

EFFECTO DE LA INGESTA DE PROPOLEOS SOBRE EL ESTADO REDOX DE LA ALBUMINA SERICA HUMANA: UN ESTUDIO EFECTUADO SOBRE PACIENTES CON ESTRÉS OXIDATIVO SEVERO

S. ERA¹, H. IMAI¹, T. HAYASHI¹, K. OKIHARA², A. NAKATSUMA², H. YAMADA²

¹Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1193, JAPON

tfn.: +81-58-267-2225; fax: +81-58-267-2962; E-mail: era@cc.gifu-u.ac.jp; imai@cc.gifu-u.ac.jp

²Yamada Apiculture Center, Inc., 194 Ichiba, Kagamino-cho, Tomata-gun, Okayama 708-0393, JAPON
tfn.: +81-868-54-1199; fax: +81-868-54-7004; e-mail: 0342@yamada-bee.com; 0438@yamada-bee.com

Resumen

La albúmina del suero humano (HSA) es una mezcla de mercaptalbúmina (HMA, forma reducida) y nonmercaptalbúmina (HNA, forma oxidada). La HMA, con un único residuo de sulfhidril, es la responsable por la más grande fracción de sulfhidril reactivo de los fluidos extracelulares, y parece estar involucrada en gran medida en el sistema antioxidante extracelular. Nosotros desarrollamos un sistema adecuado de cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) en orden a la neta separación de la HSA en HMA y HNA. Con este método obtuvimos un valor promedio de $[HMA/(HMA+HNA)]$, por ejemplo $f(HMA)$, de 73,2 % ($n = 20$) para sujetos varones sanos jóvenes. Dentro del presente estudio, examinamos la influencia de la ingesta de propóleos sobre el estado redox de la HSA en pacientes con estrés oxidativo severo, como es el caso de la terapia anticancerosa. En el caso de un paciente con cirrosis hepática y cáncer esofágico (varón de 68 años), el valor $f(HMA)$ antes de la radioterapia y la ingestión de propóleos fue de 66,6 %. Durante las dos semanas cuanto duró la radioterapia, se le administró 10 tabletas de propóleos/día (525 mg de extracto de propóleos brasileño/día), y continuó tomándolas durante otras 4 semanas. Los valores $f(HMA)$ antes, inmediatamente después y a las 4 semanas de la radioterapia fueron de 63,5, 67,7 y 74,1 %, respectivamente. Lo que indica que el estado oxidativo debido a la radioterapia se puede atenuar por la administración de un complemento de propóleos. Además, el aumento progresivo del valor $f(HMA)$ muestra que las virtudes antioxidantes del propóleos pueden acrecentar la capacidad total antioxidativa de los enfermos cancerosos.

Palabras clave: propóleos / estrés oxidativo / estado redox / albúmina sérica (humana)

Introducción

La albúmina sérica humana (HSA) es la proteína que más abunda en el sistema circulatorio y le corresponde varias funciones. Se conoce que ejerce un importante papel en la regularización osmótica del fluido circulante del sistema vascular y que es capaz de transportar una variedad de sustancias endógenas y exógenas por el cuerpo (PETERS, 1996). Otro papel funcional de esta molécula parece ser la conservación del potencial redox en los fluidos extracelulares, siendo una mezcla de mercaptalbúmina (forma reducida; en humanos, HMA) y nonmercaptalbúmina (forma oxidada; en humanos, HNA), por ej. el par redox del plasma (SOGAMI et al., 1984; SOGAMI et al., 1985a; SOGAMI et al., 1985b). La HMA posee un grupo sulfhidril libre en la posición 34 (Cys-34) y es la responsable por la fracción más grande de sulfhidril libre en los líquidos extracelulares. La HNA está formada por al menos tres tipos de compuestos. El compuesto mayoritario de la HNA es la mezcla de bisulfito y cisteína o glutation $[HNA(Cys)$ o $HNA(Glut)]$, siendo el otro un producto de oxidación más grande que la mezcla de bisulfito, como el estadio sulfénico (-SOH), sulfínico (SO_2H) o sulfónico ($-SO_3H$), siendo $[HNA(Oxi)]$ un componente menor de los fluidos extracelulares (ERA et al., 1989).

