



Muerte leucocitaria por toxicidad del propóleo

Leukocyte death incited by propolis toxicity

VC Tinoco Cabriales,* JA Quesada Castillo,* MA Maldonado Ramírez,* R Oliver Parra,* BA Luna Gojon[§]

RESUMEN

Objetivo: El propósito de este estudio fue evaluar el grado de citotoxicidad *in vitro* que presenta el propóleo sobre leucocitos polimorfonucleares. **Material y métodos:** Estudio experimental, controlado, *in vitro*. Procedimiento estadístico de: análisis de varianza de repetidas medidas y *post-hoc* de Scheffé, estableciendo una significancia estadística de $p < 0.05$. Se tomaron 10 mL de sangre venosa periférica de seis individuos sanos, ambos sexos entre 20 y 30 años de edad escogidos al azar para obtener los leucocitos. **Resultados:** Análisis de Scheffé con 95% de confiabilidad para comparación entre grupo control y grupo experimental: significativo con $p < 0.0001$ para propóleo 1, control 1 y propóleo 2, control 2, para propóleo 1, propóleo 2, $p < 0.5002$ /control 1, control 2, $p < 0.9621$. **Conclusiones:** El propóleo en dilución 1:4 aplicado a leucocitos polimorfonucleares durante 1-2 horas en el experimento provocó muerte celular en un 70%; dando significancia estadística.

ABSTRACT

Objective: The aim of the present study was to assess the extent of propolis' *in vitro* cytotoxicity on polymorphonuclear leukocytes. **Materials and methods:** The present study was an *in vitro*, controlled, experimental endeavor. Statistical procedure entailed variance analysis of repeated measures as well as Scheffe's *post-hoc*. A $p < 0.05$ statistical significance was established. To obtain leukocytes, 10 mL of peripheral venous blood was harvested from six randomly selected, healthy, 20-30 year old subjects, of both genders. **Results:** Scheffe's analysis with 95% reliability for comparison between control and experimental groups. Significant with $p < 0.0001$ for propolis 1 control 1 and propolis 2 control 2. For propolis 1 propolis 2, $p < 0.5002$ /control 1 control 2, $p < 0.9621$. **Conclusions:** In the present experiment propolis at a 1:4 dilution applied for 1-2 hours to polymorphonuclear leukocytes caused 70% cellular death. This resulted in statistical significance.

Palabras clave: Citotoxicidad, propóleo, leucocitos polimorfonucleares neutrófilos.

Key words: Cytotoxicity, propolis, neutrophil polymorphonuclear leukocytes.

INTRODUCCIÓN

Recientemente un material denominado propóleo destaca en el área de investigación en productos naturales donde la literatura lo reporta como bactericida, analgésico, fungicida, antiinflamatorio, cicatrizante, y anticariogénico.¹

Esta resina es producida por las abejas mezclando sustancias recogidas de plantas en brotes, botones florales y exudados resinosos, originando un material para cerrar huecos, embalsamar insectos muertos en el interior de la colmena y protegerse de la invasión de insectos y microorganismos.² Los incas curaban infecciones febriles, mientras que en Europa fue utilizado por los franceses en los siglos XIII y XIV para tratamiento de llagas. Sus efectos terapéuticos se atribuyen a diversos compuestos fenólicos que lo componen siendo los flavonoides los principales y algunos ácidos fenólicos, ésteres, aldehídos, alcoholes y cetonas.³⁻⁵

La composición fisicoquímica del propóleo es:

- Resinas y bálsamos aromáticos 50-80%.
- Aceites esenciales y otras sustancias volátiles (4.5 a 15%).

- Ceras (12-15%).
- Polen (5-11%).
- Flavonas, flavonoides, flavononas, dihidroflavonas.
- Alcohol bencílico, benzalcénido y ácido benzoico.
- Derivados del alcohol cinámico, cumarinas, triglicéridos fenólicos.
- Otros elementos aromáticos, monoterpenos, hexaterpenos, triterpenos.
- Ácidos grasos poliinsaturados y ácido linoleico.
- Vitaminas A, B1, B2, B6, C, E, ácido nicotínico, ácido pantoténico.
- Cobre, manganeso, magnesio, níquel, plata, silicio, vanadio, zinc.

* Profesor Investigador.

§ Estudiante graduado del postgrado de Odontopediatría.

Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Tamaulipas (UAT).

