



ESTUDIO PRELIMINAR DEL EFECTO RADIOPROTECTOR DE DIFERENTES PROPÓLEOS CUBANOS.

Autores: Dámarys Suárez¹; David Díaz²; Raquel Puente³; William Socorro³; José L. Bello.²; Luis Durán²; Enrique Barceló²

¹ Estación Experimental Apícola (EEA)

² Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología (INOR)

³ Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL), Universidad de la Habana

Resumen

Las radiaciones a que se someten los enfermos de cáncer dejan en estos una serie de secuelas que suelen ser, en ocasiones, fatales. Dentro de los efectos adversos se encuentran: la depresión del sistema inmune, las lesiones epidérmicas, que pueden convertirse en daños más profundos con complicaciones sistémicas. Sabiendo, por referencias de otros investigadores, que los propóleos actúan como inmunoestimulantes, y partiendo de estudios realizados sobre el efecto radioprotector del propóleos, fueron objetivos de esta investigación estudiar si los mismos son capaces de proteger al sistema inmune del efecto de las radiaciones.

Se ensayan los Extractos Etanólicos de Propóleos (EEP) de los propóleos P3 y P4 en ratones BDF₁, los cuales fueron tratados con dosis de 50 mg/Kg antes de ser irradiados pancorporalmente con dosis mortales de 800 cGy de una fuente de cobalto 60; aumentando la sobrevida de los animales tratados respecto a los controles al cabo de los 30 días.

Paralelamente a ello se someten ratones BDF₁ a las radiaciones, e inmediatamente se tratan con dosis de 50 mg/Kg de los propóleos P3 y P4 intraperitonealmente (ip); no observándose diferencias significativas.

Se hace evidente que estos propóleos muestran actividad radioprotectora, mientras que no tienen éxito en el tratamiento de la enfermedad radiante.

Se ensayan los propóleos P3 y P4 disueltos en Tween, en dosis de 50 mg/Kg, antes o después de ser irradiados ratones BDF₁ con dosis de 800 cGy sin que existan diferencias significativas entre los grupos.

Introducción

El propóleos está compuesto por diversos elementos vegetales y contiene sustancias que muestran actividad antioxidante. La mayoría de los compuestos responsables de esta actividad, provienen de los cereales y se denominan flavonoides. Entre los flavonoides contenidos en las



plantas en altas proporciones y distribuidos con amplitud se encuentran la flavona, el flavonol y sus derivados y la chalcona. Se conoce que los flavonoides contenidos en plantas superiores mejoran la fragilidad capilar y además recientemente se ha encontrado que estos compuestos eliminan las especies de oxígeno activo e inhiben la cascada de peroxidación lipídica. Además se supone que los flavonoides inhiben la carcinogénesis y evitan las cataratas diabéticas y la hipertensión (Matsuno, 1994).

Sin embargo, que los flavonoides puedan exhibir realmente esos efectos en condiciones biológicas depende de la concentración tisular. La acción antioxidante de los flavonoides se produce en el rango de concentración de 0.1-100 nM (Matsuno, 1994).

En un estudio de colaboración entre la Universidad de Gifu, la Api Company Ltd y la Escuela Juvenil de Mujeres Gifu se informó que el cafeinato de bencilo contenido en los propóleos inhibió la autoxidación del linoleato de metilo (Matsuno, 1994).

Se ha indicado que la quercetina, un flavonoide con un contenido relativamente elevado en los propóleos, puede ser un adyuvante eficaz para la hipertermia porque inhibe la inducción de proteínas de estrés (Matsuno, 1994).

Según refiere Scheller y col., 1989, el EEP fue testado como agente protector contra las radiaciones gamma en ratones los cuales fueron expuestos a 600 cGy con una fuente de Cobalto 60 y fueron Tratados por vía intraperitoneal con EEP disuelto en Tween 80 al 10% en salina fisiológica antes y después de la radiación.

Los ratones no tratados con el EEP murieron alrededor de las doce semanas, mientras que los ratones que habían recibido series de tratamiento con EEP sobrevivieron a la irradiación y a sus efectos. Además su conteo leucocitario y la capacidad de su bazo de formar placas retornaron a su nivel normal. Estos resultados sugieren que el efecto protector de este producto natural se deba a su acción antioxidante y secuestradora de radicales libres (Okonenko, 1986; Petrov, 1986; Krol y col., 1986).

