



UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA Y FARMACIA

DEPARTAMENTOS DE ESTOMATOLOGÍA Y FISIOLOGÍA

Programa de Doctorado en MEDICINA CLÍNICA Y SALUD PÚBLICA

ESTUDIO COMBINADO DEL EFECTO DEL PROPÓLEO SOBRE EL METABOLISMO EN MODELO ANIMAL Y POSIBLES APLICACIONES EN PACIENTES CON ENFERMEDAD PERIODONTAL

Tesis Doctoral para aspirar al grado de Doctor presentada por

M^a JESÚS LISBONA GONZÁLEZ

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: María Jesús Lisbona González
ISBN: 978-84-1117-176-2
URI: <http://hdl.handle.net/10481/72062>

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de una u otra forma, con su apoyo o colaboración, han contribuido a la realización de esta tesis y especialmente quiero dar las gracias:

A mis directores, el Dr. D. Javier Díaz Castro, profesor titular de fisiología, porque sin él no habría sido posible este trabajo. Su constancia, eficacia y tesón han sido el motor de esta tesis. Son muchas las horas que ha dedicado de su tiempo libre, vacaciones y descanso. El interés infinito demostrado ha supuesto el estímulo para superar los baches que inevitablemente encontramos en el camino.

Y la Dra. Dña. Candela Reyes Botella, profesora titular de cirugía bucal, durante el desarrollo de este trabajo no sólo ha sido profesora, directora y maestra, se ha convertido en una amiga con la que compartir inquietudes cotidianas. Su carácter, su personalidad y su forma de ser han sido claves para que este trabajo haya visto la luz.

Al Dr. D. Manuel Vallecillo Capilla, por confiar y creer en mí mucho más que yo. Gracias por darme la oportunidad de volver a retomar este trabajo. Abrirme las puertas de la cirugía bucal ha sido algo que nunca podré agradecerle del todo.

A la Dra. Dña. Esther Muñoz Soto, gracias por haberme transmitido tu pasión por la cirugía, gracias por enseñarme tu metodología, tu disciplina y tu buen hacer. Tu espíritu de superación y la avidez de conocimiento han sido el mejor ejemplo que un alumno puede tener. Gracias por estar ahí siempre.

Al Dr. D. Jorge Moreno Fernández por su generosa y valiosa ayuda en la elaboración de los artículos.

A Marta Vallecillo Rivas, amiga y compañera viaje. Me quedo corta agradeciéndote tu apoyo al estar en las horas más difíciles, cuando las tablas y los gráficos se mueven como por arte de magia y estas a punto de volverte loca ahí estabas tú con esa sonrisa y la predisposición que te caracteriza y sobre todo con ese saber hacer con el ordenador. No hay nada que se te resista eres inteligente y trabajadora, no te rindas nunca porque llegarás a donde quiera que te propongas, gracias Martita.

A la Dra. María López Jurado y al Dr. D. Alberto Rodríguez Archilla directores de los departamentos de Fisiología y Estomatología respectivamente, por aceptarme en dichos departamentos para la realización de este trabajo.

Al Instituto de Nutrición y Tecnología de los alimentos Jose Matáix, por poner a mi disposición las instalaciones de dicho instituto.

A todo el equipo de la clínica, especialmente a Marta y a Bibi, por ayudarme tanto y cubrirme en todas las fases de la elaboración de los trabajos.

A mi hermana, por su generosidad sin límites, gracias por ser mi mejor aliada en TODO porque no puedo ser más afortunada de tener la hermana que tengo. Eres un pilar fundamental para mí, haces que la vida a tu lado sea maravillosa.

Jesús, encontrar el amor a veces es sencillo, pero mantenerlo es otra historia, es un trabajo diario que a veces se hace difícil y cuesta arriba, si le sumamos, horarios, deberes, compromisos, trabajo y la elaboración de una tesis... la tarea se complica. Hay motivos para quejarnos el uno del otro y discusiones porque a veces no podemos pertenecer a polos más opuestos, aun así, las razones para quererte y agradecer que estés en mi vida son infinitas.

Me compensa con creces como nos complementamos, la familia que hemos formado, como me has dado cobertura en casa para que me pudiera “encerrar” los fines de semana, vacaciones y días libres porque sabías lo importante que era para mí, sacrificando muchas veces ocio y planes más apetecibles. Eres una parte muy importante de mis logros profesionales, gracias por creer en mí, has sido mi apoyo diario incondicional y constante, animándome en los momentos de bajón, por empujarme a seguir, gracias por entenderme tan bien, por cuidarme, mimarme y traerme al ordenador hasta la tostada y el café. Eres el compañero de viaje ideal, hombre especial y maravillo. Te quiero Jesús.

A mis niñas, Cristina y Rocío, gracias por vuestra paciencia, Sé que habéis soportado estoicamente mis cambios de humor y mi tensión. Hemos tenido que sacrificar muchos ratos en familia, para que yo estudiara y sacara adelante este proyecto que no deja de ser un logro de toda la familia. Ha requerido un esfuerzo grande para vosotras también, que veáis como pasaba las horas en el ordenador en vez de

hacer otros planes juntas. Gracias por todo ese tiempo que hemos sacrificado.

Ahora que estáis empezando vuestra andadura académica, ojalá entendáis y os acordéis de esto, el esfuerzo y la constancia son la llave para alcanzar vuestras metas y que la familia son el mejor pilar en el que apoyarse.

Habéis sido testigos de cómo nos hemos ayudado, y ha merecido la pena porque estabais ahí.

Agradeceros vuestras muestras de cariño y comprensión estoy muy orgullosa de ser vuestra madre.

A mis padres,

Habéis sido los motores de mis sueños, me formasteis con reglas, pero al mismo tiempo con ciertas libertades y siempre me motivasteis para que pudiera alcanzarlos. Sin vuestro trabajo, sacrificio y vuestra confianza desde luego no estaría hoy aquí.

Sois el mejor ejemplo, esforzándoos al máximo en cada proyecto que iniciabais, podéis estar seguros de que eso marca y nos ha dejado huella.

Gracias mamá, por tus conversaciones, por las largas horas de escucha, siempre paciente y serena. Tus consejos... irremediamente precisos y efectivos. Tu sentido común y la facilidad con que visionas la solución más lógica. No se puede ser más trabajadora, sensata y práctica. Me sabe a tan poco decir sólo gracias...

Papá, no puedo estar más orgullosa de ti, eras un chico de pueblo, nacido en el seno de una familia sin estudios que cogió su maleta y llegó a Granada con ganas de prosperar. Hoy has alcanzado la máxima distinción académica en la Universidad. Has dedicado tu vida a algo que te apasiona, has sido y eres un gran maestro, preocupado por el conocimiento y la investigación, por despertar interés en el alumno.

Ahora que la información se antoja infinita con el acceso internet, cobra todo el sentido profesores que cómo tú, han luchado para que aprendiéramos a discernir entre lo que leíamos, a pensar, a entender, a tener criterio, cuestionar y sobre todo a razonar. Para ti no tenía ningún sentido memorizar textos que luego se olvidan a la semana de hacer un examen.

Te has volcado durante más de 40 años a que entendiéramos cómo todo está relacionado, química, física y fisiológicamente desde la parte más pequeña de un ser vivo hasta el complejo sistema que forma el cuerpo humano.

Nací a los tres días de que defendieras tu tesis y el destino ha querido que lea yo la mía en el año que tú abandonas la Universidad. Al leerla terminada veo como sin darme cuenta has puesto tu sello en cada párrafo. Queriendo siempre ir a lo profundo y buscando la base fisiológica que explicara los resultados que íbamos teniendo.

He sido muy afortunada, lo he tenido mucho más fácil que lo tuviste tú. Gracias a tu esfuerzo y superación he tenido un maestro en casa que me ha involucrado en esta ardua tarea de la investigación.

¡Lo hemos conseguido, papá! Hemos pasado muchos altibajos, pero gracias a ti hoy puedo defender mi tesis doctoral.

Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	25
1.1. PROPÓLEO	25
1.1.1. HISTORIA DEL PROPÓLEO.....	25
1.1.2. ORIGEN	27
1.1.3. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS	28
1.1.4. CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS	29
1.1.5. COMPOSICIÓN QUÍMICA	29
1.1.6. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS Y BIOLÓGICAS.....	35
1.2. COMPOSICIÓN CORPORAL.....	44
1.2.1. TEJIDO ADIPOSO BLANCO (WAT).....	48
1.2.2. TEJIDO ADIPOSO MARRON (BAT)	52
1.3. ENFERMEDAD PERIODONTAL Y REPERCUSIONES SISTÉMICAS	55
1.4. LA CLORHEXIDINA	60
2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS.....	65
3. OBJETIVOS.....	69
3.1. OBJETIVO GENERAL	69
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	69
4. MATERIAL Y MÉTODO.....	73
4.1. ESTUDIO DE INTERVENCIÓN DIETÉTICA CON PROPÓLEO EN UN MODELO ANIMAL.....	73
4.1.1. MÉTODOS ANALÍTICOS	76
4.1.2. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.....	88
4.2 ESTUDIO EN PACIENTES: EFECTO ANTIMICROBIANO	88
4.2.1. DISEÑO DEL ESTUDIO MICROBIANO Y APROBACIÓN ÉTICA ..	88
4.2.2. SELECCIÓN DE PACIENTES	88
4.2.3. PREPARACIÓN DEL EEP	89
4.2.4. INTERVENCIÓN	90
4.2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	92

4.3. ESTUDIO EN PACIENTES: EFECTO CICATRIZANTE	93
4.3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO DE CICATRIZACIÓN Y APROBACIÓN ÉTICA	93
4.3.2. SELECCIÓN DE PACIENTES	93
4.3.3. INTERVENCIÓN	94
4.3.4. SEGUIMIENTO.....	96
5. RESULTADOS.....	99
5.1. ESTUDIO DE INTERVENCIÓN DIETÉTICA CON PROPÓLEO EN UN MODELO ANIMAL	99
5.2. ESTUDIO EN PACIENTES: EFECTO ANTIMICROBIANO	105
5.2.1. RESULTADOS CLÍNICOS	105
5.2.2. RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS	109
5.2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	110
5.2.4. EVALUACIÓN DE SEGURIDAD Y CONTROL	110
5.3. ESTUDIO EN PACIENTES: EFECTO CICATRIZANTE	111
5.3.1. RESULTADOS CLÍNICOS.....	112
6. DISCUSIÓN.....	119
6.1. DISCUSIÓN DEL ESTUDIO DE INTERVENCIÓN DIETÉTICA CON PROPÓLEO EN UN MODELO ANIMAL	119
6.2. DISCUSIÓN DEL ESTUDIO EN PACIENTES: EFECTO ANTIMICROBIANO	130
6.3. DISCUSIÓN DEL ESTUDIO EN PACIENTES: EFECTO CICATRIZANTE	137
6.4. RESUMEN DE LA DISCUSIÓN	141
7. CONCLUSIONES.....	147
8. BIBLIOGRAFÍA.....	151
9. PUBLICACIONES.....	197

INDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Protocolo de intervención en pacientes periodontales. Efecto antimicrobiano.....	91
Ilustración 2. Diseño del estudio en pacientes periodontales. Efecto antimicrobiano.....	92
Ilustración 3. Diseño del estudio en pacientes. Efecto cicatrizante	95
Ilustración 4. Diagrama de flujo del protocolo de estudio según las directrices de Consort.	106
Ilustración 5. Diagrama de flujo del protocolo de estudio según las directrices de Consort.	111
Ilustración 6 . Resultados cicatrización “buena” del alveolo 11 grupo test (pasta con propóleo 10%).	115

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.Composición de las dietas experimentales.....	75
Tabla 2. Madrazo-Jiménez 2016	96
Tabla 3. Parámetros hematológicos en ratas alimentadas con dieta control o suplementada con propóleo.....	99
Tabla 4. Parámetros bioquímicos en ratas alimentadas con dieta control o suplementada con propóleo.....	100
Tabla 5. Enzimas antioxidantes hepáticas (U/mg proteína) en ratas alimentadas con dieta control o suplementada con propóleo	101
Tabla 6. Concentración plasmática de hormonas que influyen el metabolismo basal y AGNE en ratas alimentadas con dieta control o suplementada con propóleo.....	102
Tabla 7. Composición corporal en ratas alimentadas con dieta control o suplementada con propóleo.....	103
Tabla 8. Concentración de minerales en órganos de ratas alimentadas con dieta control o suplementada con propóleo	103

INDICE DE ACRÓNIMOS

EEP	Extracto Etanólico de Propóleo
Rt-PCR	Real time - reacción en cadena de la polimerasa
WAT	Tejido adiposo blanco
BAT	Tejido adiposo marrón
VCM	Volumen corpuscular medio
CAT	Actividad de catalasa
SOD	Superóxido dismutasa
GPx	Glutation peroxidasa
GSH	Glutation reducido
GR	Glutación reductasa
AG	Ácidos grasos
AGNE	Ácidos grasos no esterificados
TG	Triglicéridos
TP	Tratamiento periodontal
TPS	Tratamiento periodontal de soporte
EPAP	Polvo abrasivo de eritritol
RAR	Raspado y alisado radicular
NB	Nivel basal

Índice

TP	Tratamiento periodontal
EPC	Enfermedad periodontal crónica
BOP+	Bleeding on probing positive, (Sangrado al sondaje positivo)
PPD	Periodontal pocket deep, (Profundidad de sondaje)
PI	Plaque index, (índice de placa)
CAL	Clinical attachment level, (nivel de inserción clínica)
NIC	Nivel de inserción clínica
CHX	Clorhexidina

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. PROPÓLEO

1.1.1. HISTORIA DEL PROPÓLEO

El propóleo o própolis es una sustancia resinosa de árboles y arbustos silvestres, que las abejas extraen con el fin de taponar herméticamente su colmena e impedir que se produzca dentro de ella cualquier tipo de infección.

El propóleo deriva de dos vocablos: pro, término latino que indica “antes” o “delante de”, y polis, del griego “ciudad”. Es una sustancia empleada por las abejas para sellar las posibles entradas o vías de acceso a la colmena, así que funciona como mecanismo de defensa frente a otros animales, y frente a microorganismos, debido a su acción antiséptica y bactericida. Al mismo tiempo, actúa como aislante térmico tanto del frío como del calor (V. Bankova et al., 1995).

También se emplea como material de reconstrucción de las celdas de los panales y de la colmena en general (Abdulrhman et al., 2012).

El propóleo ha sido utilizado por la medicina tradicional desde el año 300 a. C. (Ghisalberti) (E.I, 1979).

Ya Aristóteles se refirió a él en su “Historia de Animales” y llegó a la conclusión de que este producto era terapéuticamente útil para infecciones dermatológicas, llagas, heridas supurantes, contusiones y quemaduras (Castaldo & Capasso, 2002).

En el mundo romano, Virgilio, Plinio y Dioscórides mencionan en sus escritos al propóleo como la sustancia utilizada por las abejas para

construir su colmena (Dobrowolski et al., 1991) y consideraban que esta resina se obtenía de las yemas y cortezas de determinados árboles (Khalil, 2006) con efecto potencialmente curativo.

Avicena (siglo XI) lo destacaba en su Canon de la Medicina, donde menciona la presencia de una cera limpia o cera alba que forma las paredes de los panales, y otra negra, propóleo, que constituye el producto de desecho de la colmena, con propiedades desinfectantes y cicatrizante de heridas.

En la Edad Media el propóleo se empleaba como remedio contra algunas enfermedades, valorándose también su cualidad de conservante antibacteriano para la madera.

En los tratados georgianos de medicina (siglos XII-XV), como el Karabadini, de Zaza Fanaskerteli, se propone su utilización como remedio para las caries dentales, además de unguento para determinadas enfermedades, como la tuberculosis (Pitskelauri, 1960).

En el imperio Inca, aproximadamente en el año 1500, se empleaba esta sustancia contra las inflamaciones que cursaban con fiebre. En 1807 se menciona su uso en el tratamiento de las heridas asociándolo a la miel de abejas, por el poder antiséptico que también tiene esta última (Khalil, 2006).

Durante la Guerra de los Boers contra los ingleses en África del sur (1880-1902) se empleó en el tratamiento de heridas una mezcla de propóleo con vaselina y se comprobó que ejercía una acción cicatrizante y regeneradora de los tejidos observando buenos resultados en las intervenciones quirúrgicas, los rusos y franceses

también han conocido las ventajas de esta sustancia utilizándola en la curación de heridas de guerra (Donaldson, 2014).

En China, se utilizó como antibacteriano previniendo las infecciones (Chan et al., 2013) aunque el primer informe científico acerca de su composición y actividad biológica se publicó en 1908 (Fokt et al., 2010).

En definitiva, durante siglos se ha venido utilizando el propóleo como remedio de curación (Martinotti & Ranzato, 2015) el auge experimentado en los últimos años en la terapéutica con propóleo justifica el interés por conocer sus efectos inmediatos y a largo plazo. Así, en los últimos 25 años se ha apreciado un resurgimiento de este producto, llevándose a cabo investigaciones científicas en el campo de la Biología, Medicina y Veterinaria (Kuropatnicki et al., 2013).

1.1.2. ORIGEN

El propóleo es recolectado por las abejas de las yemas y cortezas de determinados árboles como el álamo, el castaño, el pino, el sauce, el abeto y el abedul. La sustancia resinosa es mezclada por las abejas con secreciones de algunas de sus glándulas. Así se obtiene el propóleo que se utiliza como material de construcción, sellador y antiséptico en la colmena (Palombo, 2011).

Algunas teorías sostienen que el propóleo se forma a partir del polen (Denisow & Denisow-Pietrzyk, 2016). Sin embargo, en el mismo deberían aparecer en mayor medida sustancias nitrogenadas, azúcares y sustancias lipídicas, que se encuentran en cantidades relativamente

grandes en el polen. Por otra parte, el propóleo difiere desde un punto de vista cualitativo como cuantitativo de las resinas vegetales en él contenidas. Esto hace pensar que las modificaciones se realizan antes de su utilización en la colmena, por incorporación de enzimas y sustancias resinosas procedentes de la digestión del polen. Todo ello confirma la participación activa de la abeja melífera en su formación (Toreti et al., 2013). La mayoría de las sustancias flavonoides aisladas e identificadas en el propóleo están en forma de glucósidos metilados, no como agluconas forma en que se encuentran en las especies vegetales (Król et al., 2013). Parece, en conclusión, que la abeja contiene una sustancia que descompone los glucósidos en sus componentes principales, que luego elabora, produciendo tanto propóleo, como alimentos para sus necesidades. La tarea de los investigadores será determinar la presencia de esa sustancia, así como su naturaleza química. La solución de este problema sería un paso importante en la explicación de la formación y el origen del propóleo.

1.1.3. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

El propóleo es una sustancia resinosa en la que los caracteres organolépticos varían en función de su origen (Wagh, 2013). Las abejas realizan la propolización durante los periodos más calurosos del día, desde comienzos del verano hasta el otoño, sobre todo hacia el final de la mielada. Su color puede variar desde el amarillo claro, pardo verdoso-castaño, marrón oscuro hasta casi negro en función de la región de procedencia. Tiene un aspecto heterogéneo

y su sabor es amargo e incluso irritante si se mantiene en la boca largo tiempo (Ahmed et al., 2017).

1.1.4. CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS

En cuanto a sus características fisicoquímicas, el propóleo a 15°C tiende a ser muy duro y friable. A una temperatura de más de 20°C se vuelve muy maleable y funde cerca de los 65°C, es termoestable (Marcucci, 1995; Martinotti & Ranzato, 2015; Wagh, 2013).

El propóleo tiene una densidad de 1,186 g/cm³, mucho mayor que la cera de abejas. Es insoluble en agua, y particularmente soluble en alcohol. Se extrae con disolventes como el etanol, cloroformo, éter y acetona, pero el de elección es el etanol. Comercialmente se puede encontrar en forma de dentífricos, comprimidos, enjuagues bucales a diferentes concentraciones (1, 2.5, 5, 10%), cremas, geles, chicles, jabón, spray, caramelos, lociones corporales y mezclas antisépticas (Chan et al., 2013; Ferreira et al., 2007).

1.1.5. COMPOSICIÓN QUÍMICA

La base de las futuras aplicaciones y su éxito en la valoración práctica del propóleo reside en el conocimiento profundo de la composición química y de la actividad biológica de sus componentes (S. Huang et al., 2014).

El propóleo bruto, recolectado por los apicultores, es una sustancia heterogénea que contiene un gran número de constituyentes (se han identificado más de 300 componentes diferentes en él). Su

composición varía según la especie vegetal visitada por las abejas, aunque de forma global se pueden distinguir:

- Resinas y bálsamos..... 55%
- Cera..... 30%
- Aceites etéricos..... 10%
- Polen.....5%

(V. Bankova et al., 1995; Kuropatnicki et al., 2013; Sforcin, 2016; Toreti et al., 2013)

Los numerosos constituyentes han sido aislados y estudiados por métodos analíticos muy precisos, métodos cromatográficos, de capa fina, en fase gaseosa, espectrales, ultravioleta, infrarrojos y resonancia magnética nuclear.

