

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO Y GENOTÓXICO DEL
PROPOLEO ALCOHOLICO DE ABEJA *Apis mellifera* EN LINFOCITOS
HUMANOS CULTIVADOS *In-Vitro***

ERIKA MERCEDES FERNANDEZ Y YUDY MARCELA QUIJANO

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN TOXICOLOGÍA GENÉTICA Y
CITOGENÉTICA
POPAYÁN
2008**

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO Y GENOTÓXICO DEL
PROPOLEO ALCOHOLICO DE ABEJA *Apis mellifera* EN LINFOCITOS
HUMANOS CULTIVADOS *In-Vitro***

ERIKA MERCEDES FERNANDEZ Y YUDY MARCELA QUIJANO

Trabajo de Grado como requisito parcial para optar al título de Biólogos

Director

Mg. SILVIO MARINO CARVAJAL

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN TOXICOLOGÍA GENÉTICA Y
CITOGENÉTICA
POPAYÁN
2008**

Nota de aceptación:

Director
Mg. SILVIO MARINO CARVAJAL

Profesora EDNA LOURDES OROZCO
JURADO

Profesora ROSA ELVIRA ALVAREZ
JURADO

Fecha se sustentación: 23 de septiembre de 2008

DEDICATORIA

*A Dios por darme en cada día, una nueva oportunidad,
A mis padres por todo su esfuerzo y amor,
A mis hermanos, mi abuela y mis pequeñas
Sobrinas por su gran cariño y ternura*

Yudy Marcela Quijano Almeida

**A DIOS POR LA VIDA Y LA SALUD,
A MIS PADRES, A MI ESPOSO,
A MI HERMANA, Y A MIS HIJAS
POR TODO SU INFINITO APOYO Y AMOR.**

ERIKA MERCEDES FERNANDEZ V.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darnos la salud y el entendimiento,

A nuestros familiares y amigos que nos han acompañado en todos los momentos de nuestra vida, apoyándonos y motivándonos para ser cada día mejores personas y profesionales,

Al Mg. Silvio M. Carvajal, gran maestro y amigo, por creer en nosotras y apoyarnos para desarrollar y culminar este trabajo,

A las profesoras del grupo de toxicología genética Mg. Luz Stella Hoyos y Nohelia Cajas, por sus enseñanzas,

A la auxiliar Elsa Betty Velasco por su gran colaboración para el desarrollo de este trabajo, pero sobre todo por su amistad.

A nuestros amigos y compañeros de carrera y del énfasis en genética, por acompañarnos y brindarnos su apoyo y su amistad,

A la Universidad del Cauca por abrirnos sus puertas y a los docentes del departamento de Biología, por permitir nuestra formación como profesionales.

TABLA DE CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÒN	12
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÒTESIS	14
2. JUSTIFICACIÒN	16
3. OBJETIVOS	18
3.1 GENERAL	18
3.2 ESPECIFICOS	18
4. ANTECEDENTES	19
5. MARCO TEORICO	23
5.1 ABEJAS	23
5.2 APITERAPIA	23
5.3 PROPÒLEO	23
5.3.1 Componentes del propòleo	24
5.3.2 Propiedades y actividad biològica	26

5.4 LINFOCITOS	27
5.5 CITOTOXICIDAD	27
5.5.1 Índice Mitótico	27
5.6 GENOTOXICIDAD	27
5.6.1 Alteraciones Cromosómicas	28
6. MATERIALES Y MÉTODOS	29
6.1 OBTENCIÓN DEL PROPÓLEO	29
6.2 PRUEBAS CITOGENÉTICAS	29
6.2.1 Preparación medio de cultivo	30
6.2.2 Cultivo de linfocitos Humanos	30
6.2.2.1 Siembra	30
6.2.2.2 Cosecha	31
6.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO DEL PROPÓLEO MEDIANTE LA PRUEBA DE ÍNDICE MITÓTICO (IM)	31
6.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO DEL PROPÓLEO, MEDIANTE PRUEBA DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS (AC)	32
6.5. DISEÑO EXPERIMENTAL	33

6.6 ANÀLISIS ESTADÍSTICO	34
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
7.1 ANÀLISIS DEL EFECTO CITOTÒXICO	35
7.2 ANÀLISIS DEL EFECTO GENOTÒXICO	40
8. CONCLUSIONES	46
9. RECOMENDACIONES	47
BIBLIOGRAFIA	48
ANEXO A	54

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Composición promedio del propóleo	25
Tabla 2. Diseño General para los ensayos de citotóxicidad	33
Tabla 3. Diseño General para los ensayos de genotóxicidad del propóleo	34
Tabla 4. Índice Mitótico de las diferentes concentraciones de propóleo alcohólico de abeja <i>Apis mellifera</i> obtenido en tres experimentos con su promedio (\bar{X}), y su respectivo error estándar. (EE)	35
Tabla 5. Número de Alteraciones cromosómicas, cromatídicas y totales, con su promedio y su respectivo error estándar, identificado en cultivos de linfocitos humanos expuestos al propóleo alcohólico de abeja <i>Apis mellifera</i> y sus controles.	40

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Abeja <i>Apis mellifera</i>	23
Figura 2. Protocolo citotóxicidad del propóleo de abeja <i>Apis mellifera</i>	32
Figura 3. Protocolo prueba de genotoxicidad del propóleo	32
Figura 4. Correlación entre las diferentes concentraciones de propóleo y el índice mitótico	36
Figura 5. Metafases observadas en cultivos <i>in-vitro</i> de linfocitos humanos Tratados con diferentes concentraciones de propóleo alcohólico de abeja <i>Apis mellifera</i>	37
Figura 6. Efecto del propóleo alcohólico de abeja <i>Apis mellifera</i> sobre la Frecuencia de alteraciones cromosómicas en cultivos de linfocitos humanos	41
Figura 7. Alteraciones cromosómicas encontradas en cultivos <i>in-vitro</i> de Linfocitos humanos observadas con diferentes tratamientos	42

RESUMEN

El propóleo es una resina cerosa, de composición compleja y consistencia viscosa, que las abejas elaboran y utilizan en la construcción, reparación, aislamiento y protección de la colmena. De él se han aislado más de 180 compuestos, que actúan sinérgicamente para darle al propóleo capacidad antimicrobiana, cicatrizante, antiinflamatoria, antimicótica, antiviral y antioxidante entre otras (Marcucci M. C. 1995).

Debido a esto se planteó este estudio para contribuir a las investigaciones que se han realizado del propóleo, ya que es necesario realizar pruebas científicas que permitan garantizar la utilización de este producto natural y así prevenir los riesgos a largo plazo por su consumo constante.

Se evaluó el propóleo de abeja *Apis mellifera* en su presentación comercial alcohólica, en linfocitos humanos de sangre periférica de un mismo individuo, con buenas condiciones de salud. Las pruebas empleadas fueron la de Índice Mitótico que permitió evaluar 9 concentraciones (1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16; 32; 66; 130 y 260 µg/ml y 2 controles (agua estéril y etanol al 0.96%). Mediante esta prueba se lograron identificar 3 concentraciones (alta, 66 µg/ml; media, 8,0 µg/ml; Baja 1,0 µg/ml) y se emplearon 3 controles (agua estéril, etanol 0.96% y mitomicina C 0.025 µg/ml como control positivo), para la evaluación genotóxica, mediante la prueba de Alteraciones Cromosómicas.

Los datos se analizaron con pruebas de Kruskal Wallis (K-W) prueba de comparaciones múltiples para varianzas no homogéneas (T3 de Dunnet y Mann-Whitney), análisis de correlación de Pearson y curva de mejor ajuste.

Los resultados mostraron que las concentraciones más altas (130 y 260 µg/ml) de propóleo tienen un efecto citotóxico, por lo que sus índices mitóticos fueron los más bajos (0.0150 ± 0.00283 y 0.0076 ± 0.00304 respectivamente) y presentaron diferencia significativa respecto al control-control (agua estéril), y al control negativo (etanol al 0.96%).

En la evaluación de la genotoxicidad del propóleo, se determinó que se presenta un relación dosis-efecto, debido a que las concentraciones más altas evaluadas mostraron un incremento significativo en las alteraciones cromosómicas totales con respecto a los controles; control-control (agua estéril) y control negativo (etanol al 0,96%)

Palabras claves: Efecto citotóxico, índice de metafases (IM), efecto genotóxico, alteraciones cromosómicas (ACs).

INTRODUCCION

Las abejas se originaron en el cretáceo hace aproximadamente 70 millones de años, y evolucionaron con las plantas fanerógamas con las que tienen una relación de interdependencia simbiótica. El uso de los productos apícolas ha sido conocido por el hombre hace miles de años.

A partir de 1979, con la llegada de la abeja africanizada a Colombia, la actividad apícola sufrió notables cambios especialmente con las técnicas de mejoramiento por selección y por manejo; de esta manera, la evolución de la apicultura se dió a la par con el desarrollo cultural del hombre y se fueron utilizando recipientes de cerámica, cestos de paja, de mimbre y corteza de madera, con el fin de proteger las abejas. Actualmente se calcula que en el país existen un poco más de 150.000 colmenas entre rústicas, semitecnificadas y tecnificadas (Vásquez R.1998).

Entre los productos de la abeja se encuentra la miel, el polen, la cera el veneno (apitoxina) y el propóleo que son sustancias resinosas de árboles y arbustos que las abejas adultas recolectan y que son utilizadas para tapar las fisuras, pegar las partes móviles de la colmena y principalmente como desinfectante y antibiótico. Lo emplean, además, para recubrir los panales antes de la puesta de los huevos por parte de la Reina, con vistas a una desinfección de la zona de la puesta. Otra finalidad es la de embalsamar a algún animal muerto en el interior de la colmena, con el objeto de aislarlo, ante la dificultad que supondría sacarlo debido a su tamaño. A pesar de que la temperatura de la colmena es de 34-35 °C, extremadamente favorable para la reproducción de microorganismos, el propóleo permite que permanezca estéril impidiendo la formación de infecciones. Así mismo, se han encontrado embalsamados, en el interior de una colmena, ratones, lagartos e incluso serpientes, sin haber sufrido descomposición alguna (Vásquez R, 1998).

En los últimos años se ha intensificado el estudio del desarrollo e impacto social de las sustancias activas obtenidas a partir de materias biogénicas, estudios donde el propóleo ocupa un importante lugar debido al gran número de propiedades terapéuticas que le son atribuidas.

Actualmente, gracias al avance de la ciencia, centros de referencia internacional mediante la utilización de sofisticados métodos analíticos, han develado la compleja composición del propóleo, describiéndose más de 100 componentes que actúan en sinergismo, para conferir al propóleo sus capacidades como: antimicrobiana, cicatrizante, antiinflamatoria, antimicótica, antiviral y antioxidante (Marcucci M. C. 1995).

Debido al auge de la medicina alternativa es necesario realizar pruebas científicas que garanticen que los productos naturales no tienen efectos citotóxicos ni genotóxicos para las células y de esta manera para el individuo que los consume. Por tal razón, el desarrollo de este estudio permitió determinar el efecto que a nivel celular tiene la utilización del propóleo, mediante las pruebas de índice mitótico y de alteraciones cromosómicas.

Esta investigación se planeó con el objetivo de evaluar el efecto citotóxico y genotóxico *in-vitro* en linfocitos humanos, del propóleo alcohólico de *Apis mellifera* adquirido en almacenes de distribución de productos apícolas, en cultivos de 48 horas tanto para índice mitótico como para alteraciones cromosómicas.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPOTESIS

Desde la antigüedad se conocen los beneficios que los productos naturales ofrecen al hombre, en especial el de las plantas medicinales, que han jugado un importante papel en la salud de muchas culturas. Es necesario tener en cuenta los beneficios que ciertos animales pueden ofrecer, como es el caso de las abejas, las que, por medio de la apicultura, han sido utilizadas para brindar diversos beneficios, en especial en la curación de algunas enfermedades como el cáncer y la artritis reumatoidea que la ciencia médica aún no ha podido controlar por medio de tratamientos con drogas sintéticas.