Se han realizado investigaciones donde se demuestra la habilidad del EEP de inhibir "in vitro" la quimioluminiscencia del luminol-H₂O₂ demostrando así su efecto antioxidante y protector contra las radiaciones gamma. Esta capacidad antioxidante de los propóleos se sugiere que se deba en parte a su alto contenido de flavonoides los cuales representan entre un 25 y un 30% del propóleos seco, siendo los más comunes: galangina, isolpinina, quenferol, ramnaitina, pinocimbrina, quercetina, etc. (Krol y col., 1990).

Krol y col., 1990, descubrieron más detalladamente la actividad secuestradora de radicales libres por espectroscopía de resonancia electrónica, se probó que el EEP dona un átomo de hidrógeno. La capacidad antioxidante de flavonoides fue además, demostrada en microsomas y mitocondrias en

células del hígado de ratas, en eritrocitos humanos, en cloroplastos iluminados en condiciones aerobias. La actividad secuestradora es fundamentalmente sobre radicales lipídicos peroxidantes. El EEP secuestra iones peróxidos, radical oxígeno y radicales peroxidantes lipídicos. Por ello, consideramos necesario realizar estudios similares a los propóleos cubanos a fin de establecer si los mismos son capaces de proteger al sistema inmune del efecto de las radiaciones.

Materiales y métodos

Preparación de las muestras de Propóleos.

En este estudio se ensayaron dos muestras de propóleos recolectadas en diferentes zonas de la provincia de Pinar del Río. Los propóleos fueron nombrados como 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 disuelto en 100ml de alcohol	Clasificación	Lugar de colecta
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 ambos 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 desaparecer 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 estos ensayos se partió de una solución madre donde el 60% correspondió al EEP y el 40% al Tween 80 de la Merck. A partir de las soluciones madres se prepararon dosis de (100 y 50 mg/Kg) en Tween 80 al 6% disuelto en agua destilada; o sea, muy por debajo del porcentaje de Tween empleado en investigaciones realizadas por Scheller y col., 1989, 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 propóleos un grado de estabilidad aceptable. Por esta razón se utilizó el Tween como solvente del propóleos, además por poseer la propiedad de favorecer los procesos de absorción de los fármacos (Fernández, 1988). Es de destacar que las muestras ensayadas se prepararon momentos antes de ser utilizadas.



Ensayos de Radioprotección.

En estos experimentos se emplearon los propóleos disueltos en Tween debido a que diferentes autores reportan resultados positivos con el uso de este solvente (Scheller y col., 1989). Además es posible ensayar el EEP ya que a dosis única de 50 mg/Kg no se han evidenciado signos de toxicidad en los estudios correspondientes. Esto permitió establecer una comparación de la influencia de los solventes en la actividad radioprotectora de los propóleos ensayados.

Evaluación del P3 disuelto en Tween.

Ratones BDF₁ machos, de 20-22 gramos de peso, provenientes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), fueron tratados con 50 mg/kg de P3 disuelto en Tween 80 por vía oral e intraperitoneal ocho horas antes de la irradiación. Momentos antes de irradiar fueron introducidos en cajas plásticas individuales fijadas a madera y cubiertas por parafina e irradiados posteriormente con una dosis de 800 cGy de una fuente de Cobalto 60, en un Theratron (Canadá).

Grupos de 10 animales fueron inmediatamente tratados por vía oral e intraperitoneal, después de la radiación, con P3 en dosis única de 50 mg/kg, y usando Tween 80 al 6% como control negativo, y se observó la sobrevida durante 30 días.

Evaluación de P3 y P4 disueltos en alcohol.

Ratones BDF₁ machos, en número de 60, provenientes de CENPALAB, de 25 g, fueron tratados intraperitonealmente con dosis única de extracto etanólico de P3 Y P4 de 50 mg/kg, antes o después de ser irradiados con una dosis de 800 cGy. Las condiciones de irradiación fueron como se describe en el acápite anterior.

El parámetro observado fue la sobrevida a los 30 días.

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) $\%AS = \frac{SPt - SPc}{SPc} \times 100$

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

- Porcentaje de Sobrevida (% S) $\% S = \frac{NRV}{n} \times 100$

donde: NRV= Número de Ratones Vivos.

Se toma como criterio de Actividad Antitumoral:

A.S. > 25% (Fernández, 1988; Geran y col., 1972).

