

TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR, CULTIVOS CELULARES Y ORGANOTIPICOS AL EFECTO DE EVALUAR LAS CARACTERISTICAS FARMACOLOGICAS DE LAS FRACCIONES NORMALIZADAS DE LOS PRODUCTOS APICOLAS

R. STOJKO¹, Zofia DZIERŻEWICZ³, J. STOJKO², A. STOJKO², Agata PYTEL¹

¹Department of Pathology, Faculty of Pharmacy, Medical University of Silesia, Katowice, POLONIA, E-mail: rstojko@slam.katowice.pl

²Department of Sanitation, Bioanalysis & Environment Research, Faculty of Pharmacy, Medical University of Silesia, Katowice, POLONIA

³Department of Molecular Biology, Biochemistry and Biopharmacy, Faculty of Pharmacy, Medical University of Silesia, Katowice, POLONIA

Resumen

En el presente, es posible que se reproduzca en el laboratorio modelos celulares que presentan las propiedades de los órganos, sobre la base de los datos de la célula original. De esta manera, se pueden formar las venas y los lóbulos del hígado. Los cultivos de células específicas son interesantísimos desde el punto de vista de la investigación del mecanismo de actuación de los distintos componentes del néctar floral y el mielato sobre el organismo humano. Se llevaron a cabo numerosas investigaciones acerca del poder estimulante de los factores naturales sobre la capacidad natural de defensa del organismo por inmunomodulación. Hoy en día, ya no se pueden ignorar los efectos de los productos apícolas sobre la eficacia del sistema inmunitario. Se ha demostrado hace ya mucho tiempo que el propóleo acrecienta la resistencia del organismo y que el veneno de abejas activa potentemente el sistema inmunitario. De esta manera, se abrió el camino a experimentar para evitar errores. La utilización de la hematoglutinina como factor mitogénico posibilitó la formación de cultivos de linfocitos. Con este fin se aplican dos métodos - el macrocultivo y el micrométodo. Así se analizan con más precisión los descubrimientos de las ciencias biomédicas, haciendo referencia al reconocimiento del transcriptoma humano. La existencia de los conocimientos sobre las secuencias reescritas con mRNA sobre cADN y de los bancos cADN permite la clonación efectiva de tan sólo algunas regiones del gen, sin otras secuencias del genoma. Los métodos clásicos y los métodos más modernos de biología molecular permiten detectar las diferencias en la expresión de los genes a nivel de la transcripción. Los genes en distintos estadios de expresión son identificados bastante tardíamente, básicamente por la hibridación diferenciada, así como por la distribución en geles de sus productos sobre albuminosos. Desde que se ha hecho posible utilizar bancos ricos en secuencias de ácidos nucleicos y proteínas, el número de genes expresados ha aumentado muchísimo respecto a los análisis tradicionales.

Uno de los métodos analíticos más modernos son los microprocesadores ADN. Con ayuda de los microcircuitos ADN también se puede investigar sobre la relación entre el ADN y las proteínas. Las técnicas sensibles de detección fluorescente permiten identificar con precisión cada componente de la mezcla estudiada y la valoración cuantitativa de sus enlaces. Esta estrategia permite estudiar miles de genes y valorar su expresión en un tiempo mucho más corto que por un análisis ordinario. Los microneú ADN existentes ya han encontrado una amplia aplicación en la investigación de la sensibilidad de las personas a los medicamentos y también en la optimización de su actuación en la creación de nuevos medicamentos, porque son muy caros. Los microprocesadores ADN se pueden utilizar además en la investigación de la interacción de los distintos enlaces, de sus componentes naturales de material genético y de la regulación de la actividad de los genes dentro de las células. En quimioterapia, hay prácticas que vienen utilizando productos apícolas desde hace mucho tiempo, consiguiéndose así una actividad sinérgica. Este uso permite reducir las dosis de algunos medicamentos y ampliar su espectro de actuación.

