos los compuestos indujeron la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial estadísticamente significativa ($p < 0,01$) comparada con el control (DMSO), particularmente malabaricatrienol con 96 % de disrupción del potencial, diacetato de dihidroclusina con 96 %, β -cariofileno 98 %, ariesina 88 %, microfilanina 85 % y en menor grado ácido betulónico con 31%, como se muestra en la figura 8. Lo que sugiere que en la vía de activación de la apoptosis ocasionada por las moléculas del estudio involucra a la mitocondria.

En otros estudios se ha demostrado que el α -bisabolol, sesquiterpeno cíclico usado en cosméticos por su actividad antirritante y antimicrobial; es también eficaz contra las células de leucemia al general la despolarización de la membrana mitocondrial, entre otros procesos y activar la apoptosis celular (Cavalieri y col., 2011). Germacrone; usado como antiviral, también parece despolarizar la membrana mitocondrial de las células cancerosas en el cáncer de mama (Chen y col., 2011). Geraniol; monoterpene alcohol, induce la despolarización de la membrana de las células del colon (Caco-2) (Carnesecchi y col., 2002). Otros terpenos como β -elemene también alteran la membrana de las células cancerosas (Zhao y col., 2007).

En cuanto al mecanismo por el cual estas moléculas inducen la despolarización mitocondrial se ha estudiado en diversos trabajos, obteniendo que la principal forma de la inducción de la pérdida de potencial mitocondrial es mediante la activación de las proteínas pro-apoptóticas como Bax y Bcl_{-XL}, que generan monómeros para la creación de canales en la doble membrana mitocondrial, generando la deformación y consecuente liberación de los componentes de la membrana mitocondrial (Reyes, 2007). Estudios *in vivo* han

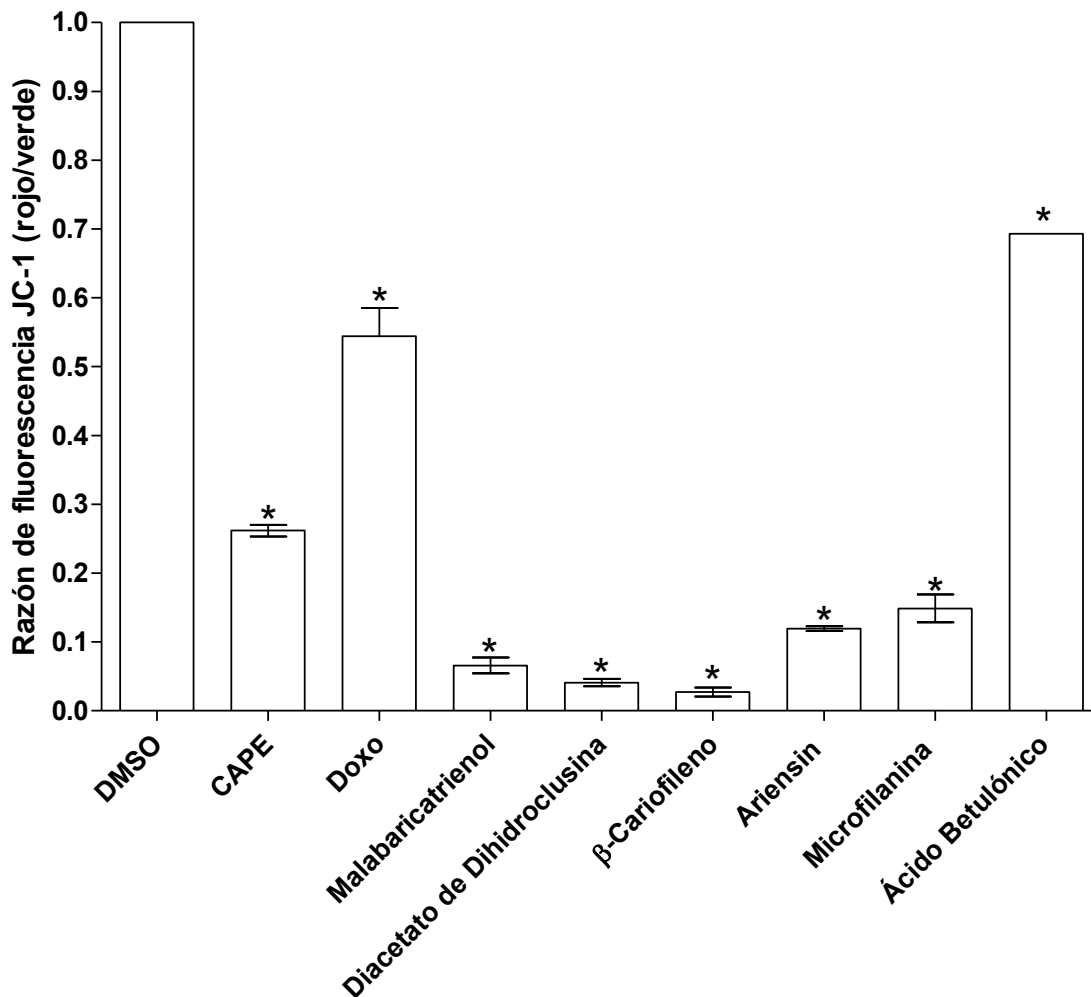


Figura 8. Despolarización del potencial de membrana mitocondrial en células A549 tratadas con compuestos aislados de resina de *B. microphylla*. Los resultados se expresan como la relación de intensidad de fluorescencia (rojo/verde) para JC-1 \pm SD de triplicado, y son representativos de tres experimentos independientes. * Diferencias significativas respecto a las células control (DMSO), $p < 0,01$ (prueba de Tukey). CAPE y doxorubicina se utilizaron como control positivo de la apoptosis.

demostrado que estos compuestos de carácter terpenico inducen la apoptosis mediante la activación de proteínas proapoptóticas (Bax) y declive de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2), especies reactivas de oxígeno y alteración directa de membrana mitocondrial (Reyes, 2007).

Activación de las Caspasas.

Se conoce que una vez que la mitocondria pierde su potencial de membrana mitocondrial se liberan activadores de la apoptosis, como citocromo C; el cual induce la activación de las caspasas y apoptosis celular. La familia de proteínas de caspasa desempeña un papel importante en las vías de iniciación y ejecución de la apoptosis celular, con la finalidad de establecer la vía apoptótica de los compuestos aislados de la resina de *B. microphylla*, se midió la activación de las tres caspasas representativas, la caspasa-9 la cual participa en la activación de la apoptosis intrínseca, la caspasa-8 la cual es la caspasa iniciadora característica de la vía extrínseca y la caspasa-3, la cual es una caspasa efectora activada por ambas vías de la apoptosis. En la figura 9 se pudo demostrar que los compuestos estudiados inducen apoptosis mediante la activación de la cascada de caspasas activando las caspasas 3, 8 y 9.

La figura 9, se muestra que la caspasa-3 se activó 3.1 veces por tratamiento con acetato de dihidroclusina y 2.5 veces por malabaricatrienol, a su vez β -cariofileno obtuvo una activación de 2.5 veces al igual que ariesina, microfilanina 1.6 veces y ácido betulónico 1.3 veces respecto al control. Mientras que la caspasa-8 (figura 10) obtuvo una activación de 3.5 por malabaricatrienol, 2.3 para diacetato de dihidroclusina, 2.7 para β -cariofileno, ariesina 2.7, microfilanina 1.5 y ácido betulónico 1.5 veces respecto al control. La caspasa-9 (figura 11) fue activada 2.9 veces por malabaricatrienol, 2.8 por ariesina, diacetato de dihidroclusina 2.5, microfilanina 1.2 y ácido betulónico 1.1 veces respecto al control. Por lo tanto, podemos concluir que los compuestos aislados fueron capaces de inducir la apoptosis a través de la activación de caspasas.

La apoptosis de las células cancerosas se produce a través de la activación de ciertas proteínas de la familia de caspasas, las caspasa-3 y -9 se activan en células leucémicas cultivadas en presencia de limonene (Lesgards y col., 2014). Desde un punto de vista bioquímico, esto requiere la fosforilación y activación de diferentes proteínas (p53, Bax y p21/waf) involucradas en la cascada de eventos que finalmente conduce a la activación de estas caspasas, lo que eventualmente dará la señal de destruir a las células cancerosas y la proliferación celular. Esta vía también implica una disminución en la expresión de los genes bcl-2 (antiapoptótico), una mayor expresión de los genes Bax (proapoptótico) y proteínas relacionadas en las células cancerosas (Lesgards y col., 2014). Los resultados del estudio muestran que los compuestos aislados de la resina de *B. microphylla* poseen la capacidad de activar la vía apoptótica por las caspasas-3, -8 y -9.