Al nacer el individuo se expone a un sinnúmero de microorganismos con los cuales no había tenido contacto, éstos pueden llegar a ser parte de su flora normal o bien pueden provocar una enfermedad que traerá como consecuencia un tipo de respuesta inmune que puede ser inespecífica, donde intervienen los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (LPMN) o específica donde interactúan tanto los linfocitos T como B.^{6,7}

Los LPMN son las principales células fagocíticas encontradas en sangre periférica correspondiendo a un 50-70% del total de las células de la serie blanca.⁷

Se les considera la segunda línea de defensa del cuerpo humano, puesto que la primera línea de defensa corresponde a la piel y mucosas.⁶ Su vida media es de 8-20 horas en circulación, la cual aumenta al entrar en tejidos infectados o inflamados.⁸

El desplazamiento de los LPMN desde el capilar hasta el sitio de la lesión consta de varias etapas: 1. Marginación: contacto de los LPMN con las paredes endoteliales. 2. Adherencia al endotelio: mediante selectinas e integrinas. 3. Diapedesis: migración transendotelial; para que esto suceda es necesario que ocurra la quimiotaxis es decir que los LPMN sean atraídos hacia el foco de infección mediante diferentes moléculas como: IL-8 (interleucina 8), factor C5a del complemento, LTB4 (leucotrieno B4) entre otros. Fagocitosis y muerte celular. La destrucción del microorganismo en el interior del neutrófilo se produce a través de dos mecanismos, uno que es dependiente de oxígeno y el otro independiente del oxígeno.⁹

Una vez que el neutrófilo ha cumplido su función muere por apoptosis (muerte celular programada) con algunas alteraciones características por ejemplo, incrementa la expresión de marcadores de superficie de fosfatidilserina lo que ayuda a los macrófagos a eliminarlos, evitando así, la posible liberación de su contenido citotóxico al medio extracelular lo que constituye un beneficio del neutrófilo apoptótico puesto que reduce la inapropiada respuesta inflamatoria, modelo que se basa en la estrategia de proveer un beneficio a una excesiva respuesta en una infección microbiana.¹⁰ En nuestra línea de investigación sobre los LPMN hemos desarrollado un modelo para aislar y purificar LPMN de sangre periférica y después enfrentarlos a diferentes sustancias, en este caso propóleo para medir si era capaz de tener efecto citotóxico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio experimental, controlado, *in vitro*, con procedimiento estadístico de: análisis de varianza de repetidas medidas y *post-hoc* de Scheffé, significancia

estadística de $p < 0.05$. La sangre obtenida se mezcló con heparina (Inhepar) a razón de 5,000 U por mL de sangre para evitar la coagulación y atrapamiento de los leucocitos en tubos de ensayo de 16 x 150 con 3 mL de dextrán (Sigma co.) al 3%. Del tubo anterior se pasa la sangre a otro tubo, al que se agregó previamente dextrán al 3%, esta manipulación debe hacerse con pipeta Pasteur estéril y con muchísimo cuidado procurando que resbale la sangre por las paredes del tubo para que no se lisen los glóbulos rojos. Se incubó a 37°C por una hora tratando de simular las condiciones del cuerpo humano y se recolectó plasma rico en leucocitos en tubos de 13 x 100. Al retirarlo de la incubadora se podían apreciar dos fases: una superior o sobrenadante rica en leucocitos y la inferior o sedimento formado principalmente por glóbulos rojos y plaquetas. Se centrifugó la sangre a 180 g (1,200 rpm) durante tres minutos (centrifuga Fisher Scientific) y se descartó el sobrenadante que no contenía células y quedó el botón del fondo del tubo que corresponde a leucocitos. Se lavó tres veces con medio de cultivo comercial RPMI-1640, y para eliminar el exceso de dextrán. Se separan gentilmente las células para proceder a contar. La población celular obtenida se ajustó a una concentración de 12×10^6 células por mL realizando una mejor cuenta leucocitaria; con ayuda de la cámara de Neubauer y microscopios de luz Leica y Van Guard y un contador manual.

