

## Efecto de extractos de propóleos colombianos sobre la expresión génica de células cancerígenas

Effect of colombian propolis extracts on gene expression of cancer cells

**Dolly Patricia Pardo Mora**

Facultad de Medicina Veterinaria  
Universidad Antonio Nariño  
dopardo@uan.edu.co

**Oscar Murillo Torres**

Facultad de Medicina  
Universidad Nacional de Colombia  
ojmurillot@unal.edu.co

**Mauricio Rey Buitrago**

Facultad de Ciencias  
Universidad Antonio Nariño  
marey@uan.edu.co

**Orlando Alfredo Torres García**

Facultad de Medicina Veterinaria  
Universidad Antonio Nariño  
ortorres@uan.edu.co

### Resumen

El propóleo es un producto natural colectado y procesado por las abejas que consiste de una mezcla resinosa de composición química variable de acuerdo a la región del mundo. El efecto antitumoral del propóleo proveniente de diferentes zonas geográficas ha sido ampliamente reportado. En este trabajo se realizó una caracterización química de cuatro extractos etanólicos de propóleo (EEP) colombianos y se determinó su acción citotóxica sobre las células de osteosarcoma (OS) canino y fibroblastos derivados de un cultivo primario canino. Adicionalmente, en estos dos tipos de células se evaluaron los cambios en la expresión de genes apoptóticos, asociados a inflamación y al ciclo celular. Los resultados indican una actividad antiproliferativa del propóleo sobre la línea celular tumoral OSCA-8, resaltando un efecto citotóxico mayor en estas células con respecto a los fibroblastos. Además, se encontró un aumento en la expresión de genes proinflamatorios y asociados con procesos proapoptóticos en las células tratadas con EPP.

**Palabras Clave**  
Acción citotóxica, Células tumorales, Extractos etanólicos, Propóleo.

**E**nfoque del artículo: Se describen los resultados de un estudio que evalúa la acción citotóxica de extractos de propóleo sobre células de osteosarcoma canino.

## **Abstract**

Propolis is a natural product collected and processed by bees that consists of a resinous mixture of chemical composition changing from region to region in the world. The anti-tumor effect of propolis from different geographical areas has been widely reported. In this work, we made a chemical characterization of four ethanol extracts of Colombian Propolis (EEP) and their cytotoxic action against canine osteosarcoma cells (OS) and fibroblasts derived from a primary canine culture was evaluated. In addition, changes in the gene expression of apoptotic, associated with inflammation and the cell cycle, were evaluated in these two cell types. The results indicate an antiproliferative activity of propolis on OSCA-8 tumor cell line, highlighting a greater cytotoxic effect in these cells with respect to fibroblasts. Furthermore, an increase in the expression of proinflammatory and proapoptotic genes and proapoptotic processes were found in cells treated with EPP.

## **¿Qué es el propóleo?**

El propóleo es un producto natural colectado y procesado por las abejas, empleado para proteger sus colmenas (Figura 1). Consiste de una mezcla

resinosa de composición química variable dependiendo de la región, tipo de vegetación, régimen de lluvias, época del año, entre otros factores (Freires *et al.*, 2016; Castro *et al.*, 2011).



**Figura 1.** La abeja (*Apis mellifera*), también conocida como abeja doméstica o abeja melífera. Fuente: Vassya Bankova *et al.* (2016).

## **Usos del propóleo**

El propóleo tiene una gran historia de uso en la medicina, que data de los antiguos egipcios y griegos en tiempos antes de nuestra era. A lo largo de la historia, se le han atribuido diferentes propiedades farmacológicas ampliamente reportadas: antiséptica, antifúngica, antiinflamatoria, antitumoral e inmunomoduladora, entre otras.

## **Osteosarcoma**

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo. Es una enfermedad caracterizada por la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de los límites del tejido donde se inició, invadiendo y propagándose por todo el cuerpo con consecuencias fatales. El osteosarcoma (OS) aunque es un tipo de cáncer raro, es el tipo de tumor primario maligno más predominante en hueso, tanto en humanos como en caninos (Simpson *et al.*, 2017). En este trabajo se empleó el modelo canino para el estudio de OS en humanos y otros tipos de cáncer.

El efecto del propóleo contra las células tumorales ha sido ampliamente reportado, en diferentes zonas geográficas del mundo. No obstante, dada la composición variada de los propóleos, es necesario reconocer nuevos tipos de propóleos y es esclarecer sus actividades biológicas antitumorales.

### ¿Cuál fue el objetivo de esta investigación?

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la actividad antitumoral de cuatro EEPs colombianos en células de OS y fibroblastos derivados de un cultivo primario canino, así como elucidar sus posibles mecanismos de acción.