Aunque su composición química es aún bastante desconocida, del 55% de las resinas y bálsamos podemos encontrar:

1.1.5.1. Flavonoides

Parece que los responsables de la actividad biológica del propóleo son este grupo de compuestos que presentan actividad antibacteriana y fungicida (Park et al., 2002). Además, algunos de ellos, poseen actividades espasmolítica, antiinflamatoria, antiulcerosa y citostática (Dobrowolski et al., 1991). El análisis por cromatografía líquida de alta resolución permite el estudio cualitativo y cuantitativo de los flavonoides con gran precisión. Los estudios de diferentes autores (V.

Bankova et al., 1995; Park et al., 2002)(Król et al., 2013; Kujumgiev et al., 1999) muestran como principales flavonoides del propóleo a la pinocembrina con un 21,4 % junto a la galangina con un 5%, seguido de un 4,3 % de crisina, 2,2 % de quercetina y un 1,1% de tectocrisina, aunque son muchos más los aislados en menor concentración como por ejemplo islapinina, ermanina, pectolinarigenina, sakuranetina, isosakuranetina, quercetina-3,3'-dimetiléter, 3-acetilpinobanksina, betuletol, isorhamnetina, kaempferida, ramnazina, ramnetina, alminoltininosina, pinocembrina, crisina, tectocrisina, quercetina, galangina, apigenina, pinobanksina, kaempferol, Rutina, catequina, luteolina, naringenina.

Estos resultados se obtienen del análisis de la resina de las yemas de álamos, en los que se encuentran los flavonoides en forma de glucósidos hidrosolubles mientras que en el propóleo son geninas liposolubles frecuentemente metiladas, (L. M. Santos et al., 2020) confirmando el proceso de transformación que realiza la abeja.

1.1.5.2. Derivados del ácido benzoico

Entre ellos se pueden distinguir ácido benzoico, ácido hidroxí-4-benzoico, ácido metoxi-4-benzoico, ácido protocatéquico, ácido gálico, ácido salicílico, ácido gentísico, ácido gálico, fenilmetil éster de ácido benzoico, fenilmetil éster de ácido salicílico, trans-coniferil benzoato y trans-p-cumaril benzoato (S. Huang et al., 2014).

1.1.5.3. Derivados del ácido y alcohol cinámico

Entre ellos se distinguen el ácido cinámico, ácido p-cumárico, ácido cafeico, ácido felúrico, ácido isoferúlico, alcohol cinámico, alcohol cinamílico, éster metílico del ácido cinámico, éster etílico del ácido cinámico y ácido cinamilidenacético (Marcucci, 1995).

1.1.5.4. Derivados del ácido alifático

Los más frecuentes son el ácido láctico, ácido hidroxiacético, ácido málico, ácido 5-hidroxi-n-valérico, ácido 2,3-dihidroxi-propanoico, ácido pentónico-2-desoxi-3,5-dihidroxi- γ -lactona b, ácido pentónico-2-desoxi-3,5-dihidroxi- γ -lactona (isómero) b, ácido succínico, ácido 2,3,4,5-tetrahidroxipentanoico-1,4-lactona, ácido 2,3,4,5-tetrahidroxipentanoico-1,4-lactona (isómero) b, ácido nonanoico, ácido palmítico, ácido oleico, ácido decanoico, ácido dodecanoico, ácido tetradecanoico, ácido heptadecanoico, ácido octadecenoico, ácido tetracosanoico, ácido eicosanoico, ácido hexacosanoico Y ácido 2-hidroxi hexacosanoico b (Abd El Hady & Hegazi, 2002).

1.1.5.5. Derivados del ácido benzaldehído

Entre los que se encuentran la vanillina, vainillina, aldehídos caproicos, p-hidroxibenzaldehído de isovanilina y el protocatechualdehído (Marcucci, 1995).

1.1.5.6. Otros ácidos y derivados

Como el éster fenilmetílico del ácido 14-metilpentadecanoico, éster etílico del ácido palmítico, ácido sórbico, éster butil-2-metilpropílico del ácido ftálico, ácido esteárico y el éster metílico del ácido acústico (Anjum et al., 2019).

1.1.5.7. Compuestos terpénicos

Principalmente se han descrito el β bisabolol, α acetoxibetulenol, geraniol, neroleodol, guaiol, farnisol, dihidroeuodesmol, β -pachouleno, β -bisaboleno, escualeno, β -bourboneno, copaeno, calareno, calameneno, cariofileno, pachoulano, seleneno Y aromadendreno (Pasupuleti et al., 2017).

1.1.5.8. Esteres

Como el palmitato de metilo, cinamil-*trans*-4-cumarato, palmitato de etilo, éster metílico del ácido esteárico, benzoato de bencilo, *trans*-4-cumarato debencilo, isoferulado de 3-metil-3-butenilo, 3-metil-2-isoferulado de butenilo, cafeato de 3-metil-3-butenilo, cafeato de 2-metil-2-butenilo, cafeato de 3-metil-2-butenilo, cafeato de bencilo, cafeato de feniletilo, cafeato de cinamilo, cafeato de tetradecilo, cafeato de tetradecenilo, cafeato de tetradecenilo^b, cafeato de tetradecanilo^b Y cafeato de hexadecilo (Abd El Hady & Hegazi, 2002).

1.1.5.9. Enzimas

Las principales enzimas encontradas en su composición son glucosa-6-fosfatasa, fosfatasa ácida, adenosina trifosfatasa, deshidrogenasa succínica (Khalil, 2006).

1.1.5.10. Ácidos grasos

Pueden suponer un 5% de la composición. Generalmente, ácidos grasos de cadena media y larga de C_7 a C_{18} , predominando el ácido mirístico (Abed et al., 2019).

1.1.5.11. Aminoácidos

Encontramos en su composición: alanina, Beta-alanina, ácido α -amino butírico, arginina, asparagina, ácido aspártico, cistina, cisteína, ácido glutámico, glicina, histidina, hidroxapatita, isoleucina, leucina, lisina, metionina, ornitina, fenilalanina, prolina, ácido piroglutámico, sarcosina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina (Anjum et al., 2019).

1.1.5.12. Vitaminas

La presencia de ciertas vitaminas ha sido detectada en pequeñas cantidades en el propóleo (Kuropatnicki et al., 2013) entre ellas las Vitamina B_1 (4,5 $\mu\text{g/g}$ de sustancia fresca), Vitamina B_2 (20 a 28 $\mu\text{g/g}$),

Vitamina C, Vitamina E, Ácido nicotínico, Ácido pantoténico y Vitamina A (6,1 a 8,1 UI/g) (Anjum et al., 2019).

1.1.5.13. Minerales

Numerosos oligoelementos han sido descubiertos en las muestras de propóleo, entre ellos: manganeso (40 mg/kg), cobre (27 mg/kg), hierro, calcio, sodio, aluminio, vanadio, estroncio, silicio, plomo, níquel, cobalto, cromo, estaño y cinc (Pasupuleti et al., 2017).

1.1.6. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS Y BIOLÓGICAS

El propóleo suscita un interés creciente, quizá motivado por su actividad biológica polivalente. Hoy día se utiliza como antibacteriano, antifúngico, antiinflamatorio, antiviral, anticancerígeno y hepatoprotector (Abdulrhman et al., 2012; V. Bankova et al., 1995; Koo et al., 2000; Kuropatnicki et al., 2013; Toreti et al., 2013).

1.1.6.1. Actividad antimicrobiana

Cizmárik and Matel, (1970) realizaron una investigación utilizando distintos preparados de propóleo y llegaron a la conclusión de que es un buen agente antimicrobiano, particularmente contra bacterias gram-positivas.

Ya demostraron en estudios *in vitro* la actividad antiprotozoaria de extractos alcohólicos de propóleo sobre *Tricomonas vaginalis* y sobre *Toxoplasma gondii*. Su pH óptimo de actividad oscila entre 6,0 y 6,8. Su

actividad es la misma cuando está disuelto tanto en etanol de 70° como en polietilenglicol, y la liofilización no disminuye su actividad bactericida.

Posteriormente han sido muchos los autores que han continuado esta línea de investigación encontrando que el propóleo tiene un efecto significativo antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus alvei* y *Proteus vulgaris*, y, en menor grado, *Salmonella dublin*, *Salmonella gallinarum*, *Escherichia coli* y *Bacillus larvae*. Los resultados pueden diferir dependiendo de si los estudios han sido realizados *in vivo* o *in vitro* (Akca et al., 2016; Ozan et al., 2007; Palombo, 2011; F. A. Santos et al., 2002; Yoshimasu et al., 2018).

Su eficacia parece ser directamente proporcional a su concentración en los estudios *in vitro* y está relacionada con la existencia de ciertos compuestos, como se ha demostrado experimentalmente, por ejemplo la galangina inhibe a *Bacillus subtilis* a concentraciones de 0,065 mg/ml en 12 horas; a concentraciones de 0,080 mg/ml inhibe el crecimiento de *Bacillus alvei* en 24 horas y el de *Proteus vulgaris* en 12 horas. A su vez, la pinocembrina inhibe a *Bacillus subtilis* a concentraciones de 0,030 mg/ml en 24 horas (Kosalec et al., 2004, 2005; Pepeljnjak et al., 1985).

En numerosos artículos se ha descrito mayor eficacia frente a bacterias grampositivas y más limitado frente a gramnegativas (Fokt et al., 2010), siendo necesario en este caso aumentar las concentraciones de propóleo para conseguir un efecto bactericida (Sforcin, 2016). Su mecanismo de acción, aunque actualmente sigue siendo objeto de estudio, parece deberse a la interacción entre los compuestos fenólicos

con otros compuestos como pinocembrina, galangina y pynobanksina (Castaldo & Capasso, 2002). En otro estudio se ha descrito el efecto antibacteriano de los compuestos activos como el ácido caféico y los flavonoides presentes en el propóleo, así como su posible mecanismo de acción para detener la división celular y la síntesis protéica o destruir la pared celular y el citoplasma bacteriano (Parolia et al., 2020).

Scheller y cols, (1999) aislaron el ácido caféico (ácido 3,4-dihidroxicinámico) que demostró una actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium diphteria*, *Proteus vulgaris*, así como una acción tuberculostática *in vitro* sobre *Mycobacterium tuberculosis*.

Son muchos los autores que describen la actividad antibacteriana contra bacterias aerobias como *B. aureus*, *S. auricularis*, *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. haemolyticus*, *S. warnerii*, *S. mutans*, *S. hominis*, *St. Pyogenes*, *St. Faecalis*, *St. Pneumoniae*. *St. Sobrinus* y *St. viridians* (Al-Ani et al., 2018; Fokt et al., 2010; Parolia et al., 2020).

Salomão y cols (2008) aislaron e identificaron al ácido 4-hidroxi-3-metoxi cinámico que posee una actividad antibacteriana sobre ciertos gérmenes gram-positivos y gram-negativos. La artepilina C, ácido p-cumárico y ácido 3-fenil-4-dihidrocinaamilocinámico son activos frente a *Helicobacter pylori* y la apigenina reduce fuertemente la glucosiltransferasa bacteriana. (Shahinozzaman et al., 2020)

Los extractos de propóleo potencian la acción antimicrobiana de tetraciclinas, neomicina, polimixina, penicilina y estreptomycin sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. En ciertos casos, el efecto

bacteriostático está aumentado de 10 a 100 veces (Martinotti & Ranzato, 2015).

1.1.6.2. Actividad antifúngica

Metzner y cols (1977) han observado actividad antimicótica en: la pinocembrina, el acetato 3-pinobanksina, el éster bencilo del ácido p-cumárico y el ácido caféico. Posteriormente Metzner y Schneidewind (1978) estudiaron los efectos de la pinocembrina sobre los blastomicetos. *In vitro*, testaron las concentraciones mínimas inhibitorias sobre diferentes cepas de *Candida*, *Saccharomyces* y *Criptococcus*, cifrándolas en 0,1 a 3 mg/ml. Asimismo, la pinocembrina no mostró ningún efecto tóxico al ser administrada por vía oral a dosis de 1 g/kg (Sforcin, 2016).

El propóleo australiano mostró actividad antifúngica contra *C. albicans*, debido a la mayor cantidad de pinocembrina que este contiene (Kujumgiev et al., 1999) coincidiendo con otros autores como Fokt y cols, (2010) que concluyeron que constituyentes como 3-acetilpinobanksina-3-acetato, pinocembrina, ácido caféico y ácido p-cumárico mostraron actividad antifúngica frente a *Mycobacteria*, *Candida*, *Trichophyton*, *Fusarium* y otros hongos que infectan la piel.

1.1.6.3. Actividad antiviral

Diferentes estudios han demostrado que el extracto de propóleo (EP) ejerce una potente actividad antiviral y de amplio espectro contra un diverso grupo de virus. La actividad contra el virus

de la gripe ha sido verificada en diferentes estudios *in vivo* e *in vitro* en los que el EP exhibía su actividad mejorando los síntomas de la gripe en ratones, sugiriendo esto el posible uso como suplemento dietético antigripal en humanos (Shimizu et al., 2008)(Abd El Hady & Hegazi, 2002).

En su búsqueda de algunos principios activos de este compuesto con efecto antiviral, recurrieron a investigar *in vitro* esta acción en seis sustancias sintéticas, ésteres de sustitución del ácido cinámico, que eran idénticos o presentaban grandes analogías con alguno de los componentes de esta fracción del propóleo. El isopentil ferulato mostró esta actividad antiviral respecto al virus de la gripe A de Hong Kong (H₃N₂) *in vitro* y producción de anticuerpos *in vivo* (Shimizu et al., 2008).

En 2016, Mazia y colaboradores estudiaron la actividad anti-HSV-1 *in vitro* del EP brasileño y su efectividad contra la infección cutánea por HSV-1 en modelos de ratón (Mazia et al., 2016). Con respecto al HSV-2, se han evaluado posibles efectos sinérgicos con aciclovir, demostrando esta asociación un efecto antiviral significativamente mayor que utilizando aciclovir sólo (Yildirim et al., 2016). Posteriormente, Bachevski y cols (2020) corroboraron este efecto contra el virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1), el virus del herpes simple tipo 2 (HSV-2), virus de la gripe A y B, y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Los flavonoides presentes en la composición del propóleo reducen la infectividad y la replicación de algunas cepas de rotavirus, herpesvirus, adenovirus y coronavirus (Bachevski et al., 2020; Scorza

et al., 2020)(Debiaggi et al., 1990). La quercetina y la vitamina C han mostrado actividad inhibidora de la aminopeptidasa, interrumpiendo así las principales proteasas de estos virus. Al tener un efecto positivo sobre el coronavirus de la gripe muchos autores están estudiando su posible aplicación para para el manejo de COVID-19 (Al Naggar et al., 2020; Fiorini et al., 2021; Khayrani et al., 2021; Lima et al., 2020; Maruta & He, 2020; Shahinozzaman et al., 2020).

1.1.6.4. Actividad antiinflamatoria

(Sforcin, 2016) informó que el propóleo brasileño y chino influían positivamente en el tratamiento de la artritis inducida por colágeno en ratones. Los flavonoides son los mayores responsables de la actividad antiinflamatoria en el propóleo. Estos compuestos frenan la producción de leucotrienos y prostaglandinas por los glóbulos blancos y retardan la actividad de la mieloperoxidasa, tirosina-proteína-quinasa, ornitina descarboxilasa y NADPH-oxidasa (Zeitoun et al., 2019).

Diferentes estudios han mostrado claramente que el propóleo promueve la inmunorregulación de citoquinas proinflamatorias, como la interleucina (IL-6), (IL-1) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y la regulación de sustancias inflamatorias que se producen en la célula (Krol et al., 1996)(Król et al., 2013).

1.1.6.5. Actividad cicatrizante de heridas

Desde la antigüedad se conoce el efecto cicatrizante del propóleo en heridas de la piel. Sus componentes reparan los tejidos y contribuyen a la regeneración de las lesiones (Kuropatnicki et al., 2013).

Se utiliza en dermatología en el tratamiento de quemaduras de segundo grado, eczemas y en el tratamiento de otros problemas dermatológicos (acné, abscesos, forúnculos, psoriasis) en forma de solución o pomada.

Sus características antiinflamatorias, antimicrobianas e inmunomoduladoras (Sforcin, 2016) son las que contribuyen a estos procesos de reparación. El propóleo reduce la cantidad de radicales libres en la lesión inflamatoria y promueve la formación de las fibras de colágeno; acelera diferentes reacciones enzimáticas, el metabolismo celular y mejora la circulación sanguínea debido a la presencia de vitamina C, bioflavonoides, arginina, provitamina A, complejo B y minerales en su composición (Parolia et al., 2020).

1.1.6.6. Actividad hepatoprotectora

El propóleo actúa como un agente hepatoprotector ya que aumenta la actividad antioxidante. Su mecanismo de acción aumenta el nivel de glutatión y detiene la peroxidación lipídica y el nivel de glutatión oxidado. Castaldo & Capasso, (2002) describieron este efecto protector contra el daño hepático causado por alcohol y paracetamol en ratas. (Vassya Bankova, 2005) sugiere que son los

componentes fenólicos y los ácidos diterpénicos los posibles responsables de esta acción. (Wagh, 2013) posteriormente estudió este efecto contra el estrés oxidativo hepatorenal.

La viabilidad celular requiere un proceso continuo de producción de energía, que se realiza en gran parte en las mitocondrias. En este proceso se forman especies reactivas de oxígeno (EROS) como aldehídos, malondialdehído, superóxidos y peróxidos, que a su vez pueden participar en el control de la homeostasis celular, actuando como señalización bioquímica intracelular o controlando la expresión génica. Los radicales libres, entre otros factores, son la causa principal del envejecimiento y el deterioro de las células. Este proceso está estrechamente relacionado con enfermedades inflamatorias, como la artritis, enfermedades degenerativas, enfermedades metabólicas, como diabetes mellitus, cáncer y enfermedades cardiovasculares (Kuropatnicki et al., 2013)(Ames et al., 1993; Pahlavani et al., 2019).

En condiciones fisiológicas, existe un equilibrio entre la producción de radicales libres y su eliminación. Los antioxidantes son moléculas capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas por mecanismos enzimáticos como la glutatión peroxidasa (GPx), la catalasa, la superóxido dismutasa (SOD) y otras sustancias no enzimáticas que tienen la capacidad de neutralizar los radicales libres y evitar que carbohidratos, proteínas, lípidos, vitaminas y ácidos nucleicos se oxiden y se acumulen en la célula alterando por tanto la naturaleza, estructura y función de las macromoléculas celulares. Estas sustancias pueden ser endógenas, tales como el ácido úrico o bien ingeridas con la dieta o como suplementos dietéticos

(flavonoides, carotenoides, polifenoles, ácido ascórbico y vitamina E) (D. Huang, 2018).

El propóleo ha mostrado actividad antioxidante y capacidad para eliminar estos radicales libres y proteger a las células de las reacciones de oxidación de los lípidos, los ácidos nucleicos y las proteínas (Dr. Vivek Kumar Adlakha, s. f.)(Ahn et al., 2004; Ames et al., 1993; D. Huang, 2018; Zheng et al., 2017).

Los compuestos fenólicos, la vainillina, la galangina y la pinocembrina (Ahn et al., 2004) presentes en la composición del propóleo ceden iones hidrógeno a los radicales libres protegiendo de esta forma a las células de las reacciones de oxidación. Aunque existe un alto grado de correlación entre los flavonoides y la capacidad antioxidante del propóleo, no se puede descartar una acción sinérgica entre varios de sus compuestos (Cui-ping et al., 2014).

Los glucósidos de quercetina representan la fracción flavonoide predominante en el propóleo. Sus propiedades moleculares (electronegatividad, potencial de ionización, afinidad electrónica, dureza e índice de electrofilia), confirman que la quercetina y sus glucósidos actúan como donantes de electrones en lugar de aceptores, demostrando así su indicador de actividad antioxidante. Zheng y cols (2017) profundizan en el conocimiento sobre la capacidad antioxidante de la quercetina y sus glucósidos en fases de gas, etanol y agua, concluyendo que son los grupos OH en el anillo B y el anillo C los responsables principalmente de esta acción. A concentraciones de 10 μ M bloquea completamente la producción de

especies reactivas de oxígeno en neutrófilos humanos y el sistema xantina/xantina oxidasa.

Hay pocos ensayos clínicos realizados en este sentido en humanos. Diniz y cols, (2020) demostraron reducción de los biomarcadores asociados con el daño de la membrana celular y del ADN causado por los radicales libres, al utilizar el extracto estandarizado microencapsulado de propóleo verde brasileño (EPP-AF®). Se encontró un aumento en la concentración de glutatión reductasa y en la actividad plasmática de SOD.