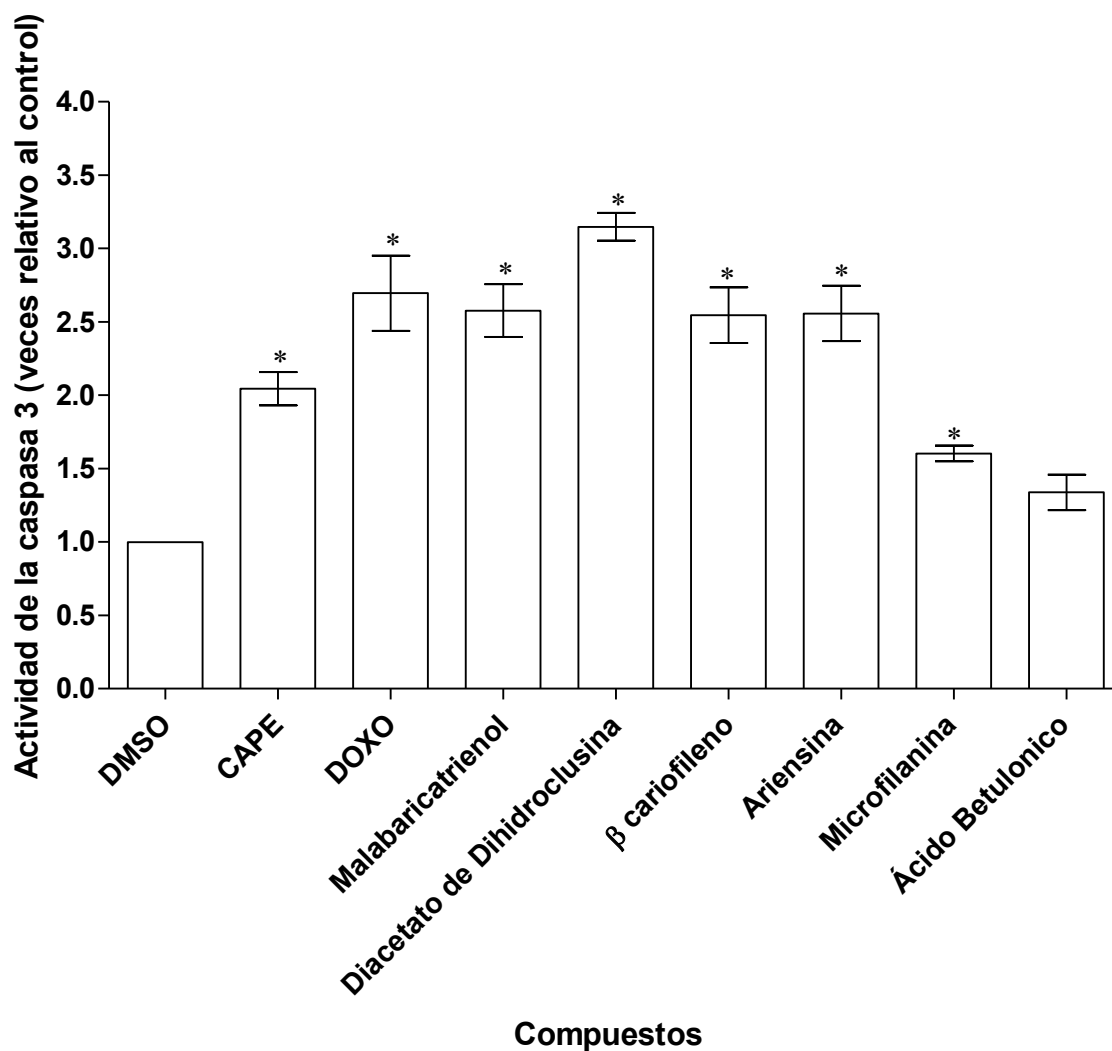


Figura 9. Actividad de la caspasa-3 en la línea A549 tratadas con compuestos aislados de resina de *B. microphylla*. Los resultados se expresan como media \pm DE de triplicado, y son representativos de tres experimentos independientes. * Diferencias significativas respecto a las células control (DMSO), $p < 0,01$ (prueba de Tukey). CAPE y doxorubicina (DOXO) se utilizaron como control positivo de la actividad caspasa.

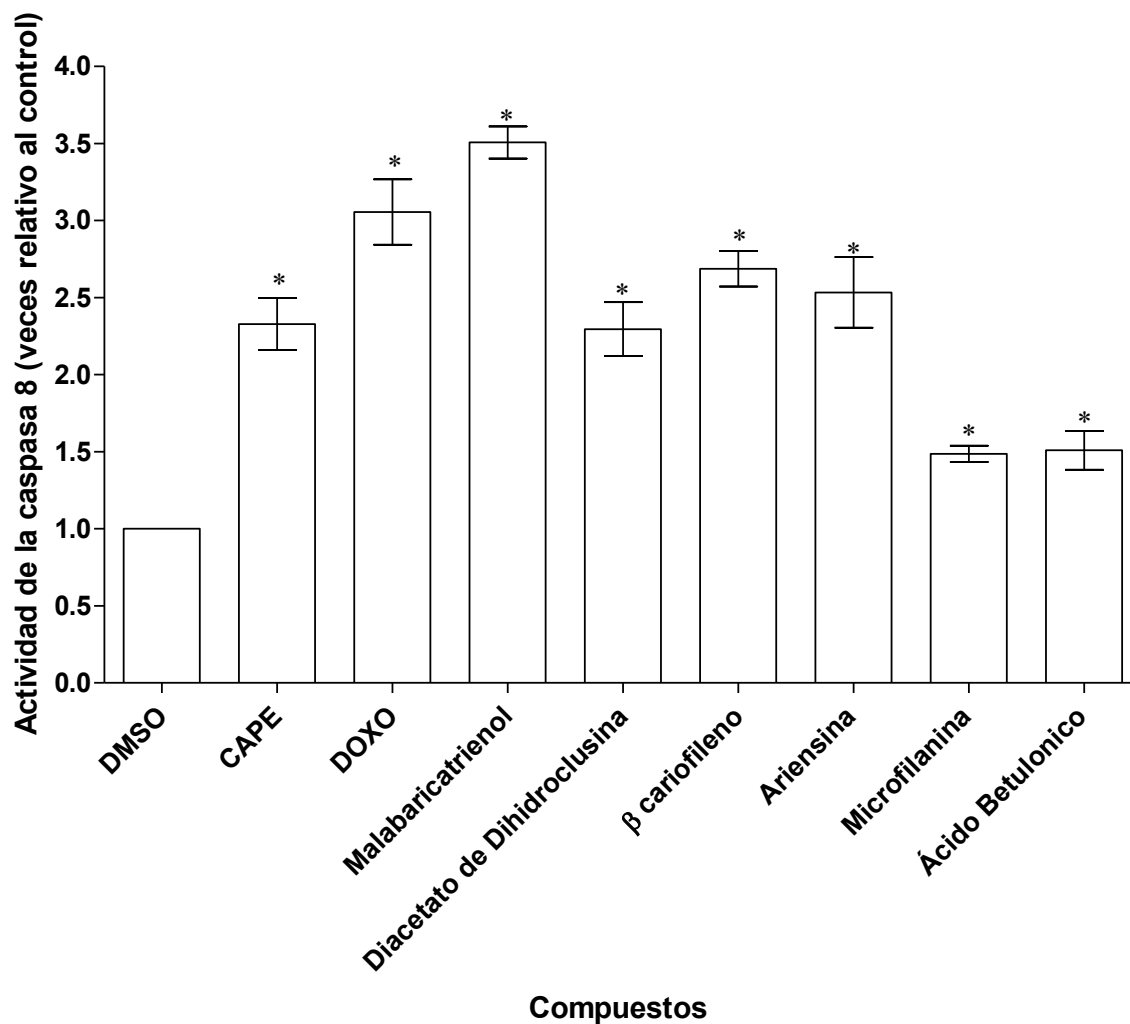


Figura 10. Actividad de la caspasa-8 en la línea A549 tratadas con compuestos aislados de resina de *B. microphylla*. Los resultados se expresan como media \pm DE de triplicado, y son representativos de tres experimentos independientes. * Diferencias significativas respecto a las células control (DMSO), $p < 0,01$ (prueba de Tukey). CAPE y doxorubicina (DOXO) se utilizaron como control positivo de la actividad caspasa.

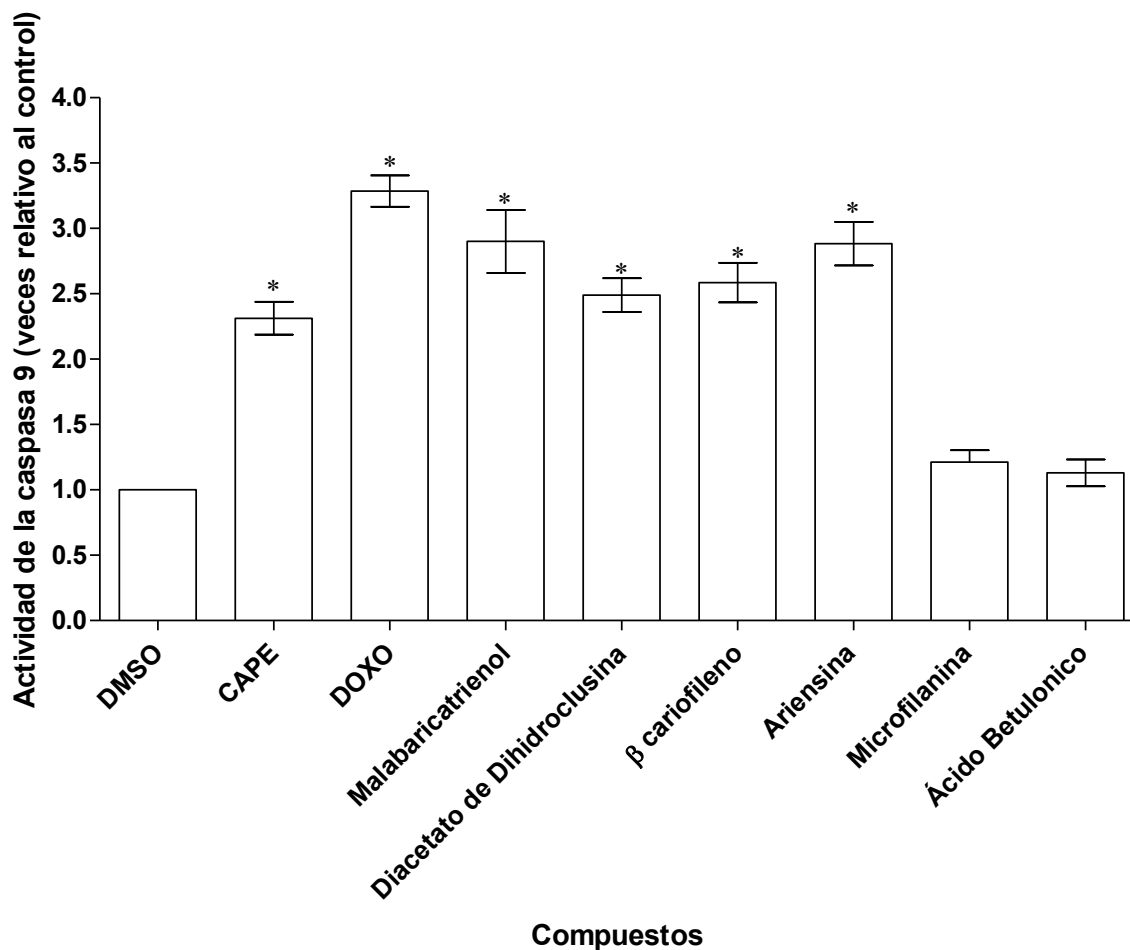


Figura 11. Actividad de la caspasa-9 en la línea A549 tratadas con compuestos aislados de resina de *B. microphylla*. Los resultados se expresan como media \pm DE de triplicado, y son representativos de tres experimentos independientes. * Diferencias significativas respecto a las células control (DMSO), $p < 0,01$ (prueba de Tukey). CAPE y doxorubicina (DOXO) se utilizaron como control positivo de la actividad caspasa.