Diseño experimental. Nuestro sistema *in vitro* contó con los siguientes reactivos:

1. **Tubo muestra problema**, contenía células, propóleo, medio RPMI-1640, ensayado a dos tiempos una y dos horas. El propóleo a una dilución de 1:4 que es la concentración mínima inhibitoria; obtenida de experimentos anteriores realizados por Lara, Tinoco y colaboradores.¹¹
2. **Control de viabilidad**, que se realizó con células y medio de cultivo RPMI-1640 como grupo control. Se dejó en la incubadora a 37°C, una muestra de cada grupo a una y dos horas. Se observaron los resultados contando células muertas y vivas utilizando el colorante azul de tripano al 5% evaluando las células teñidas de azul como muertas o no viables, por la entrada del colorante a través de la membrana y pared celular y las células vivas refringentes sin coloración y sin daño celular. En los tubos se agregó 0.5 mL de propóleo en concentración de 1:4 más, 0.5 mL de células más medio. Después de incubarse por una y dos horas se observaron las imágenes en donde se apreció la aglutinación ocasionada y varios leucocitos polimorfonucleares en color azul señal que indica muerte celular.

3. **Pureza en la obtención de LPMN**, la separación de los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos se llevó a cabo con una pureza del 95 al 100% demostrada mediante la tinción de Wright bajo microscopía en objetivo de 40x.

RESULTADOS

En la *figura 1*, podemos observar un leucocito obtenido por la técnica de purificación de dextrán teñido con Wright, el rango de viabilidad con este método fue bastante alto alcanzando un 95-100% de pureza.

En la *figura 2*, podemos apreciar a los leucocitos vivos que no los afectó el propóleo puesto que aparecen hialinos al no incorporar el colorante azul tripano mientras que los LPMN muertos van a teñirse de color azul.

En la *figura 3*, vemos marcada la aglutinación efectuada por el propóleo, y en la *figura 4* se observan los leucocitos muertos, teñidos en azul al incorporar el colorante azul Tripano al 5%.

Resultados mostrados anteriormente, cuantificados; denotan estadísticamente lo siguiente en base a seis repeticiones efectuadas

En el *cuadro 1* encontramos los resultados de seis experimentos donde se muestra el número de células vivas y muertas a la hora y a las dos horas; teniendo un control con cuenta basal de 12,000,000 de leucocitos polimorfo nucleares neutrófilos (LPMN).

Posteriormente procedimos a desglosar el número de LPMN vivos y muertos a la hora y dos horas de cada experimento, encontrando en nuestros resultados el control de una población aproximadamente tres veces mayor del conteo de viabilidad que cuando el propóleo estaba presente.

Cabe señalar que la cuenta basal inicial fue ajustada a 12,000,000 de LPMN en cada experimento estandarizando así la población para evitar fluctuaciones que pudiesen afectar los resultados.

Cuando se hizo el análisis estadístico éste mostró diferencia estadística significativa entre el propóleo 1

Cuadro I. Cálculo de células vivas y muertas después de periodos de una y dos horas.

| |
|---|
| Experimento 1. |
| Tubo uno: propóleo + células = medición basal 12,000,000. |
| A una hora: células vivas 3,600,000 células muertas 8,400,000. |
| A dos horas: células vivas 3,000,000 células muertas 9,000,000. |
| Tubo dos: células + medio = medición basal 12,000,000. |
| A una hora: células vivas 11,400,000 células muertas 600,000. |
| A dos horas: células vivas 11,400,000 células muertas 600,000. |
| Experimento 2. |
| Tubo uno: propóleo + células = medición basal 12,000,000. |
| A una hora: células vivas 3,600,000 células muertas 8,400,000. |
| A dos horas: células vivas 3,000 000 células muertas 9,000,000. |
| Tubo dos: células + medio = medición basal 12,000,000. |
| A una hora: células vivas 11,600,000 células muertas 840,000. |
| A dos horas: células vivas 10,800,000 células muertas 1,200,000. |
| Experimento 3. |
| Tubo uno: propóleo + células = medición basal 11,000,000. |
| A una hora: células vivas 4,620,000 células muertas 6,380,000. |
| A dos horas: células vivas 4,400,000 células muertas 6,600,000. |
| Tubo dos: células + medio = medición basal 11,000,000. |
| A una hora: células vivas 10,890,000 células muertas 110,000. |
| A dos horas: células vivas 9,900,000 células muertas 1,100,000. |
| Experimento 4. |
| Tubo uno: propóleo + células = medición basal 12,000,000. |
| A una hora: células vivas 3,600,000 células muertas 8,400,000. |
| A dos horas: células vivas 3,000,000 células muertas 9,000,000. |
| Tubo dos: células + medio = medición basal 12,000,000. |
| A una hora: células vivas 11,640,000 células muertas 360,000. |
| A dos horas: células vivas 11,520,000 células muertas 480,000. |
| Experimento 5. |
| Tubo uno: propóleo + células = medición basal 12,000,000. |
| A una hora: células vivas 1,560,000 células muertas 10,440,000. |
| A dos horas: células vivas 1,200,000 células muertas 10,800,000. |
| Tubo dos: células + medio = medición basal 12,000,000. |
| A una hora: células vivas 11,400,000 células muertas 600,000. |
| A dos horas: células vivas 11,400,000 células muertas 600,000. |
| Experimento 6. |
| Tubo uno: propóleo + células = medición basal 12,000,000. |
| A una hora: células vivas 3,240,000 células muertas 9,960,000. |
| A dos horas: células vivas 600,000 células muertas 11,400,000. |
| Tubo dos: células + medio = medición basal A una hora células vivas 11,400,000 células muertas 600,000. |
| A dos horas: células vivas 11,400,000 células muertas 600,000. |