Nosotros desarrollamos un sistema adecuado de cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) para la neta separación de la HSA en HMA y HNA, utilizando un Shodex-Asahipak GS-520H o una columna ES-502N, y estudiamos extensivamente las modificaciones dinámicas del estado redox de la HSA en distintos estados fisiopatológicos (SUZUKI et al., 1992; HAYAKAWA et al., 1997; HAYASHI et al., 2000; KAWAI et al., 2001; SOEJIMA et al., 2002; TOMIDA et al., 2003). Por los resultados obtenidos, comprobamos que la fracción HMA $[f(HMA)]$ decreció sensiblemente en algunas afecciones con respecto a la de sujetos sanos, donde casi no hubo modificaciones del valor de $f(HMA)$.

El objeto del presente estudio ha sido investigar sobre el efecto de la ingesta de propóleos en el estado redox de la HSA en pacientes con estrés oxidativo severo, como aquellos que están sometidos a un tratamiento anticanceroso, al considerarse que el propóleos, uno de los productos de las abejas, ejerce un efecto beneficioso como complemento antioxidante (BANSKOTA et al., 2001).

Materiales y métodos

Fueron estudiados dos pacientes con cáncer gastrointestinal. Un paciente (mujer de 56 años) padecía de cáncer gástrico y se le había practicado una gastrectomía curativa. Otro paciente (varón de 68 años) padecía de cirrosis hepática y también de cáncer esofágico, sin relación entre sí, y había estado sometido a radioterapia contra el cáncer esofágico. Un sujeto sano (varón de 45 años), sin antecedentes de afecciones renales o hepáticas, participó como control en esta investigación (uno de los autores; H.I.). Como complemento de propóleos se utilizó un extracto alcohólico de propóleos brasileño (una tableta de propóleos contenía 52,5 mg de extracto de propóleos, Yamada Apiculture Center Inc., Okayama, Japón). Se consiguió de cada sujeto un consentimiento informativo, y todos los procedimientos se practicaron de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Las muestras de sangre se colocaron en tubos colectores de sangre en vacío (EDTA-2K, Terumo Co., Tokio, Japón) y se centrifugaron durante 20 min a 3.000 rpm en una

centrifugadora Kubota 2100 (Kubota Manufacturing Co., Tokio, Japón). El plasma resultante se filtró a presión, utilizando un filtro Cosmonice (0,45 μ m, Nacalai Tesque., Inc., Kyoto, Japón), manteniendo las muestras para el análisis HPLC a -80°C .

El sistema HPLC consta de un sacamuestras automático modelo AS-8010, una bomba de doble inmersión modelo CCPM y un detector de fluorescencia modelo FS-8000 (longitud de la onda de excitación 280 nm; longitud de la onda de emisión 340 nm) acoplado a un sistema de supervigilancia modelo SC-8020, procedentes todos ellos de Tosoh Co., Japón. Se utilizó una columna Shodex-Asahipak ES-502N (10 x 0,76 cm I.D., forma DEAE para intercambio de iones HPLC, Showa Denko., Japón; temperatura de la columna: $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$). La elución se efectuó con gradiente lineal al efecto de aumentar la concentración de etanol de 0 a 5 % en un tampón de 0,05 M de acetato de sodio - 0,40 M de sulfato de sodio (pH 4,85) (tampón de acetato-sulfato) a una fluencia de 1 ml/min. Las muestras de suero se inyectaron con ayuda de un sacamuestras con el volumen fijo de 2 μ l.

Para la determinación del valor de cada fracción de albúmina, por ej. $f(\text{HMA}) = [\text{HMA}/(\text{HMA} + \text{HNA})]$ y $f(\text{HNA}) = [\text{HNA}/(\text{HMA} + \text{HNA})]$, los perfiles HPLC obtenidos se sometieron a la adaptación a una curva numérica; cada forma de peak se aproximó con una función Gauss.

Resultados y discusiones

Se sabe que la HSA es una mezcla de HMA y HNA. Además, hay varios tipos de HNA, por ej. HNA (Cys), HNA (Glut) y HNA (Oxi). Una neta separación de las tres fracciones de HSA, por ej. HMA, [HNA(Cys) & HNA (Glut)] (denominada en el presente estudio HNA-1) y HNA (Oxi) (denominada HNA-2) se efectuó dentro del presente estudio con nuestro sistema HPLC. Nuestros estudios anteriores demostraron que el estado redox de la HSA se puede aprovechar como índice biomarcador del estrés oxidativo del cuerpo (ERA et al., 1995; HAYASHI et al., 2000; IMAI et al., 2002; Tomida et al., 2003).