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

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.

Resultados y Discusión.

Actividad radioprotectora.

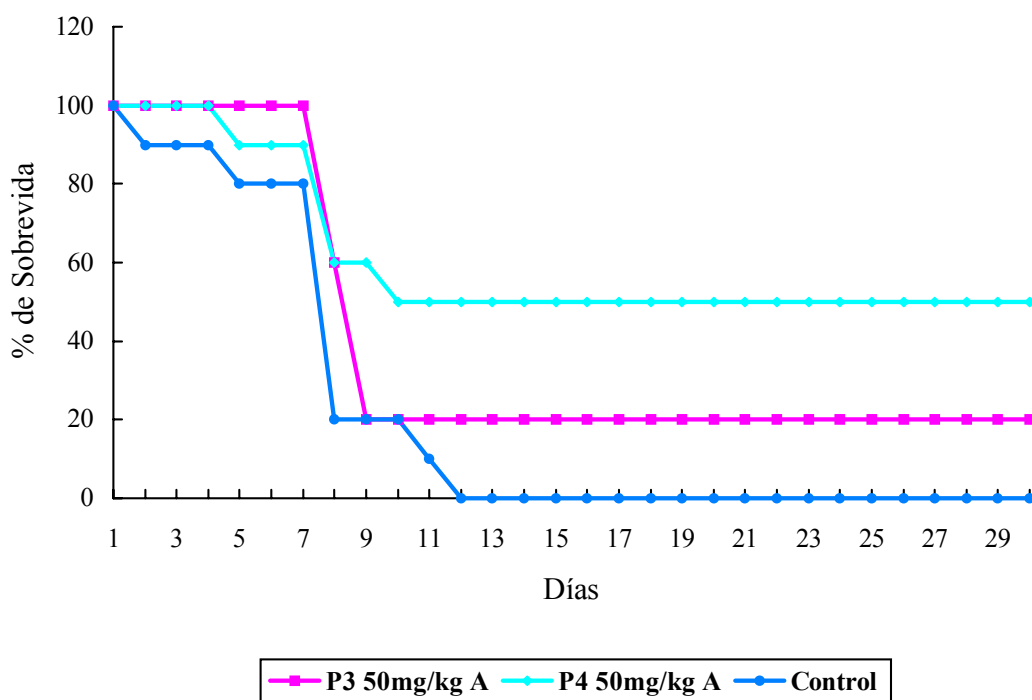
Los estudios realizados con los extractos etanólicos de los propóleos P3 y P4 en ratones BDF₁, los cuales fueron tratados con dosis de 50 mg/kg de los mismos, antes de ser irradiados muestran un A.S. para P3 de 68.42 y para P4 de 148.68 (Tabla No 2).

Tabla No.2 Comportamiento de la sobrevida de ratones BDF₁ irradiados a 800 cGy y tratados con los propóleos P3 y P4 disueltos en alcohol.

Muestra	Dosis (mg/kg)	Admón.	S.P. (Días)	%AS	%T/C
P3 Alc.	50	Antes	12.8 ± 9.01	68.42	168.42
P4 Alc.	50	Antes	18.9 ± 11.76	148.68	268.42
P3 Alc.	50	Después	6.3 ± 4.0	-17.10	82.89
P4 Alc.	50	Después	10.1 ± 7.78	32.89	132.89

Como es de apreciar en la Fig. No.1, el P4 a dosis de 50 mg/kg administrado antes de ser irradiados los ratones exhibe un 50% de sobrevivencia al cabo de 30 días, tiempo para el cual los grupos controles, habían perecidos todos, mientras que para el P3 sólo el 20% sobrevive al cabo del mismo tiempo.