1.2. COMPOSICIÓN CORPORAL

Aunque el cuerpo humano, incluida su composición química, a menudo se considera relativamente estable (homeostasis). Los parámetros analíticos muestran que está en un estado dinámico, con modificaciones que ocurren en respuesta a una serie de estímulos externos, como la comida, el clima y el estrés, estímulos internos, incluidos cambios metabólicos y hormonales, así como diversas enfermedades. Como tal, una evaluación del estado nutricional, requiere la medición de una amplia gama de componentes que forman la masa corporal. Se puede lograr una caracterización precisa de muchas áreas del cuerpo mediante una plétora de varias técnicas, por lo que es importante conocer su utilidad diagnóstica y pronóstica, así como sus límites teóricos y prácticos (Heyward, 1996). La evaluación de la composición del cuerpo humano, particularmente de las necesidades energéticas y estado nutricional, es importante, dadas las importantes aplicaciones clínicas en una variedad de condiciones

médicas y requisitos de atención médica, especialmente en la evaluación y manejo de obesidad y sus problemas asociados, incluidos los trastornos metabólicos, enfermedades cardíacas e hipertensión.

Dicha evaluación y manejo también es relevante para una serie de otras condiciones médicas, neoplásicas, enfermedad, insuficiencia renal, salud mental, anorexia y optimización del rendimiento del deportista. Aunque actualmente se dispone de una variedad de parámetros para la evaluación cuantitativa de la composición corporal, cada uno tiene sus limitaciones, en términos de características técnicas y / o información proporcionada (Machann et al., 2013; H. Wang et al., 2014).

El estudio de la composición corporal requiere conocer dos o más compartimentos de masa corporal, incluyendo componentes anatómico-fisiológicos, químicos y elementales (Heymsfield & Waki, 1991). Anatómicamente, el cuerpo puede ser dividido en secciones, que incluyen tejido adiposo, músculo esquelético, hueso y órganos. El estudio de tales componentes anatómicos no se investigaron ampliamente hasta el desarrollo de técnicas de imagen, tales como imágenes de ultrasonido, tomografía computarizada e imágenes por resonancia magnética (Fuller et al., 1990).

La mayoría de las investigaciones de composición corporal están impulsadas por un modelo del cuerpo humano que permite su división en dos compartimentos químicos distintos: masa grasa y masa libre de grasa. Sin embargo, tal procedimiento proporciona un valor numérico cuya utilidad anatómica y fisiológica es cuestionable, dado que comprende una medida de grasa de sitios anatómicamente

distintos, incluido el cerebro, el esqueleto y tejido adiposo. La dificultad con esta medida se destaca cuando la grasa corporal de extremadamente las personas delgadas, como los atletas, deben determinarse. En tales casos, la masa grasa del tejido no adiposo puede ser numéricamente equivalente al de su tejido adiposo. En consecuencia, se desarrolló el concepto de masa corporal magra, siendo el compartimento corporal sin grasa anatómica, pero aún incluyendo la “grasa esencial”, que está presente en la pared celular, entre las fibras musculares, y en la médula amarilla de los huesos largos, así como en el sistema nervioso periférico y central (Behnke, 1942).

El patrón compartimental específico de la distribución de la grasa corporal se asocia con perfiles particulares de desregulación metabólica y riesgo cardiovascular. La investigación muestra un vínculo entre la acumulación de grasa ectópica, incluida la grasa visceral, la grasa hepática y la grasa cardíaca (epicárdica o intramiocárdica), con un mayor riesgo de hipertensión, enfermedad coronaria y aterosclerosis y trombosis venosa. La inflamación es un factor importante en el desarrollo y desestabilización de placas ateroscleróticas en la vasculatura coronaria, con tejido adiposo, incluso a través de eflujos paracrinos, contribuyendo al ambiente inflamatorio y por lo tanto a procesos fisiológicos y fisiopatológicos (Mathieu et al., 2009; Mazzocchi et al., 2012; Targher et al., 2010).

El aumento de grasa ectópica es un indicador importante de la desregulación metabólica, especialmente de la resistencia a la insulina (Fei et al., 2019), así como de las enfermedades cardiovasculares y la

disminución de la cognición. Los niveles elevados de grasa que rodea el corazón, el tejido adiposo epicárdico, son un predictor importante del riesgo cardio-metabólico, y se correlacionan también con los niveles del tejido adiposo visceral. Los aumentos del tejido adiposo visceral se asocian con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular y cerebrovascular, así como con disminuciones cognitivas (Mazzocchi et al., 2014). En particular, el riesgo de tales afecciones médicas se asocia más con un aumento de los niveles de acumulación de lípidos ectópicos, en comparación con la acumulación de grasa general, que es impulsada, en parte, por la participación de la grasa ectópica en una conversación cruzada con órganos sensibles a la insulina, que a su vez modula la liberación de adipocinas, así como de agentes lipotóxicos y glucotóxicos (Gastaldelli & Basta, 2010). Dado lo anterior, la evaluación de la grasa ectópica con metodologías inofensivas y de bajo costo que se caracterizan por su precisión, confiabilidad, velocidad, facilidad de uso y seguridad, es muy recomendable, por delante de la tecnología estándar de oro actualmente considerada para la evaluación de la composición corporal in vivo, como la tomografía computerizada y resonancia magnética nuclear. Sin embargo, ambas técnicas han contribuido a la diferenciación de la grasa abdominal que se almacena por vía subcutánea, a saber, el tejido adiposo subcutáneo, del tejido adiposo que se encuentra en la cavidad abdominal, como el tejido adiposo omental, mesentérico y retroperitoneal, es decir, tejido adiposo visceral (VAT). La utilización de estas técnicas de imagen ha proporcionado pruebas sólidas de que niveles más altos de tejido

adiposo visceral se asocian con la desregulación metabólica más grave, en comparación con la adiposidad subcutánea (Cornier et al., 2011).

1.2.1. TEJIDO ADIPOSO BLANCO (WAT)

El tejido adiposo blanco (WAT) es el tejido adiposo más abundante, además de ser el principal tejido de almacén de energía que tiene el organismo y almacenar la mayor cantidad de lípidos, se le atribuye la función de aislamiento y protección mecánica para algunos órganos vitales (Kelley et al., 2000; Rodríguez et al., 2015).

A nivel intraabdominal se encuentran los mayores depósitos alrededor del omento (omental), intestino (mesentérico) y áreas perirrenales (retroperitoneal), mientras que a nivel subcutáneo la grasa se localiza sobre todo en nalgas, muslos y abdomen. Actualmente se conoce que las diferentes localizaciones del WAT tienen características metabólicas y endocrinas diferentes (del Mar Romero et al., 2009; Tchkonja et al., 2005). En el caso del WAT en las mamas y nalgas es muy sensible a estrógenos, mientras que en la parte superior de la espalda y el cuello es más sensible a los glucocorticoides, por otro lado, el VAT (intraabdominal) tiene un perfil de secreción de adipoquinas relacionado con la inflamación y diabetes tipo 2. A nivel del WAT perivascular, el cual se encuentra ampliamente distribuido por toda la circulación arterial, se ha descrito un perfil de secreción similar al visceral, siendo proinflamatorio, y se ha propuesto que evolutivamente el WAT perivascular (periarterial) podría haberse

originado como un mecanismo fisiológico de regulación de la distribución del flujo sanguíneo posprandial entre-órganos e intra-órganos; sin embargo, un exceso de WAT periarterial puede resultar nocivo, como ocurre en condiciones de inactividad o exceso de energía, donde estos depósitos se incrementan y, en consecuencia, hay una mayor producción de adipoquinas proinflamatorias que pueden propiciar la aterosclerosis (Yudkin et al., 2005).

Los adipocitos maduros del tejido adiposo blanco muestran el perfil de expresión requerido para la síntesis de triglicéridos, captación de glucosa, y lipogénesis, así como de lipólisis. Este fenotipo permite que cuando el aporte de energía al organismo sea excesivo y el gasto energético disminuya, este exceso de energía se deposite eficientemente en el WAT en forma de triglicéridos. Por otro lado, frente a una situación de escasez de ingesta energética y/o incremento del gasto energético el WAT moviliza los depósitos de lípidos liberando ácidos grasos y glicerol que a través de la sangre son transportados a los tejidos, donde serán oxidados para obtener energía (Vaughan, 1962).

El TAB tradicionalmente se ha considerado como un tejido poco activo, pero tal y como se ha explicado anteriormente se trata de un tejido altamente dinámico, sintetizando y secretando numerosos factores, no solo lipídicos sino también proteicos, los cuales son importantes e intervienen en la regulación de un amplio rango de procesos fisiológicos y metabólicos. A finales de la década de los ochenta ya se describe que el WAT secreta hormonas esteroideas (Whitworth & Meeks, 1985), y es años más tarde con el

descubrimiento de la leptina (Y. Zhang et al., 1994), cuyo factor saciante es sintetizado predominantemente por el WAT, cuando se reconoce a dicho tejido como órgano endocrino. Posteriormente se han identificado numerosos factores que son liberados por el WAT con funciones autocrinas, paracrinas y endocrinas.

De las numerosas sustancias secretadas por el WAT, los ácidos grasos son cuantitativamente las moléculas más importantes y son liberados en periodos donde el balance energético es negativo, como ocurre en situaciones de ayuno. Otras moléculas de naturaleza lipídica son también secretadas por el WAT, es el caso de los prostanoides (ácidos grasos de 20 carbonos sintetizados por el propio tejido, como las prostaglandinas y tromboxano), colesterol y retinol, que son almacenados por dicho tejido y posteriormente liberados, y las hormonas esteroideas (esteroides sexuales y glucocorticoides) que en el WAT pueden experimentar transformaciones de formas inactivas a formas activas o viceversa, con un papel autocrino y paracrino importante (Masuzaki et al., 2001; P. Trayhurn, 2005). Aparte de sustancias de naturaleza lipídica, el tejido adiposo secreta un número considerable de factores proteicos que se designan bajo la denominación común de adipoquinas. De forma estricta, el término “adipoquina” debería utilizarse para designar las proteínas que son sintetizadas y secretadas por los adipocitos (Paul Trayhurn & Wood, 2004). Sin embargo, de forma genérica se utiliza para referirse a las proteínas sintetizadas y secretadas por el TAB en su conjunto, aunque su síntesis principal sea a cargo de otros tipos celulares presentes en el tejido, como los macrófagos infiltrados.

Las adipoquinas son muy diversas en cuanto a la estructura química y a la función fisiológica, y curiosamente muchas de ellas están relacionadas con el sistema inmunitario, incluyendo citoquinas clásicas como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-4, IL-13 y MCP-1, pudiéndose establecer un nexo entre la inflamación y la obesidad, situación que se incrementa en la secreción de adipoquinas proinflamatorias (Sanz et al., 2020).

Las adipoquinas comprenden entre otras citoquinas, quimioquinas, aminas y factores de coagulación a reguladores del metabolismo lipídico, y proteínas más específicas que son secretadas por los adipocitos como son la leptina y la adiponectina. (Fasshauer & Blüher, 2015; Wronkowitz et al., 2014). Estas parecen jugar un papel fundamental en el metabolismo de glucosa, en la resistencia a la insulina, metabolismo lipídico, homeostasis, inflamación, inmunidad y en la respuesta en fase aguda (Ouchi et al., 2003; Savino et al., 2010).

La gran cantidad de adipoquinas producidas por el tejido adiposo pueden alcanzar distintos órganos mediante el sistema circulatorio, donde pueden ejercer una amplia gama de acciones biológicas incluyendo la regulación de la ingesta de alimento y balance energético (leptina), en la regulación de la presión sanguínea (angiotensinógeno), la sensibilidad a la insulina y homeostasis glucídica (resistina, visfatina y adiponectina), metabolismo lipídico, inflamación e inmunidad, hemostasia vascular y función cardiovascular así como factores de crecimiento (Stern et al., 2016).

1.2.2. TEJIDO ADIPOSO MARRON (BAT) Y SU PAPEL EN EL METABOLISMO LIPÍDICO

Los estudios en animales de experimentación han demostrado que los ácidos grasos (AG) derivados de los triglicéridos son el principal combustible para la termogénesis del BAT. La activación del BAT da como resultado una rápida inducción de la lipólisis intracelular, inducida por la activación de la lipasa adipocítica de triglicéridos (ATGL) y la hormona sensible a la lipasa (HSL), lo que resulta en la liberación de gotitas de lípidos llenas de TG. Los AG se dirigen a las mitocondrias donde activan alostéricamente la proteína desacoplante 1 (UCP1) presente en la membrana interna de la mitocondria o pueden sufrir oxidación (Cannon & Nedergaard, 2004). En consecuencia, después de la lipólisis intracelular, los depósitos de Triglicéridos (TG) intracelulares de los adipocitos deben reponerse.

Esto está mediado por tres mecanismos:

- captación de glucosa seguida de lipogénesis de novo,
- captación de albúmina unida a AG,
- absorción de AG derivados de TG de lipoproteínas muy baja densidad y quilomicrones en el plasma.

La magnitud de la capacidad de eliminación de TG del BAT se hizo evidente cuando Bartelt y col. (Bartelt et al., 2011) demostraron que los ratones alojados a 4°C durante 24h, era un desencadenante importante para la activación de BAT, mostrando una disminución masiva de los niveles plasmáticos de TG. Además, la activación de BAT mediante exposición al frío puede corregir la hiperlipidemia en

ratones knockout de ApoA5 hiperlipidémicos (Bartelt et al., 2011). Por el contrario, los animales en los que BAT se desnerva quirúrgicamente se vuelven obesos e hipertriglicéridémicos (Dulloo & Miller, 1984). Estos hallazgos subrayan la participación del BAT en el gasto energético total y la depuración de TG.

También en humanos, el BAT contribuye al metabolismo de TG. La exposición de los seres humanos al frío durante 2 h resultó en una mayor absorción de AG por parte de BAT en comparación con el músculo y el tejido adiposo blanco (WAT). Es probable que el BAT humano también utilice AG de lipoproteínas circulantes, aunque esto aún no se ha investigado. Además, 2 h de exposición al frío da como resultado un rápido aumento de la radiodensidad del BAT, lo que sugiere disminución de los depósitos de TG intracelulares en BAT. De hecho, una depleción de lípidos intracelulares en el BAT se encontró en la necropsia en recién nacidos y adultos que murieron de hipotermia (Aherne & Hull, 1966). Así, una rápida combustión intracelular TG tras la activación aguda de BAT bien puede explicar por qué la exposición al frío a corto plazo no da como resultado una disminución aguda de los TG plasmáticos en sujetos humanos, pero da como resultado aumento de la oxidación de grasas, mientras que la oxidación de glucosa no se modifica (Bakker et al., 2014). Es probable que la activación prolongada del BAT resulte en una disminución de los niveles plasmáticos de TG en sujetos humanos como consecuencia de un aumento del aclaramiento del plasma hacia el BAT.

Estudios murinos han demostrado que el BAT expresa tanto diversos transportadores de glucosa (GLUT), GLUT-4 como GLUT-1, lo que

sugiere una captación de glucosa tanto dependiente de insulina como independiente de la insulina por el tejido (Cannon & Nedergaard, 2004). Mientras que los ácidos grasos son el sustrato principal utilizado para la oxidación y el desacoplamiento, la glucosa se utiliza principalmente para la lipogénesis de novo (por ejemplo, para reponer las gotas de lípidos intracelulares) y la generación de ATP (por ejemplo, a través de la glucólisis) en lugar de la oxidación. Aún así, los estudios murinos sugieren que el aclaramiento plasmático de glucosa por el BAT puede contribuir sustancialmente a la homeostasis de la glucosa en todo el organismo. Por ejemplo, el trasplante de BAT en ratones da como resultado una mejoría en la tolerancia a la glucosa debido a una mayor absorción de glucosa por el tejido (Stanford et al., 2013). Además, la activación de BAT a largo plazo mediante un β_3 adrenérgico agonista redujo los niveles de glucosa plasmática (Q. Wang et al., 2011). Cabe destacar, también inducción de "pardeamiento" del tejido adiposo blanco por medio de la hormona recientemente identificada irisina que mejoró la tolerancia a la glucosa, lo que sugiere que también los adipocitos beige tienen la capacidad para contribuir al metabolismo de la glucosa en todo el cuerpo, al menos en ratones (Boström et al., 2012). En los seres humanos, está bien establecido que tras la exposición al frío, tiene gran capacidad de eliminación de glucosa del tejido.

(Orava et al., 2011) mostraron que la estimulación con insulina mejora notablemente la captación de glucosa por el BAT en un grado comparable al músculo, lo que sugiere que el transportador GLUT-4 está involucrado al menos en parte en captación de glucosa por el

BAT humano y que el tejido es sensible a la insulina. A pesar de la gran capacidad de captación de glucosa del BAT humano, la pregunta sigue siendo si el BAT es suficiente para condicionar el metabolismo de la glucosa general en humanos. Un estudio de asociación en el que se midieron diferentes parámetros plasmáticos en humanos con y sin BAT, mostraron que el BAT era un determinante significativamente independiente de la glucosa y los niveles de HbA1c, lo que sugiere que BAT podría afectar el metabolismo de la glucosa (Matsushita et al., 2014). Sin embargo, la activación del BAT a largo plazo da como resultado una mejora del metabolismo de la glucosa en sujetos obesos con alteraciones.

1.3. ENFERMEDAD PERIODONTAL Y REPERCUSIONES SISTÉMICAS

La enfermedad periodontal se considera actualmente una patología inflamatoria crónica no transmisible de etiología infecciosa con una alta prevalencia en el mundo. Constituye la sexta enfermedad más común en humanos, afecta al 11,2% de la población mundial (Richards, 2014) y es la principal causa de la pérdida de piezas dentales entre adultos, comprometiendo la calidad de vida de la población afectada.

La periodontitis se desarrolla con el tiempo por la acumulación de placa dental, disbiosis bacteriana, formación de bolsas periodontales, recesión de las encías, destrucción de tejidos y pérdida de hueso alveolar, que en última instancia puede conducir a la pérdida de dientes.

La mayor destrucción observada en este proceso periodontal es mediada por el sistema inmunológico del huésped, pero generalmente iniciada por el crecimiento excesivo de bacterias como *Bacteroides forsythus* y *Treponema denticola* y *Porphyromonas gingivalis*, sus subproductos tóxicos y otras causas sistémicas, como el tabaquismo y la diabetes. Cabe destacar la importancia de la bacteria *P.gingivalis* patógeno clave en el desarrollo de la enfermedad periodontal capaz de convertir una comunidad microbiana benigna en una disbiótica como describe Hajishengallis et al., 2012).

Los procesos inflamatorios crónicos provocados por la periodontitis se han asociado tradicionalmente con trastornos del metabolismo lipídico y las enfermedades cardiovasculares, siendo la inflamación sistémica una de las principales razones de esta asociación.

Actualmente se considera que la periodontitis puede ser una fuente de bacteriemia además de tener una elevada repercusión sobre las enfermedades sistémicas mencionadas anteriormente, empeorando afecciones como la diabetes mellitus y la aterosclerosis, relacionadas con el metabolismo glucídico y lipídico (Gotsman et al., 2007). Esta penetración de bacterias provoca una explosión de proteínas de fase aguda y niveles sistémicamente elevados de mediadores proinflamatorios que facilitan la resistencia a la insulina y originan complicaciones microvasculares por la acumulación de sustancias reactivas de oxígeno (ROS) (Acharya et al., 2018). El aumento de radicales libres provoca daños oxidativos en el tejido gingival, ligamento periodontal y hueso alveolar, produciendo una destrucción

local periodontal como consecuencia a esta reacción monocítica exagerada y se considera que este inicio de la muerte celular es un acelerador de la progresión de la EP.

Cuando se produce el desequilibrio entre la producción de radicales libres y el sistema de defensa antioxidante que es la capacidad del cuerpo para eliminar estas especies reactivas se desencadena el estrés oxidativo (OS). Los ROS son moléculas muy inestables con la capacidad de tomar electrones de otros átomos y moléculas. Es la unión de los ROS a los receptores de los monocitos lo que induce la producción de interleucina-1 (IL-1), IL-6, factor de crecimiento similar a la insulina-1, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (Schmidt et al., 1993). Este aumento de citoquinas proinflamatorias es clave en la patogenia de la enfermedad periodontal (Borges et al., 2007) encontrando muchos estudios clínicos que evidencian la fuerte asociación que existe entre OS y EP (Y. Wang et al., 2017).

Por otro lado el mal control glucémico de los pacientes diabéticos, se asocia a complicaciones cardiovasculares, teniendo un mayor riesgo de desarrollo prematuro de placa aterosclerótica, mecanismo patogénico central de la enfermedad cardio-vascular (ECV). La alta producción de proteína C reactiva (PCR) como consecuencia de la inflamación sistémica provocada por los ROS, origina esta disfunción epitelial al reducir los niveles de óxido nítrico. Cuando las lipoproteínas de baja densidad alcanzan un determinado umbral de concentración en sangre, penetran en el interior de la pared arterial, donde se modifican por procesos de oxidación. La PCR se une a estas

lipoproteínas y facilita la fagocitosis favoreciendo la formación de células espumosas. El acúmulo de estas células hace más propensa la erosión y rotura de la pared arterial liberándose el trombo. Sabemos por múltiples trabajos que los niveles de PCR están aumentados en pacientes con EP y que sus niveles se pueden bajar con la terapia periodontal (Paraskevas et al., 2008).