En la Unión Soviética, el uso de la apiterapia, al igual que el empleo de la miel, el polen, la jalea real y el propóleo con fines curativos, son muy corrientes y continuamente avalados por investigadores en congresos internacionales, seminarios y conferencias sobre la apicultura, probando que la terapéutica, a través de los productos del panal, es un método verdaderamente eficaz en muchos casos, así ha pasado de ser un remedio popular a estar profundamente arraigado en el arsenal médico (Fierro W.2002).

Las propiedades biológicas y terapéuticas se empezaron a evaluar a partir de la década del 60, mediante las primeras investigaciones científicas que develan la compleja estructura del propóleo y ponen de manifiesto numerosas aplicaciones farmacológicas. Entre ellas se destaca sus propiedades antibacterianas (Rojas N. 1988) cicatrizante y antiinflamatorio (Khayyal M, et al 1993), inmunomodulador (Neychev H, 1988) y antioxidante.

Pero a pesar de los diversos estudios que se han realizado sobre los beneficios de los productos de las abejas en el tratamiento de muchas enfermedades, no se han encontrado artículos de estudios realizados a nivel genético que permitan determinar el efecto citotóxico o genotóxico que pueda tener la utilización del propóleo, es decir, un posible efecto a nivel molecular o estructural del ADN que afecte cualquier parte del ciclo celular y que pueda ser expresado como daño en la estructura de los cromosomas (alteraciones cromosómicas) o cambios en el índice mitótico.

Por esta razón, en la presente investigación se realizaron pruebas para determinar el efecto del propóleo en linfocitos humanos cultivados *in-vitro*, con el fin de establecer una posible interacción con el material genético dando lugar a errores y mutaciones que a menudo son el resultado del contacto celular con agentes que causan cáncer (Anderson 2004), es decir, señales químicas, físicas y biológicas, en una o varias fases del ciclo celular, que provocan modificaciones moleculares y estructurales que alteran el proceso vital de la célula (Nurse, P, et al 1981).

Para esto se emplearon las pruebas de índice mitótico y de alteraciones cromosómicas para determinar la citotoxicidad y la genotoxicidad del propóleo.

Este estudio respondió las siguientes preguntas:

¿El propóleo de abeja *Apis mellifera* causa daños a los linfocitos humanos cultivados *in-vitro*, interfiriendo con los procesos implicados en su división celular (efecto citotóxico), que bloqueen su avance en el ciclo?

¿El propóleo de abeja *Apis mellifera* tiene efecto genotóxico para los linfocitos humanos cultivados *in-vitro*, aumentando el número de alteraciones cromosómicas?

En consecuencia, en esta investigación se sometieron a prueba las siguientes hipótesis:

Si el propóleo de abeja *Apis mellifera* tiene efecto citotóxico para linfocitos cultivados *in vitro*, se espera que el índice mitótico de los linfocitos tratados sea significativamente menor que el registrado en los linfocitos no tratados (grupo control).

Si el propóleo de abeja *Apis mellifera* tiene efecto genotóxico para los linfocitos, se espera que el número de alteraciones cromosómicas sea significativamente mayor en los linfocitos tratados con propóleo que en los linfocitos no tratados (grupo control).

2. JUSTIFICACION

En el tratamiento de muchas enfermedades se está regresando al uso de las terapias alternativas, ya que el hombre ha comprendido que es necesario hacer uso de los recursos naturales como fuente de conocimiento y de investigación, debido a que en muchos de ellos se han encontrado componentes activos y otros componentes que aun el hombre no ha podido sintetizar en los laboratorios y que han servido para la cura de diversas enfermedades. Actualmente, en todo el mundo hay una tendencia a volver a las terapias naturales pero con conocimiento científico (Entrevista al DR. Stephan Stangaciu sobre apiterapia. (<http://www.revistainterforum.com/español/articulos/051103naturalmenteentrevista-apiterapia.html>)).

En la década del 90 emergió una nueva ciencia interdisciplinaria llamada Ethnopharmacología, dedicada al estudio y la investigación de la acción terapéutica y preventiva de las plantas, animales y otras sustancias usadas en las medicinas indígenas del pasado y en culturas contemporáneas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) promueve dicha ciencia con el propósito de resolver problemas de salud y con el fin de lograr que la misma sea universal. En los últimos años, con el aumento del papel de la medicina preventiva, se comprende la importancia de los productos naturales y se promueve su consumo. Lo expuesto viene contribuyendo para que la Apiterapia, la Fitoterapia, y otras llamadas medicinas "naturales" ganen espacio dentro de la "medicina convencional" (Fierro W, 2002).

El mundo ha puesto su mayor interés en el estudio de las plantas con propiedades curativas, pero también es necesario entender y estudiar el aporte que muchos animales pueden realizar, como las abejas, las cuales son y han sido desde siempre manipuladas para obtener muchos productos destinados al consumo humano como la miel, la jalea real, el polen y el propóleo y para otros usos la cera y el veneno.

En 1998 "Archives of Internal Medicine", publicación de la "American Medical Association", dedicó un número al fenómeno de las llamadas "Medicinas Alternativas". Otras revistas especializadas como JAMA, Lancet, New England J y British Med. J. entre otras, también están publicando artículos originados en esta corriente de la medicina, que durante décadas parecía contrapuesta a la "convencional". Encuestas realizadas en EEUU señalan que el 34 % de la población usa al menos una forma de medicina no convencional dentro de las cuales se incluye la Apiterapia. Se estima que se gastan alrededor de U\$S 13,7 billones anuales en este tipo de medicina (Fierro W. 2002).

Dentro de la apiterapia, o terapia con productos de la colmena, se encuentra el tratamiento con propóleo, el cual es utilizado en muchas partes del mundo por sus propiedades antibacterianas, antivirales, inmunomoduladoras y antioxidativas.

Pero a pesar de toda la divulgación de las propiedades terapéuticas de los propóleos y considerando que se publican artículos que avalan clínicamente su utilización no se conocen estudios a nivel celular de citotoxicidad y genotoxicidad del propóleo en Colombia. Debido a la gran cantidad de gente que encuentra en la medicina alternativa una solución para sus problemas de salud, es necesario proporcionar evidencia científica de que los productos utilizados para tal fin no representan ningún riesgo para la población, por lo que resulta indispensable apoyar los estudios clínicos con estudios científicos para contribuir y complementar el conocimiento acerca de los productos naturales.

La presente investigación contribuirá a complementar todos los estudios que se han hecho, y ayudará a la generación de nuevos conocimientos ya que el ensayo citotóxico y genotóxico mediante las pruebas de índice mitótico y alteraciones cromosómicas, proporcionarán información acerca de la posible interacción del propóleo a nivel celular.

Dada la gran demanda que tiene el propóleo en sus diferentes presentaciones, es importante establecer y garantizar que su utilización no representa riesgo para la población que diariamente hace uso de estos productos.

3. OBJETIVOS

3.1 GENERAL

Determinar el efecto citotóxico y genotóxico del propóleo de abeja *Apis mellifera*, en linfocitos humanos cultivados *in-vitro*.

3.2 ESPECIFICOS

Identificar el efecto citotóxico del propóleo de abeja *Apis mellifera*, en cultivos *in -vitro* de linfocitos humanos, mediante la prueba de índice mitótico (IM).

Determinar el efecto genotóxico del propóleo de abeja *Apis mellifera*, en cultivos *in-vitro* de linfocitos humanos, mediante la prueba de alteraciones cromosómicas (ACs).

4. ANTECEDENTES

Los productos apícolas han sido conocidos por el hombre desde hace miles de años, pero no fue sino hasta la década de los 90 que apareció la Apiterapia, ciencia que se ocupa del mantenimiento y/o restablecimiento de la salud mediante el uso de los productos de la colmena, entre los cuales se encuentra el propóleo, conocido 600 años A.C por los egipcios que observaron en él la capacidad de evitar la descomposición de los cadáveres, utilizándolo como técnica para embalsamar.

Su máximo empleo se dio durante la guerra de los Boers, en África del Sur, alrededor de 1900, en el tratamiento de heridas infectadas y como sustancia cicatrizante, y en la actualidad se ha reactivado el interés por el propóleo, debido al significado que han alcanzado los antioxidantes en la medicina preventiva (Secretaría de Agricultura. Argentina, 2001).

Los sacerdotes del antiguo Egipto utilizaban el propóleo muy frecuentemente como medicina y como parte integrante de los ungüentos y cremas de embalsamar. Más tarde la utilizaron los griegos, a quienes se les debe el nombre de "propóleos": "Pro" cuyo significado es "en favor de" y "polis" que quiere decir ciudad.

Aristóteles ya habla de propóleos en su historia de animales y la considera como "remedio para las infecciones de la piel, llagas y supuraciones" (Díaz J, 2001).

A continuación se presentará en resumen la evidencia científica que avala muchas de las propiedades que le son atribuidas al propóleo, además de estudios de citotoxicidad y genotóxicidad que se complementarán con este estudio.

Diversos trabajos demuestran que el propóleo estimula la inmunidad inespecífica y la específica, tanto inmunidad celular (linfocitos T) como la humoral (linfocitos B). En ratones infectados con el virus influenza tipo A y tratados con propóleo, se constató un aumento de los linfocitos T, un mayor nivel de fagocitosis y una menor mortalidad, en comparación con animales no tratados. Los autores determinaron que se estimula la liberación del factor inhibidor de la migración de los leucocitos (Neychev H, 1988).

Los efectos antipsoriásico, antiinflamatorio y analgésico fueron evaluados en un extracto de propóleo rojo. Este extracto induce la formación de la capa granular en la prueba de la cola de ratón usada como modelo de psoriasis. El propóleo, a la dosis de 50 mg/kg (vía oral), mostró actividad antiinflamatoria en el modelo de granuloma por algodón en ratas, así como en la prueba de permeabilidad capilar en el peritoneo de ratas en la dosis de 10 mg/kg. El extracto de propóleo (25 mg/kg, vía oral) presentó propiedades analgésicas en el modelo de estiramiento por ácido acético, mientras que la dosis de 40 mg/kg fue efectiva en la prueba del “plato caliente” en ratones. Estos resultados muestran evidencias acerca de la utilidad potencial del propóleo rojo en trastornos inflamatorios y particularmente en el tratamiento de la psoriasis (Nuris Ledón et al, 1996).

En 1996 fue publicado un trabajo elaborado en el departamento de bioquímica de la Universidad de Oxford, los autores atribuyen la acción cicatrizante y antiinflamatoria del propóleo a un éster del ácido caféico (CAPE), al ácido caféico y a la quercetina. Actuando a nivel de los macrófagos, suprime la producción de prostaglandinas y leucotrienos. Empleando modelos "in vivo" e "in Vitro" constataron que el propóleo suprime la vía de la lipooxigenasa del ácido araquidónico (Bedascarrasbure, et al, 2002).

Un estudio realizado en el departamento de bioquímica de la Universidad de Oxford, publicado en Microbiologie Research, informa que el ácido cinámico y algunos flavonoides presentes en el propóleo, desactivan la energía de la membrana citoplasmática, inhibiendo la motilidad bacteriana, haciéndola más vulnerables al ataque del sistema inmunológico y potenciando los antibióticos (Bedascarrasbure, et al, 2002).