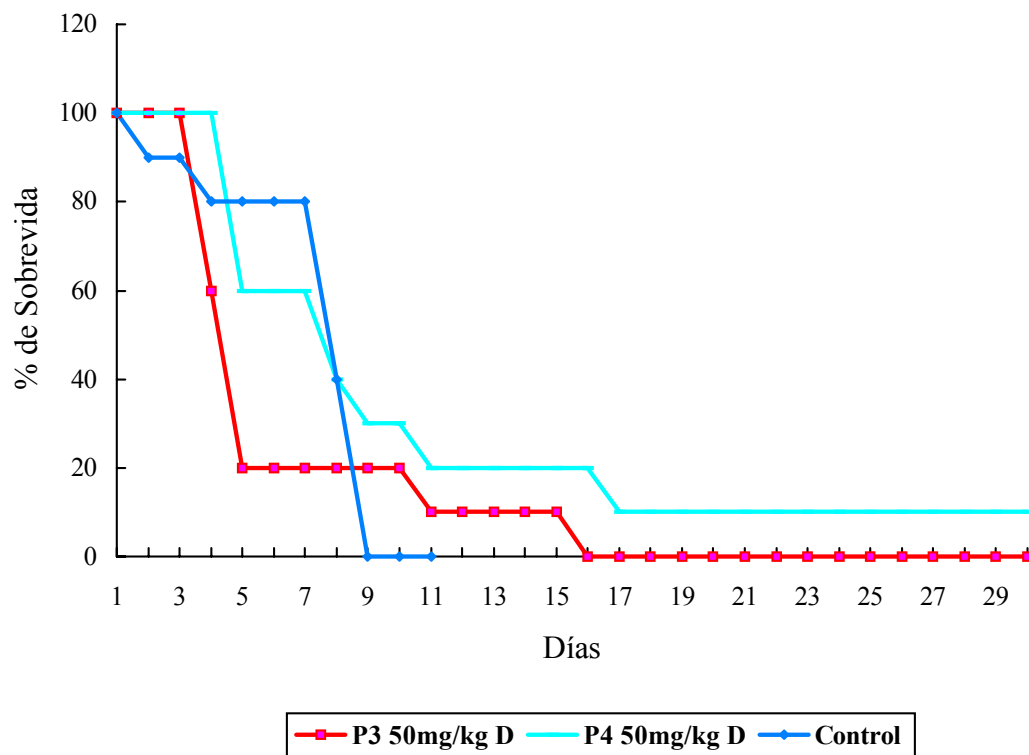
Fig. 1 Sobrevivencia de ratones BDF1 irradiados a 800 cGy y tratados 8 horas antes con P3 y P4.



Al realizar el análisis del A.S. en la radioprotección, se encontraron diferencias significativas para $P < 0.05$ entre los grupos tratados y controles lo cual se corresponde con lo reportado internacionalmente por Scheller y col., 1989, cuando al tratar con propóleos ratones irradiados pancorporalmente a dosis absolutamente mortales (Petrov, 1986) se obtienen igualmente diferencias significativas en este parámetro.

Paralelamente a este estudio se someten los animales a las radiaciones como se describió anteriormente, e inmediatamente se trataron de la misma forma con P3 y P4 disueltos en alcohol en dosis de 50 mg/kg, obteniendo un A.S. para P3 de -17.10 y para P4 de 32.89 a los 30 días (Tabla No.2).

Fig. 2 Sobrevida de ratones BDF1 irradiados con 800 cGy y tratados 8 horas después con P3 y P4.



A la par con ello se analiza el porcentaje de sobrevida para los propóleos 3 y 4, siendo de un 10% al cabo de los 15 días para P3 y un 10% para P4 al cabo de los 30 días; mientras que los grupos controles perecen al cabo de los 9 días.

Al establecer una comparación entre estas dos formas de administración, los resultados obtenidos evidencian que el uso de los propóleos para proteger los ratones frente a las radiaciones (efecto radioprotector) es más efectivo que su uso en el tratamiento de la enfermedad radiante. Referencias de algunos autores sugieren que el efecto protector de este producto natural se deba a su acción antioxidante y secuestradora de radicales libres (Okonenko, 1986; Petrov, 1986; Krol y col., 1986).

Pascual y col. (1994) estudiaron la acción secuestradora de radicales de oxígeno por los propóleos cubanos rojo y pardo. La quimioluminiscencia producida por la generación del superóxido desde la reacción xantina-xantina oxidasa fue inhibida aproximadamente en un 50 % por los propóleos rojo y pardo utilizando dosis de 5 µg/ml y 9.5 µg/ml respectivamente. La superóxido dismutasa

inhibió esta reacción en un 50 % utilizando las dosis de 70 ng/ml. Así como también los propóleos rojo y pardo inhibieron en un 50 % la quimioluminiscencia causada por la generación del radical hidroxilo utilizando en ambos casos una dosis de 0.6 µg/ml. Este efecto secuestrador del radical hidroxílico fue similar al producido por el alfa - tocoferol a una dosis de 0.11µg/ml. Estos resultados indican que las propiedades antioxidantes de ambos propóleos pueden atribuirse a la actividad secuestradora de radicales libres contra el radical hidroxilo y de menor grado contra el radical superóxido. Ello conlleva al análisis de que el efecto radioprotector de los propóleos rojos ensayados en nuestro estudio podría deberse, en gran medida, a este mecanismo secuestrador de radicales libres.

