



ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE PROPÓLEOS CUBANOS SOBRE EL TUMOR ASCÍTICO DE EHRlich.

Dámarys Suárez¹, David Díaz², Raquel Puente³, William Socorro³, Luis Durán², José L. Bello², Juan C. Rodríguez².

1: Estación Experimental Apícola (EEA)

2: Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología (INOR)

3: Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL)

INTRODUCCION

Los propóleos son polímeros balsámicos resinosos elaborados por las abejas a partir de diversas resinas de plantas, potencializadas por sus enzimas salivales, incorporándoles los residuos de la digestión láctica de los gránulos del polen. Se ha demostrado que poseen diferentes actividades terapéuticas, por lo que han constituido alternativas de fármacos usados tradicionalmente. Su composición química es muy diversa y depende en gran medida de la flora de las zonas donde se ubican las colmenas.

Se ha demostrado que algunos componentes presentes en los propóleos son los responsables de las diferentes actividades biológicas que exhiben estas sustancias naturales, como son las actividades inmunomoduladoras, antibacterianas, antivirales y antiinflamatorias. La comprobación farmacológica de las propiedades atribuidas a los propóleos es de gran importancia porque forma parte de su aval preclínico como medicamento. Estos productos han mostrado ser muy eficaces, de muy baja toxicidad y reportan grandes beneficios a la industria farmacéutica y a la economía en general, puesto que su obtención no es costosa, y resulta factible y conveniente su producción a gran escala.

La actividad antitumoral de preparaciones etanólicas y acuosas de propóleos ha sido demostrada tanto "*in vitro*", como "*in vivo*", administradas por diferentes vías: oral, intraperitoneal y subcutánea^{1,6,10}. S. Scheller y colaboradores demostraron en ratones inoculados con el Carcinoma de Ehrlich el efecto antitumoral del EEP, y lo compararon con la bleomicina¹².

El efecto antitumoral de EEP contra el TAE se supone que está relacionado con el contenido de flavonoides presentes en el extracto⁷. Los flavonoides afectan los estadios metabólicos de las células del carcinoma de Ehrlich a través de la inhibición de la incorporación de timidina, uridina y leucina que trae como consecuencia la inhibición de la síntesis del DNA tumoral³. A pesar de ello, existen diversas opiniones en cuanto a la relación composición química - actividad antitumoral.

Se ha estudiado el efecto de los derivados de propóleos solubles en agua en el crecimiento de los tumores y la instalación de metástasis en el ratón CBA con carcinoma mamario transplantado⁸.

Los derivados solubles en agua de los propóleos administrados a los ratones siete días antes de la inoculación intravenosa de células tumorales hicieron bajar sensiblemente el número de metástasis pulmonares; sin embargo, se ha reportado que una inyección de Derivados Solubles en Agua (DSA) de propóleos simultánea con la inoculación de células tumorales o puestas a los siete días de esta inoculación no tuvo ningún efecto en el número de metástasis pulmonares ².

Al existir reportes internacionales de la actividad antitumoral de los propóleos nos trazamos como objetivos investigar si los propóleos cubanos recolectados en distintas zonas de la provincia Pinar del Río, mostraban actividad antitumoral frente al Tumor Ascítico de Ehrlich, si disminuían la aparición de colonias del TAE en pulmones cuando se inoculaba este tumor por el plexo retrocular, en modelos experimentales.

MATERIALES Y METODOS

II.1.- Preparación de las muestras de Propóleos.

En nuestro estudio se ensayaron tres muestras de propóleos recolectadas en diferentes zonas de la provincia de Pinar del Río. Los propóleos fueron nombrados como P2, P3 y P4, esta nomenclatura responde sólo a las facilidades de trabajo en el laboratorio, según se puede observar en la Tabla No. 1.

Tabla No.1 Especificaciones de los propóleos ensayados.

Muestra	Masa de propóleos disuelta en 100ml de alcohol	Clasificación	Lugar de colecta
P2	10.12	Pardo	Apiario San Simón San Juan y Martínez
P3	10.00	Rojo	Apiario los Sitios Sandino
P4	10.00	Rojo	Apiario Las Tunas costa de Consolación del Sur

Se pesaron 100g de propóleos en todos los casos, se colocaron en frío a -4 °C, y al cabo de 24 horas se desmenuzó finamente. Las muestras pulverizadas se disolvieron en etanol al 70%. Finalmente el EEP obtenido se filtró varias veces hasta que desapareció toda turbidez, se concentró en evaporador al vacío y se pesó el sólido resultante. A partir de este último se tomaron 10g y se redisolviéron en 100 ml de etanol al 70%.