En la respuesta inflamatoria del huésped, el hígado es un órgano central en la homeostasis del organismo que está expuesto a productos bacterianos, toxinas y antígenos derivados de alimentos, con una notable capacidad para el metabolismo de ácidos grasos (Crispe, 2003). El fallo hepático causa consecuencias críticas para la desintoxicación de metabolitos, la síntesis de proteínas, el metabolismo y el proceso digestivo.

Como subproducto del metabolismo del oxígeno, las especies reactivas de oxígeno (EROs) oxidan las proteínas celulares, los lípidos y los ácidos nucleicos, lo que conduce a un daño y disfunción celular general y puede iniciar la muerte celular a través de varias cascadas de señalización (Uttara et al., 2009).

Se ha descrito también que la obesidad es un factor de riesgo importante para la diabetes, las enfermedades cardiovasculares y las enfermedades periodontales (Genco et al., 2005). La resistencia a la insulina parece mediar esta relación, los adipocitos secretan citocinas proinflamatorias que parecen ser las moléculas que unen la patogenia de estas enfermedades. La obesidad general y abdominal se asocia con una mayor prevalencia de enfermedad periodontal (Al-Zahrani et al., 2003). La promoción de una nutrición saludable y actividad

física adecuada pueden ser factores adicionales para prevenir o detener la tasa de progresión de la enfermedad periodontal.

Para el tratamiento de la enfermedad periodontal continúa vigente lo que Ramfjord describió hace ya más de 40 años acerca de que “las terapias periodontales deben basarse en el desbridamiento mecánico del *biofilm* dental, la eliminación de los factores locales y motivación del paciente” (Ramfjord et al., 1975).

Para el desbridamiento mecánico se realiza el raspado y alisado radicular (RAR) con curetas o ultrasonidos, en las localizaciones con sangrado y profundidad de bolsa menores o igual a 4 mm.

Está limitado a veces por la incapacidad de acceder a las zonas profundas, bolsas periodontales mayores de 4 mm y no poder eliminar todos los patógenos. Por ello se ha recomendado el uso de agentes antimicrobianos junto con el RAR para disminuir el uso de cirugías de acceso a las bolsas periodontales (Alshehri et al., 2017). Esto permite obtener una concentración efectiva del fármaco en el punto diana con una mínima carga sistémica y bajo riesgo de aparición de resistencias bacterianas (Sanz et al., 2020).

Aunque el tratamiento periodontal (TP) mecánico (RAR) puede retrasar la progresión de la enfermedad periodontal y reducir la inflamación habría que actuar al mismo tiempo sobre el desequilibrio de la respuesta inmune del paciente frente a antígenos derivados de los patógenos periodontales, que da lugar a la destrucción del tejido de soporte periodontal (Baeza et al., 2020), el metaanálisis realizado por ellos concluye que el tratamiento periodontal tiene un impacto en el control metabólico y la reducción de la inflamación sistémica.

Como Garlet *et al* (Garlet *et al.*, 2006) propugnan, “el nuevo desafío, en relación con el conocimiento que tenemos de la etiopatogenia de las enfermedades periodontales y su tratamiento, está en relación con lograr generar una respuesta protectora frente a los patógenos periodontales, pero no una respuesta destructiva contra los tejidos periodontales”

1.4. LA CLORHEXIDINA, AGENTE QUÍMICO PARA EL CONTROL DEL BIOFILM

La clorhexidina (CHX) ha asumido históricamente un papel clave en el control químico del biofilm. Es una bisguanida catiónica, utilizada frecuentemente en medicina general como antiséptico de amplio espectro desde 1953 (Gusberti *et al.*, 1988). Ha demostrado ser un agente eficaz contra el biofilm y muestra actividad antimicrobiana para bacterias grampositivas, gramnegativas, levaduras y virus, incluido el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus de la hepatitis B. No obstante, su tiempo de utilización debe ser corto debido a sus efectos secundarios, como alteración temporal del gusto, irritación de las mucosas, sensación de ardor, prurito y tinciones en las superficies dentales, mucosa o lengua. La tinción dental es sin duda su efecto adverso más común. La CHX es el agente antiséptico más utilizado tras un tratamiento periodontal o una cirugía implantológica durante las dos semanas tras la intervención (Gartenmann *et al.*, 2016).

Se ha evidenciado que su uso a concentraciones habituales de 0,12% o concentraciones muy reducidas, como al 0,00009% en sitios

quirúrgicos durante cortos periodos de tiempo antes del cierre de la herida puede tener serios efectos tóxicos en los fibroblastos gingivales y dificultar la cicatrización de la herida (Mariotti & Rumpf, 1999).

Recientemente se están utilizando polvos de glicina o con base de eritritol para el pulido radicular con aire que mejoran sensiblemente el confort para el paciente, ya que acorta el tiempo de tratamiento con respecto a la instrumentación manual y se inhibe el crecimiento sobre algunas bacterias periodontopatógenas (Hägi et al., 2013).

Para combatir estas bacterias, los requisitos que se les pide a los antibióticos para ser usados en terapia periodontal son; tener actividad *in vitro* frente a los gérmenes causantes, presentar efecto comprobado en estudios clínicos longitudinales, conseguir concentraciones efectivas en el fluido crevicular, mantener la concentración efectiva a lo largo de todo el tratamiento, no tener reacciones adversas locales o sistémicas a la dosis utilizada y demostrar un beneficio evidente frente a otros tratamientos convencionales (Eyler & Shvets, 2019).

Los principios de antibioterapia y antisepsia pueden aplicarse a estas patologías. El antiséptico comúnmente utilizado es la CHX y los efectos adversos documentados pueden aplicarse a esta situación, máxime teniendo en cuenta que existe una mayor exposición ósea.

Justificación e Hipótesis

2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

La EP es un proceso inflamatorio crónico que puede afectar a la salud sistémica mediante la bacteriemia provocada por la flora periodontopatógena y los factores de la inflamación originados por el sistema inmune, elevando el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular aterosclerótica en un futuro.

Esta vinculación ha sido corroborada por dos de las entidades de referencia a nivel internacional en este ámbito, la Federación Europea de Periodoncia (EFP) y la Federación Mundial del Corazón (WHF), publicando un consenso en febrero de 2020 que no deja lugar a dudas (Sanz et al., 2020).

Considerando que estas enfermedades crónicas tienen mecanismos fisiopatológicos que involucran daño oxidativo por generación de especies reactivas de oxígeno pretendemos estudiar el uso de “complementos nutricionales” con propiedades antioxidantes para prevenir el agravamiento de dichas enfermedades.

Nuestro plan de investigación tiene por ello dos hipótesis:

Una, si el efecto de un suplemento de propóleo adicionado a la dieta sobre el metabolismo en animales de experimentación afecta a nivel sistémico y su repercusión en los procesos oxidativos.

Y por otro lado, si su efecto antimicrobiano tiene acción para reducir las bacterias periodontopatógenas. Y si tiene efecto cicatrizante y antiinflamatorio tras la realización de exodoncias por causa periodontal.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la influencia del propóleo en el metabolismo lipídico, glucídico y la actividad antioxidante hepática en modelos animales.

Estudiar su efecto como coadyuvante en el tratamiento de pacientes periodontales.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para desarrollar este objetivo general se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Examinar los efectos de un suplemento de propóleo al 2% sobre la actividad antioxidante hepática, el perfil lipídico y glucémico en animales de experimentación.
2. Evaluar la función endocrina del tejido adiposo, la composición corporal y el depósito de minerales en órganos diana tras el consumo de un suplemento de propóleo.
3. Conocer los efectos fisiológicos de las hormonas tiroideas, grelina e insulina y la relación entre las adipoquinas, leptina y adiponectina y las concentraciones plasmáticas de ácidos grasos no esterificados durante el consumo de propóleo en animales de experimentación.

Objetivos

4. Evaluar el efecto clínico de la irrigación subgingival con EEP en bolsas periodontales de pacientes con enfermedad periodontal, midiendo índice de placa (PI), sangrado al sondaje (BOP+), la profundidad de sondaje (PPD) y el nivel de inserción clínica (CAL).
5. Estudiar el efecto microbiológico del EEP ante cepas periodontopatógenas con estudio cualitativo y cuantitativo mediante rt-PCR.
6. Profundizar en los posibles efectos de una pasta de propóleo al 10% en el proceso de cicatrización después de una exodoncia en pacientes periodontales.

Material y Métodos

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1. ESTUDIO DE INTERVENCIÓN DIETÉTICA CON PROPÓLEO EN UN MODELO ANIMAL

Se han utilizado 20 ratas macho (*Rattus norvegicus albinus*, raza Wistar) (8 semanas de edad), con un peso medio de 215 ± 10 g obtenidas en el Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Granada. Los ensayos biológicos se han llevado a cabo en la Unidad de Experimentación Animal del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Granada, en un área certificada como libre de gérmenes patógenos (SPF), y los animales se han mantenido en condiciones de alta seguridad biológica, con un control riguroso de parámetros sanitarios y medio ambientales.

Los procedimientos de cuidado animal y los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Granada de acuerdo con las directrices de la Comunidad Europea. Las ratas se dividieron en dos grupos de 10 animales cada una y se sometieron a un período de 90 días, en el que se alimentaron con dos tipos diferentes de dietas: dieta estándar AIN-93M (Reeves et al., 1993) para el grupo de control (dieta C) y dieta AIN-93M+2% de propóleo para el grupo de propóleo (dieta P). La tabla 1 muestra la composición de las dietas experimentales. Se realizó un análisis de potencia para estimar el número de ratas necesarias para obtener un 80% de potencia con un nivel de confianza del 95%. Se requerirían ocho animales para obtener una diferencia del 8% en los parámetros

Material y Métodos

hematológicos entre las dietas. De forma similar, se requerirían 7 animales por grupo para obtener una diferencia del 10% en los parámetros bioquímicos entre las dietas. Para garantizar el cálculo de la potencia, se usaron 10 ratas por grupo.

Los animales se colocaron en jaulas metabólicas individuales en una habitación ambientalmente controlada con una temperatura constante de 22 ± 1 °C, un ciclo de luz-oscuridad de 12 h y $55 \pm 10\%$ de humedad. Se controló la ingesta de la dieta (pair feed) y los animales ingirieron agua bidestilada *ad libitum*. En el día 90, todos los animales fueron sometidos a un periodo de ayuno durante la noche y se determinó la composición corporal mediante resonancia magnética. Posteriormente, las ratas fueron anestesiadas por inyección intraperitoneal de 5 mg de pentobarbital sódico/100 g de peso corporal (St Louis, MO). Se extrajo completamente la sangre mediante canulación de la aorta y se centrifugó con EDTA como anticoagulante ($1500 \times g$, 4°C, 15 min) para obtención de plasma y el posterior análisis de hormonas tiroideas, grelina, leptina, adiponectina, insulina y ácidos grasos no esterificados (AGNE), parámetros hematológicos y bioquímicos. El resto de la sangre se centrifugó ($1500 \times g$, 4°C, 15 min) sin anticoagulante para separar los glóbulos rojos del suero y el posterior análisis de Fe, capacidad total de fijación de hierro (TIBC), ferritina y hepcidina. Se extrajeron los hígados, se lavaron con solución salina y las fracciones citosólicas se prepararon frescas el mismo día mediante centrifugación diferencial con hemólisis hipotónica y centrifugaciones diferenciales sucesivas según el método de Hanahan y Ekholm (1997) (Hanahan & Ekholm, 1974), preservando estas

fracciones citosólicas a -80°C para análisis adicionales de enzimas antioxidantes Catalasa (CAT), Superóxido dismutasa (SOD), Glutathion peroxidasa (GPx) y Glutathion reductasa (GR). El contenido de proteínas en las fracciones citosólicas se midió siguiendo el método descrito por Lowry y col. (1951) (Lowry et al., 1951). Después se procedió a la extracción y congelación del resto de órganos objeto de estudio: bazo, cerebro, corazón, pulmones, testículos, riñones y fémur, en los que se determinó el contenido de Ca, P, Mg, Cu y Zn tras el adecuado procesamiento de la muestra.

Tabla 1. Composición de las dietas experimentales.

Tabla 1	
<i>Dietas ensayadas</i>	
Dieta AIN 93 M^a	Cantidad (g/kg)
Proteína (caseína)	140
Grasa (aceite de oliva virgen)	40
Fibra (celulosa micronizada)	50
Suplemento mineral ^b	35
Suplemento vitamínico ^c	10
Cloruro de colina	2.5
Almidón de maíz	621
Sacarosa	100
L-Cistina	1.8

^aA la dieta para el grupo P se agregó 2% de propóleo (que contenía 168.7 ± 3.9 mg de Equivalentes de Ácido Gálico/100 g como

compuestos fenólicos totales y 31.7 ± 1.1 mg de Equivalentes de Catequina/100 g como flavonoides totales).

^bEl suplemento mineral se preparó de acuerdo con las recomendaciones del Instituto Americano de Nutrición (Reeves et al., 1993).

^cEl propóleo crudo y se sometió a extracción de productos fenólicos y suplemento vitamínico se preparó según las recomendaciones del Instituto Americano de Nutrición (Reeves et al., 1993).

4.1.1. MÉTODOS ANALÍTICOS

4.1.1.1. Propóleo

Las muestras de propóleo fueron suministradas por el laboratorio Nadiprana S.L. (Tarragona, España) se mantuvieron a temperatura ambiente (25°C) durante 28 días y posteriormente se filtró por gravedad mediante una membrana de nitrocelulosa WhatmanR y Protran R (Sigma-Aldrich, EE. UU.)

El análisis de constituyentes revela que contenían aproximadamente 50% de resina y bálsamo vegetal, 30% de cera, 10% de aceites esenciales y aromáticos, y 5% de polen y 5% de otros compuestos. Los flavonoides presentes en su composición, incluyen crisina, apigenina, luteolina, rutina, morina, quercetina, myricetin, kaempferol, quercetina, galangina, naringina, naringenina y hesperidina, daidzeína y genisteína.

4.1.1.2. Ensayo de compuestos fenólicos totales

Se pesó una muestra liofilizada de 0,5 g de flavonoides con 50 ml de metanol acuoso al 80% en un baño ultrasónico Modelo 2510 EMS (Hatfield, EE. UU.) durante 20 min. Una alícuota (1 mL) de los extractos se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min. El contenido fenólico total de propóleo se determinó mediante el ensayo Folin-Ciocalteu. Los extractos se oxidaron con el reactivo Folin-Ciocalteu, y la reacción se neutralizó con carbonato de sodio. La absorbancia del color azul resultante se midió a 760 nm después de 60 min. El uso de ácido gálico como contenido fenólico total estándar (la curva estándar se preparó usando concentraciones de 2.5-50 mg/L) se expresó como mg de equivalentes de ácido gálico (GAE)/100 g de peso fresco. Los datos se obtuvieron por triplicado.

4.1.1.3. Ensayo de flavonoides totales

El contenido total de flavonoides se midió mediante el ensayo colorimétrico de cloruro de aluminio. Se añadió una alícuota (1 mL) de extractos (0,5 g de propóleo en 50 mL de metanol acuoso al 80%) o solución estándar de catequina (20, 40, 60, 80, 100 mg / L) a un matraz volumétrico con 4 ml de H₂O bidestilada. Al matraz se añadieron 0,3 ml de NaNO₂ al 5%. Después de 5 min, se añadieron 0,3 ml de AlCl₃ al 10%. Al sexto minuto, se añadieron 2 ml de solución de NaOH 1 M y el volumen total se completó hasta 10 mL con H₂O bidestilada. La solución se mezcló bien y se midió la absorbancia frente al blanco a 510 nm. El contenido total de flavonoides se expresó en mg de equivalentes de

catequina (CE)/100 g de masa fresca. Las muestras se analizaron por triplicado.

4.1.1.4. Parametros hematológicos

Las determinaciones hematológicas realizadas fueron las siguientes: concentración de hemoglobina, recuento de hematíes, hematocrito, volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), anchura de distribución eritrocitaria (ADE), recuento plaquetario, recuento leucocitario y linfocitos. Para su análisis se empleó el analizador automático hematológico SYSMEX KX-21 (Sysmex, Tokyo, Japan).

4.1.1.5. Hierro sérico, capacidad total de fijación al hierro y saturación de transferrina

La concentración sérica de hierro y la capacidad total de fijación de hierro (TIBC) se determinaron utilizando los reactivos Sigma Diagnostics Iron y TIBC (Sigma Diagnostics). La absorbancia de las muestras se leyó a 550 nm en un lector de microplacas (Bio- Rad Laboratories Inc., Hercules, CA). El porcentaje de saturación de transferrina se calculó a partir de la ecuación:

$$\text{Saturación de transferrina (\%)} = \frac{\text{concentración sérica de Fe } (\mu\text{g/L})}{\text{TIBC } (\mu\text{g/L})} \times 100$$

4.1.1.6. Ferritina serica

La concentración de ferritina sérica se determinó usando el kit Rat Ferritin ELISA (Biovendor GmbH, Heidelberg, Germany). La absorbancia de la reacción se leyó a 450 nm usando un lector de microplacas (Bio-tek, Vermont, EE. UU). La intensidad del color desarrollada fue inversamente proporcional a la concentración de ferritina sérica.

4.1.1.7. Hepcidina serica

La concentración de hepcidina-25 se determinó usando un kit DRG ELISA (DRG Instruments GmbH, Marburg, Germany). Los pocillos de microtitulación se recubrieron con anticuerpo monoclonal (de ratón) dirigido hacia un sitio antigénico de la molécula de hepcidina-25. La hepcidina-25 endógena de una muestra compitió con un conjugado de hepcidina-25-biotina para unirse al anticuerpo recubierto. Después de la incubación, el conjugado no unido se retiró por lavado y se añadió un complejo de enzima estreptavidina-peroxidasa a cada pocillo. Después de la incubación, el complejo de enzima libre se eliminó por lavado y se añadió la solución de sustrato.

El desarrollo del color azul se detuvo después de un corto tiempo de incubación, cambiando el color de azul a amarillo. La microplaca se leyó a 450 nm en un lector de microplacas (Bio-Rad Laboratories Inc.) y la intensidad del color desarrollado fue inversamente proporcional a la concentración de hepcidina en la muestra.

4.1.1.8. Parámetros bioquímicos

La glucosa, urea, creatinina, colesterol total, triglicéridos, glutamil-oxaloacético transaminasa (GOT), glutamil-piruvato transaminasa (GPT), fosfatasa alcalina y amilasa se determinaron utilizando kits comerciales (Spinreact, Barcelona, España) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.1.1.9. Actividad de catalasa (CAT)

La actividad de la enzima catalasa se ha medido por el método de Aebi (Aebi, 1984). Este método se basa en la acción inhibidora de la catalasa sobre la reacción oxidativa de peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

La cinética de esta enzima no sigue las reglas normales ya que se ve inactivada por concentraciones de H_2O_2 superiores a 1M, por lo tanto la determinación de su actividad se lleva a cabo con una concentración muy baja de H_2O_2 (0.001M) para evitar una caída demasiado rápida en el inicio de la reacción. Gracias a esta baja concentración de peróxido de hidrógeno la cinética será de primer orden dentro del primer minuto de la reacción.

La actividad de esta enzima se midió en el espectrofotómetro modelo utilizando microplacas Falcon debido a la longitud de onda de medida. Utilizamos una microplaca Falcon. En cada pocillo añadimos 10 μ l de muestra y 90 μ l de tampón fosfato. Preparamos 2 blancos, blanco tampón (150 μ l de tampón fosfato) y blanco reactivo (100 μ l de tampón fosfato). Se agita y se observa el descenso de absorbancia de H_2O_2 a 240 nm durante 60 segundos a 20°C.

4.1.1.10. Actividad superóxido dismutasa (SOD)

El método utilizado está basado en la técnica original de McCord y Fridovich (1969) (McCord & Fridovich, 1969), aunque con ligeras modificaciones. Es importante la eliminación previa de la hemoglobina de las muestras. La SOD compite con el citocromo C por el radical O_2^- , por lo que al añadir la muestra, la SOD de la muestra reacciona con éstos radicales y el citocromo no se puede reducir por lo que disminuye la absorbancia. Lo que desencadena la reacción es la xantina-oxidasa (que cataliza el paso de hipoxantina a ácido úrico, liberando anión superóxido) por lo que hay que buscar la cantidad de enzima adecuada para conseguir incrementos de entre 0,025 a 0,05 de Abs/min). Una vez comprobada la cantidad de xantina-oxidasa, ya tenemos el sistema patrón. A continuación hacemos lo mismo con la muestra. Se añaden distintas cantidades de Xantina-Oxidasa, empezando por 6 μ l hasta que encontremos una cantidad de xantina-oxidasa que nos de el incremento de absorbancia deseado (entre 0.025 y 0,050 abs/min). Se agita y mide inmediatamente a 550 nm de longitud de onda. Monitorizamos el incremento de absorbancia de 1 a 2 minutos a 25°C. El espectro resultante se utiliza como patrón para saber la cantidad de SOD que se corresponde con la unidad, considerando el descenso de citocromo c igual al incremento de absorbancia y como el 100% y sabiendo que la unidad representa una inhibición del 50%. En cada pocillo se añadimos 162,5 μ l de tampón con azida, 25 μ l solución de Xantina, 25 μ l solución Citocromo C y la cantidad necesaria de muestra. Agitar y añadir la cantidad de Xantina-Oxidasa determinada

anteriormente justo antes de medir. Monitorizar el incremento de absorbancia a 550 nm de 1 a 2 minutos a 25°C. La inhibición de ésta reducción por la SOD es usada para medir la actividad del enzima.