En Francia confirmaron la acción del propóleo frente al herpes tipo 1 y 2, pero también ante poliovirus. Establecieron que reduce la síntesis del ADN viral y que los responsables son flavonoides, que actúan en sinergismo con un éster del ácido caféico y el ácido ferúlico. Otro tipo de patología viral que responde favorablemente al propóleo es el herpes zoster «culebrilla», patología con expresión cutánea, dolorosa de pobre respuesta a los tratamientos convencionales. Tratado precozmente en el período eruptivo, la remisión se acorta y se evita la neuralgia postherpética (Amoros M, 1992). Otro virus como el VIH, también ha llamado la atención; un grupo de investigadores del Albert Einstein College of Medicine de Nueva York, publicaron en 1997, un trabajo donde determinaron la capacidad del propóleo de suprimir la replicación del VIH-1 y su efecto inmunoestimulante (Bedascarrasbure, et al, 2002).

Las propiedades antifúngicas de los extractos metanólicos de polen y propóleos (a las concentraciones de 2% y 5%) fueron determinadas en *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporium f. sp. melonis*. La concentración menos activa ante la prueba micótica fue la

concentración al 2% de ambos extractos. El efecto inhibitorio de todos los extractos de propóleo en crecimiento de *F. oxysporium* y *A. alternata* fueron generalmente altos, cuando se compararon con los extractos de polen. El crecimiento de *A. Alternata* y *F. oxysporium* no fueron afectadas por las concentraciones de polen. Sin embargo, *F. oxysporium* con los extractos de propóleos fueron mas sensibles que *A. alternata* ($P < 0.01$). Ambas concentraciones del extracto de propóleo mostraron más del 50% de inhibición de crecimiento de los micelios en *F. oxysporium*. Esto sugiere que las altas concentraciones del extracto de propóleo podrían ser usadas como un agente anti fúngico (Ozcan M_ et al, 2004).

El análisis químico y la actividad antibacterial fue evaluada en tres tipos de propóleo colectadas de tres diferentes razas de abeja de *Apis mellifera*. Las muestras de propóleo fueron investigadas por cromatografía de gases (GC/MS), y se identificaron 48 componentes. Los componentes identificados indican que la planta del cual es originario el propóleo fue *Populus alba*, *Populus tremuloides* y *Salix alba*. Se evaluó la actividad antimicrobial ante el *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*. El extracto etanólico de las muestras de propóleo muestran alta actividad antibacterial ante Gram-positivas cocci (*Staphylococcus aureus*), pero tienen débil actividad ante bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) y levaduras (*Candida albicans*). La muestra de propóleo colectada por *Apis mellifera* caucásica muestra una alta actividad antibacterial que la colectada por *Apis mellifera anatolica* y *Apis mellifera cárnica* (Silici S, et al, 2005).

El potencial efecto anticancerígeno del propóleo fue realizado en linfocitos humanos cultivados *in-vitro*. Las muestras de sangre fueron expuestas a diferentes concentraciones de propóleo (0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.7 y 1.0 ml), encontrando que la frecuencia media de micronúcleos fue de 1.47 ± 0.38 - 4.02 ± 0.64 y la frecuencia de índice mitótico estuvo entre 19.45 ± 2.22 y 0.28 ± 0.33 . La diferencia entre el grupo control y las células expuestas fue estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$), por lo que se concluyó que la exposición a las diferentes concentraciones de propóleo no produce ningún efecto carcinógeno en linfocitos humanos, cultivados *in- vitro*. Sin embargo, la frecuencia de micronúcleos incrementó, mostrando que el propóleo podría tener algún efecto carcinogénico a altas concentraciones (Ozkul Y et al, 2005).

Por otro lado, se realizó el estudio del efecto toxico, genotóxico, mutagénico y antimutagénico del propóleo de Tucumán, Argentina El efecto citotóxico se evaluó por medio de la prueba de letalidad para *Artemia salina* que reveló que la dosis letal 50 (DL50) era alrededor de 100 microgramos/ml. No se indicó que el extracto de propóleo tuviera toxicidad para las cepas de *salmonella Typhimurium* TA98 y TA 100 (test de Ames) y algunas variedades de *Allium cepa* en las concentraciones que tenían antibiótico y

actividad de antioxidantes. Se realizaron pruebas de genotoxicidad y mutagenicidad utilizando los compuestos químicos: isoquinoline (CI) y 4 - nitro o - phenylenediamine (NPD), estas pruebas resultaron negativas. El extracto de propóleo impedía la mutagenicidad de isoquinoline (el CI) y del 4 - nitro o - phenylenediamine (NPD) con valores de ID50 de 40 y 20 microg / placa, respectivamente. El propóleo contiene algunos compuestos químicos capaces de impedir la acción de mutágenos de desempeño directo e indirecto. El compuesto 2', 4' - dihydroxychalcone separado del propóleo indicaba actividad citotóxica (valores de LC50 de 0.5 microg / ml) pero no era genotóxico o mutagénico. Además, este compuesto podía impedir la mutagenicidad de CI (valores de ID50 de 1 microg / placa) pero era incapaz de impedir la mutagenicidad de NPD. Los resultados muestran al propóleo como un anticarcinogéno (Nieva Moreno MI *et al.* 2005.).

El estudio de la actividad mutagénica y antimutagénica del propóleo se realizó utilizando células de ovario de hámster chino. Los biomarcadores utilizados fueron frecuencia de alteraciones cromosómicas y el índice mitótico. Los resultados mostraron que a altas concentraciones se producía un aumento pequeño pero importante en la frecuencia de las alteraciones cromosómicas y, por otro lado, la concentración más baja evaluada redujo significativamente el daño inducido en los cromosomas por el agente químico Doxorubicin. Esto indica que el propóleo es genotóxico en altas concentraciones mientras que en bajas concentraciones demuestra un efecto preventivo. Los responsables para la mutagenicidad y antimutagenicidad podrían ser los flavonoides, que pueden actuar como pro-oxidantes o como receptores de radicales libres, dependiendo de su concentración (Tavares DC, *et al.* 2006).

5 .MARCO TEÓRICO

5.1 ABEJAS

La abeja, cuyo propóleo se utilizó en este proyecto, es el híbrido africanizado, resultado de la cruce de abejas *Apis mellifera scutellata* con abejas *Apis mellifera mellifera*, en Brasil (1956). Figura 1. En Colombia hizo su entrada en 1979 con lo cuál la actividad apícola sufrió notables cambios especialmente en las técnicas de mejoramiento por selección y en el manejo; de esta manera la evolución de la apicultura fue a la par con el desarrollo cultural del hombre. En Colombia, la apicultura es una actividad de tipo familiar; se calcula que en el país existen más de ciento cincuenta mil colmenas. Las abejas hacen parte de la biodiversidad y de los agrosistemas que se deben preservar en los llamados sistemas sostenibles de producción (Vásquez R, 1998).

Figura 1. Abeja *Apis mellifera*.



Salamanca, 2001.

5.2 APITERAPIA

Es la utilización medicinal de los productos apícolas, incluyendo el propóleo, de importancia para este trabajo, ya que tiene una larga tradición como remedio popular. Resulta interesante saber que recientemente se le ha asignado propiedades antiinflamatorias, analgésicas, antioxidantes e inmunoestimulantes (Katsiyannis, 2002).

5.3 PROPOLEO

El propóleo ha estado sujeto a intensos estudios farmacológicos y químicos desde hace 30 años. Como resultado se han reunido muchos conocimientos útiles. En los últimos años, el análisis de varias muestras de diferentes regiones geográficas, resultó en el descubrimiento que la composición química de la goma de las abejas es altamente variable (Bankova V, 2005).

Se da el nombre de propóleo, (en griego significa defensor de la ciudad), a una resina cética, de composición compleja y consistencia viscosa, que las abejas elaboran y utilizan en la construcción, reparación, aislamiento y protección de la colmena.

Las abejas (*Apis mellifera*), recogen con sus mandíbulas, partículas resinosas de las yemas, brotes y pecíolos de las hojas de diferentes vegetales que, una vez en la colmena, mezclan con cera y secreciones salivales para obtener el propóleo, cuya producción anual (10-300 g/colmena) difiere en función de la variedad de abejas, el clima, la flora y el dispositivo de recogida (Farré R, *et al* 2004).

Su color puede variar desde el blanco cremoso, amarillento, pasando por el rojo, hasta llegar al negro. Su olor es fuerte y característico. Su sabor entre acre y picante.

Probablemente el propóleo sea el producto de la colmena que más presentaciones tiene. La solución alcohólica es una de las más utilizadas a nivel mundial, se puede preparar en pastillas, cremas, ungüentos, capsulas, etc. (Díaz J, 2001).

Al igual que la miel, el uso del propóleo se conoce desde la antigüedad, ya que era utilizado por los egipcios para la momificación de cadáveres; en la edad media se utilizó por su propiedad conservante antibacteriana para barnizar violines; se ha documentado su uso en algunas de las guerras del siglo XX en el tratamiento de heridas y lesiones. Con el posterior desarrollo de la química farmacéutica, y al igual que ocurrió con los tratamientos fitoterápicos, el propóleo dejó prácticamente de utilizarse. Recientemente, se observa un resurgir en su uso y actualmente se investigan sus acciones, efectos y posibles usos en biología y medicina, entre los que destacan su aplicación como suplemento dietético y en la industria farmacéutica (Diez B, 2000).

5.3.1 Componentes del Propóleo. La formulación química del propóleo es altamente compleja, no habiendo sido determinados aún la totalidad de sus componentes. Esta compleja formulación química, en la cual intervienen las enzimas, lo transforma en un elemento “vivo”, versátil; cuyos componentes van a reaccionar en forma distinta de acuerdo al medio en que se encuentren.

El propóleo, básicamente es una resina. En el se han aislado mas de 180 compuestos. En su variable composición entran: 50 a 60 % de resinas y bálsamos que contienen flavonoides y ácidos fenólicos o sus ésteres; un 7.5 - 30 % de cera, entre un 7 a un 10 % de aceites esenciales y aromáticos, un 5 % de polen y un 4.4-19.5 % de impurezas. Además contienen

pequeñas cantidades de terpenos, taninos y restos de la secreción de las glándulas salivares de las abejas, contiene ácidos orgánicos, minerales y oligoelementos muy variados. Su contenido de vitaminas es bajo.

Se ha hablado de la variación de la composición del propóleo en relación a diversos factores como el clima, humedad, floración, época del año, etc., ello hace que si bien la estructura cuantitativa y cualitativa del propóleo sea distinta, esta diferencia no es tanta como para que sea notable una diferencia en sus consecuencias terapéuticas. La mayor o menor concentración de los grupos químicos podrá variar algún efecto, pero nunca hacerlo desaparecer (Díaz J, 2001). En la tabla 1 se presenta un resumen de los principales componentes del propóleo.

Tabla 1. Composición promedio del propóleo.

COMPOSICION	%	COMPUESTOS, CARACTERISTICAS Y OBSERVACIONES
Resinas	45-55	Flavonoides, ácidos fenólicos y ésteres
Ceras	7.55 a 35	Mayoría de cera de abeja, también de origen vegetal
Aceites esenciales	5-10	Volátiles
Ácidos grasos	5	La mayoría proceden de la cera y el resto dependen del origen botánico
Polen	5	Proteínas del polen y aminoácidos libres. Predominan la arginina y prolina
Otros compuestos orgánicos y minerales	5	14 oligoelementos Fe y Zn son los más abundantes, otro: Au, Ag, Cs, Hg, K, Sb. Cetonas Lactosas Quinonas Esteroides Ácido benzoico y ésteres Vitaminas: B ₁ , B ₂ , B ₄ . pequeñas cantidades procedentes principalmente del polen Azucares

Farré R, *et al* 2004.