Palabras clave: propóleo / biología molecular / ADN

Introducción

La evolución de los medicamentos se debió al desarrollo de las ciencias fundamentales y también de la medicina y la tecnología. Estos apartados del saber humano permitieron y facilitaron la investigación farmacodinámica necesaria a la valoración y normalización farmacológica de las sustancias activas obtenidas de materias biogénicas. Las observaciones que se hicieron se constituyeron en un punto de partida para la obtención de los medicamentos sintéticos. El desarrollo en paralelo de la biotecnología, la farmacología y la fitoquímica permitió considerables avances en los métodos de detección, aislamiento y análisis de sustancias tales como glicósidos, alcaloides y flavonoides. Estos descubrimientos se acompañaron de estudios farmacodinámicos cada vez más profundizados, que caracterizaron la accesibilidad biológica del medicamento y determinaron sus características farmacodinámicas y toxicológicas. El desarrollo de las ciencias fundamentales - en especial la biología molecular y la genética - contribuyó a conocer los distintos mecanismos que acompañan los procesos farmacodinámicos y farmacocinéticos. Su descubrimiento dependió del tipo de medicamento, su forma y condicionamiento en el organismo, siendo, de hecho, el resultado de la interacción de numerosos factores genéticos y no genéticos. Los productos farmacogenéticos nos ofrecen situaciones donde los factores genéticos y medioambientales coexisten y colaboran.

Estudios recientes muestran que cada raza humana reacciona específicamente a ciertas sustancias activas presentes en los medicamentos. Las razas caucásica y asiática son las que mayores diferencias presentan. Se sabe asimismo que las personas enfermas de una misma raza reaccionan distintamente al medicamento, según la edad, el sexo, el estado general de salud y otros medicamentos que se les haya administrado con anterioridad. Hay pruebas de que los genes pueden influir en la eficacia y efectividad de los distintos métodos de tratamiento farmacológico. Ello se debe a que son los genes precisamente los encargados de sintetizar los enzimas que toman parte en las reacciones químicas que se producen en nuestro organismo, incluyendo el sentido y duración de los cambios químicos determinados por

los medicamentos prescritos. Estas observaciones son parcialmente producto del seguimiento de algunos enfermos de tuberculosis tratados con isoniazida. En algunos enfermos, el medicamento no metabolizado permaneció en la sangre por más tiempo. Estos pacientes padecieron trastornos neurológicos, en tanto que los demás no tuvieron ningún problema. Los estudios genéticos efectuados sobre estos pacientes - que respondían de forma distinta al tratamiento - revelaron dos tipos de metabolismo hereditario hacia la isonidazida, los llamados metabolismos lento y rápido.

En últimos años, se han descubierto distintos tipos de genes cuyos productos proteicos participan en el proceso de los cambios químicos como enzimas. Habitualmente, los médicos no dudan a la hora de prescribir el tipo y la dosis de un medicamento, siempre que las enfermedades sean causadas por un único gen. El proceso de cartografía del polimorfismo del único nucleótido (PUN) presente en todo el genoma continúa. Un único cambio del nucleótido, observado en las secuencias de genes codificadoras de proteínas que transportan y metabolizan los medicamentos, constituye la base de la farmacogenómica. Pero cuando en una enfermedad están involucrados más de un gen, elegir la terapia no resulta demasiado simple. Desafortunadamente, las enfermedades causadas por varios genes forman el grupo más numeroso. En la actualidad, se busca a los llamados "puntos calientes", eso es los fragmentos de ADN que precisamente a causa de las diferencias que presentan en personas diferentes son los responsables por las reacciones diferentes de un organismo ante un determinado medicamento. Probablemente, la farmacogenómica, nueva rama de la biomédica, tratará a cada paciente individualmente, teniendo en cuenta su juego PUN o los "puntos calientes" de las moléculas de ADN.