Arresto Celular

El ciclo celular está controlado por una serie compleja de vías de señalización por las que crece una célula, reproduce su ADN y se divide. Este proceso incluye mecanismos para asegurar correcciones de errores mientras se produce la replicación celular, y si la corrección no puede ser realizada, las células entran en el proceso apoptótico. Sin embargo, en las células cancerosas, este proceso regulador funciona mal y da como resultado una proliferación celular incontrolada. Por lo tanto, la modulación del ciclo celular es muy importante en el tratamiento del cáncer con agentes anticancerígenos (Nagappan y col. 2016). Con el fin de obtener información de los distintos efectos apoptóticos causados por los compuestos aislados de la resina de *B. microphylla*, se analizó el efecto sobre el ciclo celular el cual fue analizado por la incorporación de yoduro de propidio (PI), cuyo incremento en el interior celular es proporcional a la cantidad de DNA celular, la intensidad del PI fue analizada mediante citometría de flujo.

β -cariofileno, ariensina y ácido betulónico induce la detención en fase G2/M; acetato diacetato de dihidroclusina en fase S y microfilanina en G0/G1, figura 12. El ciclo celular se controla mediante la regulación periódica de un número de reguladores del ciclo celular, incluyendo ciclinas, cinasas dependientes de ciclina (CDK) y proteínas inhibidoras de CDK (Kim y col., 2011). Se ha informado que los inhibidores de CDK de molécula pequeña inducen la apoptosis en varios tipos de células cancerosas (Grant y col., 2003). Fallahian y col., 2011 establecieron que DANPT (7,13-diacetyl-5-angeloyl-20-nicotinyl-3-propionyl-1,2,6,7-tetrahydroingenol) induce el arresto en G2/M y geraniol en G0/G1, terpenos con características similares a los compuestos de nuestro estudio (Kim y col., 2011). Por los resultados obtenidos podemos inferir que los compuestos actúan desactivando proteínas como las cinasas dependientes de ciclina (CDK), que controlan el ciclo celular y generan una detención, lo que lleva a la célula a la apoptosis celular por despolarización de las mitocondrias y posterior activación de las caspasas proteínicas. Por lo tanto, la inducción de la apoptosis y la modulación

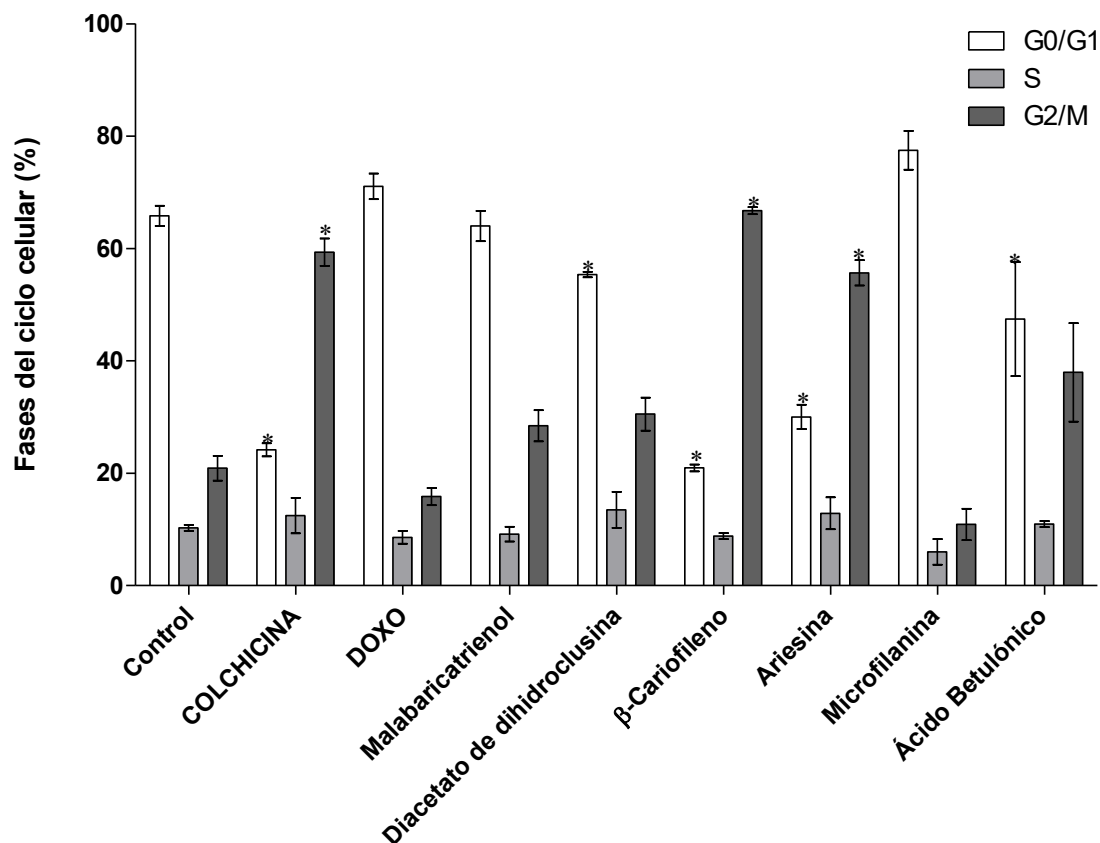


Figura 12. Detención del ciclo celular en células A549 tratadas con compuestos aislados de resina de *B. microphylla*. Los resultados se expresan como media \pm DE de triplicado, y son representativos de tres experimentos independientes. * Diferencias significativas respecto a las células control (DMSO), $p < 0,01$ (prueba de Tukey). La cochicina y doxorubicina se utilizaron como control positivo de la detención del ciclo celular.

del ciclo celular es muy importante en el tratamiento del cáncer con agentes anticancerígenos (Nagappan et al., 2016).

Mecanismo de inducción de apoptosis

En el trabajo se demostró que las moléculas malabaricatrienol, acetato de dihidroclusina, β -cariofileno, ariensina, microfilanina y ácido betulónico inducen la apoptosis a través de activación de la vía mitocondrial, activación de caspasas y arresto celular.

Los resultados nos muestran una parte de la ruta de inducción de la apoptosis por parte de estos compuestos, el resultado primordial es la gran despolarización causada por los compuestos en mitocondria, una vez demostrado que el potencial de membrana mitocondrial fue alterado y aunado a la activación de las caspasas podemos decir que la ruta de activación de la apoptosis es por vía mitocondrial y activación de caspasas, basándonos en la bibliografía y reportes anteriores se infiere que la vía involucrada es la vía de las MAP quinasas (MAPK) ya que Kiung y col. (2011) establecieron bases en las que demostraron que β -cariofileno inducía la activación de esta vía produciendo la activación de genes que llevan a la células a apoptosis a través de la activación de las señales de JNK y p-38 (de la vía de las MAP quinasas) además de la inactivación de la vía PI3K. Es sabido que la familia de las de MAPK está implicada en diferentes respuestas celulares, ERK es predecesor de factores de crecimiento, lo que conduce al crecimiento celular y la supervivencia, además se ha demostrado que la activación de JNK y p38 está implicada en el aumento de la producción de ROS intracelular (Seo y col., 2015). La producción de ROS por terpenos y en especial por β -cariofileno se ha establecido en diferentes estudios (Kiung y col., 2011), por lo que podemos deducir que los compuestos activan la vía de MAPK y JNK generando la producción de ROS y despolarización de mitocondria generando posteriormente la activación de las caspasas y apoptosis (figura 13).

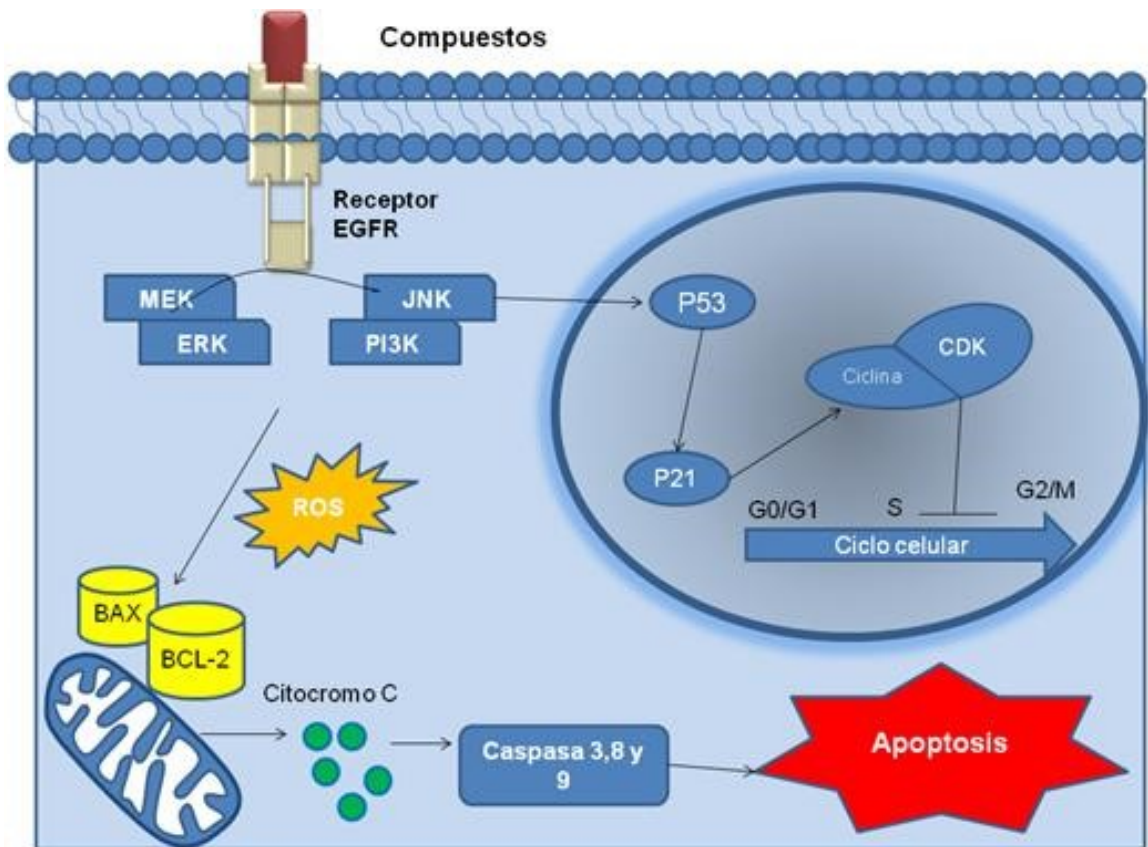


Figura 13. Mecanismo propuesto de inducción de apoptosis por los compuestos extraídos de la resina de *Bursera microphylla*. Activación de receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR); de la vía de las MAP quinasas (MAPK) y de proteínas Bax, Bcl-2, despolarización de mitocondria y activación de caspasas que conlleva a la apoptosis celular. La iniciación de la vía de las MAP quinasas activa p53 generando la activación de p21 y bloqueando el complejo ciclina-CDK que conlleva al arresto celular.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio revelaron que malabaricatrienol, el acetato de dihidroclusina, el β -cariofileno, la ariensina, la microfilanina y el ácido betulónico aislados de la resina de *B. microphylla*, indujeron la muerte celular a través de apoptosis.