Los compuestos activos del propóleo son los flavonoides que incluyen flavonas, flavonoles y flavononoles. Debe señalarse que la mayoría de los estudios no pretenden determinar la composición química completa, sino tan solo algunos componentes de interés, en especial los flavonoides. Entre los compuestos mas importantes ya identificados del propóleo estan: pinocembrina, pinobanksina, o-acteto de pinobanksina, crisina, galangina, pentenil cafeatos, bencil cafeato, prenetil cafeato, apigenina, acacetina, ácido cafêico, ácido acético, glicéridos fenólicos, ácidos diterpénicos (Farré R, *et al* 2004).

5.3.2 Propiedades y Actividad Biológica. El propóleo es una compleja mezcla de metabolitos de plantas, que posee un ancho espectro de actividad biológica, incluyendo propiedades antibióticas, anticancerígenas, antioxidantes y anti-inflamatorias (Chia-Nan Ch, 2004).

A partir de la década del 60, se efectúan las primeras investigaciones científicas que revelan la compleja estructura del propóleo y ponen de manifiesto numerosas aplicaciones farmacológicas. Científicos de diferentes disciplinas profundizaron en su estudio, por lo que hoy se tiene respuesta a muchos interrogantes acerca de los mecanismos de acción que explican sus propiedades antimicrobianas, cicatrizantes, estimulantes del sistema inmunológico y antioxidantes (Bedascarrasbure, *et al*, 2002). Las propiedades con las que cuenta el propóleo son numerosas (se estiman a nivel mundial 19 propiedades terapéuticas), algunas de ellas se enumeran a continuación:

Capacidad Antibacteriana. (Rojas N, 1988).

Capacidad Antiviral. (Amoros M, 1992).

Capacidad Cicatrizante y Antiinflamatoria. (Khayyal M, 1993).

Capacidad Inmunomoduladora. (Neychev H, 1988).

Capacidad Antioxidante. (Claus R, *et al*, 2000)

Capacidad Antitóxica. (Heo M, *et al*, 2001)

5.4 LINFOCITOS

Los linfocitos se generan en la médula ósea. Estas células son las principales responsables del control de las infecciones, ya que atacan de manera directa a los antígenos, o sustancias extrañas al organismo, es por esta razón que son llamados las células centinelas del cuerpo.

Los linfocitos se encuentran normalmente en fase G₀, es decir que no están sufriendo división celular, no obstante estos pueden ser incitados a dividirse por medio del antígeno fitohemaglutinina (PHA). Por esta razón los linfocitos hoy en día son una gran herramienta para el estudio de los procesos de la célula, tales como su ciclo celular y también las transformaciones que el ADN sufre dentro de ellas, permitiendo investigar el efecto que pueden ejercer ciertos tóxicos ambientales (radiaciones, drogas, plaguicidas, cigarrillo, etc.) sobre el material genético (genotóxicidad) y la regulación normal de división celular (Citotóxicidad), además de su mecanismo de acción, ya sea *In- vitro* o *In- vivo* (Novell, 1960).

5.5 CITOTOXICIDAD

Es el potencial que posee un agente ya sea de tipo químico, físico o biológico de dañar la célula, manifestando alteraciones del ciclo de las células y, en casos extremos, en la muerte de las mismas.

5.5.1 Índice Mitótico. El índice mitótico (IM) es el porcentaje de células en división que existe en un tejido y, por tanto, dará el potencial proliferativo del mismo. Es una prueba que permite evaluar un agente con efecto bloqueador pre mitótico, en la fase S, ya que es una de las fases más perceptivas del ciclo celular. Para detener las células en mitosis se emplea un inhibidor del huso acromático, el colcemid, que impide el acople de estas fibras, evitando la repartición del material genético hacia las células hijas (Manfriedi et al, 1986). El uso de la técnica permite establecer la citotóxicidad de la sustancia en estudio mediante comparación con un grupo control y un grupo experimental (Rojas et al, 1993).

5.6 GENOTOXICIDAD

La genotóxicidad se define como la capacidad de un agente químico, físico o biológico para inducir efectos tóxicos, letales o heredables al material genético nuclear o extranuclear en células somáticas y germinales. Las pruebas de genotóxicidad evalúan el mutágeno permitiendo obtener una estimación del daño genético, el cual puede ser evaluado a nivel citogenético y molecular. Uno de estos ensayos es la prueba de alteraciones cromosómicas (AC) de tipo numérico y estructural (Tobar T, 2004)

5.6.1 Alteraciones cromosómicas. La prueba de alteraciones cromosómicas, permite identificar alteraciones de tipo numérico y de tipo estructural; estas alteraciones son la expresión de las lesiones primarias causadas en el ADN, las cuales conducen a la discontinuidad de la doble hélice de ADN (Talaska, et al. 2002).

Desde décadas pasadas los biomarcadores citogenéticos en linfocitos de sangre periférica han sido utilizados para evaluar la exposición a agentes carcinogénicos o mutagénicos, el primer método utilizado fue el de alteraciones cromosómicas siendo este el biomarcador de efecto temprano mejor validado y más empleado en el estudio de poblaciones, (Albertini et al. 2000) ha sido utilizado desde 1960 en programas de vigilancia de salud ocupacional de trabajadores expuestos a agentes mutagénicos o carcinogénicos. Se propone que las alteraciones cromosómicas pueden no ser solo biomarcadores de exposición a mutágenos sino también biomarcadores de daño genético de relevancia para los procesos carcinogénicos, (Aitio et al, 1988), pero en general se acepta que las mutaciones cromosomales son eventos causales en el desarrollo de neoplasias, pero no se ha comprobado que el incremento en el daño cromosomal puede reflejar un aumento en riesgo de cáncer (Hagmar et al, 2001).

Las alteraciones de tipo numérico se originan por la no disyunción de los cromosomas durante la división celular, (ganancia o pérdida de los cromosomas), a este tipo pertenecen las euploidias, poliploidias y aneuploidias (Hoyos L, 2002).

El ensayo de alteraciones cromosómicas detecta cambios en la estructura de los cromosomas que corresponden a roturas y reordenamientos dentro de un cromosoma o cromosomas diferentes y son producidas sobre todo por aquellas sustancias que rompen directamente la cadena de ADN o que distorsionan la doble hélice de ADN (Hoyos L, 2002). Atendiendo al momento del ciclo celular en el que tenga lugar la exposición se pueden presentar: alteraciones de tipo cromatídico y alteraciones de tipo cromosómico (Calle I, 1998).

6. MATERIALES Y METODOS

El proyecto se dividió en dos fases, en la primera se realizó la identificación del efecto citotóxico del propóleo mediante la prueba de índice mitótico, para determinar las concentraciones que serían evaluadas en la segunda parte, donde se determinó el efecto genotóxico del propóleo mediante la prueba alteraciones cromosómicas.

6.1 OBTENCIÓN DEL PROPOLEO.

El propóleo de abeja *Apis mellifera* se adquirió en un almacén de distribución de productos apícolas, en la presentación alcohólica, que ha nivel comercial es preparada mezclando 30 kilos de propóleo, 50 litros de alcohol al 96% y 20 litros de agua, quedando el etanol a una concentración de 48% y el propóleo a 0.43 g/mL.

Las concentraciones se obtuvieron esterilizando el propóleo con un filtro milliporo de 0.22 μm ; la concentración más alta de propóleo fue de 260 $\mu\text{g/ml}$ a partir de la cual se realizaron ocho diluciones seriadas utilizando un factor de dilución de 1:1 vol. /vol. también se realizó un control-control con agua estéril, un control negativo (etanol al 0.96%) y un control positivo con Mitomicina C a una concentración de 0.025 $\mu\text{g/mL}$.

Como el propóleo posee etanol en la presentación comercial, a una concentración de 48%; cuando se tratan cultivos de linfocitos con propóleo a la concentración más alta 260 $\mu\text{g/ml}$ la concentración final del etanol es del 0.96 %; en las otras concentraciones diluidas de propóleo (factor de dilución 1:1) el etanol reducirá su concentración cada vez a la mitad. En consecuencia entre los tratamientos se incluyó el etanol a la concentración más alta 0.96% con el fin de registrar su influencia en el Índice mitótico.

6.2 PRUEBAS CITOGENÉTICAS.

Las pruebas para evaluar el índice mitótico y alteraciones cromosómicas del propóleo, se llevaron a cabo en cultivos de linfocitos de sangre periférica.

Para la investigación se utilizaron entre 5- 10 ml de sangre heparinizada de un mismo individuo, el cual fue seleccionado teniendo en cuenta los siguientes requisitos:

* Tener buenas condiciones de salud al momento de la prueba

* No haber padecido enfermedades graves (Enfermedades virales, como hepatitis, VIH, etc.)

* No tener ni haber tenido exposición a agentes tóxicos como alcohol étílico, cigarrillo o drogas psicoactivas ilegales.

* No presentar enfermedades de tipo genético.

* Edad entre 20 y 30 años

6.2.1 Preparación medio de cultivo. Para la siembra se utilizó medio RPMI -1640, al cual se le adicionó suero fetal bovino al 10 % (Sigma), 1% de L-glutamina (Sigma), y 1% de Penicilina-estreptomicina (Sigma).

Se preparó 1000 ml de medio de cultivo. Para lo cual se pesaron 10.4 g de medio RPMI-1640 y se disolvieron en 800 ml de agua estéril, a los cuales se le adicionaron 2 g de NAHCO_3 , se completó con 200 ml de agua estéril, se agitó permanentemente hasta obtener una mezcla homogénea. Se ajustó a un pH entre 7.12 y 7.20 con HCl 1N luego se le adicionó 1 ml de Penicilina-estreptomicina a la concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$ y 100 $\mu\text{L/ml}$, respectivamente. Por ultimo, el medio se esterilizó, con un filtro miliporo de 0.22 μm en la cámara de flujo laminar.

Antes de realizar la siembra, el medio se suplementó con suero fetal bovino a la concentración final de 10 % y con L-glutamina (1%) (Hoyos L, 2002).

6.2.2 Cultivo de linfocitos Humanos

Siembra. Se realizó en condiciones totales de esterilidad, en la cámara de flujo laminar. En tubos estériles se depositaron 4.5 ml de medio RPMI 1640 preparado como se indico en 6.3.1; consecutivamente se agregaron 0.5 ml de sangre periférica heparinizada a cada tubo de cultivo, y finalmente se agregaron 0.1 ml de Fitohemaglutinina (1%). Los tubos se colocaron a 37 °C en la incubadora por 48 horas.

Pasadas 24 horas, se adicionaron los 9 tratamientos de propóleo, el control negativo (etanol al 0.96 %) y el control-control (Agua estéril) y se prosiguió con el tiempo de incubación.

Dos horas antes de la cosecha (46 horas de cultivo) se agregó a cada tubo de cultivo 0.1 ml de Colcemid y a las 48 horas se realizó la cosecha de las células.

Cosecha. Pasadas 48 horas después de la siembra, los tubos se centrifugaron a 1000 rpm por 10 minutos, se removió el sobrenadante sin perturbar el botón celular y se resuspendió. Se adicionaron 6 ml de Solución Hipotónica 0.075M KCl precalentada (37 °C). La suspensión celular se resuspendió y se incubó a 37 °C por 30 minutos.

Transcurridos los 30 minutos, se realizó una prefijación agregando 1 ml de Fijador Carnoy (metanol: ácido acético glacial; 3:1), se mezcló y se dejó reposar por 1 minuto. Se centrifugó por 10 minutos a 1000 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular. Se realizaron 3 fijaciones con 5 ml de fijador Carnoy, en la primera, se refrigeró la suspensión celular por 20 minutos, se centrifugó a 1000 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular, se realizaron dos fijaciones más de la misma manera, en la última fijación se descartó el sobrenadante y se procedió a realizar el goteo.

Para el goteo se utilizaron placas limpias y humedecidas en ácido acético al 60% refrigerado, sobre las cuales se dejaron caer de tres a cinco gotas de la suspensión celular, en diferentes lugares de la placa. Las placas se dejaron secar en la plancha caliente a 40-45 °C; después de tres días se tiñeron con Giemsa al 10% durante 8 minutos.