La farmacogenómica es una rama que se va a encargar del "tratamiento-diana" y será parte componente de la futura revolución en la medicina, afirma en una conocida revista de especialidad Francis Collins, presidente del Instituto Nacional Norteamericano de Investigaciones sobre el Genoma Humano (American National Human Genome Research Institute). Esta nueva rama de la medicina no sólo permitirá ahorrar tiempo y dinero, que muchas veces se desperdician a causa de un tratamiento ineficaz, sino que también minimizará los efectos secundarios de los medicamentos. Los datos farmacoepidemiológicos muestran sin equívocos los efectos indeseables de numerosos medicamentos autorizados. Los informes hechos públicos en EE.UU. indican que en este país una de cada cuatro personas muere a causa de los efectos nocivos de los medicamentos. Datos desconcertantes nos llegan, por ejemplo, de Francia, mostrando que en este país uno de cada cuatro medicamentos autorizados para la venta es ineficaz o incluso nocivo para la salud y la vida. Se cree asimismo que la farmacología podrá dominar el proceso de elaboración de nuevos medicamentos. Para elaborar un nuevo medicamento hay que conocer la estructura 3D de las proteínas, enzimas, ácidos nucleicos y los receptores de la superficie celular. Las compañías farmacéuticas ya están recolectando muestras de ADN humano, con la esperanza de que puedan crear un perfil que permita clasificar a los pacientes y repartirlos luego en la categoría de medicamentos que los pueden ayudar o, por lo contrario, que los afectarán. La elaboración de un nuevo medicamento es un proceso duradero, que empieza por estudios fundamentales en laboratorio y ensayos multietapas que se llevan a cabo en clínica, al efecto de valorar su efectividad e inocuidad como potencial método de tratamiento de una determinada afección. Antes de experimentar el medicamento en humanos, se comprueba su seguridad ensayándolo en animales y mediante cultivos celulares. En algunos casos, los estudios clínicos probaron el papel favorable de los productos recogidos, elaborados o segregados por las abejas en la cura de ciertas enfermedades.

El constante avance en los estudios biomédicos, consecuencia del rápido desarrollo de la biología molecular, brinda nuevas posibilidades experimentales para adquirir conocimientos en relación con los mecanismos a través de los cuales algunas sustancias químicas tomadas directamente de la naturaleza influyen como tal o como sistema complejo en el organismo humano. Tal es el caso de las comunidades de insectos, entre los cuales destaca, desde luego, el sobresaliente ejemplo de las colonias de abejas.

El propóleo es uno de los materiales farmacopeicos utilizados en apiterapia, además de la miel de abejas, por supuesto. Las propiedades antibacterianas de este producto biogénico se conocen desde hace tiempo. En el presente, se cree que las propiedades bactericidas del propóleo se deben al efecto sinérgico de los flavonoides, ácidos aromáticos y secviterpina. Los estudios clínicos mostraron sus efectos adyuvantes en el tratamiento de cualquier tipo de quemaduras, escaras, úlceras varicosas y eccemas. Los espectaculares resultados de este producto en el tratamiento de numerosas afecciones mostraron que además de sus virtudes bactericidas el propóleo también colabora en la regeneración de los tejidos deteriorados. Los estudios llevados a cabo sobre un modelo celular demostraron que el extracto standard de propóleos potencia la actividad prolífica de los fibroblastos. Y los estudios moleculares revelaron que el propóleos es el responsable por la acrecentada actividad de transcripción de los genes participantes en el proceso de la angiogénesis^[1]. Contrastando los estudios clínicos con los estudios fundamentales fue posible explicar los mecanismos de su actuación a nivel celular y molecular. El conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares de la fracción activa de los productos apícolas en el sistema fisiológico y patológico permitirá rellenar lagunas y ayudará a su utilización no sólo en la prevención sino también en el tratamiento de las enfermedades.

Hay varios factores que respaldan la idea de que los ácidos grasos de cadena corta (AGLS) elaborados en el intestino grueso humano desempeñan numerosos e importantes papeles fisiológicos. Se

cree que la perturbación de su metabolismo puede ser una de las causas de las enfermedades infecciosas del intestino grueso. Energéticamente, entre todos los ácidos grasos el más beneficioso para la mucosa es el ácido butírico. Se ha demostrado que la reducción de su concentración en el lumen del colon, consecuencia de un escaso aflujo de substratos fácilmente fermentables, induce la atrofia de la membrana mucosa de esta parte del tracto digestivo. Con un suplemento de butirato se regenera la membrana mucosa, demostrable por la intensificación del crecimiento del epitelio y también por el ahondamiento de los repliegues intestinales^[2]. Se supone que el butirato podría ser un importante factor de protección contra el cáncer del intestino grueso, al indicar los estudios *in vitro* una influencia disciplinar de éste sobre las células cancerosas^[3]. En este momento, se está buscando sus fuentes naturales. Nuestra atención se dirige hacia el pan de abejas, ya que bibliografías más recientes^[4,5] indican que el 14 % de su contenido está formado por ácidos orgánicos. En nuestro instituto de bioquímica (la sección de biología molecular, bioquímica y biofarmacia de la Universidad Silesiana de Medicina) desarrollamos un método cuantitativo de determinación de los AGLS en el pan de abejas^[4,5]. En el pan de abejas estudiado, encontramos varios AGLS, entre los cuales el ácido butírico. Comprobamos asimismo que el secado del pan de abejas influyó negativamente en su contenido en AGLS.