Para preparar las dosis de propóleos empleadas en nuestros ensayos se partió de una solución madre donde el 60% correspondía al EEP y el 40% al Tween 80 de la Merck. A partir de las soluciones madres se prepararon dosis de (200, 150, 100, 50 y 25 mg/Kg) en Tween 80 al 6% disuelto en agua



destilada; o sea, muy por debajo del porciento de Tween empleado en investigaciones realizadas por Scheller¹¹ y que nos permitió hacer grandes diluciones sin cambios físico-químicos observables en días, tales como: floculación, precipitación, formación de grumos o pérdida de la transparencia. De todas las preparaciones ensayadas fue esta la que concedió al propóleo un grado de estabilidad aceptable. Por esta razón se utilizó el Tween como solvente del propóleo, además por poseer la propiedad de favorecer los procesos de absorción de los fármacos⁴. Su comportamiento fue muy diferente al extracto etanólico, el cual provocó cambios anatomopatológicos en los órganos de la cavidad abdominal tales como: engrosamiento y adherencia de los órganos de esta cavidad, entre ellos y a las paredes, probablemente a causa de la precipitación *in situ* de los componentes menos solubles del propóleo. También se presentaron síntomas tóxicos debido al alcohol para el tratamiento de dosis altas y repetidas, por cualquier vía de administración, no siendo así para las dosis bajas en tratamiento único. Asimismo desechamos las preparaciones acuosas puesto que no cumplían con los parámetros físico-químicos antes mencionados.

En nuestros estudios fueron ensayadas dos vías de administración, la oral y la intraperitoneal, siendo esta última la más utilizada debido a sus ventajas. Es de destacar que las dichas muestras se prepararon momentos antes de ser utilizadas.

II.2.- Estudios toxicológicos.

Con la finalidad de ensayar dosis referidas en la literatura, se procedió a realizar ensayos toxicológicos previos, con el propósito de conocer si nuestros propóleos eran tóxicos en determinado rango de dosis. Esto se hace atendiendo que la composición química de los propóleos varía en dependencia de las zonas ecológicas.

Se realizaron dos ensayos toxicológicos:

- 1.- Ensayos de toxicidad aguda.
- 2.- Ensayos de toxicidad subaguda.

II.2.1.- Ensayos de toxicidad aguda.

Se emplearon para estos fines ratones NMRI y BDF1 machos de pesos comprendidos entre 19-25g, provenientes de CENPALAB, los cuales se randomizaron a razón de 10 animales por caja en 20 grupos, para cada línea. Los animales fueron mantenidos en condiciones de vida uniformes, comida y agua ad libitum y una temperatura de 25 °C promedio.

Las dosis ensayadas fueron de 25, 50, 100, 150 y 200 mg/kg. Los grupos del 1-5 correspondieron al P2, del 6-10 al P3, del 11-15 al P4 y del 16-20 a los controles con Tween 80, ya que este fungió como solvente de las muestras. Las preparaciones fueron administradas intraperitonealmente con jeringuillas tipo tuberculina y agujas No. 26G.



Treinta días seguidos, después de administrárseles el tratamiento, se les midieron los siguientes parámetros:

- muerte.
- alteraciones gastrointestinales.
- alteraciones neurológicas.
- alteraciones dérmicas.
- alteraciones respiratorias.
- alteraciones de la conducta.

II.2.2.- Ensayos de toxicidad subaguda.

Se emplearon para estos fines ratones NMRI y BDF1 machos, de pesos comprendidos entre 19-25g, provenientes de CENPALAB. Se randomizaron a razón de 10 animales por caja en 20 grupos, para cada línea. Los animales fueron mantenidos en condiciones de vida uniformes, comida y agua ad libitum y una temperatura de 25 °C promedio.

Las dosis ensayadas fueron de 25, 50, 100, 150 y 200 mg/kg. Los grupos del 1-5 correspondieron al P2, los grupos del 6-10 al P3, del 11-15 al P4, del 16-20 a los controles con Tween 80, ya que este fungió como solvente de las muestras.

Las preparaciones fueron administradas intraperitonealmente con jeringuillas de tipo tuberculina y agujas No. 26G durante 15 días. Durante este período y hasta completar treinta días, se les midieron los parámetros observados en el estudio toxicológico agudo.

II.3.- Transplante de tumores murinos.

Se transplantó el Carcinoma de Ehrlich, un tumor murino, mantenido por el Grupo de Transplante del Departamento de Ensayos Preclínicos del INOR:

II.3.1.- Transplante del Tumor Ascítico de Ehrlich.

Ratones línea IOR, hembras, con TAE en pase No. 3, fueron escogidos como donantes, para expandir el tumor que se usó en el experimento.

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical e introducidos en un baño de alcohol yodado al 70%, con la finalidad de esterilizar toda su superficie corporal y poder ser introducidos en el Area de Transplante. Una vez terminado este paso, se procedió a introducir 5 ml de Salina Fisiológica 0.9% en la cavidad peritoneal de los animales con jeringuilla de 5 ml y aguja No. 20G, seguidamente se les practicó un masaje abdominal con el fin de remover todas las células tumorales crecidas en dicha cavidad. El líquido ascítico fue extraído y depositado en un tubo plástico de 50 ml y puesto en baño helado.