4.1.1.11. Actividad glutatión peroxidasa (GPx)

La actividad de esta enzima se determina a 25°C, mediante un método indirecto descrito previamente (Flohé & Günzler, 1984). La glutatión peroxidasa cataliza la oxidación de hidroperóxidos, incluido el peróxido de hidrógeno, al reducir al glutatión protegiendo así a las células del estrés oxidativo. Con la excepción de la GPx fosfolípido hidroperóxido, que es un monómero, las demás GPx son tetrámeros con 4 subunidades idénticas. Cada subunidad contiene una selenocisteína en el sitio activo que participa directamente en la reducción de los electrones del sustrato enzimático. La enzima utiliza al glutatión como último donante de electrones para regenerar la forma reducida de la selenocisteína.

El glutatión oxidado (GSSG), producido sobre la reducción de hidroperóxido por la GPx, es reciclado a su estado reducido por la GR+NADPH. La oxidación de NADPH a NADP⁺ se acompaña de un descenso de absorbancia a 240 nm. La velocidad de descenso de absorbancia es proporcional a la actividad de GPx en la muestra.

El descenso de absorbancia de los pocillos muestra que debe estar entre 0.02 y 0.135 abs/min. Cuando sea necesario podemos diluir las muestras con tampón para conseguir que el descenso de absorbancia entre dentro de este rango.

Se procede posteriormente a la monitorización espectrofotométrica (Thermo Spectronic, Rochester, NY, USA) del descenso de NADPH a 240 nm durante 2 minutos, enfrentada a un blanco con un contenido igual salvo el H₂O₂. Para eliminar el descenso no enzimático se realiza otra lectura en la que la muestra se reemplaza por tampón, efectuándose dicha lectura frente a un blanco sin muestra ni H₂O₂.

4.1.1.12. Glutathion reductasa

El glutatión reducido (GSH) es esencial para la homeostasis redox del organismo. Puede sintetizarse en forma reducida, pero existen mecanismos que permiten reciclarlo. La glutatión reductasa (GR), es una enzima oxidoreductasa dependiente de NADPH, que cataliza la conversión de glutatión oxidado (GSSG) en (GSH). Así, regula la relación entre GSH/GSSG y suministra GSH para distintas enzimas, entre las que destaca la GPx, como se ha mencionado anteriormente. Contiene dos moléculas de dinucleótido de flavina y adenina (FAD) como grupo prostético, que es reducible por NADPH. La GR se encuentra ubicuamente en todos los organismos desde procariotas hasta eucariotas, incluidas plantas y mamíferos (Gill et al., 2013). La GR tiende a acumularse en las regiones celulares de alto flujo de electrones, donde se generan las especies reactivas del oxígeno. En eucariotas se encuentra en el citoplasma y dentro de los orgánulos, incluidos el núcleo y las mitocondrias. Así pues, la GR juega un papel esencial en la prevención del estrés oxidativo, de manera indirecta manteniendo los niveles de GSH intracelular, cuyo papel es crítico

como uno de los principales sistemas de defensa antioxidante y también contribuye en el mantenimiento del hierro en estado ferroso en la hemoglobina, así como en el mantenimiento de la estructura de los eritrocitos.

La actividad de la glutatión reductasa (GR) se determinó utilizando el método de Worthington y Rosemeyer (1974), basado en la oxidación de NADPH a NADP, catalizada por una concentración limitante de GR. En esta reacción, la reducción del glutatión oxidado se determinó indirectamente midiendo el consumo de NADPH espectrofotométricamente a 340 nm (Thermo Spectronic, Rochester, EE. UU) durante 2 minutos, enfrentada a un blanco con un contenido igual salvo el H₂O₂. Para eliminar el descenso no enzimático se realiza otra lectura en la que la muestra se reemplaza por tampón, efectuándose dicha lectura frente a un blanco sin muestra ni H₂O₂.

4.1.1.13. Composición corporal

La composición corporal (tejido graso y magro) fue determinada mediante resonancia magnética cuantitativa (QMR) con un analizador de composición corporal Echo MRI (Houston, TX, USA); todas las mediciones de QMR fueron hechas durante la fase de luz (9:00 a.m.- 18:00 p.m.). Los animales fueron colocados en un cilindro de plástico de paredes finas (3mm de grosor, 6.5 cm de diámetro) al que se añadió un "inserto" cilíndrico de plástico para limitar el movimiento para que se pudieran hacer las pruebas de escaneo. Mientras tanto, en el tubo, los animales se sometieron a un campo

electromagnético de baja intensidad (0.05 T) con el fin de medir grasa, masa magra, agua libre y agua corporal total. Brevemente, este sistema genera una señal que modificaba los patrones de rotación de los átomos de hidrógeno dentro del animal y hace uso de un algoritmo para evaluar los cuatro componentes medidos: masa grasa, equivalente de masa muscular magra, agua corporal total y agua libre. Los escaneos QMR fueron llevados a cabo con tiempo acumulado de 2 minutos.

4.1.1.14. Hormonas tiroideas, grelina, leptina, adiponectina e insulina

La hormona estimulante del tiroides (TSH), triyodotironina (T₃) y tiroxina (T₄) fueron determinadas mediante un panel de cuentas magnéticas tiroideo (RTHYMAG-30K Milliplex MAP), mientras que los niveles de grelina e insulina fueron determinados utilizando un panel de cuentas magnéticas de hormonas metabólicas (RMHMAG-84K Milliplex MAP). Los niveles de adiponectina fueron medidos usando el panel metabólico de adipocitos (RADPC MAG-82K Milliplex MAP), el cual se basa en inmunoensayos sobre la superficie de unas cuentas fluorescentes (microesferas), siguiendo las indicaciones del fabricante (50 resultados por cuenta, 50µL de muestra a 8000-15000 rv, durante 60 segundos, "melatonin bead set of 34").

La placa fue leída en el analizador LABScan 100 (Luminex Corp., Austin, TX, USA), usando el software xPONENT para la adquisición de datos. Las hormonas tiroideas, grelina, leptina,

adiponectina y las concentraciones de insulina en las muestras de plasma, fueron determinadas comparando la media de las muestras duplicadas con la curva patrón de cada ensayo.

4.1.1.15. Ácidos grasos no esterificados (AGNE)

Los ácidos grasos no esterificados (AGNE) son liberados de los triglicéridos por la acción de la enzima lipasa y transportados en la sangre unidos a la albúmina. Éstos sólo constituyen una proporción pequeña de la grasa corporal, sin embargo, producen una gran cantidad de energía.

Para el análisis cuantitativo de los AGNE en suero se utilizó el kit (Randox Laboratories Ltd, Crumlin, UK), 50µl de muestra de estándar y de suero fueron pipeteadas en tubos eppendorf. Después, 1 ml de la solución “R1” fue añadida a todos los tubos. Las mezclas se centrifugaron durante 5-10 segundos e incubaron a 37 °C durante 10 min. Inmediatamente después, se les añadió 2 ml de la solución “R2” y el tubo fue mezclado y reincubado a 37 °C. Tras 10 min, la mezcla fue medida a una densidad óptica de 550 nm en un espectrofotómetro (BioTek). Además, todos los parámetros, muestras de suero y muestras control o estándar fueron analizados por duplicado.

El cálculo de la concentración de ácidos grasos no esterificados se realizó a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{AGNE (mmol/L)} = (\text{absorbancia muestra/absorbancia estándar}) \times (\text{concentración estándar})$$

4.1.1.16. Minerales totales

Los minerales totales se determinaron por mineralización total de la muestra por vía húmeda de los órganos. La muestra se coloca en un vaso de precipitado, se añaden 10-12 mL de ácido nítrico concentrado (riqueza del 69%) y se tapa con un vidrio de reloj. Se coloca en un baño de arena SELECTA (Selecta, Barcelona, España) a una temperatura de 70-80°C y se espera la aparición de vapores rojizos/anaranjados de óxido nítrico. Se añaden 2 mL de nítrico a la muestra, tantas veces como se necesario hasta la aparición de vapores blanquecinos. En este momento se comienza a añadir 10 mL de mezcla nítrico/perclórico (4:1, v/v) en alícuotas de 2mL cada vez, hasta completar la mineralización. Una vez finalizada la mineralización, se deja enfriar, se filtra en papel Whatman del nº 41 (libre de cenizas), y se enrasa hasta un volumen final de 25 mL en un matraz aforado. Como resultado final obtenemos una solución transparente que emplearemos en la posterior determinación de minerales. Las concentraciones de Ca, Mg, Cu y Zn en órganos se determinaron por espectrofotometría de absorción atómica (PERKIN ELMER 1100B, Norwalk, USA) a partir de una muestra adecuada, previamente mineralizada por vía húmeda y diluida convenientemente, comparándose frente a una serie de patrones de concentración conocida. En la espectroscopía atómica se consigue que los átomos individuales de una especie interactúen con la radiación electromagnética. La concentración de P se analizó por

espectrofotometría visible mediante un kit comercial (Spinreact, Barcelona, España).

4.1.2. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Los datos se muestran como medias \pm error estándar de la media (SEM). Los análisis estadísticos se realizaron con el programa informático SPSS (versión 25.0, 2013, SPSS Inc., Chicago, Illinois). Las diferencias entre los grupos alimentados con dietas control (C) o suplementadas con propóleo (P) se evaluaron con la prueba de la t de Student. Se estableció un nivel de significación para el valor de $p < 0,05$.

4.2. ESTUDIO EN PACIENTES: EFECTO ANTIMICROBIANO

4.2.1. DISEÑO DEL ESTUDIO MICROBIANO Y APROBACIÓN ÉTICA

Se diseñó un primer ensayo clínico aleatorizado y controlado siguiendo las pautas CONSORT (Schulz et al., 2010). El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Universidad de Granada con el código de registro nº 819. Se obtuvo por escrito el consentimiento informado de todos los participantes.

4.2.2. SELECCIÓN DE PACIENTES

Los pacientes fueron seleccionados entre las primeras visitas que acudieron a admisión de pacientes de la Facultad de Odontología de Granada, entre mayo 2018 y mayo 2021. El examen que se les realizó incluía: historia clínica detallada, identificando las variables, sexo, edad,

hábitos dietéticos y tabáquicos, examen periodontal básico y consentimiento informado firmado.

Se incluyen pacientes de ambos sexos, de edad comprendida entre 40-70 años con enfermedad periodontal localizada o generalizada, estadio II grado B según clasificación de Tonetti (Tonetti et al., 2018) que quieran completar el tratamiento activo para enfermedad periodontal, que no hubieran recibido terapia periodontal activa durante los 3 meses previos y en los que se detecte más de 2 dientes con sangrado (BOP+) y profundidad de la bolsa periodontal entre 4 – 6 mm (PPD entre 4 – 6 mm). Para el recuento microbiano se recogieron las muestras antes de realizar el tratamiento periodontal (TP) y en la reevaluación al mes.

Se excluyen pacientes que no entiendan el procedimiento o no firmen el consentimiento informado, alérgicos a alguna sustancia utilizada, que estén en tratamiento psiquiátrico, con alteraciones de la coagulación, embarazadas o en periodo de lactancia. También se excluyeron del estudio los pacientes que no acudieron a la visita de reevaluación al mes.

4.2.3. PREPARACIÓN DEL EEP

El propóleo de abeja (*Apis mellifera*) no refinado se obtuvo de la zona noroeste de España (Galicia). 20 g de propóleos sin refinar (Shimadzu EB-330 EU, Japón) se trocearon y se disolvieron en 100 mL de etanol al 66% (Sigma-Aldrich, EE. UU).

La mezcla fue realizada por el laboratorio Nadiprana S.L. (Tarragona, España) se mantuvo a temperatura ambiente (25 °C) durante 28 días y

posteriormente se filtró por gravedad mediante una membrana de nitrocelulosa WhatmanR y Protran R (Sigma-Aldrich, EE. UU.)

El sobrenadante final se analizó mediante espectrofotometría ultravioleta visible obteniéndose una composición cualitativa de polifenoles totales (5882 mg/mL EEP) y flavonoides totales (360 mg/mL EEP).

4.2.4. INTERVENCIÓN

Los pacientes incluidos en el estudio se dividieron en dos grupos de manera aleatoria (test y control), mediante tabla de aleatorización realizada en la página web www.random.org

Tanto los tratamientos periodontales como las mediciones clínicas realizadas antes del tratamiento y al mes siguiente fueron realizados por el mismo operador.

En su primera visita, a todos los pacientes se les realizaron las mediciones clínicas, Índice de placa (PI), tal y como describen Silness y Løe en 1964; BOP +; PPD y CAL.

Se tomaron las muestras según protocolo descrito por el laboratorio Origen (Madrid, España) al que se mandaron para su estudio microbiológico cualitativo y cuantitativo utilizando rt-PCR para los microorganismos *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythensis*, *P. gingivalis*, *Pr. intermedia* y *T. denticola*.

Se realizó el TP con ultrasonidos durante 30 segundos en cada una de las superficies (Piezon® Master 400, EMS Swiss instrument, Perio Slim) ajustando la potencia del ultrasonido al 75% posteriormente se procedió al pulido con Perio- Set® (Intensiv S.A, Switzerland) y tazas de

goma con pasta de baja abrasividad (Kerr Hawe® España). Una vez concluido el TP propiamente dicho se procedió a irrigar el surco gingival con EEP administrado en pipetas graduadas UEETEK® de 3 ml en el grupo test y con suero fisiológico Vitulia al 0,9 % como placebo en el grupo control. (Ilustraciones 1 y 2)

No se utilizó anestesia durante el procedimiento ni ningún tratamiento antibiótico.

Transcurrido un mes se repitieron las mediciones clínicas y la segunda toma de muestras en las mismas localizaciones según el protocolo descrito previamente.

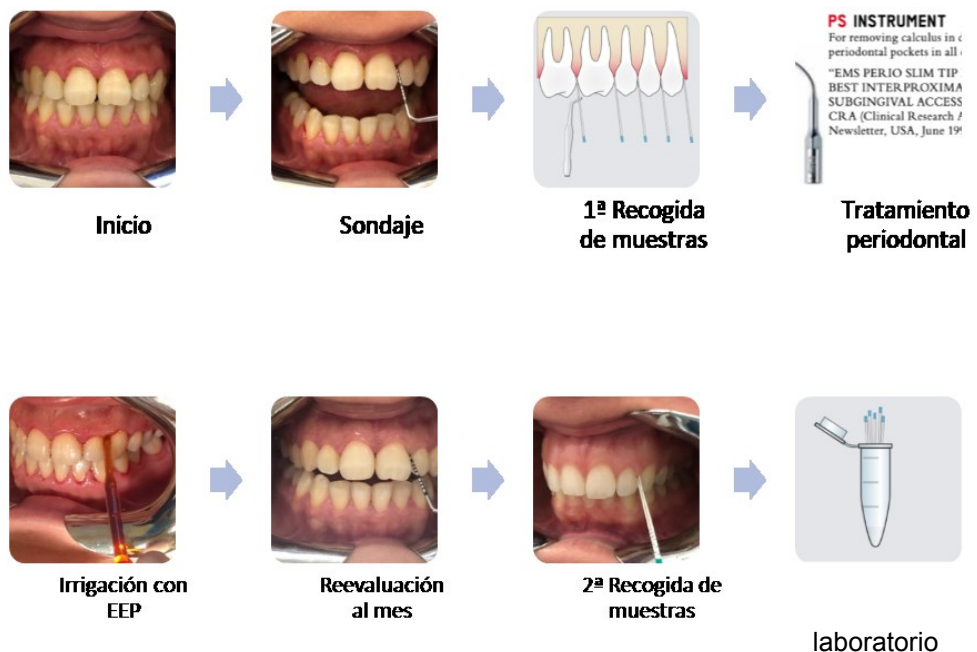


Ilustración 1. Protocolo de intervención en pacientes periodontales. Efecto antimicrobiano

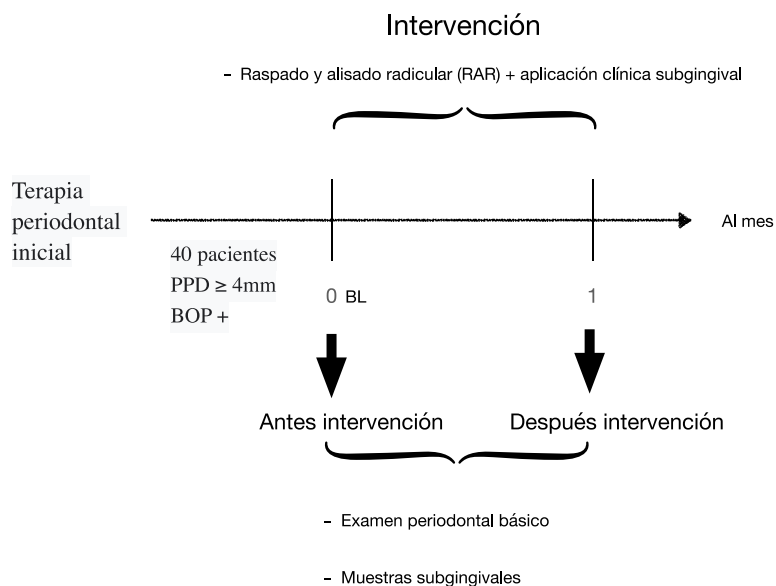


Ilustración 2. Diseño del estudio en pacientes periodontales. Efecto antimicrobiano.

4.2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se llevó a cabo mediante el programa SPSS v 24.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

Análisis univariante.

Se efectúa un resumen descriptivo de las variables objeto de estudio intra-tratamiento y entre tratamientos tanto antes como después de la intervención, mediante coeficientes de centralización y dispersión.

La normalidad de las variables fue comprobada mediante el test de Shapiro-Wilk.

Análisis bivalente.

La comparación dentro de cada tratamiento para las variables cuantitativas se realizó mediante el test de Wilcoxon. En el caso de la variable cualitativa, la comparación dentro de cada tratamiento se realizó mediante el test de McNemar. La comparación entre tratamientos para las variables cuantitativas se realizó mediante el test de Mann-Whitney. En el caso de la variable cualitativa, la comparación entre tratamientos se realizó mediante el test de proporciones de la Binomial. Asimismo, de forma gráfica y a efectos comparativos, se representan ambos tratamientos mediante gráficos de barras. En todos los test realizados se fijó el nivel de significación p en $p \leq 0,05$.

4.3. ESTUDIO EN PACIENTES: EFECTO CICATRIZANTE

4.3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO DE CICATRIZACIÓN Y APROBACIÓN ÉTICA

Se realizó un ensayo clínico aleatorizado y controlado, siguiendo las pautas Consort (Schulz et al., 2010). El protocolo fue aprobado por el Comité de Ètica en Investigación de la Universidad de Granada con el código de registro nº 819. Se obtuvo por escrito el consentimiento informado de todos los participantes.

4.3.2. SELECCIÓN DE PACIENTES

Los pacientes fueron seleccionados entre las primeras visitas que acudieron a admisión de pacientes de la Facultad de Odontología de Granada, entre mayo 2018 y mayo 2021. El examen que se les realizó

incluía: historia clínica detallada, identificando las variables, sexo, edad, hábitos dietéticos y tabáquicos, examen periodontal básico, radiografía panorámica estandarizada realizada en el Servicio de Radiología Dental de la Facultad de Odontología de la UGR y consentimiento informado firmado.

Se incluyen pacientes de ambos sexos, de edad comprendida entre 40 – 70 años con enfermedad periodontal localizada o generalizada en estadio IV, grado B según la clasificación recomendada en el último consenso la EFP para enfermedades periodontales (Tonetti et al., 2018) que presenten al menos dos dientes unirradiculares con movilidad que requieran exodoncia por pérdida ósea radiográfica con extensión al tercio medio o apical de la raíz y profundidad de sondaje mayor o igual a 6 mm, sin sintomatología, ni hubieran tomado antibióticos y/o antisépticos 15 días previos a la exodoncia. Se excluyen pacientes que no entiendan el procedimiento o no firmen el consentimiento informado, alérgicos a alguna sustancia utilizada, que estén en tratamiento psiquiátrico, con alteraciones de la coagulación, embarazadas o en periodo de lactancia. También se excluyeron del estudio los pacientes que no acudieron a las visitas de revisión a los 3, 4 y 7 días.