6.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO MEDIANTE LA PRUEBA DE ÍNDICE MITÓTICO (IM)

24 horas después de la siembra, se adicionaron las 9 concentraciones de propóleo y los controles. Dos horas antes de la cosecha se agregó a cada tubo de cultivo 0.1 ml de colcemid y a las 48 horas se realizó la cosecha de las células. Figura 2.

Mediante la evaluación del efecto citotóxico se seleccionaron las 3 concentraciones para evaluar el efecto genotóxico del propóleo, las cuales se establecieron teniendo en cuenta los siguientes parámetros (Hoyos L, 2002).

Concentración alta:

La que disminuyó el índice mitótico aproximadamente a un 20 % respecto al grupo control.

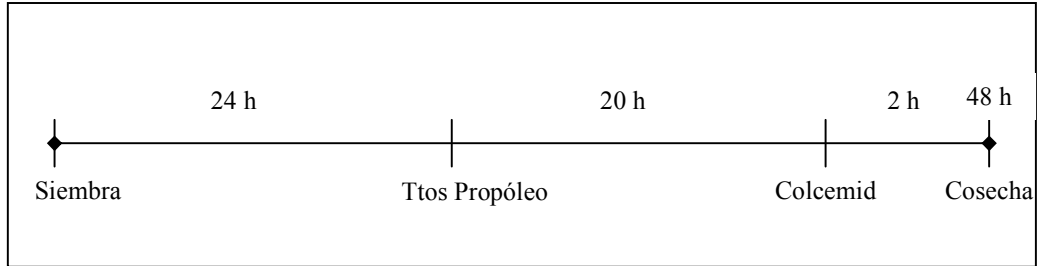
Concentración media:

La que disminuyó el índice mitótico aproximadamente en un 50 % respecto al grupo control.

Concentración baja:

La que presentó el mayor índice mitótico semejante al grupo control.

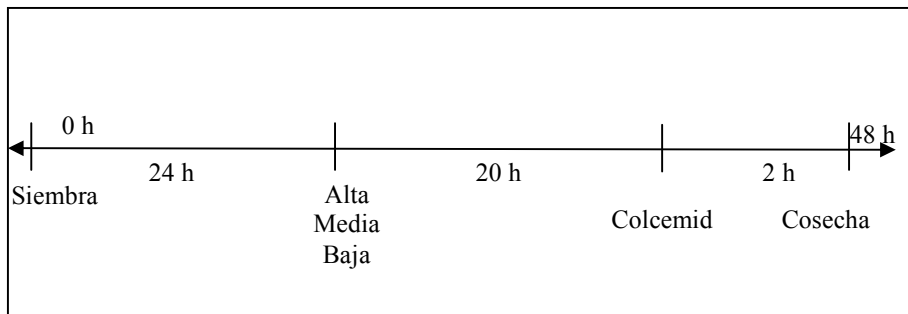
Figura 2. Protocolo citotóxicidad del propóleo de abeja *Apis mellifera*



6.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO DEL PROPÓLEO, MEDIANTE LA PRUEBA DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS (AC).

Las tres concentraciones alta, media y baja del propóleo de abeja *Apis mellifera*, fueron evaluadas en cultivos de 5 ml, utilizando el mismo protocolo de siembra y cosecha del numeral 6.2.2 como lo muestra la figura 3.

Figura 3. Protocolo prueba de genotoxicidad del propóleo.



6.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para las pruebas de citotoxicidad se realizaron dos cultivos por cada tratamiento, de cada tratamiento se gotearon cuatro placas, dos por tubo. El experimento se realizó tres veces en semanas diferentes, para obtener seis datos por tratamiento y un total de 66 datos. Ver tabla 2.

El registro del IM se llevo a cabo con un aumento de 40 x y el dato se reportó como:

$$\text{IM} = \frac{\text{\# de metafases}}{2000 \text{ cel.}} \times 100$$

Para el registro de las alteraciones cromosómicas, por cada tratamiento se analizaron 200 metafases, 50 por placa, que presentaran un número completo de 46 centrómeros como resultado del primer ciclo de división celular. Las placas se analizaron con un aumento de 100 x como se indica en la tabla 3.

Tabla 2. Diseño General para los ensayos de Citotóxicidad

Prueba de Citotóxicidad					
Grupo	Tratamiento	Volumen	No Células	No Replicas	No Repeticiones
Control Negativo	Etanol 0.96%	0.1 ml	2000	2	3
Control-Control	Agua Estéril	0.1 ml	2000	2	3
P R O P O L E O μg/ml	1.0	0.1 ml	2000	2	3
	2.0	0.1 ml	2000	2	3
	4.0	0.1 ml	2000	2	3
	8.0	0.1 ml	2000	2	3
	16	0.1 ml	2000	2	3
	32	0.1 ml	2000	2	3
	66	0.1 ml	2000	2	3
	130	0.1 ml	2000	2	3
	260	0.1 ml	2000	2	3

Tabla 3. Diseño para los ensayos de genotoxicidad del propóleo.

Prueba de Genotoxicidad					
Grupo	Tratamiento	Volumen	No Metafases Analizadas	No Replicas	No Repeticiones
Control Negativo	Etanol 0.96%	0.1 ml	200	2	3
Control-Control	Agua Estéril	0.1 ml	200	2	3
PROPÓLEO µg/ml	Alta 66	0.1 ml	200	2	3
	Media 8.0	0.1 ml	200	2	3
		0.1 ml		2	3
		0.1 ml		2	3
	Baja 1.0	0.1 ml	200	2	3
		0.1 ml		2	3
0.1 ml		2		3	
Control Positivo	MMC 0.025µg/ml	0.1 ml	200	2	3

6.6 ANALISIS ESTADISTICO

Los datos obtenidos en la prueba de índice mitótico se acomodan a la distribución normal, aunque en el análisis comparativo se aplica la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, debido al tamaño de muestra, $n = 6$ y se complementa con la prueba paramétrica de comparaciones múltiples, para varianzas no homogéneas T3 de Dunnet. Posteriormente se realiza análisis de asociación entre las concentraciones de propóleo y el índice mitótico, mediante análisis de correlación de Pearson y curva de mejor ajuste.

El análisis de genotoxicidad se realizó con la prueba estadística no-paramétrica de Kruskal Wallis debido a que los datos no cumplen con la asunción de normalidad y homogeneidad de varianza y a que el tamaño de muestra es pequeño $n = 6$. Las pruebas se realizaron en tres tiempos diferentes, para identificar la variabilidad entre los experimentos, mediante la prueba de Kruskal Wallis, con la que se determinó que no existe diferencia significativa entre ellos. ($p = 0.00$)

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 ANALISIS DEL EFECTO CITOTOXICO

En la tabla 4, se muestra el número de metafases y el índice mitótico obtenido en las diferentes concentraciones de propóleo, como resultado del análisis de 6000 células por tratamiento, incluyendo el control-control (agua estéril o concentración 0.0 µg/mL) y el control negativo (etanol 0.96%)

Tabla 4. Índice mitótico de las diferentes concentraciones de propóleo alcohólico de abeja *Apis mellifera* obtenido en tres experimentos con su promedio (\bar{X}), y su respectivo error estándar. (EE)

Concentración Final (µg/ml)	Índice Mitótico			$\bar{X} \pm EE^*$
	Experimento			
	1	2	3	
0	0.071	0.0635	0.067	0.0684±0.00152 ^a
Etanol (0.96%)	0.04	0.044	0.043	0.0420±0.00108
1.0	0.047	0.05	0.044	0.0469±0.00205
2.0	0.036	0.042	0.039	0.0388±0.00161
4.0	0.025	0.021	0.025	0.0235±0.00115
8.0	0.026	0.031	0.041	0.0329±0.00366
16	0.038	0.04	0.044	0.0405±0.00223
32	0.03	0.025	0.024	0.0263±0.00206
66	0.026	0.022	0.021	0.0227±0.00132
130	0.015	0.0072	0.034	0.0150±0.00283
260	0.0058	0.001	0.016	0.0076±0.00304 ^b

* Índice mitótico promedio con su error estándar resultado de analizar 6000 células / concentración

^a Mayor valor y ^b menor valor de índice Mitótico que difiere significativamente del resto de concentraciones, según prueba de T3 de Dunnet. (P =0.05)

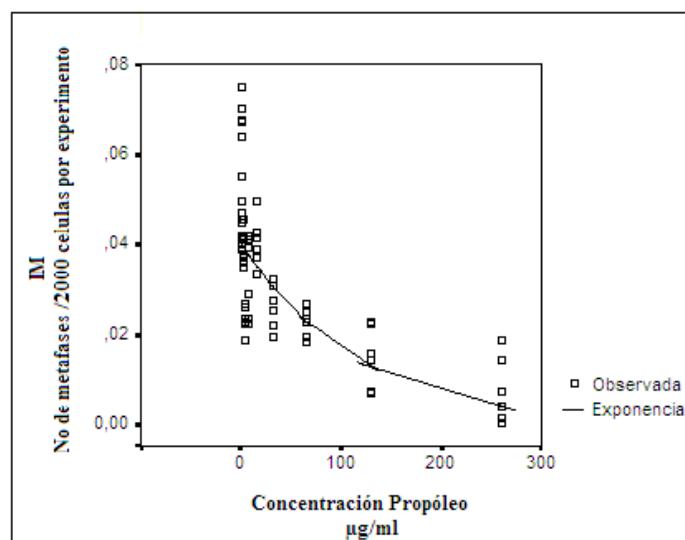
Mediante la prueba de comparaciones múltiples se logró establecer que el control- control (agua estéril) presentó el mayor promedio de índice mitótico y difiere significativamente de las demás concentraciones. De la misma manera, la concentración más alta, 260 µg/mL, tuvo el menor promedio 0.783±0.3043 y difiere significativamente de las otras concentraciones.

Por otra parte, el control negativo (etanol 0.96%) difiere significativamente del control-control (agua estéril), indicando un efecto depresor del índice mitótico debido a este, además el control negativo (etanol 0.96%), también difiere significativamente del efecto de las concentraciones altas de propóleo (32, 66, 130 y 260 $\mu\text{g/mL}$); permitiendo concluir que a estas concentraciones el propóleo tiene un efecto citotóxico depresor del índice mitótico.

La prueba de índice mitótico como biomarcador de proliferación celular, ha sido ampliamente utilizado para medir la proporción de células en la fase de mitosis del ciclo celular y debido a que altas concentraciones de propóleo están causando un efecto a nivel del ciclo celular, probablemente en las etapas G1, S y G2, se muestra una disminución en el número de células que pasan a mitosis, lo que indica una relación dosis-efecto (Jackson et al 1979), debido posiblemente a muerte celular o procesos de apoptosis.(Rojas et al.1993). Ver figura 5.

Por medio del análisis de correlación de Pearson, se logró determinar que existe una asociación negativa, estadísticamente significativa ($R = -0.686$; $P = 0.00$), entre el índice mitótico y las concentraciones de propóleo, excluido el control negativo con etanol al 0.96 %.