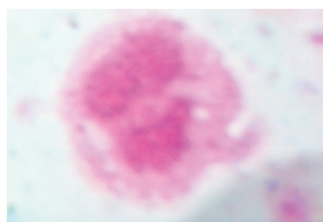


Figura 1. Leucocito tinción Wright.

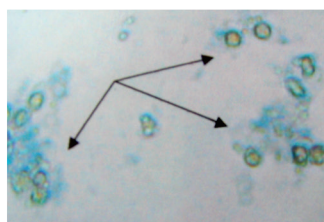


Figura 2. Leucocitos vivos.

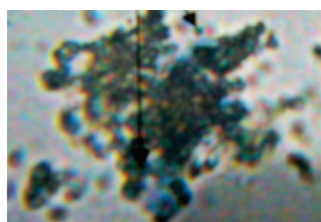


Figura 3. Leucocitos muertos aglutinación.

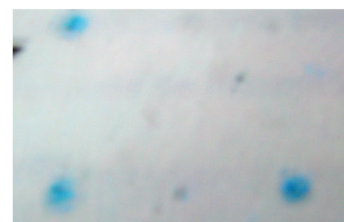


Figura 4. Leucocitos teñidos azul, muerte celular.

Cuadro II. Análisis de Scheffé con 95% de confiabilidad entre grupo control y experimental.

| |
|---|
| Propóleo 1 propóleo 2 = mean diff. 836666.667 p-value 0.5002 |
| Propóleo 1 control 1 = mean diff. -8018333.333 p-value < 0.0001 |
| Propóleo 2 control 2 = mean diff. -8570000.000 p-value < 0.0001 |
| Control 1 control 2 = mean diff. 285000.000 p-value 0.9621 |

(medido a la hora de incubación) y el control 1 con un valor $p < 0.0001$, lo mismo fue para el propóleo 2 (medido a las dos horas de incubación) frente al control dos con un valor $p < 0.0001$.

El análisis arroja lo siguiente (*Cuadro II*):

DISCUSIÓN

La capacidad antimicrobiana del propóleo ha sido ampliamente estudiada y demostrada por Bretz y su grupo; Koo y asociados; Hegazi AG, El Hady FK, Drago M y colegas.^{2,4,11-13} Su toxicidad ha sido poco investigada, encontrándose una limitada cantidad de estudios realizados en células vivas por tal razón se utilizaron leucocitos polimorfonucleares neutrófilos, células fácilmente recuperables de la sangre periférica que son la segunda línea de defensa del cuerpo humano; y están implicadas en los procesos antiinfecciosos y antibacterianos, características primordiales mencionadas también para el propóleo. La separación de leucocitos se basó en el método utilizado por Arce Mendoza, Tinoco Cabriales (1984) en la medición de la quimiotaxis leucocitaria en el efecto de las tetraciclinas.^{14,15} Los resultados reflejan que la pureza en la obtención de las células fue la adecuada puesto que al ser teñidas por el método Wright y aparecen de color morado y con sus núcleos característicos (*Figura 1*). Respecto a nuestro control de viabilidad celular fue bastante alto, 95 a 100% en donde los leucocitos aparecen refringentes y por lo tanto vivos.