4.3.3. INTERVENCIÓN

Se asignarán las exodoncias según una tabla de aleatorización realizada en la página web www.random.org a dos grupos (Test y Control) en los que la única diferencia de actuación protocolizada será la aplicación tópica de una pasta orabase adicionada de propóleo al

10%, 3 veces al día durante 7 días sobre el alveolo (T) frente a la aplicación de pasta orabase (placebo) (C). El investigador que evalúe el postoperatorio estará cegado para esta asignación. Investigador y operador serán los mismos para todos los procedimientos.

(Ilustración 3)

En todos los pacientes se siguió idéntico protocolo. Anestesia articaína al 4% con adrenalina 1:100.000 (Laboratorios Normon; Tres Cantos, Madrid, España). y exodoncia simple con botador y fórceps. Los pacientes no recibieron tratamiento antibiótico ni antiinflamatorio. Los pacientes trajeron a las revisiones la cantidad de gel sobrante para confirmar su aplicación.

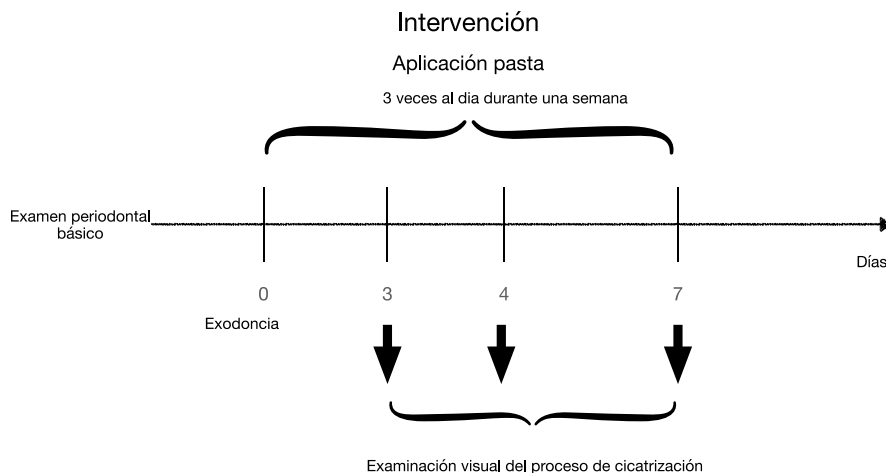


Ilustración 3. Diseño del estudio en pacientes. Efecto cicatrizante

4.3.4. SEGUIMIENTO

Durante la semana postoperatoria, los pacientes del grupo test aplicaron la pasta adicionada de propóleo 10% sobre la herida quirúrgica tres veces al día y los pacientes de grupo control aplicaron la pomada orabase (placebo) de igual forma.

Las variables de cicatrización medidas a los 3, 4 y 7 días serán las siguientes según la tabla modificada de Madrazo *et al* (Madrazo-Jiménez *et al.*, 2016).

Tabla 2. Madrazo-Jiménez 2016

CALIFICACIÓN DE LA HERIDA	BUENA	ACEPTABLE	MALA
Bordes	Estéticos, limpios	Levemente irregulares, leve sangrado o eritema	Irregulares, sangrado moderado, profuso, exudado, pus, signos de infección
Coloración mucosa	Idéntica a la circundante	Similar a la circundante	Eritematosa
Cierre	Total	Aproximación casi total de los bordes	Herida abierta. Cierre antiestético.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. ESTUDIO DE INTERVENCIÓN DIETÉTICA CON PROPÓLEO EN UN MODELO ANIMAL

Después de la ingesta de la dieta C o P, no se encontraron diferencias significativas en los parámetros hematológicos estudiados (Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros hematológicos en ratas alimentadas con dieta control o suplementada con propóleo

Parámetros hematológicos en ratas alimentadas con dieta control o suplementada con propóleo

	<i>Dieta C</i> (n=10)	<i>Dieta P</i> (n=10)
SANGRE TOTAL		
Concentración de Hb (g/L)	121,27 ± 2,81	122,35 ± 2,36
Eritrocitos ($10^{12}/L$)	7,03 ± 0,21	7,11 ± 0,32
Hematocrito (%)	40,88 ± 1,12	41,07 ± 1,26
VCM (fL)	54,38 ± 0,49	55,43 ± 0,54
HCM (pg)	19,81 ± 0,17	18,88 ± 0,43
CHCM (g/dL)	35,01 ± 0,32	34,65 ± 0,57
ADE (%)	16,31 ± 0,34	15,87 ± 0,39
Plaquetas ($10^9/L$)	761 ± 74,02	756 ± 71,21
Glóbulos blancos ($10^9/L$)	8,56 ± 0,37	8,67 ± 0,76
Linfocitos ($10^6/mL$)	7,75 ± 0,51	7,67 ± 0,63

SUERO		
Fe ($\mu\text{g/L}$)	1332 \pm 88,53	1325 \pm 58,50
TIBC ($\mu\text{g/L}$)	2677 \pm 165	2521 \pm 165
Saturación de Tf (%)	47,83 \pm 3,75	46,48 \pm 3,25
Ferritina ($\mu\text{g/L}$)	79,01 \pm 2,12	78,98 \pm 2,59
Hepcidina (ng/mL)	15,89 \pm 0,53	14,93 \pm 0,61

*Diferencias estadísticamente significativas del grupo control ($P < 0,001$; test de la t de Student).

El suplemento de propóleo indujo una reducción de la glucosa ($p < 0,01$), el colesterol total ($p < 0,001$), la GOT ($p < 0,05$) y la GPT ($p < 0,01$), en comparación con el grupo control (sin propóleo) (Tabla 4).

Tabla 4. Parámetros bioquímicos en ratas alimentadas con dieta control o suplementada con propóleo.

	Dieta C (n=10)	Dieta P (n=10)
Glucosa (mg/dL)	126,12 \pm 6,11	98,46 \pm 5,91**
Urea (mg/dL)	31,12 \pm 2,87	32,35 \pm 3,85
Creatinina (mg/dL)	0,57 \pm 0,14	0,62 \pm 0,15
Colesterol total (mg/dL)	85,3 \pm 6,2	60,1 \pm 6,9***
Triglicéridos (mg/dL)	77,61 \pm 7,23	75,8 \pm 7,54
GOT (IU/L)	125,21 \pm 9,14	103,67 \pm 10,24*
GPT (IU/L)	33,11 \pm 2,98	25,24 \pm 3,11**
Fosfatasa alcalina (IU/L)	407,54 \pm 30,24	411,12 \pm 31,76
Amilasa (IU/L)	1811 \pm 188	1875 \pm 176
Glucosa (mg/dL)	126,12 \pm 6,11	98,46 \pm 5,91**

* Diferencia estadísticamente significativa del grupo C ($p < 0,05$). ** Diferencia estadísticamente significativa del grupo C ($p < 0,01$). *** Diferencia estadísticamente significativa del grupo C ($p < 0,001$).

Tras el consumo de la dieta con suplemento de propóleo, encontramos un incremento en la actividad hepática de la SOD ($p < 0,001$), CAT ($p < 0,01$) y la GR ($p < 0,05$) en comparación con el grupo control (Tabla 5).

Tabla 5. Enzimas antioxidantes hepáticas (U/mg proteína) en ratas alimentadas con dieta control o suplementada con propóleo

	Dieta C (n=10)	Dieta P (n=10)
SOD	1,003 ± 0,185	1,956 ± 0,134***
CAT	10,123 ± 0,628	12,395 ± 0,636**
GPx	0,820 ± 0,064	0,881 ± 0,071
GR	26,445 ± 0,886	28,445 ± 0,714*

* Diferencia estadísticamente significativa del grupo C ($p < 0,05$). ** Diferencia estadísticamente significativa del grupo C ($p < 0,01$). *** Diferencia estadísticamente significativa del grupo C ($p < 0,001$).

Los reguladores endocrinos del metabolismo basal después de la ingesta de la dieta C o P, se muestran en la Tabla 6. La hormona estimulante de la tiroides (TSH), triyodotironina (T_3) y la tiroxina (T_4) no fueron diferentes tras la ingesta de las dos dietas, mientras que la grelina y adiponectina disminuyeron ($P < 0,01$ y $P < 0,05$ respectivamente) y la insulina ($P < 0,01$), la leptina ($P < 0,05$) y los AGNE ($P < 0,05$) aumentaron cuando se suministró propóleo al 2% en la dieta.

Resultados

Tabla 6. Concentración plasmática de hormonas que influyen el metabolismo basal y AGNE en ratas alimentadas con dieta control o suplementada con propóleo.

	Dieta C (n=10)	Dieta P (n=10)
TSH (pg/mL)	32,25 ± 2,27	32,05 ± 2,11
T ₃ (pg/mL)	13312 ± 395,47	13798 ± 311,15
T ₄ (pg/mL)	1335 ± 77,44	1336 ± 91,22
Grelina (pg/mL)	21,49 ± 1,43	16,63 ± 0,97**
Insulina (pg/mL)	645,14 ± 33,87	739,12 ± 37,01**
Adiponectina (ng/mL)	1335 ± 121,25	1114 ± 110,67*
Leptina (pg/mL)	1603 ± 101,12	1975 ± 112,94*
AGNE (mmol/L)	0,51 ± 0,08	0,64 ± 0,09*

*Diferencias estadísticamente significativas del grupo control ($P < 0,05$; test de la t de Student). **Diferencias estadísticamente significativas del grupo control ($P < 0,01$; test de la t de Student).

Al finalizar el tratamiento con la dieta P, el peso y la grasa corporal fueron menores ($P < 0,05$), mientras que la masa magra incrementó ($P < 0,05$) (Tabla 7).

Tabla 7. Composición corporal en ratas alimentadas con dieta control o suplementada con propóleo.

	Dieta C (n=10)	Dieta P (n=10)
Peso corporal (g)	373,22 ± 8,85	308,24 ± 7,31*
Grasa (%)	8,15 ± 0,70	7,51 ± 0,82*
Masa magra (%)	87,11 ± 1,72	91,52 ± 1,80*
Agua libre (%)	0,35 ± 0,03	0,41 ± 0,07
Agua total (%)	74,57 ± 0,51	75,32 ± 0,79

*Diferencias estadísticamente significativas del grupo control ($P < 0,05$; test de la t de Student).

La ingesta de la dieta suplementada con propóleo incrementó el depósito de calcio en bazo, pulmones, testículos y fémur ($p < 0,05$), mientras que no modificó el resto de los minerales determinados en ninguno de los órganos analizados (Tabla 8).

Tabla 8. Concentración de minerales en órganos de ratas alimentadas con dieta control o suplementada con propóleo

	Dieta C (n=10)	Dieta P (n=10)
BAZO		
Ca ($\mu\text{g/g}$)	208,15 ± 10,35	252,51 ± 26,09*
P (mg/g)	12,82 ± 0,61	12,91 ± 0,64
Mg (mg/g)	1,51 ± 0,11	1,62 ± 0,12
Cu ($\mu\text{g/g}$)	16,21 ± 0,57	16,35 ± 0,92
Zn ($\mu\text{g/g}$)	87,41 ± 3,33	85,16 ± 3,61

CEREBRO		
Ca ($\mu\text{g/g}$)	592,95 \pm 38,30	639,24 \pm 48,36
P (mg/g)	10,24 \pm 0,10	10,27 \pm 0,70
Mg (mg/g)	1,29 \pm 0,02	1,28 \pm 0,04
Cu ($\mu\text{g/g}$)	15,56 \pm 0,22	16,11 \pm 0,78
Zn ($\mu\text{g/g}$)	48,65 \pm 0,36	48,84 \pm 0,51
CORAZÓN		
Ca ($\mu\text{g/g}$)	388,35 \pm 21,50	398,52 \pm 21,37
P (mg/g)	5,50 \pm 0,22	5,89 \pm 0,19
Mg (mg/g)	1,94 \pm 0,02	2,00 \pm 0,09
Cu ($\mu\text{g/g}$)	19,13 \pm 0,47	18,68 \pm 0,62
Zn ($\mu\text{g/g}$)	60,22 \pm 1,10	61,36 \pm 1,50
PULMONES		
Ca ($\mu\text{g/g}$)	0,41 \pm 0,05	0,55 \pm 0,03*
P (mg/g)	6,03 \pm 0,72	6,14 \pm 0,28
Mg (mg/g)	1,32 \pm 0,06	1,21 \pm 0,06
Cu ($\mu\text{g/g}$)	10,42 \pm 0,91	11,12 \pm 0,84
Zn ($\mu\text{g/g}$)	61,42 \pm 2,80	62,49 \pm 2,59
TESTÍCULOS		
Ca ($\mu\text{g/g}$)	259,60 \pm 5,24	293,33 \pm 5,10*
P (mg/g)	7,64 \pm 0,29	7,70 \pm 0,23
Mg (mg/g)	1,01 \pm 0,10	1,07 \pm 0,08
Cu ($\mu\text{g/g}$)	17,68 \pm 0,80	17,70 \pm 0,96
Zn ($\mu\text{g/g}$)	145,69 \pm 2,17	143,18 \pm 2,30

RIÑONES		
Ca ($\mu\text{g/g}$)	$0,65 \pm 0,13$	$0,67 \pm 0,08$
P (mg/g)	$5,91 \pm 0,08$	$6,10 \pm 0,10$
Mg (mg/g)	$1,66 \pm 0,04$	$1,55 \pm 0,03$
Cu ($\mu\text{g/g}$)	$25,32 \pm 1,58$	$25,22 \pm 2,17$
Zn ($\mu\text{g/g}$)	$88,97 \pm 1,95$	$86,21 \pm 1,98$
FÉMUR		
Ca ($\mu\text{g/g}$)	$168,4 \pm 3,23$	$182,8 \pm 3,11^*$
P (mg/g)	$122,7 \pm 2,51$	$125,1 \pm 2,91$
Mg (mg/g)	$4,32 \pm 0,21$	$4,12 \pm 0,14$
Cu ($\mu\text{g/g}$)	$81,12 \pm 2,01$	$85,31 \pm 2,66$
Zn ($\mu\text{g/g}$)	$227,37 \pm 2,61$	$228,45 \pm 2,82$

*Diferencias estadísticamente significativas del grupo control ($P < 0,05$; test de la t de Student).

5.2. ESTUDIO EN PACIENTES: EFECTO ANTIMICROBIANO

5.2.1. RESULTADOS CLÍNICOS

De los 46 pacientes elegibles para el estudio, seis fueron excluidos por no cumplir los criterios de inclusión o declinar su participación, tras realizar la aleatorización se incluyeron veinte pacientes en cada grupo. (Ilustración 4)

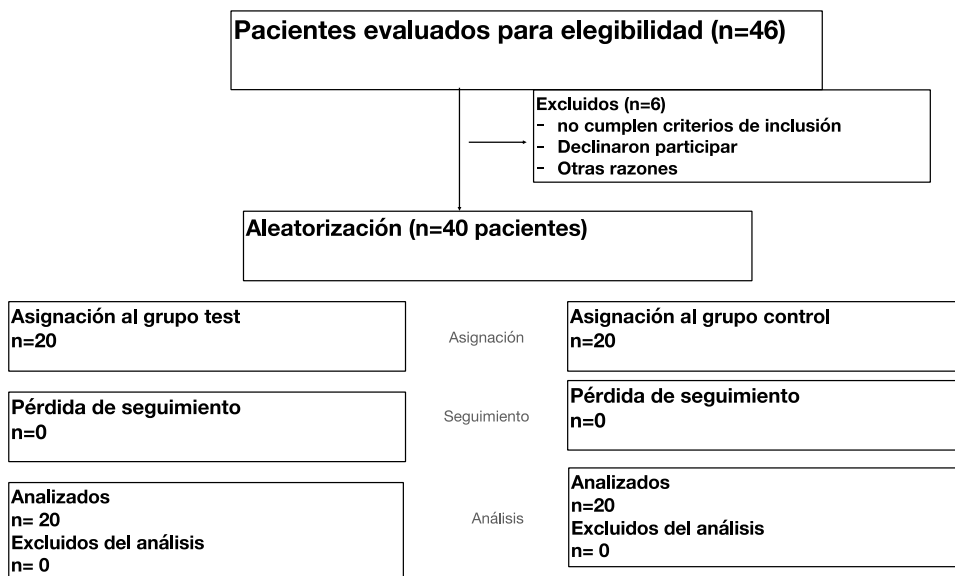


Ilustración 4. Diagrama de flujo del protocolo de estudio según las directrices de Consort.

Los resultados mostraron una mejora significativa ($p \leq 0,05$) en los parámetros clínicos estudiados intra-tratamiento, comparándolos al inicio y al mes del TP, como puede verse en la tabla 9 y Figuras 1 y 2. Aunque existió más reducción en el grupo test que en el control las diferencias no fueron significativas al comparar PPD y CAL entre tratamientos (Figuras 3 y 4).

En la revisión, transcurrido un mes del tratamiento el índice de sangrado al sondaje se había reducido significativamente ($p \leq 0,05$) en un 90% en el grupo test frente al 75% del control (Figuras 5 y 6).

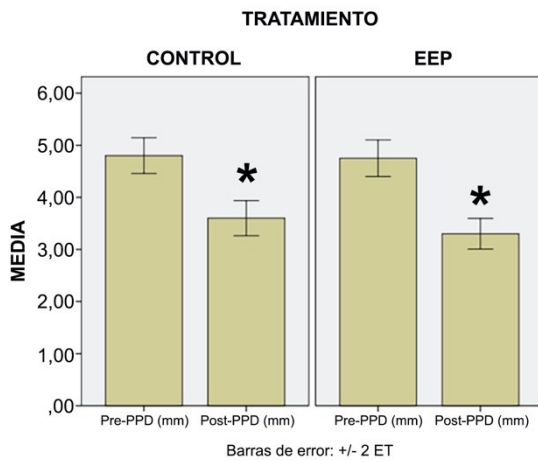


Figura 1. Profundidad de sondaje (PPD).
Intra-tratamiento. *Test de Wilcoxon.*

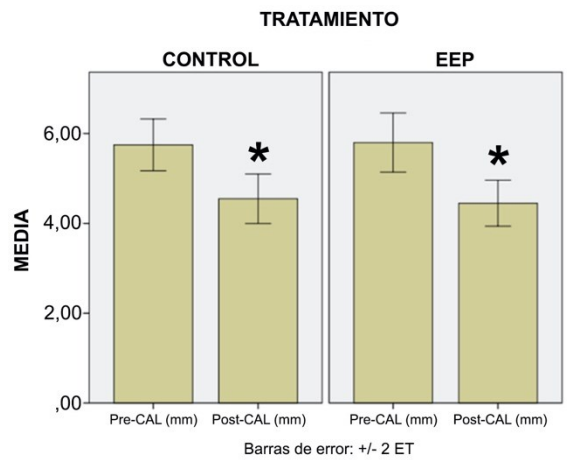


Figura 2. Nivel de inserción clínica (CAL).
Intra-tratamiento. *Test de Wilcoxon.*

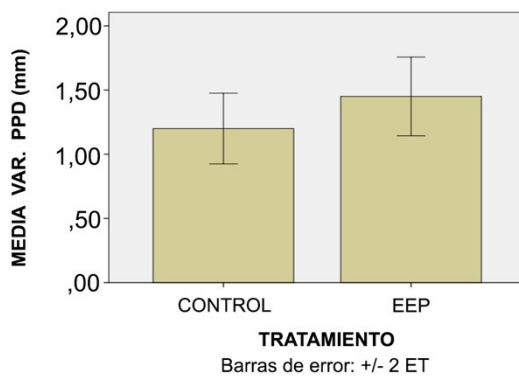


Figura 3. Profundidad de sondaje (PPD).
Entre-tratamiento. *Test de Mann-*

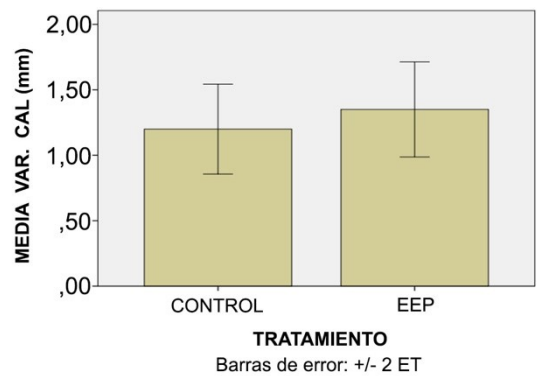


Figura 4. Nivel de inserción clínica (CAL).
Entre-tratamiento. *Test de Mann-*

Resultados

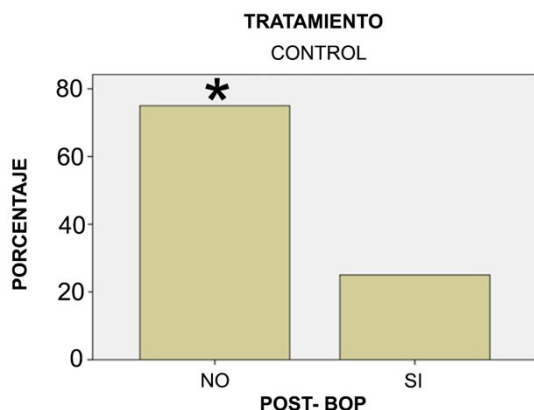


Figura 5. Porcentaje de BOP en el grupo control. Reevaluación al mes del TP. Test McNemar.