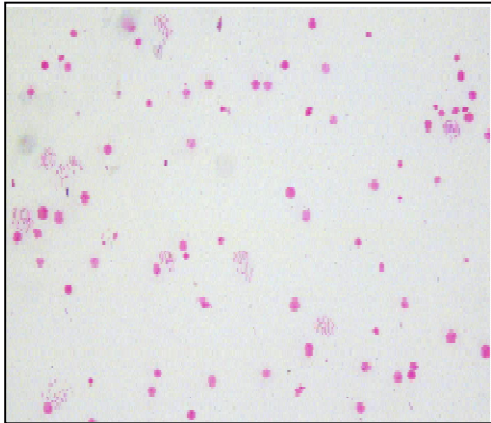
Figura.4 Correlación entre las diferentes concentraciones de propóleo y el índice mitótico



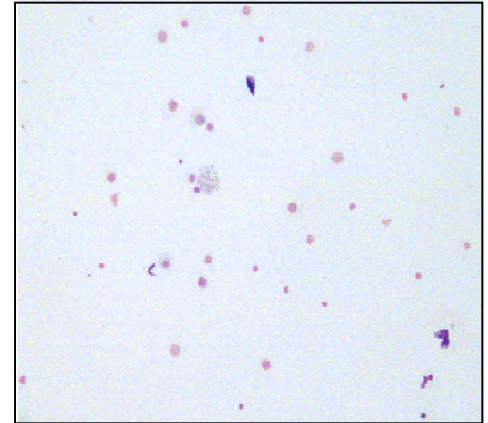
Mediante análisis de curva de mejor ajuste, se identificó que la asociación entre las concentraciones de propóleo y el índice mitótico es de tipo exponencial. Se observa que a

medida que aumenta la concentración del propóleo, el índice mitótico presenta una disminución, respecto al grupo control negativo (agua). Ver Figura 4

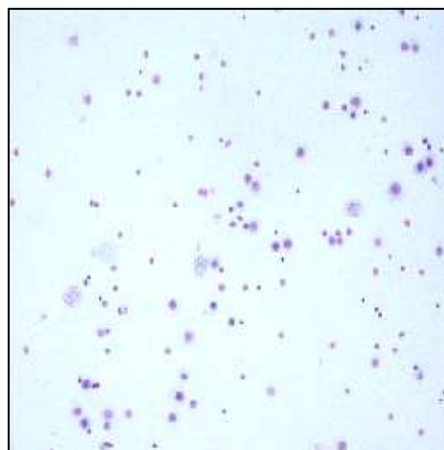
Figura 5. Metafases observadas en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos tratados con diferentes concentraciones de propóleo alcohólico de abeja *Apis mellifera*.



Control-control (Agua), aumento de 10X



Concentración 66 µg/mL aumento de 10X



Concentración 8 µg/mL aumento de 10X

Con base en el coeficiente de determinación ($R^2 = 0.65$) se puede inferir que la disminución en el índice mitótico, se debe en un 65 % al aumento en la concentración del propóleo, por lo que existe un 35 % de variabilidad sin explicar, lo cual se puede deber a las condiciones propias de los cultivos (manipulación, cambio de temperatura, reactivos, o a factores desconocidos etc.).

Este estudio contribuye a las investigaciones realizadas del propóleo debido a que no se ha reportado otro estudio con estas mismas características, donde se empleen las pruebas de índice mitótico y alteraciones cromosómicas en la línea celular de linfocitos humanos.

Los resultados obtenidos en este trabajo se asemejan a los obtenidos en el trabajo de Oskul y colaboradores en 2005, quienes investigaron el efecto anticancerígeno del propóleo en cultivo de linfocitos humanos empleando las pruebas de micronúcleos y de índice mitótico (I.M), llegando a la conclusión que este tiene un efecto citotóxico debido a que las diferentes concentraciones causaron una disminución en el I.M. El promedio de índice mitótico de las diferentes concentraciones estuvo entre 0.28- 19,45 lo que indica que el aumento en las concentraciones de propóleo causa una disminución del I.M, pero no decreció más que el grupo control, lo que estaría indicando un comportamiento como agente anticancerígeno y antimitótico.

Sin embargo otro estudio realizado para determinar el efecto de la genotoxicidad y antigenotoxicidad del propóleo en líneas celulares de ovario de hámster chino, empleando las pruebas de I.M y de ACs, y un agente químico (Doxorubicin), se concluyó que no hay diferencia significativa en el I.M observado entre cultivos tratados con diferentes concentraciones de propóleo y el respectivo control negativo, indicando que el propóleo en diferentes concentraciones no tiene efecto citotóxico, no obstante, también se determinó que la concentración más baja de propóleo, produjo efecto protector en contra del daño de los cromosomas inducido por el agente químico (Tavares et al. 2006).

Diversos estudios han corroborado la actividad antiproliferativa y anticarcinogénica del propóleo, como el realizado por Hernández j. et al, en el 2007, en el cual se observó la acción antiproliferativa en líneas celulares de cáncer. También se ha demostrado que el propóleo coreano, al igual que el comercial (sigma # p-1010) induce apoptosis en líneas celulares de cáncer de hepatoma humano (Choi YH et al, 1999), así como varios de los componentes aislados del propóleo, han mostrado actividad anticancerígena asociada a la inhibición del ciclo celular y la inducción de apoptosis (Chen C, et al 2003). Posiblemente por esta razón las concentraciones más altas (260 y 130 $\mu\text{g/ml}$) evaluadas de propóleo presentaron los más bajos índices mitóticos, 1.508 ± 0.2838 y 0.783 ± 0.3043

respectivamente y, a causa de esto, no fue posible evaluar los daños a nivel del material genético.

Existe la necesidad de clarificar la calidad y cantidad de los constituyentes del propóleo en orden de evaluar su actividad biológica. Como se pudo observar en este estudio, varios extractos vegetales y sustancias que exhiben actividad antioxidante, muestran un incremento en la citotoxicidad, a medida que se aumenta la concentración (Cavalcante *et al.*, 2003).

La formulación química del propóleo es altamente compleja, no habiendo sido determinados aún la totalidad de sus componentes. Esta compleja formulación química, en la cual intervienen entre otros enzimas, lo transforma en un elemento “vivo”, versátil; cuyos componentes van a reaccionar en forma distinta de acuerdo al medio en que se encuentren, y siempre lo van a hacer en forma sinérgica. Al respecto, los estudios que se han realizado con fracciones parciales del propóleo o con algunos de sus componentes sintetizados, no han tenido el mismo efecto que la totalidad. (Díaz J. 2002)

Banksota *et al.*, en el 2000, compararon la actividad citotóxica, hepatoprotectora y depuradora de radicales libres de los propóleos de Brasil, Perú, Holanda y China. Descubrieron que los propóleos de Holanda y China poseían la mayor actividad citotóxica; mientras que casi todas las muestras poseían una significativa actividad hepatoprotectora. La actividad depuradora de los radicales libre DPPH en todas las muestras era similar; tan sólo la muestra peruana mostraba una menor actividad depuradora.

Siguiendo un modelo similar, Chen *et al.*, en el 2001, compararon la actividad depuradora de radicales, los efectos citotóxicos y la inducción de apoptosis en células humanas de melanoma del propóleo taiwanés de distintas regiones. Las flavanonas C-preniladas de las muestras fueron detectadas mediante HPLC, y el contenido total de fenol fue determinado a través de espectrofotometría. Se descubrió que la alta concentración de flavanonas C-preniladas es esencial para la inducción de apoptosis en las células humanas de melanoma y para las propiedades anti-radicales.

A partir de las concentraciones de propóleo empleadas para la prueba de índice mitótico, se seleccionaron tres concentraciones para la evaluación del efecto genotóxico mediante la prueba de alteraciones cromosómicas: Baja: 1 µg/mL, la cual no mostró diferencia significativa respecto al grupo control; Media: 8 µg/mL, la cual disminuyó el IM en aproximadamente un 50 % y Alta: 66 µg/mL, la cual disminuyó aproximadamente a un 20% el índice mitótico respecto al grupo control.

7.2 ANALISIS DEL EFECTO GENOTOXICO

En la tabla 6, se muestran las concentraciones elegidas de la prueba de índice mitótico, alta, media y baja, que fueron sometidas a evaluación genotóxica mediante la prueba de A.C, empleando como control positivo la Mitomicina C (0.025 µg/mL) y dos controles: control-control (agua estéril) y control negativo (etanol al 0.96%). El número de alteraciones cromatídicas y cromosómicas de tres experimentos con su promedio y medida de variabilidad (error estándar), producto de analizar 200 metafases/cultivo (6 cultivos /concentración) en cada experimento.

Tabla 5. Número de alteraciones cromosómicas, cromatídicas y totales, con su promedio (\bar{X}) y su respectivo error estándar (EE), identificado en cultivos de linfocitos humanos expuestos al propóleo alcohólico de abeja *Apis mellifera* y sus controles.

Concentraciones de Propóleo µg/mL	ALTERACIONES CROMOSOMICAS / 600 METAFASES		
	$\bar{X} \pm EE^*$		
	Alteraciones Cromatídicas	Alteraciones Cromosómicas	Alteraciones Totales
Control-Control (Agua estéril)	0.33 ± 0.211	0.17 ± 0.167	0.50 ± 0.342
Control Negativo (Etanol 0.96%)	0.83 ± 0.167	0.50 ± 0.224	1.33 ± 0.211
Concentración Baja (1µg/mL)	0.50 ± 0.224	0.50 ± 0.224	1.00 ± 0.365
Concentración Media (8µg/mL)	1.33 ± 0.494	1.17 ± 0.401	2.50 ± 0.563
Concentración Alta (66µg/mL)	2.67 ± 0.919a	1.00 ± 0.258	3.67 ± 0.715a
Control Positivo (MMC 0.025 µg/mL)	3.83 ± 0.477a	3.00 ± 0.477a	6.83 ± 0.792a
P	0.001	0.003	0.000

*promedio de alteraciones cromosómicas con su error estándar, resultado de analizar 600 metafases /concentración.

^a = concentraciones que difieren significativamente del control negativo, concentración baja y control etanol, según prueba de Mann-Whitney

P = significancia estadística según prueba de Kruskal-Wallis.

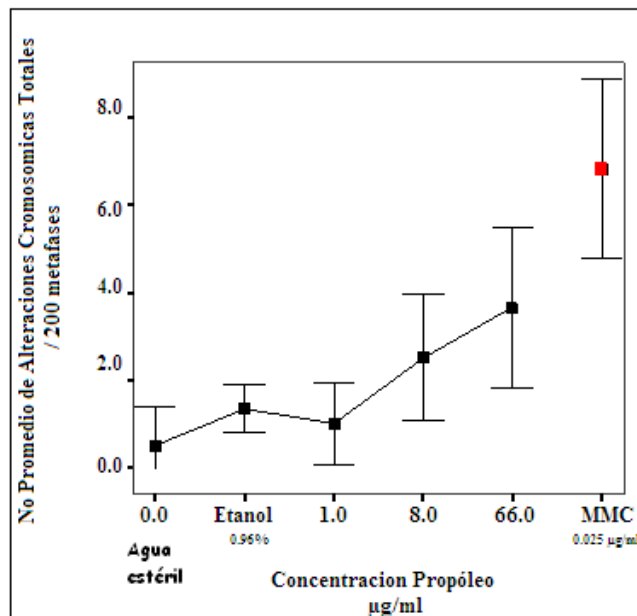
En la tabla 5, se observa que a la concentración alta (66 µg/mL), le corresponde un promedio de alteraciones cromatídicas de 2.67 ± 0.919, el cual es significativamente mayor

que los quiebres cromatídicos registrados en el control-control (agua estéril) y en la concentración baja (1 µg/mL), pero no difiere significativamente de la concentración media (8µg/mL) y el control negativo (etanol al 0.96%).

La inducción de ACs cromatídicas y cromosómicas, es muy semejante en su frecuencia, a excepción del control-control y la concentración alta, que presenta mayor tendencia a inducir alteraciones cromatídicas. Por esta razón, para facilitar el análisis y con base en la semejanza, la comparación entre las diferentes concentraciones, se hizo respecto de la frecuencia total de ACs.