En nuestro tubo de ensayo al que se agregó propóleo a las células vimos una marcada aglutinación, lo cual proponemos pueda ser uno de los mecanismos de efecto antibacteriano que está siendo estudiado por diversos autores como Koo, Park y colaboradores.^{4,16}

Además tenemos que las poblaciones celulares con las que trabajamos (medición basal) fue constante (estandarizada) 12,000,000 de leucocitos como población celular inicial, encontrando en el control una población tres veces mayor del conteo de viabilidad que cuando se utilizó propóleo; resultado repetitivo en las diferentes muestras cuantificadas sin haber diferencia aparente significativa a la hora y dos horas, corroborando con esto que efectivamente el propóleo está actuando con una constante toxicidad sobre las

células empleadas, situación que coincide con Scheller y su grupo que trabajando con ratones aplicaron etanol y extracto de propóleo, encontraron importantes cambios patológicos en hígado los cuales fueron transitorios y reversibles dentro de dos a cuatro semanas después de aplicación intravenosa.

Aunque autores como Ramírez y asociados¹⁷ reportan que el propóleo a dosis altas por vía digestiva en animales (10 a 15 mg/kg de peso) no producen efecto tóxico ni disturbio patológico aun a largo plazo, esto pudiera tener cierta relación a un efecto dosis-respuesta.

Nuestros resultados de acuerdo a variable-tiempo no fueron significativos. Mientras que las diferencias entre grupo control a la hora arrojaron diferencias estadísticamente significativas $p < 0.0001$. También el de dos horas y su control $p < 0.0001$. Esto es paradójico de acuerdo a los resultados encontrados por Magro Filho y Carballo¹⁸ que refieren que el propóleo produce acelerada reparación epitelial post-extracción en ratas.

Mientras que Seheller y asociados, usando propóleo encontraron estimulación del proceso regenerativo en perros y Stojko y Seheller reportan también en perros aceleración en la osteogénesis y regeneración del tejido óseo con marcado efecto antibacteriano. Aunque cabe señalar que ellos no estaban midiendo muerte celular, además de que suponemos que estamos usando propóleos de diferente forma de preparación o extracción, lo cual puede afectar los resultados, puesto que como producto alternativo no tienen una estandarización precisa.

Finalmente se debe recordar que los experimentos que realizamos son *in vitro* y que al interactuar *in vivo* los elementos implicados en este experimento podría ocurrir un efecto Buffer del organismo, ya que al diluirse el propóleo en nuestro sistema humano puede minimizar el efecto tóxico hacia los LPMN más no así su efecto bactericida y antiinflamatorio.

REFERENCIAS

1. Young K, Matías S, Lima C. *Comparação das características físico químicas das própolis produzidas na região sub-tropical da América do Sul; evidencia firoquímica de sua origem botânica.* Mesagem Doce. 2001; 61.