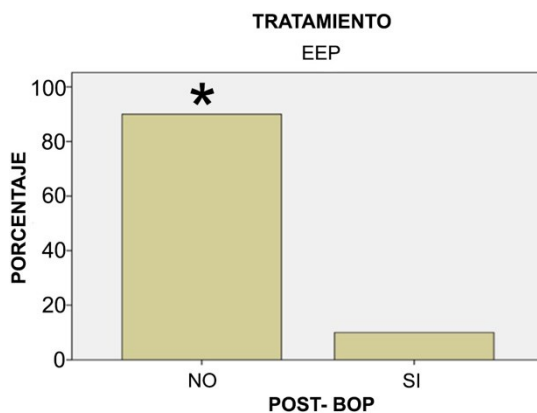


Figura 6. Porcentaje de BOP en el grupo test. Reevaluación al mes del TP. Test McNemar.

Tabla 9. Resultados parámetros periodontales antes y después del tratamiento periodontal.

	Control (n=20)			Test (n=20)		
	Media±SD	SEM	Mediana	Media±SD	SEM	Mediana
Pre-PPD (mm)	4,75±0,77	0,17	5,00	4,75±0,79	0,18	5,00
Pre-CAL (mm)	5,75±1,29	0,29	5,50	5,80±1,47	0,33	5,50
Post-PPD (mm)	3,60±0,75	0,17	4,00	3,30±0,66	0,15	3,00
Post-CAL (mm)	4,55±1,23	0,28	5,00	4,45±1,15	0,26	4,00
VAR. PPD (mm)	1,20±0,62*	0,14	1,00	1,45±0,69*	0,15	1,00
VAR. CAL (mm)	1,20±0,77*	0,17	1,00	1,35±0,81*	0,18	1,00
VAR. PPD (%)	36,42±23,01*	5,14	33,33	46,83±26,91*	6,02	33,33
VAR. CAL (%)	30,63±25,58*	5,72	25,00	31,46±18,98*	4,24	25,00

SD= desviación estándar; SEM= error estándar de la media. Significación estadística * $p \leq 0,05$

5.2.2. RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS

En ninguno de los pacientes incluidos en el estudio se detectó la presencia de *A. actinomicetemcomitans*, por lo que no se pudo observar el efecto antimicrobiano del EEP para esta bacteria. En cuanto al recuento bacteriano de las otras bacterias, al mes observamos, una reducción significativa ($p \leq 0,05$) para *T. forsthensis*, *P. gingivalis*, *Pr. Intermedia*, *T. denticola* en ambos grupos. Al comparar el porcentaje de disminución de bacterias entre los grupos para evaluar la efectividad de las sustancias irrigadas, encontramos diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en la reducción del número de colonias para *T. forsthensys* y *P. gingivalis* en el grupo test, como puede verse en la Figura 7.

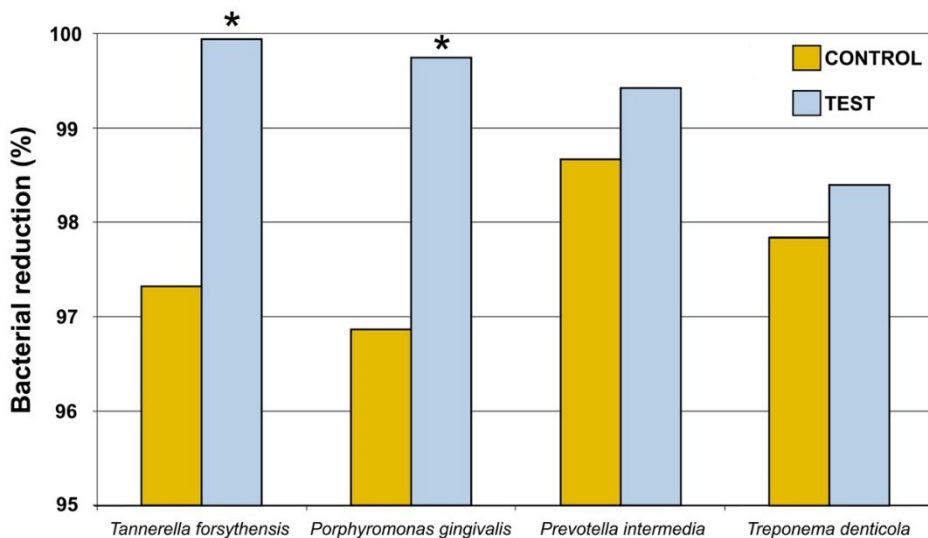


Figura 7. Resultados de la reducción bacteriana al mes del protocolo de intervención.

Resultados

5.2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

- PRUEBA DE LOS RANGOS CON SIGNO DE WILCOXON (CONTROL)

Para comparar la efectividad del grupo test frente al control, se estudió el % de disminución de bacterias mediante el test de Mann-Whitney. El resultado fue una disminución significativa para las bacterias *Tannerella forsthensis* y *Porphyromonas gingivalis*.

5.2.4. EVALUACIÓN DE SEGURIDAD Y CONTROL

No se observaron ni fueron descritos por los pacientes efectos adversos con los tratamientos realizados.

5.3. ESTUDIO EN PACIENTES: EFECTO CICATRIZANTE

Durante el período disponible para el desarrollo del estudio se realizó una selección en la que fueron elegibles 86 pacientes. Debido a los criterios de inclusión y exclusión y a la disponibilidad, solo fue posible incluir una muestra de 66 individuos de los cuales 60 sujetos (28 hombres y 32 mujeres) completaron el período de estudio, con un total de 120 alveolos analizados la pérdida de seguimiento se muestra en la ilustración 5.

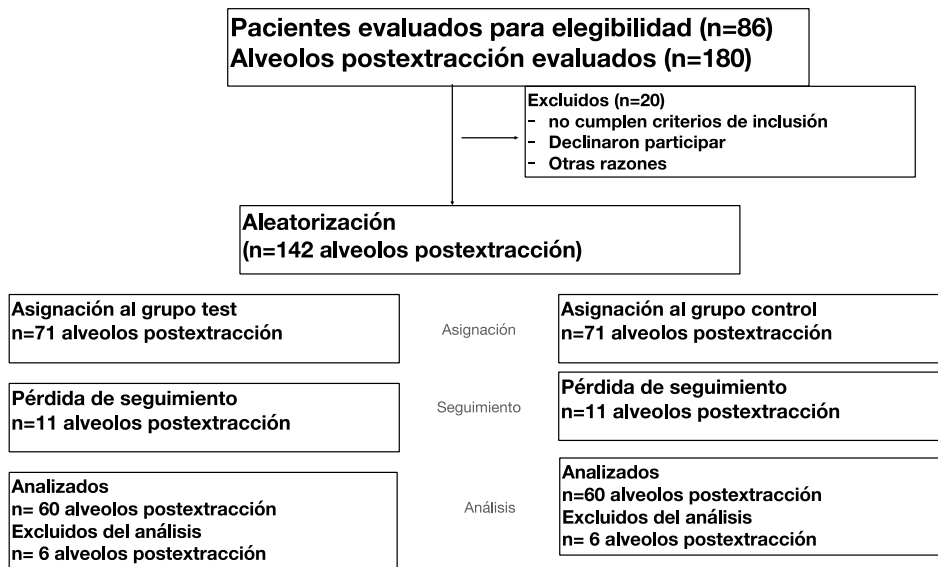


Ilustración 5. Diagrama de flujo del protocolo de estudio según las directrices de Consort.

5.3.1. RESULTADOS CLÍNICOS

Tres días después de las exodoncias la cicatrización se consideró según la tabla de Madrazo y cols “buena” en 63,3% en el grupo test frente a 13,3% en el grupo control, “aceptable” en 26,7% de los alveolos del grupo test frente a 30% del control y “mala” en un 10% del grupo test frente a un 56,7% en el control (Figura 8).

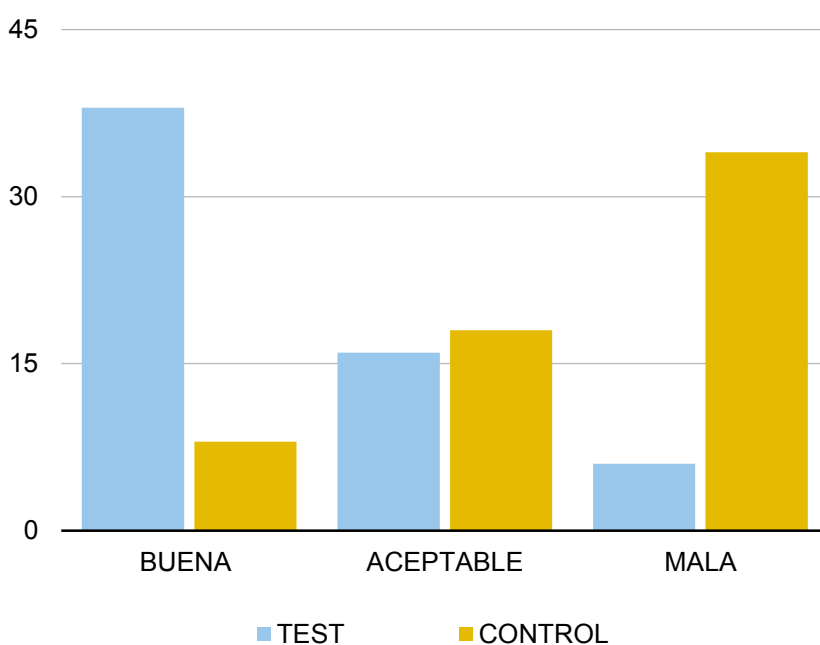


Figura 8. Resultados de la cicatrización a los 3 días.

Al cuarto día de las exodoncias la cicatrización se consideró “buena” en el 70% del grupo test frente al 23,4% del grupo control, “aceptable” un 18% frente a un 60% del grupo placebo y “mala” un 0% en el grupo test frente a un 13,3% en el grupo placebo (Figura 9).

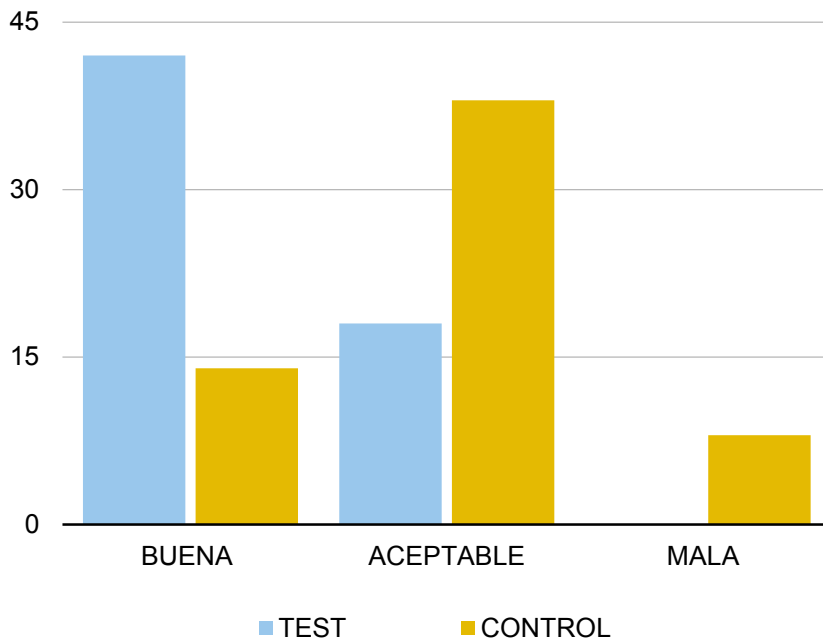


Figura 9. Resultados de la cicatrización a los 4 días

A la semana la cicatrización en el grupo control fue “buena” en el 60% de los alveolos estudiados y “aceptable” en un 40% frente a un 100% de “buena” cicatrización en el grupo test (Figura 10).

Resultados

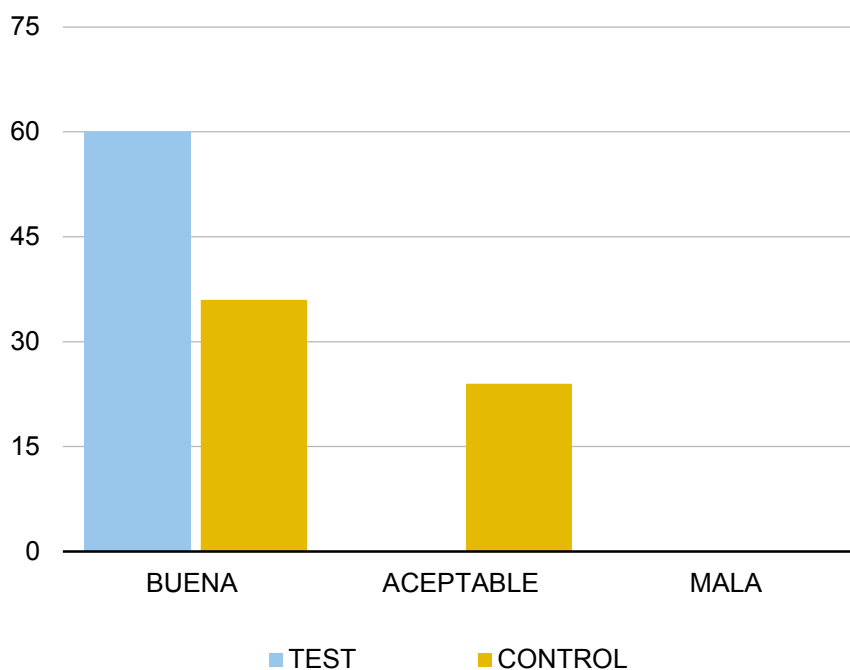


Figura 10. Resultados de la cicatrización a la semana

	Día 3			Día 4			Día 7		
	<i>n</i> (% alveolos)		<i>p-value</i>	<i>n</i> (% alveolos)		<i>p-value</i>	<i>n</i> (% alveolos)		<i>p-value</i>
	Control	Test		Control	Test		Control	Test	
Buena	8 (13.4)	38 (10)	< 0.001	14 (23.4)	42	< 0.001	36 (53.4)	60 (100)	< 0.001
Aceptable	18 (33.4)	16 (26.7)	0.096	38 (63.3)	18	< 0.001	24 (46.6)	-	< 0.001
Mala	34 (53.4)	6 (63.3)	< 0.001	8 (13.3)	-	0.03	-	-	-

Tabla 10. Resultados de la cicatrización alveolar en las 3 visitas y significación estadística en ambos grupos.

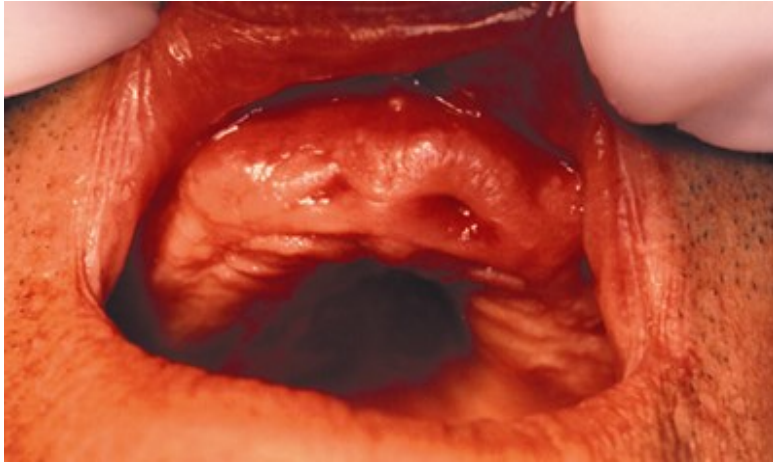


Ilustración 6 . Resultados cicatrización “buena” del alveolo 11 grupo test (pasta con propóleo 10%).

El resultado del pH de las formulaciones de pasta de propóleo (media de tres repeticiones \pm EEM) fue de $5,9 \pm 0,48$ y $6,0 \pm 0,51$ para la pasta de propóleo y la formulación de placebo, respectivamente. El análisis químico reveló que el propóleo utilizado en el estudio actual contenía $169,8 \pm 4,1$ mg GAE /100 g como fenoles totales y $32,1 \pm 1,2$ mg CE/100 g como flavonoides totales.

Discusión

6. DISCUSIÓN

6.1. DISCUSIÓN DEL ESTUDIO DE INTERVENCIÓN DIETÉTICA CON PROPÓLEO EN UN MODELO ANIMAL

En esta parte de nuestro estudio hemos observado que el suplemento de la dieta habitual con propóleo produce los siguientes efectos en nuestro modelo de animal *in vivo*:

- 1° Inflamatorio
- 2° Antioxidante
- 3° Metabólico

En relación con la actividad antiinflamatoria del propóleo, diversos estudios han demostrado que la administración pautada y controlada de propóleo en humanos y animales se asocia con mejores condiciones de salud en diversas patologías y situaciones, destacando sobre todas su actividad antiinflamatoria. Xu y cols. (2020) han propuesto que el extracto de propóleo podría reducir las reacciones inflamatorias inducidas por lipopolisacáridos, mejorar la supervivencia celular y proteger las células endoteliales aórticas de ratón (MAEC), regulando la expresión de las moléculas de adhesión endotelial ICAM-1, VCAM-1, MCP-1 (Xu et al., 2020). Estos autores identificaron al ácido p-cumárico del ácido 5-isoprenil caféico como posible responsable de esta acción. En segundo lugar, en otros estudios se han puesto de manifiesto las excelentes propiedades antioxidantes del propóleo. Así tras la ingesta

regular de diversos extractos de propóleo se han observado aumentos en las concentraciones de las dos líneas principales de la defensa antioxidante del organismo: el GSH, un tripéptido ubicuo en todas las células y la enzima SOD, la principal defensa enzimática de todas las células; paralelamente se han observado reducciones significativas en la generación celular de sustancias derivadas del ataque oxidativo de las macromoléculas, siendo relevantes: 1) las caídas observadas en la eliminación urinaria de 8-isoprostano, un marcador derivado de la peroxidación lipídica y, 2) la reducción de los niveles celulares de 8-OHdG, que es un marcador muy fiable del daño oxidativo infringido por los radicales libres al ADN en humanos, cuya reducción está asociada con una mayor capacidad de protección enzimática frente el daño redox (Diniz et al., 2020). Para dilucidar el mecanismo de los efectos antioxidantes observados determinamos la actividad de las 4 enzimas antioxidantes principales, SOD, CAT, GR y GPx, como indicadores fiables y precisos de los niveles de estrés oxidativo (Auger et al., 2015; Li et al., 2015). Nosotros hemos constatado que el suplemento dietético de propóleo aumentó significativamente las actividades de la SOD, CAT y GR, sugiriendo claramente que el tratamiento con propóleo reduce el estrés oxidativo hepático incrementando la actividad de las principales enzimas antioxidantes. Esta actividad antioxidante del propóleo podría atribuirse a su elevado contenido en polifenoles antioxidantes, principalmente fenoles y flavonoides (Bazmandegan et al., 2017). Estos resultados, en concordancia con los de otros autores, permiten sugerir que parte de los mecanismos antiinflamatorios atribuidos al propóleo podrían estar relacionados con su potencial antioxidativo, ya que son

procesos interrelacionados, y las enfermedades cardiovasculares y metabólicas tienen un estado de inflamación crónica constante relacionado con el avance de la degeneración vascular de los procesos de aterosclerosis (Forrester et al., 2018). Sabemos también que el estrés oxidativo activa la cascada inflamatoria a través de NF- κ B (potenciador de la cadena ligera kappa del factor nuclear de las células B activadas) y que esta vía es inhibida por el aumento de la enzima SOD, cuya actividad aumenta tras tratamiento con propóleo (Diniz et al., 2020).

En tercer lugar, en relación con los efectos metabólicos del propóleo, hemos observado que el suplemento del producto en la dieta de nuestro modelo experimental posee efectos metabólicos significativos ya que por una parte reduce los niveles de colesterol total y la glucemia, la actividad de las transaminasas hepáticas (GOT y GPT) y los niveles de las hormonas grelina y adiponectina; en cambio, como se ha indicado anteriormente, aumenta la actividad hepática de las principales enzimas antioxidantes; sin embargo debemos señalar que no observamos efectos significativos en ninguno de los parámetros hematológicos estudiados en el modelo de animal *in vivo*.