Las figs. 1A y 1B reproducen los perfiles representativos HPLC de la HSA para un sujeto sano (varón de 45 años) y un enfermo de cirrosis hepática y cáncer esofágico (varón de 68 años). Hubo una separación neta de las fracciones HMA, HNA-1 y HNA-2. Los valores de las fracciones HMA, HNA-1 y HNA-2 fueron de 74,0, 24,3 y 1,7 % (fig. 1A) y respectivamente de 63,5, 34,8 y 1,7 % (fig. 1B). El valor de $f(\text{HMA})$ de 74,0 % para el sujeto sano del estudio no fue diferente del valor promedio $f(\text{HMA})$ anteriormente reportado para sujetos sanos ($73,2 \pm 2,3\%$) (IMAI et al., 2002). El valor $f(\text{HMA})$ de 63,5 % del enfermo con cáncer esofágico fue significativamente inferior al de sujetos normales, indicando que probablemente en este paciente canceroso el mecanismo de defensa ante el estrés oxidativo era sensiblemente más débil. Al no existir estudios *in vivo* sobre el efecto antioxidante del propóleos, estudiamos primero el impacto de la ingesta de propóleos sobre el estado redox de la HSA en un sujeto sano (varón de 45 años). A éste se le administró diariamente 12 tabletas durante 4 semanas. Sorprendentemente, el valor de $f(\text{HMA})$ fue aumentando de 74,0 (fig. 1A) a 79,2 %, y el de $f(\text{HNA-1})$ fue disminuyendo de 24,3 (fig. 1A) a 19,9 % en el intervalo de 4 semanas. Esto sugiere que el nivel antioxidante pudo haber crecido por efecto del complemento de propóleos. Por tal razón, estudiamos el impacto de la ingesta de propóleos sobre el estado redox de la HSA en dos pacientes enfermos de cáncer gastrointestinal sometidos a una terapia anticancerosa.

Caso 1: mujer de 56 años con cáncer gástrico y gastrectomía curativa. Se quejaba de falta de apetito, debida tal vez a la gastrectomía. Durante una semana se le administró diariamente propóleos a razón de 5 tabletas/día, tomó durante otras 12 semanas 6 tabletas al día y continuó tomando 10 tabletas cada día durante otras 8 semanas. En el periodo en que se le administró el complemento de propóleos mejoró un tanto el apetito y el valor de $f(\text{HMA})$ se mantuvo entre 73 y 79 %, indicando que el propóleos era una substancia potencialmente eficaz en el combate del estrés oxidativo.

Caso 2: varón de 68 años con cirrosis hepática y cáncer esofágico, tratado por radioterapia. El valor de $f(\text{HMA})$ antes de someterse a radioterapia y de ingerir propóleos era de 66,6 %. Durante la radioterapia que se extendió por 2 semanas se le administraron diariamente 10 tabletas de propóleos y continuó tomándolas 4 semanas más. Los valores de $f(\text{HMA})$ en el momento inmediatamente anterior, inmediatamente posterior y a las 4 semanas de la radioterapia fueron de 63,5 (un perfil HPLC aparece en la fig. 1B), 67,7 y 74,1 %, respectivamente. Es sabido que la radioterapia con ^{60}Co , aun siendo una dosis terapéutica para humanos, produce una serie de radicales de oxígeno, y la opinión general es que éstos son los responsables por numerosos estados de estrés oxidativo (DAVIES, 1987). De cualquier modo, nuestras comprobaciones en relación con el valor de $f(\text{HMA})$ en el caso 2 sugieren que el estado oxidativo por efecto de la radioterapia se puede atenuar con complementos de propóleos. Además, el aumento progresivo del valor de $f(\text{HMA})$ indica que las virtudes antioxidantes del propóleos podrían incrementar la capacidad antioxidante total de los enfermos cancerosos.