Los compuestos activaron a las caspasas -3, -8 y -9 y despolarización de membrana mitocondrial.

Los compuestos β -cariofileno, ariensina y ácido betulónico provocaron la interrupción del ciclo celular en fase G2/M; diacetato de dihidroclusina en fase S y microfilanina en G0/G1.

RECOMENDACIONES

Evaluar por PCR los genes de las vías intrínseca (P53, Bax; Bcl-2) y extrínseca (Receptor FADD) de apoptosis para conocer cascada abajo las proteínas afectadas.

Comprobar la actividad de las especies reactivas de oxígeno en la línea celular A549 tratada con los compuestos extraídos de la resina de *Bursera microphylla*.

Llevar el estudio de los compuestos extraídos de la resina de *Bursera microphylla* a modelo *in vivo*.

BIBLIOGRAFÍA

- American Cancer Society. 2017. *Cancer Facts & Figures*. Atlanta: American Cancer Society. <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-pulmon-no-microcitico/acerca/estadisticas-clave.html>
- Arrieta O, Guzmán-de Alba E, Alba L, Acosta-Espinoza A, y col., 2013. Consenso nacional de diagnóstico y tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas. *Revista de Investigación Clínica* Vol. 65, Supl. 1.
- Boroda A, Kipryushina Y, Yakovlev K, Odintsova N. 2016. The contribution of apoptosis and necrosis in freezing injury of sea urchin embryonic cells. *Cryobiology* 73: 7-14.
- Cai X, Zhang H, Tong D, Tan Z, Han D, Ji F, Hu W. 2011. Corosolic acid triggers mitochondria and caspase-dependent apoptotic cell death in osteosarcoma MG-63 Cells. *Phytother. Res.* 25: 1354–136.
- Carnesecchi S, Bradaia A, Fischer B, et al. 2002. Perturbation by geraniol of cell membrane permeability and signal transduction pathways in human colon cancer cells. *J Pharmacol Exp Therapeut* 303(2): 711–715.
- Castro A, Villarreal M, Salazar L. 2011. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology* 133: 945–972.
- Cavalieri E, Bergamini C, Mariotto S, Leoni S, Perbellini L. 2009. Involvement of mitochondrial permeability transition pore opening in a-bisabolol induced apoptosis. *FEBS Journal* 276 3990–4000.
- Cavalieri E, Rigo A, Bonifacio M, Carcereri de Prati A, Guardalben E, Bergamini C, Fato R, Pizzolo G, Suzuki H, Vinante F. 2011. *Journal of Translational Medicine*: 9:45 <http://www.translational-medicine.com/content/9/1/45>.

- Chen W, Lu Y, Wu J, Gao M, Wang A, Xu B. 2011. Beta-elemene inhibits melanoma growth and metastasis via suppressing vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. *Cancer Chemother Pharmacol*; 67:799–808. DOI 10.1007/s00280-010-1378-x.
- Espinosa D, Llorente J, Morrone J. 2006. Historical biogeographical patterns of the species of *Bursera* (Burseraceae) and their taxonomic implications. *Journal of Biogeography (J. Biogeogr.)* (2006) 33, 1945–1958.
- Fallahian F, Ghanadian M, Aghaei M, Zarei SM. 2016. Induction of G2/M phase arrest and apoptosis by a new tetrahydroingenol diterpenoid from *Euphorbia erythradenia* Bioss. in melanoma cancer cells. *Biomed Pharmacother* 86:334–342.
- Fernald K, Kurokawa M. 2013. Evading apoptosis in cancer. *Trends Cell Biol.* Author manuscript; available in PMC 2014 December 01.
- Flöter J, Kaymak I, Schulze A. 2017. Regulation of Metabolic Activity by p53. *Metabolites*. 7, 21; doi:10.3390/metabo7020021.
- Harmand P, Duval R, Delage C, Simon A. 2005. Ursolic acid induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway and caspase-3 activation in M4Beu melanoma cells. *Int. J. Cancer*: 114, 1–11.
- INEGI. 2017. Instituto Nacional de Estadística y Geografía: “Estadísticas a propósito del... día mundial contra el cáncer (4 de febrero)”. Datos nacionales.
- Jordán J. 2003. Apoptosis: muerte celular programada. *Ambito farmacéutico: Bioquímica*. Vol 22 Núm. 6.
- Juárez C, Aguilar J, Juárez M, Bugarín R, Juárez P, Cruz E. 2013. Hierbas aromáticas y medicinales en México: tradición e innovación. *Revista Bio Ciencias* 119-129.
- Kavitha CV, Nambiar M, Narayanaswamy PB, Thomas E, Rathore U, Ananda CS, Choudhary B, Rangappa KS, Raghavan SC. 2013. Propyl-2-(8-(3,4-

difluorobenzyl)-29,59-dioxo-8-azaspiro [bicycle [3.2.1] octane-3,49-imidazolidine]-19-yl) acetate induces apoptosis in human leukemia cells through mitochondrial pathway following cell cycle arrest. *PLoS ONE* 8(7):e69103.

Kim SH, Bae HC, Park EJ, Lee CR, Kim BJ, Lee S, Park HH, Kim SJ, So I, Kim TW, Jeon JH. 2011. Geraniol inhibits prostate cancer growth by targeting cell cycle and apoptosis pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 407:129–134.

Lesgards JF, Baldovini N, Vidal N, Pietri S. 2014. Anticancer activities of essential oils constituents and synergy with conventional therapies: a review. *Phytother. Res.* 28: 1423–1446.

Legault J, Pichette A. 2007. Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *J Pharm Pharmacol* 59(12): 1643–1647.

Lin M, Tang S, Zhang C, Chen H, Huang W, Liu Y, Zhang J. 2016. Euphorbia factor L2 induces apoptosis in A549 cells through the mitochondrial pathway. *Acta Pharmaceutica Sinica B*: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2016.06.008>

Lu J, Li Y, Shen Z, Lu C, Lu L. 2016. TNF- α is involved in apoptosis triggered by grass carp reovirus infection in vitro. *Fish & Shellfish Immunology* 55: 559e567.

Messina F, Curini M, Di Sano C, Zadra C, Gigliarelli G, Rascón LA, Robles RE, Marcotullio MC. 2015. Diterpenoids and triterpenoids from the resin of *Bursera microphylla* and their cytotoxic activity. *J. Nat. Prod.* 78: 1184–1188.

Nagappan A, Lee H, Saralamma VV, Park HP, Hong GE, Yumnam S, Raha S, Charles SN, Shin SC, Kim EH, Lee WS, Kim GS. 2016. Flavonoids isolated from *Citrus platymamma* induced G2/M cell cycle arrest and apoptosis in A549 human lung cancer cells. *ONCOLOGY LETTERS* 13(9): 1394-1402.

OMS. 2017. Organización Mundial de la Salud. http://www.who.int/topics/traditional_medicine/es/ (Fecha de acceso: Junio 16 de 2017).

Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang F, Zhou T, Liu B, Bao J. 2012. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif.*, 2012, 45, 487–498 doi: 10.1111/j.1365-2184.2012.00845.x.

Pokrovskii A, Shintyapina A, Pronkina N, Kozhevnikov V, Plyasunova O, Shul'ts E, Tolstikov G. 2005. Activation of Apoptosis by Derivatives of Betulinic Acid in Human Tumor Cells in vitro. *DOKLADY BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS* Vol. 407.

Rascón Valenzuela LA. 2015. Caracterización química y biológica de los compuestos químicos con actividad antiproliferativa del extracto metanólico de *Asclepias subulata* (Decne. 1844). Tesis de Doctorado. Universidad de Sonora. México.

Rascón LA, Velázquez C, Garibay A, Medina LA, Vilegas W, Robles RE. 2015. Antiproliferative activity of cardenolide glycosides from *Asclepias subulata*. *J Ethnopharmacol* 171:280–286.

Rascón LA, Jiménez M, Velázquez CA, Garibay A, Medina LA, Gámez N, Robles RE. 2015. Antiproliferative and apoptotic activities of extracts of *Asclepias subulata*. *Pharm Biol*, Early Online: 1–1.

Reyes Zurita FJ. 2007. Caracterización del efecto anticancerígeno del ácido maslínico, triterpeno pentacíclico de origen natural. Tesis de Doctorado. Universidad de Granada.

Reynoso N. (2015, noviembre). Recursos contra el cáncer: presupuesto en salud y necesidades actuales en la atención del cáncer en México. Documento presentado en el Foro Legislativo “Necesidades de la atención integral a pacientes con cáncer en México. Un abordaje económico, clínico y social”,

Cámara de Diputados, Ciudad de México. Recuperado el 5 de enero de 2017 de:<http://www.cefp.gob.mx/difusion/evento/2015/forocancer/presentaciones/p10.pdf>)

Reynoso N, Armas D, Gutiérrez C, Lasa F, Mohar A. 2015. "Cancer Epidemiology: The challenge of the epidemiological surveillance system in Mexico", en prensa.

Rojas M, Salmen S, Berrueta L. 2009 .Muerte celular programada: I. Activación y mecanismos de regulación. Revista Médica de la Extensión Portuguesa - ULA. Vol 4/Num 3/ 2009.