Se realizó una dilución del contenido ascítico 1:100 en Tripán Azul al 0.3% y se procedió a hacer un conteo de células en cámara de Neubauer, tomando como criterio de viabilidad las células no teñidas. El conteo se realizó contando los cuatro cuadrantes externos de la cámara, como sigue:

$$C1 + C2 + C3 + C4 / 4 = \text{No. células} \times 10^6.$$

Finalmente se ajustaron las concentraciones celulares a 8×10^6 células tumorales por ml, para los experimentos de inoculación subcutánea e intraperitoneal, y a 80×10^6 células por ml para los experimentos inoculados por el plexo retrocular. Los ajustes de concentraciones fueron realizados en todos los casos con Salina Fisiológica 0.9%.

II.4.- Diseño de los Experimentos de Actividad Antitumoral.

II.4.1.- Actividad antitumoral en el Carcinoma de Ehrlich inoculado por vía subcutánea.

Ratones NMRI machos, de 22-25 gramos de peso, provenientes de CENPALAB, fueron inoculados con Tumor de Ehrlich, en la región axilar, previa esterilización del área, a razón de 2×10^6 células en volumen de 250 μL , por animal, con jeringuillas tipo insulina de 40 UI y agujas No. 26G.

Veinticuatro horas después fueron randomizados a razón de 10 animales por caja, en dos grupos, mantenidos con comida y agua ad libitum y una temperatura uniforme de 25 °C. El tratamiento consistió en la administración intraperitoneal de una dosis de 100 mg/Kg de P3 por doce días consecutivos, y el control fue tratado con el solvente.

Los parámetros medidos fueron la sobrevida en días, el incremento de la sobrevida a los 60 días, así como el crecimiento tumoral según la fórmula^{5,9}:

$$\text{Peso Tumoral (mg)} = \text{Largo (mm)} \times [\text{Ancho (mm)}]^2 / 2.$$

II.4.2.- Actividad antitumoral en T.A.E. inoculado por vía intraperitoneal.

Ratones NMRI machos, de 22-25 gramos de peso, provenientes de CENPALAB, fueron inoculados con Tumor Ascítico de Ehrlich, intraperitonealmente, previa esterilización del área, a razón de 2×10^6 células en volumen de 250 μL , por animal, con jeringuillas tipo insulina de 40 UI y agujas No. 26G. Veinticuatro horas después fueron randomizados a razón de 10 animales por caja, en 8 grupos, mantenidos con comida y agua ad libitum y una temperatura uniforme de 25 °C.

El tratamiento consistió en la administración intraperitoneal de dosis de 100 y 50 mg/Kg de los

propóleos P3 y P2, por nueve días consecutivos. Se mantuvo una caja control positivo, usando 5-Fluoruracilo en dosis de 20 mg/Kg (Shanghai Pharmaceutical Industry Corporation) y tres controles negativos con el empleo del solvente.

Los parámetros medidos fueron el incremento de la sobrevida a los 30 días y el peso corporal.

II.5.- Actividad inhibitoria sobre la colonización del T.A.E. en modelos pulmonares.

Ratones NMRI machos, de 22-24 gramos de peso, provenientes de CENPALAB, fueron inoculados con el TAE, por el plexo retrocular, a razón de 2×10^6 células en volumen de 25 μ L, por animal, con jeringuillas tipo insulina de 40 UI y agujas No. 26G.

Veinticuatro horas después fueron randomizados a razón de 10 animales por caja, en 5 grupos, mantenidos con comida y agua ad libitum y una temperatura uniforme de 25 °C. El tratamiento consistió en la administración intraperitoneal de una dosis de 100 mg/Kg de los propóleos P3 y P4, por nueve días consecutivos. Se mantuvo una caja control positivo, usando 5 Fluoruracilo en dosis de 20 mg/Kg (Shanghai Pharmaceutical Industry Corporation) y dos controles negativos con el empleo del solvente.

Al décimo día de la inoculación los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y extraídos los pulmones. Estos órganos fueron lavados en S.F. 0.9% y luego introducidos en solución de Bouin (Acido pícrico 70 ml, Formol 20 ml y Acido acético 10 ml) preparada momentos antes de la fijación. Las metástasis superficiales fueron contadas 48 horas después de la fijación, auxiliados por un estereoscopio de la Carl Zeiss.

II.6.- Evaluación de los experimentos de tamizaje.

La sobrevida de los animales fue observada diariamente y determinado el aumento de sobrevida a diferentes tiempos según el ensayo, utilizando las siguientes fórmulas:

- Promedio de sobrevida (SP) $SP = (NRM \times D)/n$

donde: NRM= Número de Ratones Muertos.
D= Día en el cual mueren los ratones.
n= Cantidad de ratones por grupo.

- Aumento de Sobrevida (AS) $\%AS = SPt - SPc / SPc \times 100$

donde: SPt= Sobrevida Promedio de los tratados.
SPc= Sobrevida Promedio de los controles.