En las alteraciones totales, a la concentración alta (66 µg/mL), le corresponde un promedio de 3.67 ± 0.715 el cual difiere significativamente de la concentración baja, el control-control (agua estéril) y el control negativo (etanol 0.96%), pero no difiere significativamente de la concentración media (8µg/mL). El control positivo Mitomicina C, presentó diferencia significativa, ya que muestra el mayor promedio de alteraciones totales respecto a los demás tratamientos. Ver Figura 6.

Figura 6. Efecto del propóleo alcohólico de abeja *Apis mellifera* sobre la frecuencia de alteraciones cromosómicas en cultivos de linfocitos humanos.



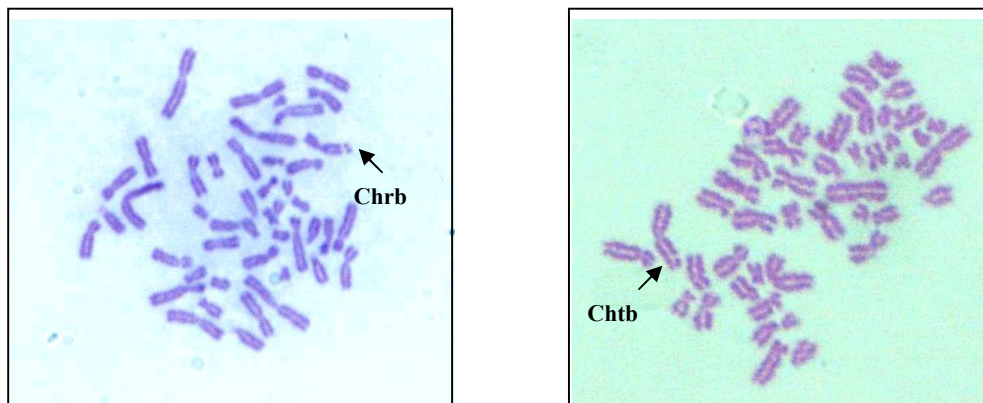
Por medio del análisis de correlación de Spearman se logró determinar que existe una asociación significativa y positiva ($Rho= 0.621$; $P= 0.000$) entre las concentraciones de propóleo y el total de alteraciones cromosómicas.

Mediante análisis de curva de mejor ajuste, se identificó que la asociación entre las concentraciones de propóleo y el número de alteraciones cromosómicas es de tipo lineal.

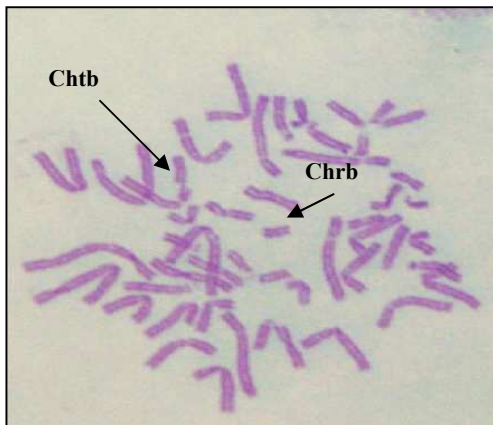
Con base en el coeficiente de determinación ($R^2 = 0.610$) se puede inferir que el aumento en el número de alteraciones cromosómicas, se debe en un 61 % al incremento en la concentración del propóleo.

Estos datos muestran que de las concentraciones evaluadas del propóleo alcohólico de abeja *Apis mellifera*, las concentraciones alta y media presenta efecto genotóxico al ser comparadas con el control-control (agua estéril). (Figura 7).

Figura 7. Alteraciones cromosómicas (AC) encontradas en cultivos *in-vitro* de linfocitos humanos observadas en diferentes tratamientos.



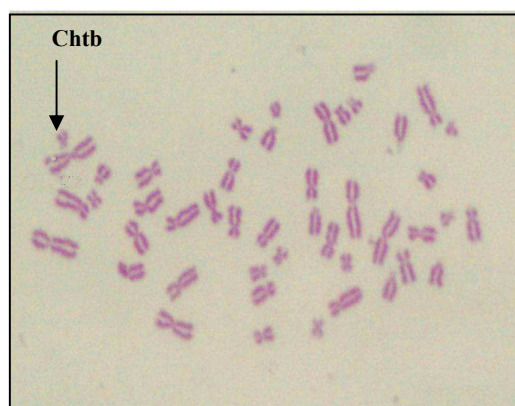
Concentración Alta (66 μ g/ml); 100X



Control positivo (MMC, 0.25µg/mL); 100X



Control-control (agua estéril); 100X



Control negativo (etanol al 0.96%); 100X

La prueba de alteraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica ha sido no solo empleada como biomarcador de exposición a mutágenos, sino también como biomarcador de daño genético de relevancia para los procesos carcinogénicos (Aitio et al, 1988), debido a que la célula con este tipo de lesión puede vivir mucho tiempo (Au, 1991) y la acumulación de alteraciones cromosómicas pueden permitir el desarrollo del cáncer. Por esta razón, es una de las mayores pruebas aplicadas para estudios genotóxicidad y monitoreo (Mateuca R. 2006). Debido a esto se han realizado diversos estudios para determinar el potencial efecto carcinogénico del propóleo; como el realizado por Ozkul y colaboradores en 2006, los cuales emplearon las pruebas de ICHs y ACs, y determinaron que el propóleo no causa incremento de las ACs, pero si aumenta la frecuencia de ICHs,

por lo que concluyeron que a altas concentraciones el propóleo presenta un efecto genotóxico.

En otro estudio, también realizado por Ozkul Y, *et al* 2005, para determinar el efecto anticancerígeno del propóleo en linfocitos humanos, se determinó que el aumento en la concentración de propóleo, incrementa la tasa de micronúcleos mostrando que puede tener efecto carcinogénico a altas concentraciones.

Tavares y colaboradores, en el 2007, investigaron la influencia del extracto hidroalcohólico de propóleo sobre las alteraciones cromosómicas producidas por el agente quimioterapéutico Doxorubicin en medula ósea de ratón. Los resultados mostraron que, a altas concentraciones de propóleo, se observa un pequeño pero significativo aumento de la frecuencia de alteraciones cromosómicas, y que, a bajas concentraciones reduce el número de cromosomas dañados inducidos por el químico Doxorubicin, comparado con el grupo control. Esta reducción puede deberse a la presencia de componentes fenólicos, los cuales son capaces de capturar radicales libres producidos por agentes quimioterapéuticos.

Los autores concluyen que la actividad antimutagénica del propóleo puede deberse a la presencia de flavonoides en vista de su bien sabida actividad antioxidante (Tavares, D. et al, 2006). Recientemente, Fu *et al*, en 2005, también reportó un efecto inhibitorio del propóleo en la mutagenicidad de dos medicamentos en *Salmonella typhimurium*, así como de Ciclofosfamida y Mitomicina en ratón. Usando la prueba cometa, Lima *et al*. 2005, demostraron la actividad antimutagenica del propóleo, contra el daño del ADN, inducido por 1,2-dimetilhidrazina en células de colon de rata. El efecto antimutagénico observado, puede deberse al efecto antioxidante, ya que muchos compuestos que dañan el material genético, muestran habilidad para producir radicales libres (Keizer et al., 1990), los cuales pueden causar diferentes tipos de daños celulares, incluyendo quiebres al ADN.

Gracias a todas las investigaciones de las propiedades anticancerígenas del propóleo se ha podido determinar que es un compuesto “Janus”, termino empleado para referirse a sustancias que se comportan como genotóxicas y antigenotóxicas, dependiendo de las condiciones en que sean usadas (Borstel and Higgins, 1998); numerosos mecanismos moleculares se han relacionados con la actividad del “janus“, pero en general se debe a una inducción específica de enzimas en un sistema antimutagénico y saturación de sistemas enzimáticos envueltos en la reparación del ADN. (Mersch-Sundermann et al 2004).

También se puede deber a los flavonoides, principales componentes del propóleo, los cuales presentan un efecto antimutagénico debido a su capacidad de capturar radicales libres, mecanismo más importante en procesos de mutagénesis y carcinogénesis; sin embargo, en otros estudios, también se ha determinado el papel de los flavonoides como agentes pro-oxidantes (Pérez G. 2003), lo cual representa daño en el material genético.

Se han aportado evidencias sobre el doble papel que desempeñan los flavonoides como antioxidantes/pro-oxidantes; así como la contribución de la estructura a tales actividades, los mecanismos a través de los cuales ejercen su acción antioxidante resultan de una combinación de sus propiedades quelatantes de metales de transición y secuestradoras de radicales libres, así como de la inhibición de oxidasas y acción sobre otras enzimas. Sin embargo, estos compuestos pueden actuar como agentes pro-oxidantes, rasgo probablemente responsable de los efectos mutagénicos y genotóxicos también encontrados para algunos de estos metabolitos en diversos sistemas experimentales (Pérez G. 2003).

Algunos de los mecanismos a través de los cuales ejercen sus acciones pro-oxidantes incluyen la reducción temporal de Cu (II) a Cu (I), la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO), así como la afectación de las funciones de los componentes del sistema de defensa antioxidante nuclear: glutatión y glutatión-S transferasa (Sahu SC et al 1996).

Estudios presentados ponen en evidencia que los flavonoides pueden comportarse como antioxidantes y pro-oxidantes, e influyen en ello factores como: las condiciones del ensayo, la concentración efectiva que se alcance en el sitio donde la especies reactivas de oxígeno (ERO) son formadas; la estabilidad del radical del flavonoide formado al donar un átomo de hidrógeno al radical atacante; la lipofilicidad para ser captados por la membrana y el pH del medio (Pérez G. 2003).

8. CONCLUSIONES

Las concentraciones del propóleo alcohólico, evaluadas en linfocitos humanos cultivados *in-vitro*, mostraron una asociación negativa, estadísticamente significativa entre el I.M y las concentraciones de propóleo, que indica que un aumento en la concentración produce una disminución del I.M. (relación dosis-efecto).

Las concentraciones más altas evaluadas, 130 y 260 $\mu\text{g/mL}$ mostraron una disminución significativa en el I.M, debido a un efecto a nivel del ciclo celular en etapas pre- mitóticas, lo que se debe posiblemente a procesos de apoptosis, mediados por los flavonoides, uno de los principales componentes del propóleo.

En la prueba de genotoxicidad se observa que también existe una relación dosis efecto, por lo que el aumento en la concentración de propóleo produce un aumento significativo en el número de alteraciones cromosómicas.

La concentración alta (66 $\mu\text{g/mL}$) presentó el mayor promedio de alteraciones totales (3.67 ± 0.715), el cual difiere significativamente de la concentración baja (1.0 $\mu\text{g/mL}$) y los controles (agua estéril y etanol al 0.96%). Lo que indica que niveles iguales o por encima de esta concentración tiene un efecto genotóxico.

En este estudio la mayor parte de alteraciones fueron de tipo cromatídico, por lo que se puede inferir que el mayor daño producido por el propóleo alcohólico, en el material genético se produjo en la fase G2 del ciclo celular.

9. RECOMENDACIONES

La realización de este trabajo pretende ser una contribución a las investigaciones realizadas sobre el propóleo, generando conocimientos sobre sus efectos genotóxicos y citotóxicos. Pero es importante la evaluación de la citotoxicidad y genotoxicidad *in-vitro* del propóleo con activación metabólica (fracción microsomal S9), o realizar pruebas *in vivo*.

Debido a que la presentación alcohólica del propóleo, es la más empleada comercialmente, no se han reportado muchos trabajos donde se investigue el propóleo crudo, por esta razón se recomienda la evaluación de la solución acuosa del propóleo, con el fin de eliminar las posibles acciones dañinas del etanol.

Teniendo en cuenta que en la prueba de citotoxicidad se determinó que las concentraciones más altas de propóleo 130 y 260 $\mu\text{g/mL}$ presentaron los más bajos índices mitóticos, debido posiblemente a procesos de apoptosis, se recomienda realizar ensayos en líneas celulares de cáncer, con el fin de evaluar el posible efecto antimitótico del propóleo en estas células.