### ¿Cuáles fueron los propóleos estudiados?

En esta investigación fueron estudiadas cuatro muestras de propóleo colombiano obtenidas de diferentes regiones del país: Usme, Meta, Silvia y Cajibío. Las muestras recolectadas fueron disueltas en etanol al 70% y posteriormente caracterizadas químicamente por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Los propóleos mostraron ser ricos en diferentes compuestos como: diterpenos, triterpenos y benzofenonas (Pardo Mora *et al.*, 2019).

### ¿Cómo se desarrolló la investigación?

Inicialmente, la investigación fue desarrollada evaluando los efectos citotóxicos de cada uno de los EEPs. Los ensayos de citotoxicidad han sido desarrollados para detectar los efectos tóxicos de una sustancia de interés, pudiendo afectar la estructura y/o funciones esenciales para la supervivencia celular, funcionamiento basal, proliferación, etc. Dentro de estos se encuentran la evaluación de la integridad de: membrana celular, citoesqueleto, maquinaria energética, enzimas del metabolismo de síntesis y degradativo, canales iónicos, maquinaria de división celular, etc. (Simpson *et al.*, 2017; Cinegaglia *et al.*, 2012).

Para evaluar la citotoxicidad de los EEPs en los dos tipos celulares se empleó un ensayo denominado MTT. El ensayo consiste en transformar el MTT por una enzima mitocondrial en un compuesto coloreado azul (formazan). La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido, el cual puede ser cuantificado espectrofotométricamente.

Con el fin de comprender los posibles mecanismos de acción de los extractos, se determinó la expresión de diferentes genes. Se extrajo el ARN total a partir de células tratadas con los EEPs a una concentración y tiempo de incubación óptimos determinados en un ensayo previo. El ARNm fue transcrito a cDNA y fue analizado mediante microarreglos o "chips de ADN". Esta técnica permite detectar la expresión de diferentes genes de manera simultánea y en gran número. En esta investigación se detectaron alrededor de 27.681 genes.

Para corroborar los resultados de los microarreglos se evaluó la expresión diferencial de los genes asociados a inflamación,

apoptosis y división celular por una técnica adicional denominada reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). Los genes validados fueron: interleucina 6 (IL-6), receptor de la interleucina 1 tipo 2 (IL-1R2), caspasa 8, caspasa 9 y p21 en células OSCA-8 y fibroblastos. Se utilizaron como genes normalizadores la beta-2-microglobulina (B2M) y la  $\beta$ -Glucuronidasa (GUSB).

### Hallazgos

Todas las muestras de propóleos evaluadas indujeron un efecto citotóxico a las células de OS, el efecto citotóxico aumentó con el tiempo después de la incubación con propóleo. El parámetro de viabilidad celular se midió estimando la concentración citotóxica 50% (CC50), es decir, la concentración requerida del extracto para reducir la viabilidad de las células en un 50%, el cual fue inferior a 36.24  $\mu\text{g/ml}$  después de 72 h de tratamiento.

Los EEPs tienen un efecto citotóxico mayor sobre las células de OS con respecto a los fibroblastos y en ambos casos el efecto ocurre de manera dependiente de la dosis empleada. Considerando los resultados obtenidos de todos los EEPs, el tratamiento con el extracto de propóleo colectado en Usme fue el que disminuyó en mayor proporción la viabilidad de las células OSCA-8 que las del control.

La expresión génica observada con los microarreglos mostraron que los EEPs alteran la transcripción de genes tanto de forma positiva (aumentan) como negativa (disminuyen) en las células de OS. Entre los más relevantes se encuentra la sobre-expresión de IL-6, IL-1R2 (proinflamatorios) y el gen p21 (ciclo celular). Estos hallazgos fueron corroborados por qPCR, confirmando un incremento en la expresión relativa de estos genes y una sobreexpresión

mayor en OSCA-8 en comparación con los fibroblastos.

De la misma forma, todas las muestras de propóleo aumentaron la expresión de genes asociados con la muerte celular. En particular, el gen de la caspasa 8 mostró un nivel de expresión más alto en la muestra incubada con extracto de propóleo de Cajibío. Los extractos de Meta, Cajibío y Silvia indujeron la expresión del gen de la caspasa 9.

Otros autores han reportado la actividad antiproliferativa del propóleo en líneas tumorales. Sin embargo, en células control (no transformadas) no se observa el mismo efecto. Este trabajo reprodujo este mismo fenómeno, aunque cabe destacar que el efecto citotóxico es mayor en las células OSCA-8 respecto a los fibroblastos, lo cual podría ser un indicador de selectividad con respecto a la acción de los EEP.

El arresto del ciclo celular se debe al incremento en la expresión, entre otras, de proteínas como p21 y quizás a miembros de la vía de las MAPK. Por otro lado, diversos autores han demostrado que la activación de la respuesta proinflamatoria puede favorecer procesos proapoptóticos, este patrón de expresión fue similar al determinado en nuestro trabajo (Sureerat *et al.*, 2015; Marcelo *et al.*, 2016).