Creemos que estas comprobaciones están fuertemente apoyadas también por el hecho de que el propóleos ejerce un papel beneficioso como complemento antioxidante. Hasta donde sabemos, éste es el primer estudio *in vivo* que analiza la albúmina oxidada y reducida en enfermos con cáncer y estrés oxidativo severo y que comprobó asimismo el efecto antioxidante del propóleos. Bien es cierto que para la confirmación de la validez de estas comprobaciones, así como para la determinación del significado clínico de los datos aportados por este estudio se requieren más estudios, que abarquen más casos.

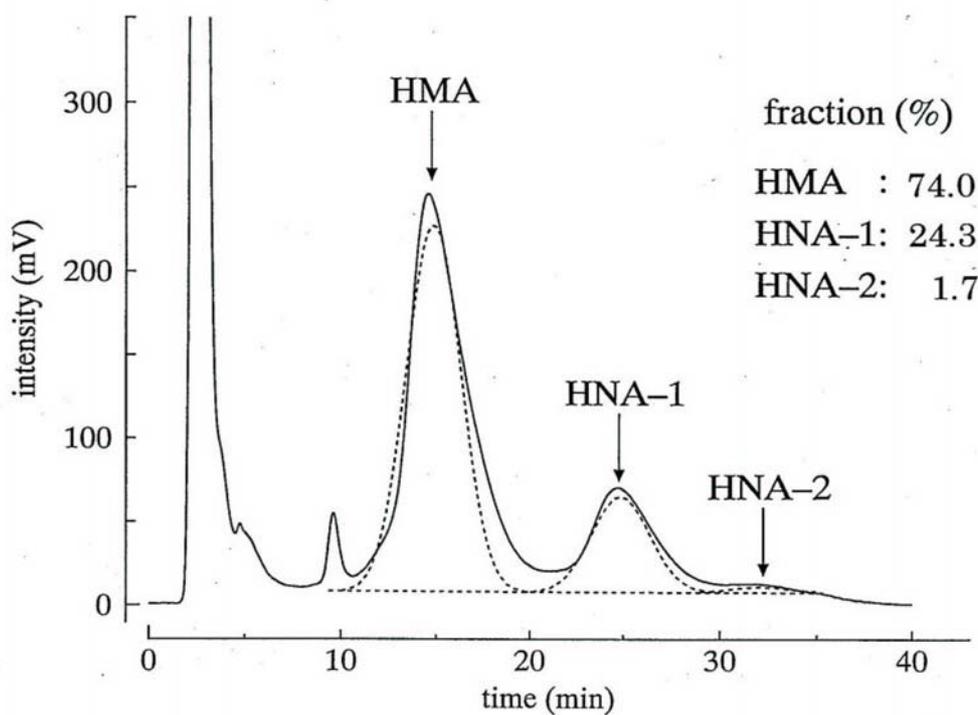


Figura 1A

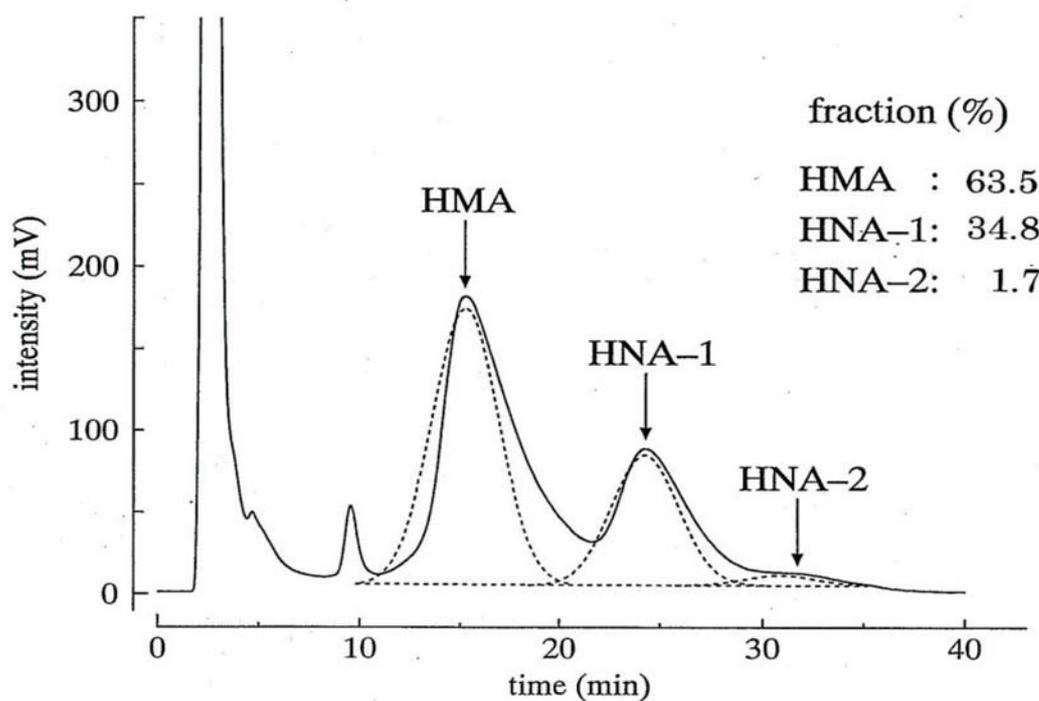


Figura 1B

Figura 1 - Perfiles HPLC representativos para el suero de (A) sujeto sano (varón de 45 años) y (B) enfermo con cirrosis hepática y cáncer esofágico (varón de 68 años) obtenidos mediante un sistema HPLC con detección fluorescente (longitud de la onda de excitación 280 nm; longitud de la onda de emisión 340 nm). Para las condiciones detalladas de elución, véase el texto. Los perfiles se sometieron a una adaptación a curvas numéricas (línea de puntos). Los valores obtenidos para cada fracción vienen indicados en la parte derecha de la figura.

BIBLIOGRAFIA

- Banskota HA., Tezuka Y., Kadata S., Recent progress in pharmacological research of propolis, *Phytotherapy Res.*, 15 (2001), 561-571
- Davies K.J.A., Protein damage and degradation by oxygen radicals, *J. Biol. Chem.*, 262 (1987), 9895-9901
- Era S., Hamaguchi T., Sogami M. et al., Further studies on the resolution of human mercapt- and nonmercaptalbumin and on human serum albumin in the elderly by high-performance liquid chromatography, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 31 (1989), 435-442
- Era S., Kuwata K., Imai H. et al., Age-related change in redox state of human serum albumin, *Biochim. Biophys. Acta*, 1247 (1995), 12-16