- Porcentaje de Sobrevida (% S) $\% S = \text{NRV}/n \times 100$
donde: NRV= Número de Ratonos Vivos.

Se tomó como criterio de Actividad Antitumoral:

$$\text{A.S.} > 25\% \quad 4,5$$

Se evaluaron además, los pesos de los animales diariamente, durante todo el experimento, los cuales fueron promediados según los grupos experimentales.

II.7.- Análisis estadístico de los resultados.

Los datos experimentales obtenidos fueron procesados por el paquete estadístico SPSS.

Se estimó el porcentaje de sobrevida promedio utilizando el método de Kaplan-Meier, y se compararon las curvas de sobrevida para cada grupo mediante el test de Log-Rank, con un 95% de confianza.

El volumen tumoral y el conteo de metástasis se analizaron mediante el test de comparación de medias para muestras independientes con un 95% de confianza.

Se utilizó además, el paquete estadístico PRIMER para determinar el conteo de metástasis mediante el test ANOVA de clasificación múltiple, y se realizó la comparación entre grupos mediante el test de Student-Newman-Keuls.

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

III.1.- Ensayos de toxicidad.

III.1.1.- Ensayos de toxicidad aguda.

La prueba de toxicidad realizada a las muestras de propóleos no evidenciaron síntomas tóxicos en los animales de las líneas BDF1 y NMRI, durante los treinta días de observación, como se observa en la Tabla No. 2.

Tabla No.2 Resultados del estudio de toxicidad aguda.

Muestra	Dosis(mg/Kg)	No. animales	Mortalidad	Signos Tóxicos
P2	200	10	0	No
	150	10	0	No
	100	10	0	No
	50	10	0	No
	25	10	0	No
P3	200	10	0	No
	150	10	0	No
	100	10	0	No
	50	10	0	No
	25	10	0	No
P4	200	10	0	No
	150	10	0	No
	100	10	0	No
	50	10	0	No
	25	10	0	No

III.1.2.- Ensayos de toxicidad subaguda.

Los resultados obtenidos en este ensayo no reflejan síntomas tóxicos en ratones de la línea BDF₁, no siendo así en ratones NMRI, donde las dosis de 200, 150 y 100 mg/Kg de P3 provocaron en algunos animales inflamación testicular. En P2, las dosis de 100, 150 y 200 mg/Kg provocaron alteraciones gastrointestinales en algunos animales, apareciendo síntomas diarreicos asociados al tratamiento, y que desaparecen terminado este (Tabla No. 3).

Tabla No.3 Resultados del estudio de toxicidad subaguda.

Muestra	Dosis(mg/Kg)	No. animales	Mortalidad	Signos Tóxicos
P2	200	10	0	Diarreas 100%
	150	10	0	Diarreas 100%
	100	10	0	Diarreas 30%
	50	10	0	No
	25	10	0	No
P3	200	10	0	Inflamación Testicular 100%
	150	10	0	Inflamación Testicular 90%
	100	10	0	Inflamación Testicular 50%
	50	10	0	No

	25	10	0	No
P4	200	10	0	No
	150	10	0	No
	100	10	0	No
	50	10	0	No
	25	10	0	No

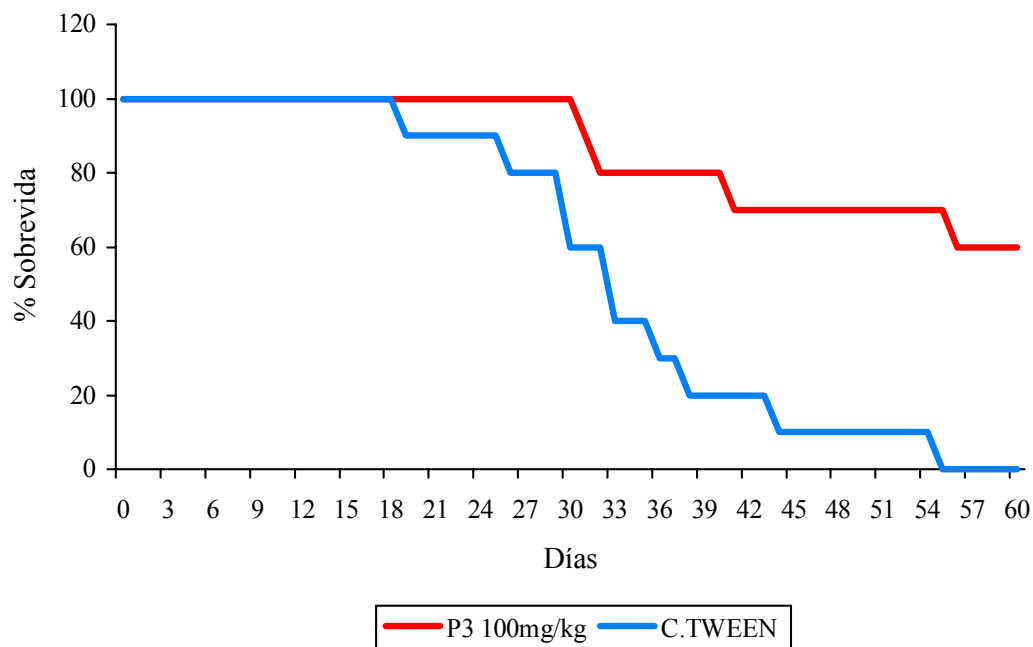
De las tres dosis máximas utilizadas en este ensayo, se escogió la de 100 mg/Kg de peso por ser la menos tóxica.