Siegel R, Naishadham D, Jemal A. 2013. Cancer Statistics, 2013. CA CANCER J CLIN; 63:11–30.

Tornero D, Ceña V, Jordán J. 2002. La mitocondria como diana farmacológica en los procesos neurodegenerativos. BIOQUIMICA; VOL 21 NÚM 11.

Zhang L, Zhang S. 2011. Modulating Bcl-2 family proteins and caspase-3 in Induction of apoptosis by paeoniflorin in human cervical cancer cells. *Phytother. Res.* 25: 1551–1557.

Zhang G, Zeng X, Zhang R, Liu J, Zhang W, Zhao Y, Zhang X, Wu Z, Tan Y, Wu Y, Du B. 2016. Dioscin suppresses hepatocellular carcinoma tumor growth by inducing apoptosis and regulation of TP53, BAX, BCL2 and cleaved CASP3. *Phytother. Res.* 23:1329–1336.

Zhao J, Li QQ, Zou B, et al. 2007. In vitro combination characterization of the new anticancer plant drug ss-elemene with taxanes against human lung carcinoma. *Int J Oncol* 31(2): 241–252.

Zou K, Liu C, Zhang Z, Zou L. 2015. The effect of elemene on lung adenocarcinoma A549 cell radiosensitivity and elucidation of its mechanism. *CLINICS* 2015;70(8):556-562.

ANEXOS

Anexo 1

“Apoptotic mechanisms with antiproliferative activity from *Bursera microphylla* resin”

Francisco H. González-Gutiérrez¹; Luisa A. Rascón-Valenzuela¹, Olivia Valenzuela-Antelo¹, M.C. Marcotullio², Ramón E. Robles-Zepeda¹.

¹Departamento de Ciencias Químico Biológicas, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad de Sonora, Encinas y Rosales Hermosillo, Sonora, México.

²Department of Pharmaceutical Sciences, University of Perugia, Via del Liceo, 1-06123 Perugia, Italy.

Corresponding author: Departamento de Ciencias Químico Biológicas, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales, Hermosillo, Sonora 83000, Mexico. E-mail address: robles.zepeda@unison.mx (R.E. Robles-Zepeda).

Department of Pharmaceutical Sciences, University of Perugia, Via del Liceo, 1-06123 Perugia, Italy. E-mail address: mariacarla.marcotullio@unipg.it (M.C. Marcotullio)

Keywords: Terpenes, cancer, apoptosis, caspases and *Bursera*.

Abstract

Lung cancer is the leading cause of cancer-related mortality worldwide. Due to the low therapeutic efficacy and serious side effects of current chemotherapeutic drugs, recent research on cancer has focused on the possibility of finding new drugs to help to fight it. Studies in the composition of the resin of *Bursera microphylla* showed the presence of several terpenoids and lignans. Some of these compounds proved to be active against different cancer cell lines. In this work the mechanism involved in the antiproliferative activity of compounds malabaricatrienol, dihydroclusin acetate, β -caryophyllene, ariensin, microphyllanin, and betulonic acid isolated from the resin of *B. microphylla* was studied. The apoptotic activity was determined by annexin V staining and propidium iodide (PI). The depolarization of the mitochondrial membrane potential was measured using JC-1. . Caspase activity was measured using antibody staining of active caspase. Cell arrest was assessed by quantification of DNA by staining with PI. The compounds malabaricatrienol, dihydroclusin acetate, β -caryophyllene, ariensin, microphyllanin, and betulonic acid induced apoptosis in A549 cancer cell line by loss of mitochondrial membrane potential and activation of the caspases and cell cycle arrest. The results obtained in the present study revealed that compounds isolated from the resin of *B. microphylla*, induced cell death by an apoptosis process which is caspase-dependent and it is activated, preferably, by intrinsic pathway.

INTRODUCTION

Lung cancer is the leading cause of cancer-related mortality worldwide (Siegel *et al.*, 2013). Most lung cancers belong to non-small cell lung cancer (80% of all lung cancers) (NSCLC) (Nagappan *et al.*, 2016). The survival rates of patients with NSCLC are poor and > 85% of patients succumb to the disease within 5 years of diagnosis. Due to the low therapeutic efficacy and serious side effects of current chemotherapeutic drugs, it is clear that a paradigm shift is required for the treatment of this disease. In this context, recent research on cancer has focused on the possibility of finding new drugs to help us fight it (Lin *et al.*, 2016 and Nagappan *et al.*, 2016).

Bursera microphylla A. Gray (Burseraceae), commonly known as “elephant tree” or “torote blanco”, is largely distributed in the Sonoran Desert in Mexico. The Seri ethnic group uses different parts of the plant (leaves, fruits, bark, and exudate) for treating several illnesses, such as sore throats and headache, and for wound healing. Mesina *et al* (2015) showed that *Bursera microphylla* resin constituted mainly terpenoids and lignans, and these compounds malabaricatrienol, dihydroclusin acetate, β caryophyllene, ariensin, microphyllanin and betulonic acid proved to be active against different cancer cell lines (Messina *et al*, 2015).

However, the molecular process through these substances induced their antiproliferative effect was not studied. Cells can die for three major processes, apoptosis, necrosis and autophagy. Apoptosis is one of the most clearly characterized cell death processes and it is very important in a cancer treatment, because is a highly organized and evolutionarily conserved cellular process that occurs under normal physiological conditions and is accompanied by de novo gene expression of caspases or other enzymes responsible for controlled cellular dissolution (Boroda; 2016). The development of novel strategies to specifically trigger apoptosis would be valuable for the treatment of various types of cancer (Zhang *et al.*, 2016.). Since apoptotic programs can be manipulated to produce massive changes in cell death, the genes and proteins

that control apoptosis are potential targets for anticancer drugs. Therefore, there is an increasing interest in identifying novel drugs with apoptosis-inducing properties in cancers of various origins (Rascón *et al.*, 2015).

The aim of the present work is to determine the molecular mechanisms of the compounds that showed antiproliferative activity in the cell line A549 derived from the resin of *B. microphylla*.

2.-MATERIAL AND METHODS

Compounds

Malabaricatrienol, dihydroclusine acetate, β -caryophyllene, ariensin, microphyllanin and betulonic acid, were isolated and characterized from the resin of *Bursera microphylla*, in a previous work (Figure 1) (Messina *et al.*, 2015).

Cell Line

Human alveolar adenocarcinoma A549 cells (ATCC number: CCL-185) were purchased from American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, USA). The cell line was maintained using DMEM high glucose growth medium supplemented with 5% of fetal bovine serum, 1% (v/v) penicillin-streptomycin solution (10,000 units penicillin and 10 mg streptomycin/mL), 0.75 % (v/v) L-glutamine 200 mM solution and 1% (v/v) sodium pyruvate 100 mM solution. Cells were grown in 75 cm² flask and were incubated at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO₂. Cells were transferred into fresh medium when they reached confluence and trypsin-EDTA solution (0.25%) was used for detach the cells.

Annexin V/PI staining

The effect of compounds isolated of *B. microphylla* resin on apoptosis induction in A549 cells was analyzed by double staining with annexin V-FITC and PI using flow cytometry (Rascón *et al.*, 2015). Briefly, A549 cells (200,000) were seeded

in 12 well plates to allow cell adhesion for 24 h. Based on the previous study, the cells were treated with malabaricatrienol (98.6 μM), dihydroclusin acetate (60 μM), β -caryophyllene (171.5 μM), ariensin (50 μM), microphyllanin (100 μM), and betulonic acid (40 μM) solutions for 24 h. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE, 70 μM) and doxorubicin (2 μM) were used as positive control. After the incubation period, cells were removed from the plates by trypsinisation and were transferred into 5 mL round-bottom polystyrene tubes. Cells were washed twice with cold PBS (200 $\times g$, 4 $^{\circ}\text{C}$, 7 min) and the pellet was resuspended in 50 μL of annexin V-FITC-binding buffer (1 mg/mL final concentration) and incubated for 10 min at room temperature in the dark. Subsequently, PI staining solution (0.5 mg/mL final concentration) was added and the cells were incubated under the mentioned conditions. After this period of time, the cells were washed twice and resuspended in cold PBS. The samples were immediately measured by FACS Canto II flow cytometer (BDSystems, San Jose, CA, USA). Results were analyzed by FACS DIVA 6.0 software (BDSystems, San Jose, CA, USA).

Mitochondrial membrane potential (MMP) assay

Mitochondrial membrane potential was measured using the fluorescent dye JC-1 (5,5',6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethyl-benzamidazolocarbo-cyanin iodide) by flow cytometry as described in Rascón *et al.* 2015. Briefly, A549 cells (200,000 cells per well, 12 well plates) were treated with solutions of malabaricatrienol (98.6 μM), dihydroclusin acetate (60 μM), β caryophyllene (171.5 μM), ariensin (50 μM), microphyllanin (100 μM), and betulonic acid (40 μM) for 24h. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE, 70 μM) and doxorubicin (2 μM) were used as positive controls. After trypsinisation and PBS washing, cells were incubated for 15 min in freshly prepared JC-1 solution (1.25 $\mu\text{g/mL}$ in culture medium) at 37 $^{\circ}\text{C}$ in the dark. Cells were washed twice with PBS to remove the spare dye and the pellet was resuspended in fresh culture medium. Cells were, then, analyzed by flow cytometry as soon as possible. Flow cytometry was performed on FACS Canto II flow cytometer.

Caspase activity assay

To determine the apoptotic pathway that the compounds can trigger, the activity of caspase-8 (initiator caspase of extrinsic pathway), caspase-9 (initiator caspase of intrinsic pathway) and caspase-3 (executioner caspase of both pathways) was measured using the commercial kits Fluorescein Active Caspase-3, Fluorescein Active Caspase-8 and Fluorescein Active Caspase-9 as described in Rascón *et al.* 2015. After treatment for 24 h with solutions of malabaricatrienol (98.6 μM), dihydroclusin acetate (60 μM), β -caryophyllene (171.5 μM), ariensin (50 μM), microphyllanin (100 μM), betulonic acid (40 μM), caffeic acid phenethyl ester (CAPE, 70 μM) and doxorubicin (DOXO, 2 μM), the cells were detached and washed twice with cold PBS (200 $\times\text{g}$, 4 $^{\circ}\text{C}$, 7 min). Then, the pellet was resuspended in 300 μL of culture medium (DMEM 5% FBS) containing 1 mL of caspase inhibitor-FITC (FITC-DEVD-FMK) and was incubated for 1h at 37 $^{\circ}\text{C}$ in the dark. Subsequently, the cells were washed twice and resuspended in wash buffer. The samples were immediately measured in FACS Canto II flow cytometer. The results were represented as the fold change in the activity of caspase-3, caspase-8 and caspase-9 compared to the cells treated with only vehicle (DMSO control).