2. Yong Kun Park, Ikegaki M, de Alencar SM. *Clasificação das própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas*. Mesagem Doce 2000; 58.
3. Bankova V, Christov R, Hegazi A.G, ABD El Hady, Popov S. Chemical composition of propolis from popular budws. *International Symposium on Aphiterapy Cairo* 1997; 8-9.
4. Dos Santos A, Mendes da Silva JF, Kiltzke R, Nobrega J, de Aquino Neto FR. *Identificação do esterres graxos de triterpenoides pentacíclicos em própolis*. Mesagem Doce 54.
5. Almas K, Mahmoud A, Dahlan A. A comparative study of propolis and saline applications on human dentin. A SEM study. *Indian J Dent Res*. 2001; 12 (1): 217.
6. Anaya JM y cols. *Inmunología (de memoria)*. Cap. 4, p. 39, 15ª Ed. Corporación para investigaciones biológicas 2009. México, D.F.
7. Guyton A. *Fisiología y fisiopatología básicas*. 4ª ed. Ed. Interamericana 1980. Barcelona, España. Pte. II Células de la sangre, inmunidad y coagulación.
8. Edwards SW. *Biochemistry and physiology of the neutrophil*. Cambridgen University Press 1994. New York.
9. Brobeck JR, Best R. *Bases fisiológicas de la práctica médica*. 10ª ed. Ed. Panamericana, República de Argentina. 2006.
10. Jenkins N. *Fisiología y bioquímica bucal*. 1ª ed. Ed. Limusa México 1983: 179-212.
11. Lara M y cols. Estudio *in vitro* de la actividad antibacteriana del propóleo contra microorganismos de la placa dentobacteriana supragingival. *Tesis 2001 Fac de Odontología UAT*.
12. Katzung G. *Farmacología básica y clínica*. Ed. Manual Moderno. México. 1984.
13. Isla M, Nieva, Moreno M, Samprieto A, Vattuone M. Antioxidant activity of Argentine propolis extract. *J Ethnopharmacol*. 2001; 76 (2): 165-170.
14. Arce MA y cols. Efecto de las tetraciclinas sobre la quimiotaxis leucocitaria, estudio doble ciego en pacientes con acné vulgaris. *Tesis 1983. Monterrey N.L.*
15. Rivera y cols. Evaluación de la fagocitosis y digestión intracelular por leucocitos polimorfonucleares de individuos sanos para dos especies de estafilococos coagulasa negativo. Tesis para obtener grado de maestría. *UANL Fac de Medicina. 1990 Monterrey N.L.*
16. Koo H, Rosalen P et al. Effects of apis mellifera propolis from two brazilian regions on caries development in desalivated rats. *Caries Res*. 1999; 33 (5): 393-400.
17. Ramírez ME, Villalobos DE, Villafuerte GA, Andrade FF. Propóleo: ¿Una alternativa en la terapéutica médica y odontológica? *Primera parte Med Oral*. 2001; 2: 91-99.
18. Magro O, Carvalho A. Application of propolis to dental sockets and skin wound. *J Nihon Univ Sch Dental*. 1999; 36 (2): 4-10.

LECTURAS RECOMENDADAS

- Samson y Wright. *Fisiología aplicada. La sangre, los glóbulos rojos en la sangre*. 5ª ed. Sección II, Ed. Marin S.A.; Barcelona España. 1966.
- Asis M. *Apiterapia para todos, cómo usar los siete productos de la colmena para curar*. Editorial Científico Técnica. 1993. La Habana Cuba.
- Makashvili ZA. From the history of propolis, in remarkable hive products: propolis, scientific data and suggestions concerning its composition, properties and possible use in therapeutics. Apimondia standing commission on beekeeping technology and equipment. *Apimondia Archivos de la Federación Internacional de Asociaciones de Apicultura 1978. Bucharest*.
- Hajdaragi I. The effects of propolis on the reparative processes of the pulp and histological analysis of the pulp 28 days after artificial exposure and covering with propolis. *Stomatol Vjesn*. 1983; 12 (3-4): 111-114.
- Quintana J, Alonso O, Díaz M, López M. Empleo de la tintura de propóleo al 5% en la cura de heridas sépticas faciales. *Rev Cubana Estomatol*. 1997; 34 (1): 25-27.
- Bretz WA, Chiego DJ et al. Preliminary report of the effects of propolis on wound healing in the dental pulp. *Z Naturforsch C*. 1998; 53 (11-12): 1045-1048.
- Scheller S, Luciak J, Koziol M et al. Biological properties and clinical application of propolis. VIII, experimental observation on influence of ethanol extracts of propolis on regeneration of bone tissue. *Arzneim-Forsch Ed Cantor. Drug Res*. 1978; 28 (II)9: 1594-1595.
- Gafar M, Dimitriu H, Smichise E. Preparados farmacéuticos con extracto de propóleos, empleados en el tratamiento de las parodontopatías marginales crónicas. *Simposium Internacional de Apiterapia, Apimondia, Bucarest*. 1976; 20: 189-192.
- Khayal M, El Ghazaly MA. Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. *Drugs Exptt Clin Res*. 1993; XIX (5): 197-203.
- Drago L, Mombelli B, De Vecchi E, Fascina M, Tocalli L, Gismondo M R. *In vitro* antimicrobial activity of propolis dry extract. *Chemother*. 2000; 12 (5): 390-395.
- Vasilev V, Monova KSE, Todorov V. Tratamiento con propóleos en la moniliasis e intertigo de los lactante. Propóleos Investigaciones científicas y opiniones acerca de su composición y utilización con fines terapéuticos. *Apimondia Archivos de la Federación Internacional de Asociaciones de Apicultura. Bucharest*. 1975: 274-275.

Dirección para correspondencia:
Jorge A Quesada Castillo
 E-mail: jquesada@uat.edu.mx