Se comenzó a realizar el estudio histopatológico de dichos propóleos, y macroscópicamente los daños son, aparentemente, en la bolsa escrotal para P3. No se reportan resultados concluyentes porque los estudios no han sido terminados. Es importante señalar que los signos de inflamación testicular desaparecen terminado el tratamiento.

III.2.- Actividad antitumoral sobre el Carcinoma de Ehrlich.

Ratones NMRI inoculados con el Carcinoma de Ehrlich por vía subcutánea y tratados durante 12 días con P3 en dosis de 100 mg/Kg, exhiben un 60% de sobrevivencia al cabo de 60 días, tiempo para el cual los controles tratados con Tween 80 al 6%, habían perecido todos. Como se observa en la Fig. No. 1, el P3 en dosis de 100 mg/Kg es capaz de mantener con vida a más de la mitad de los animales del grupo, lo que evidencia actividad antitumoral del P3 para esta dosis, en este tumor.

Fig. 1 Sobrevida de ratones NMRI inoculados con TAE sc y tratados con P3 100 mg/Kg de peso.

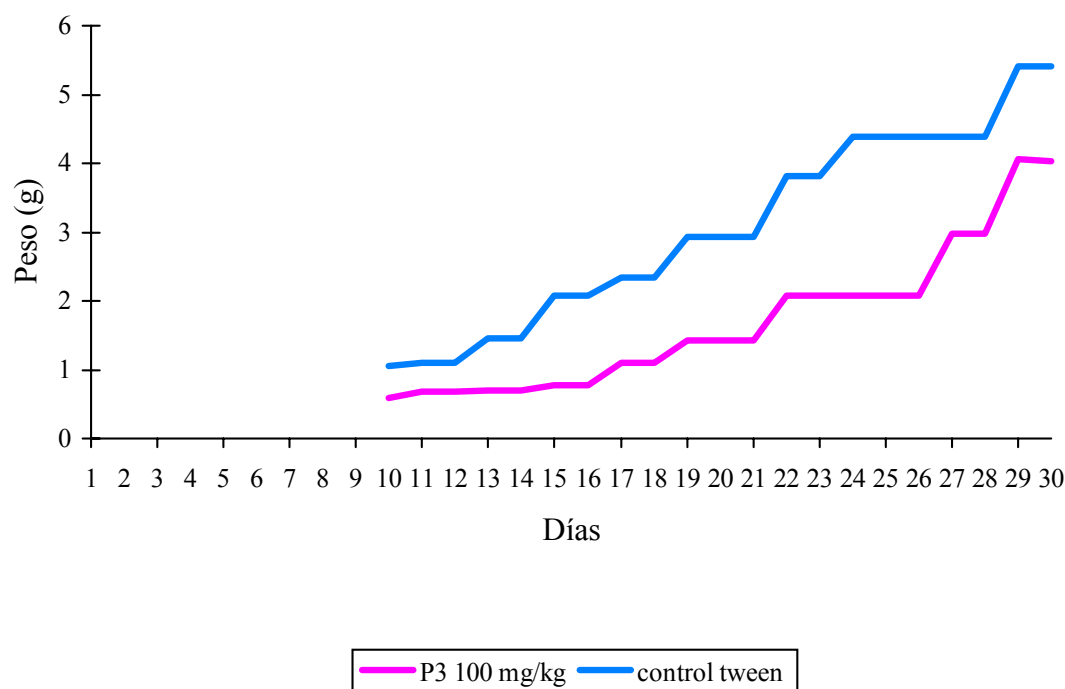


El análisis del incremento de sobrevida de este experimento arroja un valor del 52.78% y 152.78 % del criterio T/C para P3 respecto al control, lo que se puede considerar como actividad antitumoral, teniendo en cuenta que el criterio internacional de actividad es cuando se logra rebasar el 25% del AS frente a los controles o un 125% del criterio T/C [4, 5].

Los análisis estadísticos demuestran que hubo diferencias significativas para $P < 0.05$ entre los grupos tratados con P3 en dosis de 100 mg/Kg y el control (Tween 80 al 6%). Estos resultados se corresponden con los reportados internacionalmente para los EEP en TAE ¹².