Cell cycle analysis

Propidium iodide (PI) staining was used to analyze DNA content and cell cycle distribution as described in Fallahian *et al.* 2016. Briefly, A549 cells (200,000 cells per well, 12 well plates) were treated with solutions of malabaricatrienol (98.6 μM), dihydroclusin acetate (60 μM), β caryophyllene (171.5 μM), ariensin (50 μM), microphyllanin (100 μM), and betulonic acid (40 μM), colchicine (0.0125 μM) and doxorubicin (2 μM) (was used as positive control) for 24h and then were trypsinisation, PBS washing and fixed with 66.6% ice-cold ethanol. After fixation, cells were washed twice with ice-cold PBS and incubated for 30 min in freshly prepared RNase solution (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in PBS) at 37 $^{\circ}\text{C}$ in the dark without CO_2 . Then cells were washed twice with ice-cold PBS incubated for 30 min in prepared PI solution (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in PBS) in the dark. After this period of time, the cells were washed twice and resuspended in cold PBS. The samples

were immediately measured by FACS Canto II flow cytometer (BDSystems, San Jose, CA, USA). Results were analyzed by FACS DIVA 6.0 software (BDSystems, San Jose, CA, USA).

Statistical analysis

All experiments were performed at least three times, in triplicate. The data were expressed as the mean \pm standard deviation (GraphPad Prism 5, GraphPad Software, Inc., CA, USA). Statistical differences between groups of data were assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test (IBM, SPSS, Statistic 20 software, Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Compounds isolated from the *B. microphylla* resin induce cellular apoptosis in A549.

Apoptosis has become a fundamental factor in the research of new compounds with antiproliferative activity due to apoptosis causes an organized cell death, avoiding the release of the intracellular content in to the surrounding tissue (Rascón *et al.*, 2015). To examine whether the growth-inhibitory effect on A549 cells was associated with the induction of apoptosis, FITC conjugated annexin V and PI staining were used to distinguish apoptotic cells and the percentages of apoptotic cells shown in Figure 2. A significant percentage of A549 cells in apoptosis were obtained by treatment with malabaricatrienol (30%) and dihydroclusin acetate (26.5%) compared to the DMSO control (5%) with a $p < 0.01$. β -Caryophyllene, ariesin, microphyllanin and betulonic acid showed percentages of 10.5%, 10.5%, 2% and 4%, respectively. The percentages of

apoptosis induced by isolated substances on cancer cells evidenced that the mechanism of death is governed mainly by early and late apoptosis (Figure 2).

Effect of compounds isolated from the *B. microphylla* resin on the disruption of mitochondrial membrane potential.

Disruption of mitochondrial membrane potential represents one of the early events occurring during the apoptosis process. To determine the effects of the compounds isolated from the *B. microphylla* resin on the disruption of mitochondrial membrane potential of A549 cells JC-1, a cationic lipophilic fluorescent probe, was used. All the compounds induced loss of mitochondrial membrane potential particularly malabaricatrienol (96%), dihydroclusin acetate (96%) and β -caryophyllene (98%) as shown in Fig. 3 and this suggests that in the apoptosis activation pathway mitochondria are involved.

Compounds isolated from the *B. microphylla* resin induced Caspase activation.

The caspase protein family plays an important role in the initiation and execution pathways of cell apoptosis, in which caspase-3 acts central protease regulator and it is required for the progression of apoptosis activated during the cascade (Béchohra *et al.*, 2016).

Fig. 4A shows that caspase-3 was activated 3.1 times by treatment with dihydroclusin acetate and 2.5 times by malabaricatrienol, whereas caspase-8 (Fig. 4B) obtained an activation of 3.5 by malabaricatrienol and 2.7 by β -caryophyllene and caspase-9 (Fig. 4C) was activated 2.9 times by malabaricatrienol and 2.8 by ariesin. Therefore, we can conclude that the isolated compounds were able to induce apoptosis via caspases activation. Although both caspases-9 and 8 were activated, probably the main pathway is the intrinsic apoptotic one.

Compounds isolated from the *B. microphylla* resin induced cell cycle arrest in A549.

The cell cycle is controlled by a complex series of signaling pathways by which a cell grows, replicates its DNA and divides. This process includes mechanisms to ensure errors corrections while cell replication occurs, and if the correction cannot be performed, cells enter into the apoptotic process. However, in cancer cells, this regulatory process malfunctions and results in uncontrolled cell proliferation. Therefore, modulation of cell cycle is very important in cancer treatment with anti-cancer agents (Nagappan *et al.*, 2016). To address the precise mechanism responsible for the molecules mediated antiproliferative effect, the cell cycle distribution profile was examined. Fig. 4D show that β -cariofileno, ariensin and betulonic acid led to an accumulation of cells in the G2/M phase, microphyllanin in the G0/G1 phase and dihydroclusin acetate in S phase compared with control cells.

Discussion

Terpenoids are generally well absorbed by the body (through oral and transdermal pathways, or by inhalation) and are easily metabolized by oxidation, hydroxylation, and conversion into glucuronides or sulfates, although some of these molecules remain unchanged (Lesgards *et al.*, 2014). Some particular terpenoids constituents have been extensively studied *in vitro* and *in vivo* and have shown significant anticancer capabilities in combination with chemotherapy agents. Studies suggest that β -caryophyllene facilitates the passage of paclitaxel through cancer cells membrane and thus potentiates its anticancer activity (Legault and Pichette., 2008).

In the study by Messina *et al.*, 2015, malabaricatrienol, dihydroclusin acetate, β -caryophyllene, ariensin, microphyllanin, and betulonic acid isolated from resin of *B. microphylla*, were found to have antiproliferative activity against different cell lines including A549, which causes the greatest amount of death for cancers in

the world. So it was of primary importance to elucidate the mechanism of action to continue the study to formulate new drugs for the fight against cancer.

The induction of apoptosis in cancer cells emerges as a valuable approach to fight cancer (Zhang *et al.*, 2011). The growing understanding of the molecular events underlying the etiology of different cancers, as well as the signaling events which are critical for the continue growth and proliferation of cancer cells have enhanced the opportunities to develop novel drugs (Kavitha *et al.*, 2013) In the present work it was possible to demonstrate that the tested compounds induce apoptosis.

In order to know more about the apoptotic mechanism. The mitochondrial permeability was evaluated, since the collapse of the mitochondrial membrane potential causes mitochondrial dysfunction leading to swelling, cytochrome c release, and, finally, cell apoptosis (Lesgards *et al.*, 2014). This study demonstrated the ability of malabaricatrienol, dihydroclusin acetate, β -caryophyllene, ariensin, microphyllanin, and betulonic acid to induce a depolarization of mitochondria in line A549. Other studies demonstrated that α -bisabolol is also efficient against leukemia by depolarizing the mitochondrial membrane, among other processes (Cavaliere *et al.*, 2011). Germacrone also seems to depolarize the mitochondrial membrane of cancer cells in breast cancer (Chen *et al.*, 2011). Geraniol induces membrane depolarization of colon cells (Caco-2) (Carnesecchi *et al.*, 2002). Other terpenes, such as β -elemene, also alter the membrane of cancer cells (Zhao *et al.*, 2007).

It is known that activating the mitochondrial apoptosis pathway is likely to activate caspases leading to cell apoptosis. For that reason the activity of caspases was assessed. Currently, two major pathways for activation of caspase-dependent apoptosis mechanisms have been described: the extrinsic pathway and the intrinsic one. In the extrinsic pathway, caspase-8 is activated by ligand binding to specific death receptors on the cell surface. In the intrinsic pathway, caspase-9 is activated by mitochondrial stress. Activated caspase-8 and -9 then induce an activation of the downstream effector caspases, such as

caspase-3. Caspase-3 is one of the key executioners in the final execution phase of apoptosis (Cai *et al.*, 2011). In the Fig. 4 it was possible to demonstrate that the tested compounds induce apoptosis by means of the intervention of the caspase pathway by activating caspases-3, 8 and 9.

Apoptosis of cancer cells occurs through the activation of certain proteins of the caspase family, these proteins proteolytically activate a variety of cytoplasmic and nuclear substrates, inducing the typical phenomena characteristic of cell death by apoptosis. Caspases-3 and 9 are activated in leukemic cells cultured in the presence of limonene (Lesgards *et al.*, 2014). From a biochemical point of view, this requires the phosphorylation and activation of different proteins (p53, Bax, and p21/waf) involved in the cascade of events that ultimately leads to the activation of these caspases, which will eventually give the signal to destroy cancer cells, and to cell proliferation. This pathway also implies a decrease in the expression of genes bcl-2 (antiapoptotic), an increased expression of Bax genes (proapoptotic) and related proteins in cancer cells (Lesgards *et al.*, 2014). The results of the study show that compounds isolated from *B. microphylla* resin possess the ability to activate the apoptotic pathway by caspases-3, 8 and 9. For that it is necessary the o design more studies to test the evaluated the genes involving in the apoptotic pathway activity for compounds isolated from *B. microphylla* resin.

In order to have a broader picture of the mechanism of cell death, the effect on the cell cycle generated by the compounds was evaluated. β -Caryophyllene, ariensin and betulonic acid induce arrest in G2/M phase; dihydroclusine acetate in S phase and microphyllanin in G0/G1. Cell cycle is controlled by the periodic regulation of a number of cell cycle regulators, including cyclins, cyclin-dependent kinases (CDKs), and CDK inhibitory proteins (Kim *et al.*, 2011). Small molecule CDK inhibitors have been reported to induce apoptosis in several types of cancer cells (Grant *et al.*, 2003). Fallahian *et al.*, 2011 established that DANPT (7,13-diacetyl-5-angeloyl-20-nicotinyl-3-propionyl-1,2,6,7-tetrahydroingenol) induces arrest in G2/M and geraniol in G0/G1 (Kim *et*

al., 2011). By the obtained results we can assert that our compounds act by deactivating proteins like cyclin-dependent kinases (CDKs), which control the cell cycle and generate an arrest, which leads the cell to cellular apoptosis by depolarization of mitochondria (Fig. 3) and subsequent activation of protein caspases (Fig. 4). Induction of apoptosis and modulation of cell cycle is very important in cancer treatment with anti-cancer agents (Nagappan *et al.*, 2016), and we think that the tested compounds act to induce cellular apoptosis in line A549. However, more studies are necessary to test the theory.