Como se ha determinado que el propóleo puede comportarse como agente genotóxico y antígenotóxico, dependiendo de las condiciones en que se emplee, se sugiere hacer un uso adecuado de este producto, evitando su consumo excesivo.

Debido al gran potencial terapéutico del propóleo, vale la pena seguir investigando sus propiedades biológicas para que pueda seguir siendo utilizado, para tratar y/o prevenir enfermedades.

BIBLIOGRAFIA

AITIO A, *et al.* Indicators for Assessing Exposure and Biological Effects of Genotóxic Chemicals. Consensus and technical reports. Commission of the European Communities. International programme on chemical Safety, World Health Organization Regional Office Europe, Institute of Occupational Health, Finland, 1988.

ALBERTINI RJ, *et al.* IPCS Guidelines for The Monitoring Of Genotoxic Effects Of Carcinogens In Humans. En: Mutation Research. Vol. 463 (2000); p. 111-72.

AMOROS M. SIMOES C, GIRRE L. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. En: J Of Natural Products. Vol. 55, No. 12, (1992); p.1732-40.

ANDERSON. Informe del M.D para médicos sobre los avances en el tratamiento y en la investigación del cáncer. En: OncoLog, Vol. 49, No. 9 (septiembre 2004)

AU, W. *et al.* Factors contributing to chromosome damage in lymphocytes of cigarette smokers. En: Mutation Research. (1991); p. 137-144.

BANKOVA V. Recent trends and important developments in propolis research. En: Evid based complement alternat med. Vol 2, No. 1, (Marzo, 2005)

BANSKOTA, a. *et al.* Cytotoxic, hematoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Perú, the Netherlands and China. En: Journal Ethnopharmacol. Vol.72. (2000); p. 139-246.

BEDASCARRASBURE E. Propóleos: Un valioso producto de la colmena. En: Horizonte Agroalimentario. Argentina. (2002); p. 4-7

CALLE ANGEL, I. Biología celular y molecular. Universidad del Cauca. División de Ciencias de la Salud. Departamento de Ciencias Fisiológicas. Popayán (1998); p. 320-36

CAVALCANTE M, *et al.*, Mutagenicity, antioxidant potential, and antimutagenic activity against hydrogen peroxide of cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice and cajuina. En: Environ Mol Mutagen. Vol. 41. (2003); p. 360-9

CHEN, YJ. *Et al.* Effect of caffeic acid phenethyl ester, and antioxidant from propolis, on inducing apoptosis in human leukemic HL-60 cells. En: Journal of agricultural and food chemistry. Vol. 49 (2001); p. 5615-5619.

CHEN, C. Cytotoxic prenyflavanones from taiwanese propolis. En: Journal Nat Prod. Vol. 66. (2003) ; p. 503-506.

CHIA-NAN CHEN. *et al.* Comparison of Radical Scavenging Activity, Cytotoxic Effects and Apoptosis Induction in Human Melanoma Cells by Taiwanese Propolis from Different Sources. En: Evid Based Complement Alternat Med. Vol. 1, No. 2, (Septiembre, 2004); p. 175–185.

CHOI, YH. *Et al.* Apoptosis induced by propolis in human hepatocellular carcinoma cell line. En: Int. Journal Mol Med. Vol. 4 (1999); p. 29-32.

CLAUS R, KINSCHERF R, GEHRKE C, BONATERRA G, BASNET P, METZ J. Antiapoptotic effects of propolis extract and propel on human macrophages exposed to minimally modified low density lipoprotein. En: Arzn Forsch Drug Res. Vol. 50, Num. 4, (2000); p. E373- E379.

DIAZ, Julio C. Apiterapia Hoy en Argentina y Cuba. Argentina. Editorial José Antonio Falco publicaciones. 2001. p. 12, 25

DIEZ B. ¿Que es el propóleo?. En: Argibideak. Vol. 10, Núm. 5,(Noviembre - Diciembre 2000)

Entrevista al DR. Stephan Stangaciu sobre apiterapia
http://www.revistainterforum.com/espanol/articulos/051103Naturalmente_entrevista-apiterapia.html

FARRÉ R, FRASQUET I, SÁNCHEZ A. Propolis and human health. En: ARS. Pharmaceutica. Vol. 45. Num. 1 (2004); p. 21-43

FIERRO MORALES, WALTER. Evidencia Científica del Propóleos desde el punto de vista médico. (2000). PROAPI Argentina.

FU, J.Y. *et al.* Antimutagenicity of propolis against some mutagens in vivo and in vitro. En: Biomedical and Environmental Sciences. Vol.17(2005); p.469–475.

HAGMAR L, *et al.* The Usefulness of Cytogenetic Biomarkers as Intermediate Endpoints in Carcinogenesis. En: International Journal Hygiene Environmental Health. Vol. 204 (2001); p. 43-47.

HEO M, SOHN S, AU W. Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate. En: Mutation Res. Vol. 488 (2001); p. 135-50.

HERNANDEZ, J. *Et al* . Sonoran propolis: chemical composition and antiproliferative activity on cancer cell lines. En: Planta Medica. Vol. 73. (2007).; p. 1469-1474.

HOYOS, Luz S y CARVAJAL, Silvio. Manual de Citogenética. Linfocitos humanos. Universidad del Cauca. Grupo de investigación en Toxicología genética y citogenética. Departamento de Biología. Popayán (2002).p. 56

JACKSON, and Bender, R. Cytotoxic thresholds of vincristine in a murine and a human leukemia cell line in vitro. En: Cancer Research. Vol. 39. (1979); p. 4346-4349.

KATSIYANNIS, EDUARDO. Apiterapia. (Online). Argentina. 2002. http://www.mantra.com.ar/contenido/zona1/frame_apiterapia.html

KEIZER, H.G. *et al.* Doxorubicin (Adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. En: Pharmacology and Therapeutics. Vol. 47, (1990); p. 219–231.

KHAYYAL M, GHAZALY M, KHATIB A. Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. En: Drugs Under Experimental & Clinical Research. Vol. 19. No. 5 (1993); p. 197-203

LIMA, R.O.A. *et al.* Modifying effect of propolis on dimethylhydrazine- induced DNA damage but not colonic aberrant crypt foci in rats. En: Environmental and Molecular Mutagenesis. Vol. 45, (2005); p. 8–16.

MANFRIEDI, J.J y HORWITZ, B. Taxol: an antimetabolic agent with a new mechanism of action. Capitulo II. Cell Cycle Effect of Drugs. En: International encyclopedia Of Pharmacology and Therapeutics. (1986). p.287

MARCUCCI M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. En: Adipologie. Vol. 26. (1995):83-99.

MATEUCA, R. *et al.* Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. En: Biochimie. Vol. 88. (2006); p. 1515-1531.

MERSCH-SUNDERMANN, V. *Et al.* Extract of toxicodendron quercifolium caused genotoxicity and antigenotoxicity in bone marrow cells of CDI mice. En: Food and chemical toxicology. Vol. 42 (2004); p. 1611-1617.

NEYCHEV H, AND COL. Immunomodulatory action of propolis. En: Acta Microbiol-Bulg. Vol. 23 (1988); p. 58-61.

NIEVA MORENO, et al. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity, and antimutagenicity of propolis from Tucuman, Argentina. En: Journal of agricultural and food chemistry. Vol. 53 (2005); p. 8957-8962

NOWELL, P.C En: Cáncer Res. Vol. 20 (1960). Citado por: CARVAJAL, Silvio y HOYOS, Luz Stella. Manual de citogenética: Linfocitos humanos. Grupo de investigación en Toxicología Genética y Citogenética. Universidad del Cauca (2002); p. 56

NURIS LEDÓN, *et al.* Efectos antipsoriásico, antiinflamatorio y analgésico del propóleo rojo colectado en Cuba. En: Revista Cubana de Farmacia. Vol. 3, No.1 (Enero – Abril, 1996)

NURSE, P., Y BISSETT, Y. Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeasts. En: Nature. Vol. 292 (1981); p. 558-560.

OZCAN, M. *Et al.* Inhibitory effect of pollen and propolis extracts. En: Nahrung. Vol. 48, No. 3 (Junio, 2004); p. 188-94

OZKUL Y, Silici S, Eroglu E. The anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes culture. En: Phytomedicine. Vol. 12, No. 10 (Noviembre, 2005); p.742-7

_____, Eroglu HE , Ok E. Genotoxic potential of Turkish propolis in peripheral blood lymphocytes. En: Pharmazie, Vol. 61 (2006);p. 638-640.

PEREZ, G. *Et al.* Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. En: Rev. Cubana. Invest. Biomedica. Vol. 22. No. 1 (Enero-Marzo 2003)

ROJAS, E *et al.* Mitotic index and cell proliferation kinetics for identification of antineoplastic activity. En: Anti cancer drugs. Vol. 4 (1993); p. 637-340

ROJAS N Y COL. Acción antibacteriana de un preparado a base de propóleos. In: Asís M. editors. Investigaciones Cubanas sobre el propóleos. Proceedings of 1º simposio sobre los efectos del propóleos en la salud humana y animal. Varadero, Cuba; (1988); p. 78-82

SAHU, SC. *Et al.* Pro-oxidant activity of flavonoids: effects on glutathione and glutathione-s transferase in isolated rat liver nuclei. En: Cancer Lett. Vol. 104. (1996); p. 193-6.

SALAMANCA, Guillermo. Recomendaciones y criterios terapéuticos en el tratamiento con la Apitoxina de Apis mellifera. (Online) 2001. <http://apisevices.com>

Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. Dirección de Industria Alimentaria. Argentina. 2001

SILICI S, and Kutluca S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. En: Journal Ethnopharmacol. Vol. 13; 99, No. 1(Mayo, 2005); p. 69-73

TALASKA, G et al. carcinogen biomonitoring in human exposures and laboratory research: validation and application to human occupational exposures: En Toxicology letters. Vol. 134. (2002). p. 39-49.

TAVARES DC. Propolis-induced genotoxicity and antigenotoxicity in Chinese hamster ovary cells. En: Toxicol in *Vitro*. Vol. 20, Num. 7 (Octubre, 2006); 20(7); p. 1154-8

_____. *Et al.* Effects of propolis crude hydroalcoholic extract on chromosomal aberrations induced by doxorubicin in rats. En: Planta Medica. vol. 73 (2007);p. 1531-1536.

TOBAR TOSSE, Dora. Evaluación del efecto citotóxico y genotóxico *In vitro* del extracto de alcaloides del lirio pequeño (*Eucharis amazonica Planchon & Linden*) en cultivo de linfocitos humanos. Popayán, 2004, 63p. Trabajo de grado (Biólogo). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Departamento de Biología.

VASQUEZ R y TELLO J. Producción Apícola. Editorial Produmedios. Bogotá, 1998. p.13

VON BORSTEL R:C. and Higgins J.A. Janus carcinogens and mutagens. En: Mutation Research. Vol. 402. (1998); p. 321-329.

ANEXO A

REGISTRO DE ALTERACIONES CROMOSÒMICAS
Proyecto *Apis mellifera*

Registrador. _____ Fecha. _____
 Placa. _____ Microscopio. _____

# Cel	No Crom	Alteraciones Cromosomicas				Coordenadas	# Cel	No Crom	Alteraciones Cromosomicas				Coordenadas
		chtb	chrb	Gaps					chtb	chrb	Gaps		
				chtb	chrb						chtb	chrb	
1						26							
2						27							
3						28							
4						29							
5						30							
6						31							
7						32							
8						33							
9						34							
10						35							
11						36							
12						37							
13						38							
14						39							
15						40							
16						41							
17						42							
18						43							
19						44							
20						45							
21						46							
22						47							
23						48							
24						49							
25						50							