Parece ser que un importante progreso en el estudio de los productos apícolas se registrará cuando se contará con la posibilidad de utilizar los cultivos primarios y los distintos tipos de líneas celulares provenientes del organismo humano para el estudio de la influencia de estas preparaciones en bruto y normalizadas sobre los parámetros morfológicos y bioquímicos de las células utilizadas en los cultivos. No cabe ninguna duda de que es una buena alternativa a los estudios en animales, que no indican siempre los procesos que se producen en los órganos o los tejidos humanos.

En los últimos veinte años, se han desarrollado nuevas técnicas de cultivo de células y tejidos humanos *in vitro*. La posibilidad de obtener una masa de cultivo partiendo de un pequeño fragmento, el progreso logrado en el descubrimiento de la biología de los numerosos tipos de células y también de la habilidad para modificar sus actuaciones en cultivos determinaron un mayor interés por la utilización de estos resultados en la práctica, no sólo en la biología sino también en la medicina. Se ha observado que las células provenientes de un tejido conjuntivo sano se pueden cultivar con más facilidad. Se elaboraron métodos de cultivo celular, básicamente de células epiteliales, como son los keratinocitos de la piel, los epitelios del tracto urinario, la próstata, la cavidad bucal, la vagina y la córnea. La epidermis es un tejido idóneo para el cultivo, porque en más del 90 % se encuadra en una categoría de células - los keratinocitos. En condiciones normales, los keratinocitos son estables en cultivo, no pierden la capacidad para multiplicarse y diferenciarse. Los fallos en el injerto de epidermis se deben principalmente a su no adhesión a la herida, por ej. en heridas consecutivas a quemaduras, tal vez por faltar una piel apropiada para el injerto. Pero este problema ha sido superado con la elaboración de un equivalente de la piel viva (EPV). Se ha observado que la piel humana obtenida en cultivos presenta numerosas similitudes con la piel natural en cuanto al aspecto morfológico y vascular y, por tanto, es buena para los diversos ensayos que hasta el presente sólo se realizaron en animales. Los datos experimentales probaron que la exposición de 2 cm² de EPV a factores químicos irritativos de la piel o la córnea, provocan las mismas reacciones biológicas que en la piel natural y que son eliminados mediadores pro-inflamadores: prostaglandinas E₂, prostacilinas, interleukinas^[6,7]. Es muy importante también que con la EPV se puede ensayar con sustancias sólidas, sustancias insolubles, líquidos, emulsiones y cremas, en aplicaciones locales en zonas expuestas al aire. Se pueden estudiar asimismo los mecanismos de adhesión de los microorganismos que pueden infectar la piel y los efectos de los medicamentos sobre los mismos. Sobre EPV también se puede experimentar con nuevos medicamentos que contienen, por ejemplo, productos apícolas farmacológicamente activos.

En el presente, es posible reconstituir bajo condiciones de laboratorio otros modelos de células, que presentan las características de las células específicas del órgano de procedencia. En esta forma se crean las venas y los pequeños lóbulos del hígado. Los cultivos organotípicos son particularmente interesantes para el estudio de los mecanismos de algunos productos a base de néctar o de mielato, con efecto favorable sobre el organismo humano.

Muchos investigadores y médicos opinan que la inmunoterapia, cuyo propósito es el fortalecimiento de las defensas naturales del organismo a través de inmunomoduladores, va a adquirir cada vez más importancia. En este momento ya no se puede dudar de la influencia favorable de los productos apícolas sobre el sistema inmunitario. Hace mucho tiempo que se sabe que el propóleo potencia la inmunidad del organismo y que la apitoxina estimula potentemente el sistema inmunitario. Lo que queda por hacer es poner a punto el procedimiento para estudios experimentales y errores. Utilizando como factor mitogénico la fitohemaglutinina, se pueden cultivar los linfocitos. Se emplean al efecto dos métodos distintos - el macrocultivo y el micrométodo. Para el macrocultivo se requiere recolectar 5 - 10 ml de sangre y cultivar linfocitos, aislados por centrifugación o sedimentación. El micrométodo consta del cultivo de una pequeña cantidad de células en 0,3 - 0,5 ml de sangre. Si se analizan a fondo los avances de la ciencia biomédica, queda patente la necesidad de conocer la transcripción humana. Para ello, hay que conocer las secuencias transcriptas del mRNA y sADN y crear bancos de datos cADN, que permitirán la clonación eficaz de sólo un fragmento de gen y no de todas las secuencias genómicas adyacentes.