Por otra parte, el seguimiento del crecimiento tumoral demuestra que los animales tratados con P3 en la dosis mencionada, tienen un crecimiento retardado con respecto a los controles negativos (Fig. No. 2). Es de notar que las mediciones efectuadas a partir del décimo día de tratamiento, muestran que este efecto es tratamiento dependiente, ya que al terminar el mismo, el volumen tumoral mostró un crecimiento más acelerado, no obstante los grupos tratados con P3 se mantuvieron por debajo de los controles en cuanto a este parámetro, existiendo diferencias significativas entre los mismos para $P < 0.05$, en el tiempo de medición del ensayo.

Fig. 2 Crecimiento tumoral del Carcinoma de Ehrlich sc en ratones NMRI tratados con P3 100 mg/Kg de peso.

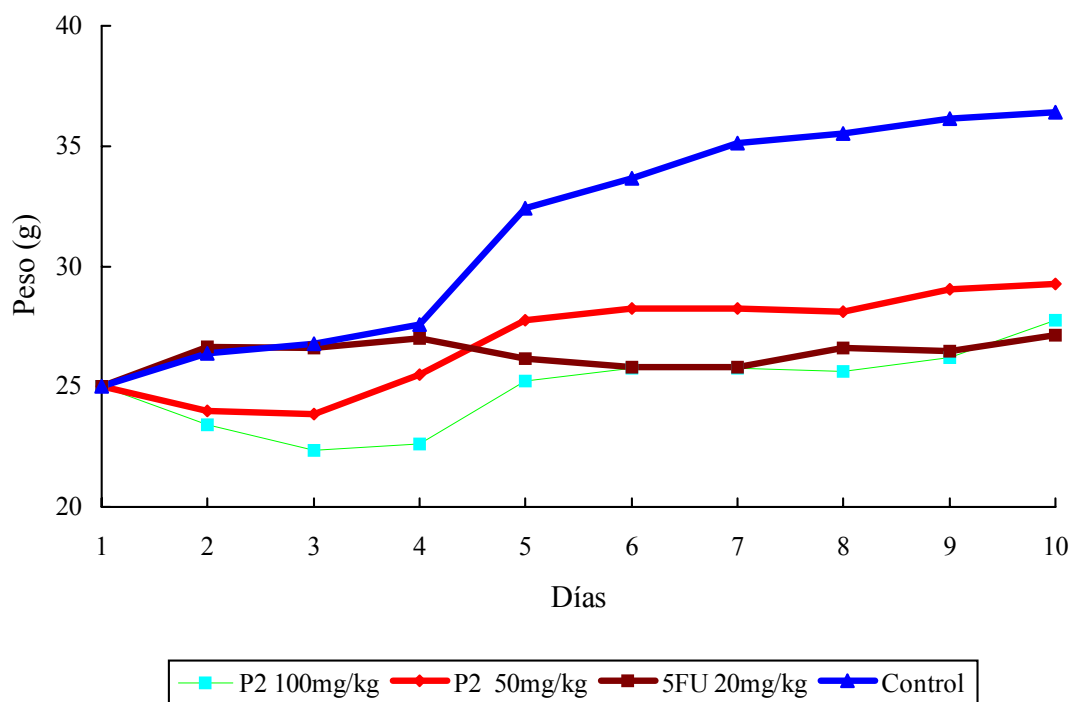


Estudios realizados en ratones NMRI con TAE inoculado por vía intraperitoneal y tratados con P2 y P3 en dosis de 50 y 100 mg/Kg, demuestran que los grupos que recibieron la dosis de 100 mg/Kg de P3 exhiben una sobrevida mayor que los controles negativos, no siendo así para las dosis de 50 mg/Kg de P3 y tampoco para las dosis de P2. Existiendo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los grupos tratados con P3 100 mg/Kg, 5 FU y control Tween 80 al 6%, en cuanto al comportamiento de sobrevida. Podemos decir entonces, que hay una evidencia de actividad antitumoral del P3 para esta dosis de propóleos, a juzgar por el 24,5% del A.S. Al parecer esta dosis es insuficiente para el tratamiento del Tumor Ascítico de Ehrlich. Finalmente se corrobora lo descrito por Scheller y colaboradores¹², donde los propóleos "in vivo" ejercen actividad antitumoral en el TAE.

Teniendo en cuenta que en el TAE el incremento del peso corporal es directamente proporcional al crecimiento tumoral, podemos afirmar que las dosis de 50 y 100 mg/Kg de P2 fueron capaces de retardar el crecimiento tumoral. A juzgar por los resultados mostrados en la Fig. No. 3 estas dosis mantienen los valores del crecimiento tumoral muy cercanos a los valores del 5FU. Estos resultados mostraron diferencias significativas entre los tratados y los controles para $P < 0.05$. Sin embargo, esto

no produjo un incremento significativo en el Aumento de Sobrevida.