Conclusion

The results obtained in the present study revealed that malabaricatrienol, dihydroclusin acetate, β -caryophyllene, ariensin, microphyllanin, and betulonic acid isolated from resin of *B. microphylla*, induced the cell death through apoptosis and cell cycle arrest process which is caspase-dependent and it is activated, preferably, by intrinsic pathway. This work constitutes one step forward to prove that these compounds from *B. microphylla* could be potential anticancer agents.

References

- Béchohra L, Laraba F, Hammoudi D. 2016. Cytotoxic activity of *androctonus australis hector* venom and its toxic fractions on human lung cancer cell line. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*: 22:29.
- Cai X, Zhang H, Tong D, Tan Z, Han D, Ji F, Hu W. 2011. Corosolic acid triggers mitochondria and caspase-dependent apoptotic cell death in osteosarcoma MG-63 Cells. *Phytother. Res.* 25: 1354–136.
- Carnesecchi S, Bradaia A, Fischer B, et al. 2002. Perturbation by geraniol of cell membrane permeability and signal transduction pathways in human colon cancer cells. *J Pharmacol Exp Therapeut* 303(2): 711–715.

Cavaliere E, Rigo A, Bonifacio M, Carcereri de Prati A, Guardalben E, Bergamini C, Fato R, Pizzolo G, Suzuki H, Vinante F. 2011. *Journal of Translational Medicine*: 9:45 <http://www.translational-medicine.com/content/9/1/45>.

Fallahian F, Ghanadian M, Aghaei M, Zarei SM. 2016. Induction of G2/M phase arrest and apoptosis by a new tetrahydroingenol diterpenoid from *Euphorbia erythradenia* Bioss. in melanoma cancer cells. *Biomed Pharmacother* 86:334–342.

Grant S, Roberts JD. 2003. The use of cyclin-dependent kinase inhibitors alone or in combination with established cytotoxic drugs in cancer chemotherapy. *Drug Resistance Updates* 6: 15–26

Kavitha CV, Nambiar M, Narayanaswamy PB, Thomas E, Rathore U, Ananda CS, Choudhary B, Rangappa KS, Raghavan SC. 2013. Propyl-2-(8-(3,4-difluorobenzyl)-29,59-dioxo-8-azaspiro [bicyclo [3.2.1] octane-3,49-imidazolidine]-19-yl) acetate induces apoptosis in human leukemia cells through mitochondrial pathway following cell cycle arrest. *PLoS ONE* 8(7):e69103.

Kim SH, Bae HC, Park EJ, Lee CR, Kim BJ, Lee S, Park HH, Kim SJ, So I, Kim TW, Jeon JH. 2011. Geraniol inhibits prostate cancer growth by targeting cell cycle and apoptosis pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 407:129–134.

Legault J, Pichette A. 2008. Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *J Pharm Pharmacol* 59(12): 1643–1647.

Lesgards JF, Baldovini N, Vidal N, Pietri S. 2014. Anticancer activities of essential oils constituents and synergy with conventional therapies: a review. *Phytother. Res.* 28: 1423–1446.

Lin M, Tang S, Zhang C, Chen H, Huang W, Liu Y, Zhang J. 2016. Euphorbia factor L2 induces apoptosis in A549 cells through the mitochondrial pathway. *Acta Pharmaceutica Sinica B*: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2016.06.008>

Messina F, Curini M, Di Sano C, Zadra C, Gigliarelli G, Rascón LA, Robles RE, Marcotullio MC. 2015. Diterpenoids and triterpenoids from the resin of *Bursera microphylla* and their cytotoxic activity. *J. Nat. Prod.* 78: 1184–1188.

- Nagappan A, Lee H, Saralamma VV, Park HP, Hong GE, Yumnam S, Raha S, Charles SN, Shin SC, Kim EH, Lee WS, Kim GS. 2016. Flavonoids isolated from *Citrus platymamma* induced G2/M cell cycle arrest and apoptosis in A549 human lung cancer cells. *ONCOLOGY LETTERS* 13(94): 1394-1402.
- Rascón LA, Velázquez C, Garibay A, Medina LA, Vilegas W, Robles RE. 2015. Antiproliferative activity of cardenolide glycosides from *Asclepias subulata*. *J Ethnopharmacol* 171:280–286.
- Rascón LA, Jiménez M, Velázquez CA, Garibay A, Medina LA, Gámez N, Robles RE. 2015. Antiproliferative and apoptotic activities of extracts of *Asclepias subulata*. *Pharm Biol*, Early Online: 1–1.
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. 2013. Cancer Statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 2013; 63:11–30.
- Zhang G, Zeng X, Zhang R, Liu J, Zhang W, Zhao Y, Zhang X, Wu Z, Tan Y, Wu Y, Du B. 2016. Dioscin suppresses hepatocellular carcinoma tumor growth by inducing apoptosis and regulation of TP53, BAX, BCL2 and cleaved CASP3. *Phytother. Res.* 23:1329–1336.
- Zhang L, Zhang S. 2011. Modulating Bcl-2 family proteins and caspase-3 in Induction of apoptosis by paeoniflorin in human cervical cancer cells. *Phytother. Res.* 25: 1551–1557.
- Zhao J, Li QQ, Zou B, et al. 2007. In vitro combination characterization of the new anticancer plant drug ss-elemene with taxanes against human lung carcinoma. *Int J Oncol* 31(2): 241–252.
- [Zhong Z](#), [Chen X](#), [Tan W](#), [Xu Z](#), [Zhou K](#), [Wu T](#), [Cui L](#), [Wang Y](#). 2011. Germacrone inhibits the proliferation of breast cancer cell lines by inducing cell cycle arrest and promoting apoptosis. *Eur J Pharmacol* 667(1-3):50-5.

Figures

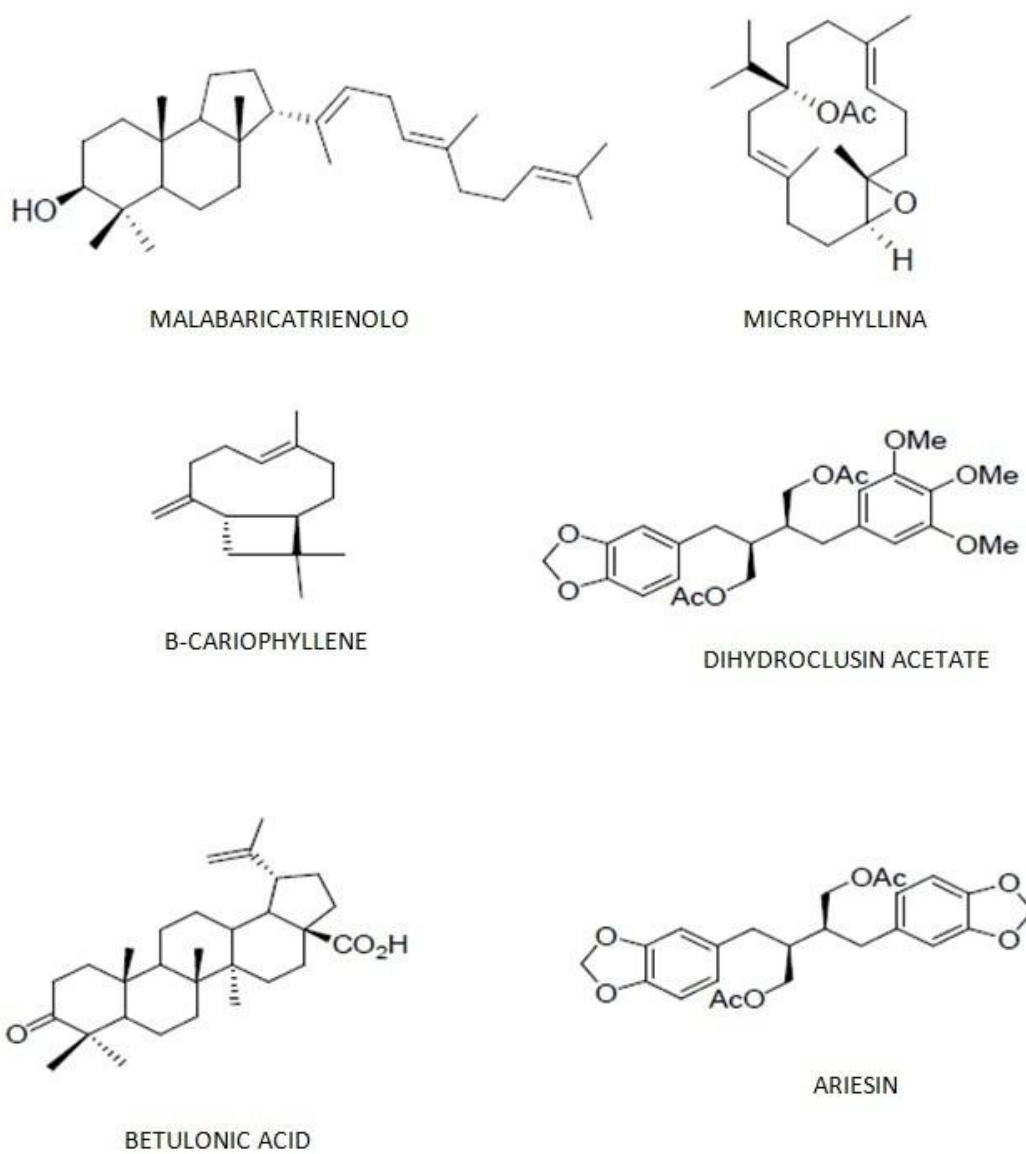


Figure 1. Structure of the compounds derived of from *B. microphylla* resin.