- Hayakawa A., Kuwata K., Era S. et al., Alteration of redox state of human serum albumin in patients under anesthesia and invasive surgery, *J. Chromatogr. B*, 98 (1997), 27-33
- Hayashi T., Era S., Kawai K. et al., Observation for redox state of human serum and aqueous humor albumin from patients with senile cataract, *Pathophysiology*, 6 (2000), 237-243
- Imai H., Hayashi T., Negawa T., et al., Strenuous exercise-induced change in redox state of human serum albumin during intensive kendo training, *Jpn. J. Physiol.*, 52 (2002), 135-140
- Kawai K., Yoh M., Hayashi T. et al., Effect of diabetic retinopathy on redox state of aqueous humor and serum albumin in patients with senile cataract, *Tokai J. Exp. Clin. Med.*, 26 (2001), 93-99
- Peters T. Jr., All about albumin, New York, Academic Press, 1996
- Soejima A., Kaneda F., Manno S. et al., Useful markers for detecting decreased serum antioxidant activity in hemodialysis patients, *Am. J. Kidney Dis.*, 39 (2002), 1040-1046
- Sogami M., Nagaoka S., Era S., et al., Resolution of human mercapt- and nonmercaptalbumin by high-performance liquid chromatography, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 24 (1984), 96-103
- Sogami M., Era S., Nagaoka S., et al., HPLC-studies on nonmercapt-mercapt conversion of human serum albumin, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 25 (1985), 398-402
- Sogami M., Era S., Nagaoka S. et al., High-performance liquid chromatographic studies on mercapt = nonmercapt conversion of human serum albumin II, *J. Chromatogr.*, 332 (1985), 19-27
- Suzuki E., Yasuda K., Takeda N. et al., Increased oxidized form of human serum albumin in patients with diabetes mellitus, *Diabetes Res. Clin. Prac.*, 18 (1992), 153-158
- Tomida M., Hayashi T., Ishimaru J. et al., Observation for the redox state of human synovial fluid albumin from patients with temporomandibular joint disorders, *Acta Sch. Med. Univ. Gifu*, 51 (2003), 21-28