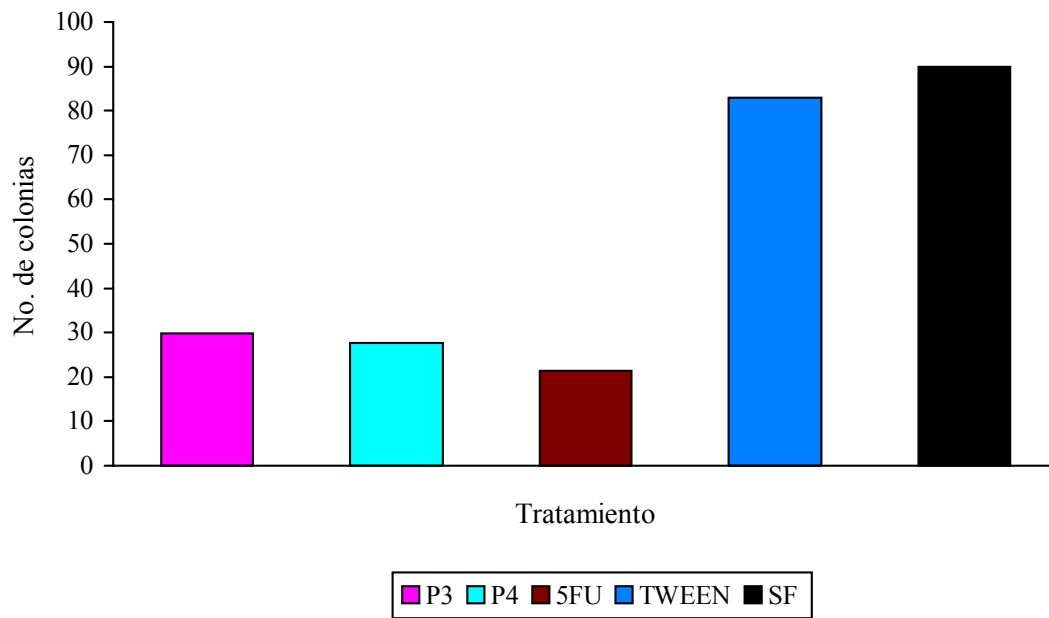
Fig. 3 Incremento del peso de ratones NMRI inoculados con TAE i.p. y tratados con P2 100 mg/kg de peso.



III.3.- Actividad inhibitoria de la formación de colonias pulmonares del TAE.

Los propóleos 3 y 4 fueron capaces de disminuir el número de colonias causadas por el T.A.E. inoculado por vía hematogena, usando el plexo retrocular, en ratones NMRI, a juzgar por los resultados que se muestran en la Fig. No. 4.

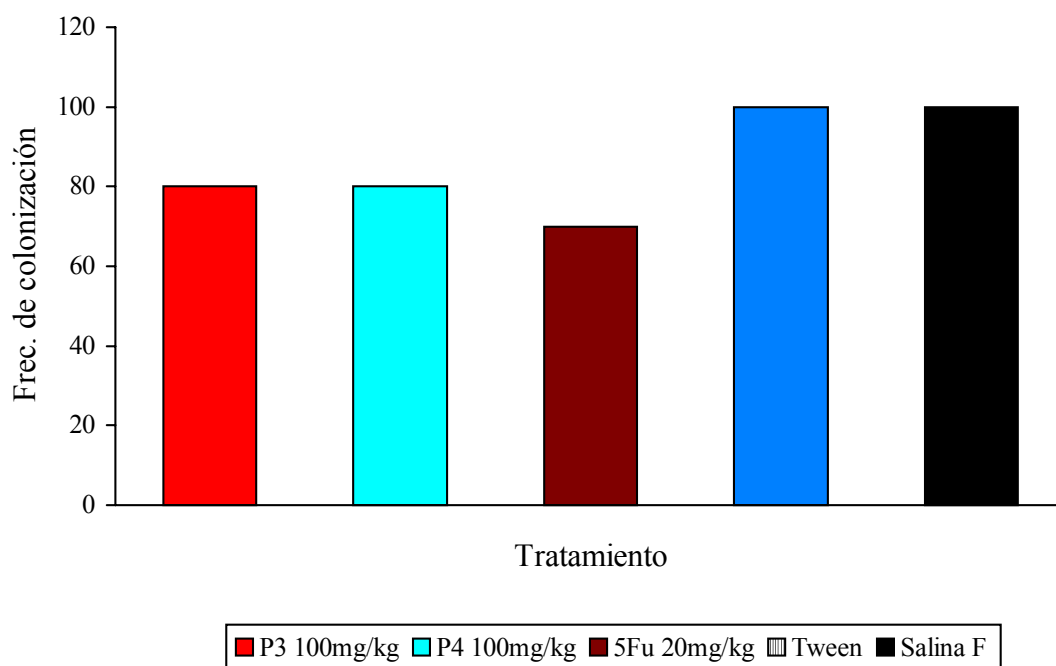
Fig. 4 Actividad inhibitoria sobre la colonización del TAE en modelos pulmonares de P3 y P4.