Los métodos clásicos, igual que los más modernos, de la biología molecular permiten comprobar las diferencias en la expresión génica a nivel de la transcripción. Los genes de las distintas expresiones se han identificado hasta hace poco tiempo mediante la hibridación diferencial o subtractiva y la separación de sus productos proteicos. Desde que podemos utilizar los bancos de datos de ácidos nucleicos y secuencias proteicas, el número de genes, cuya expresión podemos seguir, ha superado la capacidad de los análisis tradicionales.

Una abordación moderna de los diversos análisis de la expresión génica, con la técnica de la hibridación, es el microprocesador ADN. La tecnología se reduce a inmovilizar sobre un sustrato un portador sujeto de gran número de partículas de oligonúcleos o de ADN de una sola cadena^[8,9]. Estas partículas se emplean como muestras moleculares, aunque no contienen marcadores. Son analizados y marcados los ácidos deoxi y ribonucleico, que hibridan con ellos. Gracias a los microarreglos ADN, se pudo estudiar el enlace del ADN y las proteínas u otros enlaces. Técnicas sensibles de detección fluorescente permiten identificar con precisión cada componente de la mezcla que se estudie y la evaluación cuantitativa de su enlace. Los datos obtenidos se almacenan y luego se procesan empleando un software avanzado. Con esta estrategia se pueden analizar miles de genes y evaluar su expresión en un tiempo increíblemente breve en un mismo experimento. Los micronet ADN se utilizan cada día más en el estudio de la sensibilidad individual a un medicamento, la optimización de su efectividad y la búsqueda de nuevos medicamentos. De cualquier forma, estos micronet todavía son muy costosos.

Otras oportunidades que se espera proporcionen los microprocesadores ADN son las que resultan de los estudios que se hicieron acerca de las interacciones entre distintas sustancias y su composición natural, tanto con el material genético como con los reguladores de la actividad génica dentro de las células. Desde que se demostrara que algunos productos apícolas, utilizados durante largo tiempo, tienen en quimioterapia efectos sinérgicos, su incorporación al tratamiento permitiría administrar menores dosis de medicamentos y ampliar su espectro de actuación.

BIBLIOGRAFIA

- Pytel A. (2001), Leczenie ran oparzeniowych Propolem-O, Praca doktorska, Śląska Akademia Medyczna, Wydział Farmaceutyczny
- Dzierżewicz Z. et al. (1999), The role of butyric acid in growth, proliferation and differentiation of colonocytes. *Gastroenter. Pol.*, 6, 153-159
- Dzierżewicz Z. et al. (2002), Changes in the cellular behaviour of human colonic cell line Caco2 in response to butyrate treatment. *Acta Biochem. Pol.*, 49, 211-220
- Chodurek E. et al. (2002), Pyrolytic methylation in GC-MS analysis of short-chain fatty acids. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, (in press)
- Gryczka-Suchy R.(2002), Profile krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w pierzgach pszczelich. Praca magisterska, Śląska Akademia Medyczna, Wydział Farmaceutyczny
- Marewicz E. (1994), Skin cultures for transplantology and biotechnology. *Post. Biol. Kom.*, 21, (supl.3), 73-87
- Drukała J. (2001), Cell cocultures in skin reconstruction for clinical applications. *Post. biol. kom.* 28,(supl.16) 97-110
- Mirowski M., Bartkowiak J.(2000), DNA microarrays in biomedical studies. *Post. biochem.*, 46, 272-281
- Linkiewicz A., Filipecki M. (2001), From differential gene expression to cDNA clone - a review of methods for identification of genes with variable level of transcription. *Post. biochem.*, 47, 253-263