Los Extractos Etanólicos de Propóleo (EEP) podrían estar implicados en distintos mecanismos que interrumpen la viabilidad celular, adicionalmente su efecto podría llegar a ser selectivo, según el tipo de células, convirtiéndose en productos promisorios en el desarrollo de nuevas estrategias para combatir el cáncer.

### Fichas biográficas de los autores

**Dolly Patricia Pardo Mora:** Médico veterinario de la Universidad Nacional de Colombia. Maestría en salud animal de la Universidad Nacional de Colombia. Doctorado en ciencias aplicadas de la Universidad Antonio Nariño. Campos de desempeño: investigación y desarrollo en productos de las abejas.



**Oscar Julián Murillo Torres:** Nutricionista y dietista graduado de la Universidad Nacional de Colombia. Actualmente es estudiante de segundo año de la Maestría en Bioquímica de la Universidad Nacional de Colombia y se desempeña como becario docente en la Facultad de Medicina de la misma universidad.



**Mauricio Rey Buitrago:** Bioquímico de la Universidad Estatal del Lviv (Ucrania), maestría en genética humana de la Universidad Nacional de Colombia. Candidato a Doctor en ciencias farmacéuticas de la Universidad Nacional de Colombia. Campos de desempeño en genética molecular y bioquímica genética.



**Orlando Torres García:** Médico veterinario de la Universidad de La Salle, Bogotá. Maestría en microbiología con énfasis en inmunología de la Universidad Javeriana. Maestría en investigación y avances en inmunología molecular y celular de la Universidad de Granada, España. Doctor en inmunología de la Universidad de Granada con posdoctorado en inmunogenética del Instituto de Parasitología López Neira (CESIC), Granada, España. Campos de desempeño en investigación: inmunogenética de enfermedades complejas (cáncer y tripanosomiasis).



## Referencias

- Castro, V., Negri, G., Salatino, A. y Bandeir, M. (2011). A new type of Brazilian propolis: prenylated benzophenones in propolis from Amazon and effects against cariogenic bacteria. *Food Chemistry*, 125, pp. 966-972 [doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.089].
- Cinegaglia, N. C., Bersano, P. R., Bufalo, M. C. y Sforcin, J. (2012). Cytotoxic Action of Brazilian Propolis In Vitro on Canine Osteosarcoma Cells. *Phytotherapy Research*, 27, pp. 1277-1281.
- Freires, I. A., de Alencar, S. M. y Rosalen, P. L. (2016). A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 110, pp. 267-279 [doi:10.1016/j.ejmech.2016.01.033].
- Marcelo, F., David, C., Marcos, G., Fernanda, V., André, L., Bruno, B., Severino, M., Thiago, M. y Pedro, L. (2016). Neovestitol, an isoflavonoid isolated from Brazilian red propolis, reduces acute and chronic inflammation: involvement of nitric oxide and IL-6. *Nature Scientific Reports*, 6,36401 [doi: 10.1038/srep36401].
- Pardo Mora, D., Santiago, K., Conti, B., de Oliveira Cardoso, E., Conte F., Oliveira, L., de Assis Golim, M., Uribe, J., Gutiérrez, R.M., Rey, M., Popova, M., Trusheva, B., Bankova, V., García, O. y Sforcin, J.M. (2019). The chemical composition and events related to the cytotoxic effects of propolis on osteosarcoma cells: A comparative assessment of Colombian samples. *Phytother Res.* 33(3), pp. 591-601.
- Vassya Bankova et al. (2016). Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. *Journal of Apicultural Research*. Vol. 58 [doi.org/10.1080/00218839.2016.1222661].
- Simpson, S., Dunning, M. D., de Brot, S., Grau-Roma, L., Mongan, N. P. y Rutland, C. S. (2017). Comparative review of human and canine osteosarcoma: morphology, epidemiology, prognosis, treatment and genetics. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 59, 71 [doi.org/10.1186/s13028-017-0341-9].
- Sureerat, B., Songchan, P., Tanapat, P., Kriengsak, L., Preecha, P., Jisnuson, S. y Chanpen, C. (2015). Cardanol isolated from Thai *Apis mellifera* propolis induces cell cycle arrest and apoptosis of BT-474 breast cancer cells via p21 upregulation. *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences*, pp. 23-55 [doi.org/10.1186/s40199-015-0138-1].
- Zaccaria, V., Curti, V., Di Lorenzo, A., Baldi, A., Maccario, C., Sommatì, S. y Daglia, M. (2017). Effect of Green and Brown Propolis Extracts on the Expression Levels of microRNAs, mRNAs and Proteins, Related to Oxidative Stress and Inflammation. *Nutrients*, 9(10), 1090 [doi.org/10.3390/nu9101090].