Se comprobó que existen diferencias significativas ($P < 0.05$) en la colonización del Tumor Ascítico de Ehrlich en pulmones de ratones NMRI tratados con propóleos con respecto a los controles. El número de colonias superficiales fue muy parecido al mostrado por el 5FU.

Un comportamiento similar lo demuestran los resultados de la Fig. No. 5 (Frecuencia de colonización) donde los controles negativos (Tween y Salina) muestran un 100% de aparición de colonias, mientras que los grupos tratados con 5 FU y con los propóleos 3 y 4 mostraron una frecuencia de aparición de colonias de 70, 80 y 80 % respectivamente.

Fig. 5 Frecuencia de colonización pulmonar en ratones NMRI inoculados con TAE por el p.r.o. y tratados con P3 y P4.



Estos resultados se corresponden con estudios similares realizados por Basic y colaboradores², donde se evidencia la actividad antimetastizante con el uso de preparados de propóleos. Pensamos que siendo el sistema inmune responsable en gran medida de la metastización y diseminación de los tumores por el organismo, nuestros productos hayan influenciado por los mismos mecanismos en la aparición de colonias del TAE en pulmones¹³.

CONCLUSIONES.

1. El propóleos 3 administrado intraperitonealmente en dosis de 100 mg/Kg aumenta la sobrevivencia de los animales inoculados con el Tumor Ascítico de Ehrlich inoculado por vía subcutánea e intraperitoneal respecto a los controles.
2. El propóleos 3 administrado intraperitonealmente en dosis de 100 mg/Kg retarda el crecimiento del Carcinoma de Ehrlich inoculado por vía subcutánea respecto a los controles, siendo este efecto tratamiento - dependiente.
3. Los propóleos 3 y 4 muestran actividad inhibitoria de la colonización pulmonar por el Tumor de Ehrlich inoculado por el plexo retrocular.



RECOMENDACIONES.

- ◆ Fraccionar los propóleos más activos para dilucidar en un estudio más detallado de actividad antitumoral las sustancias responsables de la misma.
- ◆ Definir la acción inmunomoduladora de los propóleos.
- ◆ Realizar estudios de actividad antimetastizante en otros sistemas experimentales.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Ban, J.; S. Porovic; D. Maysinger. Cytostatic effects of propolis in vitro. Acta Pharm Iugost; 33; p 245-255, 3-4; 1983.
2. Basic, I.; A. M. Curic; Z. Tadic et al. Actividad antimetastásica de venenos de abejas y derivados de propóleos solubles en agua en ratones. –En XXXIV Cong. Int. Apicultura. Budapest. Apimondia; p 139-140; 1995.
3. Digiovanni, J.; T. J. Slaya and D. L. Berry. Carcinogenesis. 5; p 145-168; 1980.
4. Fernández, E. Biofarmacia. Univ. Habana. Fac. Farm. Alim. Tomo I; p 190-194; 1988.
5. Geran, R. I.; N. H. Greemberg; M. M. Mc. Donald; A. M. Schumacher and B. J. Abbott. Protocols for screening chemical agents and natural products against animals tumors and other biological systems. Cancer Chemotherapy Reports; Vol 3(2); 1972.
6. Guarini, L.; ZZ, Su; S. Zucker; J. Lin; D. Grunberger; P.B. Fisher. Growth inhibition and modulation of antigenic phenotype in human melanoma and glioblastoma multiforme cells by caffeic acid phenethyl ester (CAPE). Cell - Mol-Biol. 38(5); p 513-27; 1992.
7. Hladon, B.; W. Bylka and W. Ell nain – Wojtaszeke et al.; p 1847-1848; 1985.
8. Kivalkina, V.F. El propóleos es necesario al hombre y las abejas. Apiacta No.3; p 117-120; 1980.
9. Mainardi, V.; J. L. Bello; R. I. Alvarez; M. Larrinaga. Nuevas drogas antitumorales. Un sistema experimental para el tamizaje animal. Rev. Cub. Farm. Vol.17(2); p 174-181; 1983.
10. Rao, C.V.; D. Desai; B. Kaul; S. Digiovanni, J.; T. J. Slaya and D. L. Berry et al. Carcinogenesis. 5; p 145-168; 1980.
11. Scheller, S.; G. Gazda; W. Krol; Z. Czuba et al. Ethanolic Extract of Propolis (EEP) to protect mice against Gamma irradiation. Z. Naturforsch; 44c; p 1049-1052; 1989.
12. Scheller, S.; W. Krol; J. Swracik; S. Owezarek and J. Shani. Antitumoral property of ethanolic extract of propolis in mice-Bearing Ehrlich Carcinoma, as compared to Bleomycin. Z. Naturforsch. 44c; p 1063-1065; 1989.
13. Stites, D. P. y col. Inmunología Básica y Clínica. Editorial Pueblo y Educación; La Habana, 1986.