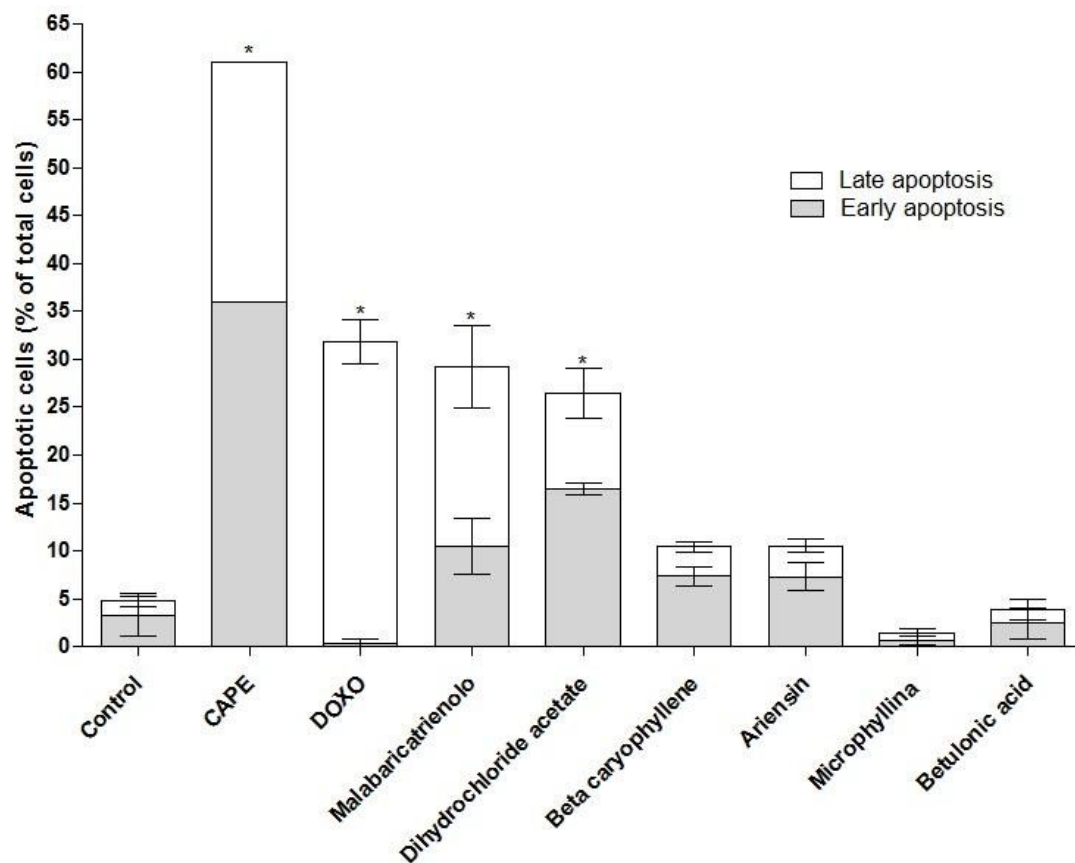


Figure 2. Percentages of apoptotic cells induced for the treatment with compounds isolated of *B. microphylla*. Values represent the mean \pm SD of at least three independent experiments. *Statistical significance based on the comparison with control cells (DMSO) for each condition, $p < 0.01$ (Tukey's test).

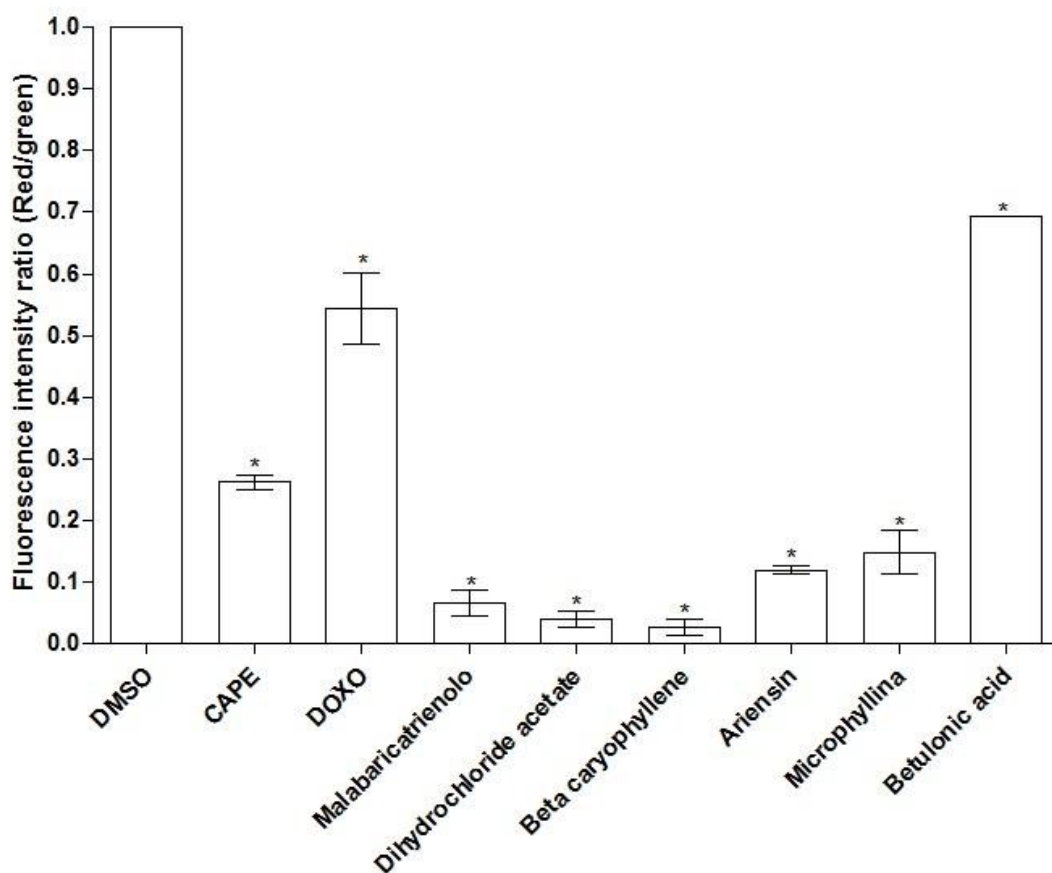


Figure 3. Depolarization of mitochondrial membrane potential in A549 cells treated with compounds isolated of *B. microphylla* resin. Results are expressed as the fluorescence intensity ratio (red/green) for JC-1 \pm SD of triplicate, and are representative of three independent experiments. ANOVA * significant differences respect to control cells (DMSO), $p < 0.01$ (Tukey's test). CAPE and doxorubicin were used as positive control of apoptosis.

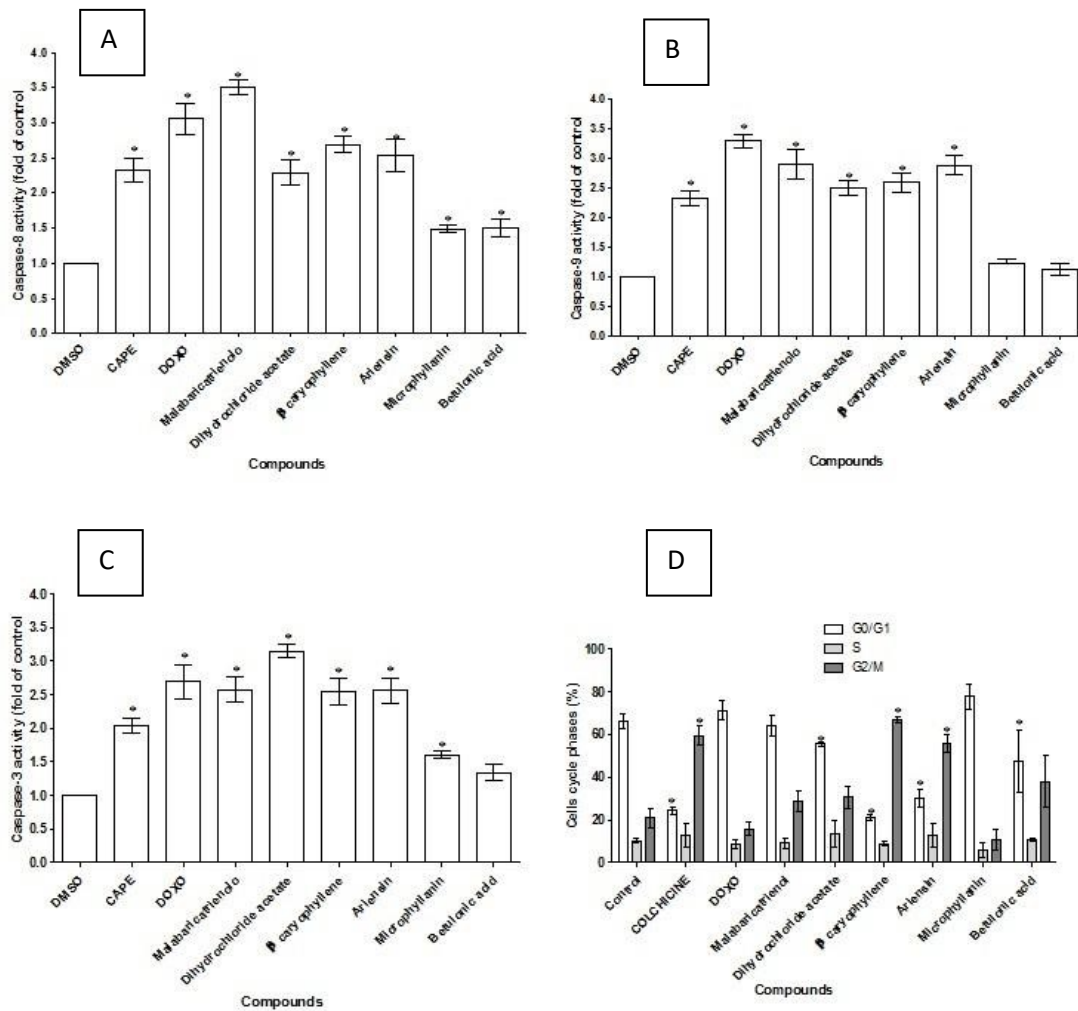


Figure 4. Caspase activity (A: caspase-8; B: caspase-9 and C: caspase-3) and cell cycle arrest (D) in A549 cells treated with compounds isolated of *B. microphylla* resin. Results are expressed as mean \pm SD of triplicate, and are representative of three independent experiments. ANOVA * significant differences respect to control cells (DMSO), $p < 0.01$ (Tukey's test). CAPE and doxorubicin were used as positive control of apoptosis.