Sin embargo, al ensayar los propóleos disueltos en Tween 80, tratando los animales antes y después de ser irradiados, los valores del aumento de sobrevida del P3 en dosis de 50 mg/Kg por vía oral (34.89) a pesar de que superan el 25% no muestran diferencias significativas estadísticamente, a pesar de que los grupos tratados sobreviven más que los controles (Tabla No.3)

Tabla No.3 Comportamiento de la sobrevida de ratones BDF₁ irradiados a 800 cGy y tratados con el propóleos 3 disuelto en Tween.

Admón.	Muestra	Dosis	SP(Días)	%AS	%T/C
ip	P3	50 mg/kg	17.4 ± 11.75	-11.2	88.77
Oral	P3	50 mg/kg	20.1 ± 8.79	34.89	134.89
ip	Tween 80	-	19.6 ± 9.02	-	-
Oral	Tween 80	-	14.9 ± 8.07	-	-

Al comparar la acción de los extractos etanólicos de propóleos con la de los propóleos disueltos en Tween, se hace notable que los primeros ejercen un efecto radioprotector superior a estos últimos; demostrándose que protegen contra las radiaciones, incluso cuando se irradian con dosis superiores a las empleadas por Scheller y col., 1989, en sus experimentos.

Conclusiones.

Los propóleos 3 y 4 disueltos en alcohol, administrados en dosis única de 50 mg/kg, muestran actividad radioprotectora; mientras que no tienen éxito en el tratamiento de la enfermedad radiante en ratones BDF₁.

El propóleos 3 disuelto en Tween, administrado por vía oral en dosis de 50 mg/kg, aumentó la sobrevida de los animales con respecto a los tratados por vía intraperitoneal y a los controles; sin embargo estas diferencias no son significativas estadísticamente.

Recomendaciones.

Realizar estudios comparativos de radioprotección utilizando otras dosis, entre los propóleos disueltos en Tween y el EEP.

Comprobar *in vitro* si las muestras analizadas presentan un comportamiento similar a los propóleos ensayados por Pascual y colaboradores, para poder justificar los mecanismos por los cuales estas muestras protegen a los ratones contra las radiaciones.

Referencias Bibliográficas.

- Fernández, E. (1988). Biofarmacia. Tomo I. U. H. Fac. Farm. Alim. La Habana (Cuba).
- Geran, R. I.; Greemberg, N. H.; Mc. Donald, M. M.; Schumacher, A. M. y Abbott, B. J. (1972). Protocols for screening chemical agents and natural products against animals tumors and other biological systems. *Cancer Chemotherapy Reports*, 3 (2).
- Krol, W.; Czuba, Z. y Scheller, S. (1986). *Immunology Pol.*, 11(40), 292.
- Krol, W.; Czuba, Z.; Scheller, S.; Grabiec, J. y col. (1990). Antioxidant property of ethanolic extract of propolis (EEP) as evaluated by inhibiting the chemiluminiscence oxidation of luminol. *Biochemistry International*, 21(4), 593-597.
- Matsuno, T. (1994). Antitumoral and Therapeutical effects of Propolis. Tokio (Japan).
- Okonenko, L. B. (1986). EL propóleos como inhibidor de la oxidación de radicales libres de lípidos en la salmonelosis. *Vaprosi. Predilsiskin*, 45-46.
- Pascual, C.; González, R. y Torricella, R. G. (1994). Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. *J. E. Pharmacol.*, 41(1-2), 9-13.
- Petrov, V. I. (1986). Inmunología Básica y Clínica. Ed. Pueblo y Educación. La Habana (Cuba).
- Scheller, S.; Gazda, G.; Krol, W.; Czuba, Z. y col. (1989). Ethanolic Extract of Propolis (EEP) to protect mice against Gamma irradiation. *Z. Naturforsch*, 44c, 1049-1052.
- Scheller, S.; Wilczok, T.; Imielsk, S.; Krol, W. y col. (1988). *N. Med. Biol.* (in press).