Diversos autores han observado tras la ingesta de propóleo incrementos significativos en los niveles de colesterol HDL en pacientes con riesgo cardiovascular y dislipidemia (Kelley et al., 2000; Mujica et al., 2017) y mejora del patrón cognitivo en pacientes con Alzheimer, asociado a una reducción de los marcadores inflamatorios (Zhu et al., 2018). Por otra parte, diversos estudios han demostrado que el propóleo es efectivo para reducir la glucemia por diferentes

mecanismos (Aga et al., 2009) han observado que el extracto de propóleo inhibe la resistencia a la insulina en cultivos de adipocitos, sugiriendo que el propóleo puede regular el metabolismo glucémico y lipídico, además de mejorar la sensibilidad a la insulina. Adicionalmente, otros estudios sugieren que el propóleo evita el desarrollo de resistencia a la insulina inducida en animales de experimentación que consumen elevadas cantidades fructosa (Zamami et al., 2007). La mejora del perfil glucémico y presión arterial inducida por el propóleo es atribuible al ácido cafeoilquínico, uno de los principales componentes bioactivos de esta sustancia natural (Mishima et al., 2005). Adicionalmente, Ueda et al, (2013) mostraron que el propóleo tiene el potencial de prevenir la hiperglucemia promoviendo la translocación del transportador GLUT4 en células del músculo esquelético.

Por otro lado, otro estudio informó que la administración de propóleo reduce la actividad de la enzima clave en la biosíntesis de colesterol, la HMG-CoA reductasa, sugiriendo así que el compuesto inhibe la síntesis hepática de colesterol (Ichi et al., 2009). Otro posible mecanismo implicado en la reducción del colesterol total podría relacionarse con los compuestos resinosos presentes en el propóleo (Salatino et al., 2011). Estos compuestos actúan como quelantes de las sales biliares en el intestino, lo que aumentaría su eliminación fecal y, en cambio, reduciría su circulación enterohepática. Esto podría dar como resultado un aumento de la síntesis de sales biliares en los hepatocitos, a partir del colesterol hepático, para compensar las mayores pérdidas fecales de sales biliares. La combinación de ambos efectos podría explicar la

actividad hipolipemiante del propóleo. En este sentido, un estudio mostró que los polifenoles del propóleo reducen los triglicéridos plasmáticos, incluso después del consumo de una dieta rica en grasas (Han et al., 2003). Además, algunos componentes del propóleo atenúan la acumulación de grasa en los adipocitos a través de la represión

del receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma (PPAR γ). Asimismo, se ha demostrado que el agonista PPAR γ aumenta la masa de tejido adiposo en ratas Wistar alimentadas con una dieta rica en grasas (Pickavance y col., 1999), lo que sugiere que PPAR γ juega un importante papel en el tejido adiposo, y su reducción por el suplemento de propóleo puede estar involucrada en la menor acumulación de grasa.

Uno de los índices más comunes para evaluar la función hepática son las transaminasas (Kew, 2000). La disminución marcada de estas dos aminotransferasas con el suplemento de propóleo indica que hay una menor liberación de las transaminasas intracelulares hepáticas a la circulación, en comparación con la dieta control (Hyder et al., 2016). Sin embargo, hay que tener en cuenta que las enzimas hepáticas GOT y GPT son marcadores frecuentemente utilizados para medir el daño hepatocelular, y aunque son muy útiles en el contexto de investigación con modelos animales, su valor es limitado cuando se estudia el efecto de una intervención en hígados no patológicos. En este sentido, sería interesante validar cambios en los valores de estas enzimas en un modelo experimental de daño hepatocelular. Este trabajo pretende servir de modelo experimental basal para futuras

líneas en las que evaluar el efecto del suplemento dietético de propóleo en situaciones patológicas tales como la esteatosis o hiperlipidemia.

Adicionalmente a los efectos metabólicos descritos hasta ahora, debemos resaltar que el suplemento de propóleo en la dieta al 2% aumenta la capacidad lipolítica en el tejido adiposo y disminuye la síntesis de lípidos, reduciendo también los niveles circulantes de dos hormonas clave en la homeostasis lipídica y metabólica: la adiponectina y la grelina, hecho que puede explicar no solo la mejora de la composición corporal observada en los animales, sino la disminución de la adiposidad y el aumento de la tasa de secreción de insulina, ya que esta hormona actúa sobre el sistema melanocortinérgico hipotalámico. Este efecto inhibitor del propóleo sobre la secreción de adiponectina y grelina nos parece sumamente importante, y coherente con los resultados de nuestro estudio sobre composición corporal.

Varios autores han demostrado que la grelina actúa en la pituitaria anterior, los islotes pancreáticos, la glándula tiroides, el corazón y varias regiones del cerebro (Janas-Kozik et al., 2006); además, estimula el apetito, posiblemente a través de la activación de circuitos nerviosos orexigénicos, en coherencia con los efectos observados en los niveles plasmáticos de grelina y otros péptidos neuroactivos, y la estimulación lipolítica independiente de la ingesta de alimentos, ya que se controló esta ingesta mediante *pair feed*, que en conjunto conducen a un aumento del peso corporal y la adiposidad. Los efectos de la grelina, más allá de los efectos que posee sobre la regulación del apetito y de la secreción de hormona del crecimiento (GH), incluyen la regulación de la

motilidad intestinal, el ritmo de sueño-vigilia, la sensación de sabor, el comportamiento de búsqueda de recompensas y la regulación del metabolismo de la glucosa, mejorando la resistencia a la insulina y la diabetes mellitus tipo II (Poher et al., 2018). Por otra parte, en nuestro estudio hemos observado que el suplemento de propóleo en la dieta redujo, además de la grelina, los niveles circulantes de la adiponectina, una adipocitocina clave en la homeostasis energética y en la sensibilidad celular a la insulina, los cuales se correlacionan inversamente con el grado de adiposidad (Raff et al., 2001), lo que podría contribuir a explicar la reducción de masa grasa observada por nosotros, ya que la adiponectina es producida por el tejido adiposo, y su producción es proporcional a la cantidad del mismo.

La disminución de grelina y adiponectina, y el aumento de las concentraciones plasmáticas de leptina tras la suplementación con propóleo podría inducir una disminución del apetito. Además, en concordancia con otros estudios (Lavoie et al., 2009), existe una asociación inversa entre la adiponectina circulante y las concentraciones de AGNE en plasma, lo que indica un incremento de la capacidad lipolítica en los depósitos adiposos inducida por el suplemento de propóleo; todo ello influye en la composición corporal, disminuyendo la masa grasa y por lo tanto, la secreción de adiponectina y grelina (Salmerón et al., 2015).

La grelina inhibe la secreción de insulina (Reimer et al., 2003; Tong et al., 2010), mejorando así la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos (Sun et al., 2006) Más allá de su papel como regulador negativo de la secreción de insulina, la grelina también parece tener

efectos protectores sobre las células β en condiciones de diabetes tipo I (Irako et al., 2006).

El propóleo también aumentó la tasa de secreción de insulina por otros mecanismos independientes de la grelina. Varios estudios han evaluado los efectos del propóleo sobre el nivel de insulina sérica en modelos animales de diabetes inducida por estreptozocina. Dado que la estreptozocina destruye las células β -pancreáticas, los niveles de insulina en sangre disminuyen notablemente. En este sentido, extractos etanólicos de propóleo (300 mg/kg/día) protegieron parcialmente la deficiencia de insulina inducida por estreptozocina, mejorando la sensibilidad a la insulina y función de células β pancreáticas (Nna et al., 2018). El propóleo es capaz de prevenir la destrucción de las células β pancreáticas por varios mecanismos. Los flavonoides son capaces de neutralizar y eliminar especies reactivas del oxígeno (EROs), y uno de éstos, la quercetina, protege a las células β del daño oxidativo (El Rabey et al., 2017). De hecho, se ha descrito que la quercetina (15 mg/kg/día durante 4 semanas) recuperó parcialmente la deficiencia de insulina inducida por estreptozocina en ratas (Coskun et al., 2005).

Junto con la eliminación de EROs en el páncreas, el propóleo tiene un efecto directo en el mecanismo de secreción de insulina. Las células β pancreáticas promueven la secreción de insulina en respuesta a la arginina. La arginina interactúa con su complejo diana para la secreción de insulina en el retículo endoplásmico de las células β . El propóleo fue capaz de mimetizar los efectos de la arginina en líneas celulares β pancreáticas NIT-1. El propóleo (0.01%) mostró un efecto más

prominente en la secreción de insulina en comparación con la arginina, lo que sugiere que involucra efectos estimulantes sobre la secreción de insulina adicionales que no han sido descritos. (Umeda et al., 2015). Los mismos autores también demostraron que la administración de propóleo aumentó la concentración de insulina circulante en ratones no diabéticos, junto con una disminución de la glucosa en sangre. Varios compuestos químicos presentes en el propóleo mejoran de forma independiente la tasa de secreción de insulina. El ácido caféico (15-30 mg/kg 5 semanas) mejoró significativamente el nivel de insulina en ayunas y la tolerancia a la glucosa en ratones tratados con estreptozocina (Nie et al., 2017). La crisina (100 mg/kg/día, durante 30 días) también mejoró la señalización de la insulina (Satyanarayana et al., 2015). También, otros compuestos como la galangina (10–80 M) y la pinocembrina (1–4 M) mejoraron la resistencia a la insulina y potenciaron la acumulación de glucógeno inducido por insulina en células HepG2 resistentes a la insulina (Y. Liu et al., 2018).

Por otra parte, el suplemento de propóleo en la dieta produjo otros efectos metabólicos importantes en nuestro modelo animal: causó una reducción de peso corporal y del volumen de tejido adiposo visceral, mejorando así la masa magra. Se sabe que el incremento de los lípidos plasmáticos causa obesidad y resistencia a la insulina, y que el perfil lipídico se ve afectado por la dieta y órganos reguladores como el hígado, tejido adiposo y músculo. Estudios previos (Koya-Miyata et al., 2009) en ratas han informado que el propóleo reduce significativamente la actividad de la enzima ácido graso sintasa en los grupos tratados con extracto de propóleos, sugiriendo que uno de los

mecanismos responsables del efecto inhibitorio en la acumulación de tejido adiposo visceral es la disminución de la síntesis de ácidos grasos. Diversos estudios han demostrado un papel crucial de las células inmunes del tejido adiposo en inflamación crónica, y en el desarrollo del síndrome metabólico. Se ha demostrado que las células inmunes T CD4+, células T CD8+, células T reguladoras y los eosinófilos, contribuyen a la diferenciación de macrófagos inflamatorios y, en este sentido, Kitamura y col. (2013) propusieron que el propóleo mejora los niveles de glucosa en sangre y colesterol plasmático a través de su efecto sobre las células inmunes del tejido adiposo (Kitamura et al., 2013). Sakai y col. (2017) mostraron que la infiltración reducida de las células inmunes en el tejido adiposo resulta en la reducción de la acumulación de grasa y/o atenuación de la ganancia de peso corporal durante el tratamiento con propóleo en ratones (Sakai et al., 2017). En este estudio, el peso y el contenido de grasa de las heces de ratones tratados con propóleo se incrementó en comparación con los de las heces de ratones que no recibían este compuesto. El propóleo contiene una variedad de compuestos químicos, principalmente polifenoles, que pueden explicar la disminución de la adiposidad encontrada. Se ha demostrado que el ácido ferúlico promueve pérdida de peso en ratas y mejora la glucemia en ratones alimentados con una dieta alta en grasas (Son et al., 2011; Totani et al., 2012). Otro polifenol, el kaempferol, mejora la hiperglucemia, hiperinsulinemia y el perfil lipídico (Luo et al., 2015); a su vez, el ácido p-cumárico incrementa la expresión de carnitina, mejorando el metabolismo lipídico hepático (Xie et al., 2014). A pesar de que el propóleo tiene un alto contenido de resinas (S. Huang

et al., 2014), y de que estos compuestos reducen -por su efecto quelante- la absorción de los minerales de la dieta, no hemos observado efectos adversos sobre los niveles plasmáticos o el metabolismo de los minerales estudiados en nuestro estudio; de hecho, hemos constatado una mejora en el depósito de calcio en órganos diana. El aumento del depósito de calcio en bazo, pulmones, testículos y fémur, puede deberse a la mayor digestibilidad del calcio en los animales alimentados con el suplemento de propóleo, que como se ha publicado previamente (Haro et al., 2000) contiene aminoácidos libres como lisina, aspartato, glutamato y ornitina, que favorecen la absorción del calcio. Otro mecanismo que explica el mejor depósito de calcio en órganos diana es su contenido en ácido 4-hidroxi-benzoico que favorece la solubilidad del calcio de la dieta, aumentando así la absorción de este mineral (Claycombe et al., 2000).

Por último, la mejora de la composición corporal también puede atribuirse a la mejora de la homeostasis del calcio asociada al suplemento de propóleo. Se ha demostrado que en sujetos obesos existe un aumento de la unión del calcio a las proteínas plasmáticas en lugar de la unión a proteínas transportadoras de calcio. El calcio intracelular ionizado desempeña un papel clave en la regulación del metabolismo de los adipocitos al modular las reservas de triglicéridos. Debido a que las hormonas calciotrópicas regulan el calcio intracelular, la supresión de estas hormonas cuando aumenta la biodisponibilidad de calcio, redirige la energía de la dieta desde el tejido adiposo hacia la masa magra corporal y la termogénesis (Papakonstantinou et al., 2003; Xue et al., 2001), y también el calcio de la dieta en el tracto

gastrointestinal conduce a la precipitación de jabones insolubles de ácidos grasos que hacen que la grasa esté menos disponible para la absorción (Papakonstantinou et al., 2003). Además, varios estudios (J. M. G. Gomes et al., 2015; Júnia Maria Geraldo Gomes et al., 2017; F. Zhang et al., 2018) han demostrado que el suplemento de calcio en la dieta produce efectos beneficiosos sobre la reducción del peso y grasa corporal, y sobre la homeostasis de la glucosa en ratones y humanos.

6.2 DISCUSIÓN DEL ESTUDIO EN PACIENTES: EFECTO ANTIMICROBIANO

La mayor destrucción de tejido periodontal observada en los pacientes periodontales es mediada por el sistema inmunológico del huésped, pero generalmente iniciada por bacterias y sus subproductos tóxicos.

Aunque existen variaciones relacionadas con la zona geográfica, raza, edad y sexo entre otros, las bacterias anaerobias estrictas que se presentan en mayores proporciones en la periodontitis, considerándose además las más patógenas, son *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsthensis* y *Treponema denticola* (Socransky et al., 1998; Tomšič et al., 2021). En este sentido nuestros resultados muestran una acción bactericida significativa del EEP sobre *P.gingivalis* y *T. forsthensis* ($p \leq 0,05$) transcurrido un mes de la terapia periodontal con irrigación subgingival de EEP. La *P.gingivalis* es un patógeno clave en el desarrollo de la enfermedad periodontal capaz de convertir una microbiota benigna en una disbiótica (Hajishengallis et al., 2012) y se

considera el segundo patógeno más detectado en los estudios periodontales (76%) manteniendo sus recuentos similares entre los diferentes grados y estadios de enfermedad periodontal (Alazemi et al., 2020; Tomšič et al., 2021). El hecho de que las concentraciones de *P. gingivalis* aumenten con la edad cuando los sistemas defensivos REDOX del paciente están más disminuidos hace que tenga especial importancia el papel bactericida del EEP junto con su potencial antioxidante.

Nuestros resultados coinciden con los de Yoshimasu et al., (2018) quienes describen cómo casi todas las cepas de *P. gingivalis* a distintas concentraciones (1×10^4 – 1×10^6 CFU/mL) fueron eliminadas *in vitro* con el uso de EEP de manera dosis-dependiente. Sus estudios muestran que el EEP desencadenó inmediatamente el desarrollo de ampollas aberrantes y eventos de fusión en la superficie bacteriana, concretamente señalan al ácido ursólico como el compuesto con mayor acción bactericida por su alta permeabilidad para afectar el potencial de la membrana bacteriana, debido a su naturaleza altamente lipofílica. Palombo (2011), describe que el EEP inhibe el crecimiento de patógenos orales, reduciendo el desarrollo de biopelículas y la placa dental, disminuyendo la adhesión de bacterias a las superficies y reduciendo los síntomas de las enfermedades orales.

Otros autores, como Santos et al., (2002) han evaluado la susceptibilidad de *P.intermedia* y *P. gingivalis* frente a los antimicrobianos tradicionalmente utilizados en la consulta dental, y han comprobado que todas las cepas estudiadas fueron susceptibles al EEP,

incluso las cepas de *P. intermedia* que mostraron resistencia a la clindamicina y a la tetraciclina.

Akca *et al.*, (2016) obtienen un efecto bactericida mayor del EEP respecto a la CHX para *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *P. intermedia* y *C. albicans* siendo mayor el efecto de la CHX contra *S. aureus* y *A. actinomycetemcomitans*. En un reciente estudio Bapat *et al.*, (2021) concluyen que el propóleo es tan eficaz como la CHX en la reducción bacteriana frente a *L. acidophilus* y *S. mutans*. Aunque la eficacia antimicrobiana de la CHX frente a todas estas especies periodontopatógenas está sobradamente probada, también existen evidencias recientes de sus efectos adversos sobre distintos parámetros celulares. Por ello se han evaluado concentraciones menores de CHX que mantengan su efectividad y minimicen los riesgos de citotoxicidad (Mariotti & Rumpf, 1999). Liu *et al.*, (2018) describen que la concentración de CHX (2%) utilizada clínicamente detiene de forma permanente la migración celular y reduce significativamente la supervivencia de fibroblastos, mioblastos y osteoblastos.

A este respecto, el propóleo se revela menos tóxico para fibroblastos humanos que la CHX. La seguridad del propóleo está comprobada no sólo por su larga historia de uso en la medicina popular, sino también por estudios de evaluación de seguridad *in vitro* e *in vivo* (Sforcin, 2016), por lo que parece ser una alternativa válida a antimicrobianos convencionales para ser utilizado como coadyuvante en las terapias periodontales. El uso de preparaciones estandarizadas de propóleos es seguro, menos tóxico que muchas otras preparaciones sintéticas que usamos habitualmente y mejora los resultados del tratamiento

periodontal como demuestran nuestros resultados coincidiendo con dichos autores (Björkner, 1994; Nakao et al., 2020) (López-Valverde et al., 2021).

En nuestro estudio encontramos en la revisión realizada al mes una reducción de la profundidad media de las bolsas al sondaje de 46,83% del grupo test frente al 36,42% en el grupo control (tabla 9). Un reciente metaanálisis (López-Valverde et al., 2021) concluye coincidiendo con nosotros que el propóleo, reduce las profundidades de bolsa periodontal al sondaje, en comparación con el tratamiento en el que se aplicó placebo junto al tratamiento periodontal.

Giammarinaro et al., (2018) no encontraron diferencias significativas clínicas entre el grupo control y el experimental al comparar la aplicación de propóleo frente a CHX en PPD, BoP e IP. Sin embargo, los pacientes tratados con propóleo en ambos estudios obtuvieron mejores resultados en cuanto a marcadores de estrés oxidativo en la saliva y mejoras considerables en su salud periodontal con respecto a la profundidad de sondaje y sangrado. Wei et al., (2010) estudiaron la relación entre el estrés oxidativo en la saliva y la progresión de la enfermedad periodontal. La saliva es el primer fluido biológico que contiene radicales libres de los alimentos consumidos. La literatura muestra que las enzimas antioxidantes glutatión y superóxido dismutasa dentro de la célula y antioxidantes de bajo peso molecular como el ácido ascórbico, α -tocoferol y β -caroteno en el líquido extracelular tienen efectos protectores sobre la célula (Ahmadinejad et al., 2017). En pacientes con enfermedad periodontal los niveles de la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y la catalasa que han

sido estudiados en el líquido gingival, la saliva y el suero sanguíneo se encuentran disminuidos como describen Lourido Pérez *et al.*, (2009). Es aquí donde adquieren especial relevancia nuestros resultados en animales (Lisbona-González *et al.*, 2020) ya que se muestra el aumento de estos sistemas enzimáticos antioxidantes con la administración de un suplemento dietético de propóleo que podría compensar la disminución que se evidencia en los pacientes periodontales.

Miricescu *et al.*, (2014) también muestran niveles elevados de estrés oxidativo con pérdida de hueso alveolar en la saliva de pacientes con EP, sugiriendo que existen más probabilidades de desequilibrio en las reacciones REDOX a consecuencia de su periodontitis. En estudios con animales Aghel *et al.*, (2014) sugieren que el propóleo podría prevenir la reducción de los niveles de antioxidantes en la saliva en ratas irradiadas.

En cuanto a las localizaciones con sangrado, obtuvimos una disminución significativa del 90% en el grupo test frente a un 75% en el grupo control (figuras 9 y 10). La ausencia de sangrado es considerada como el indicador de estabilidad periodontal (Lang *et al.*, 1990) por ello la importancia de conseguirla en los controles de los pacientes que siguen mantenimiento periodontal. Coincidimos por tanto con autores como Coutinho, (2012); y Sanghani *et al.*, (2014) quienes encuentran una mejora de los parámetros biológicos y clínicos en los tejidos periodontales tras utilizar EP en la terapia periodontal. Anauate-Netto *et al.*, (2014) informaron también de una reducción en la inflamación gingival y de la profundidad de sondaje en pacientes tratados con enjuagues bucales con solución de propóleo en comparación con los

que usaban colutorios con CHX o solución salina al 0,12%. Andrade *et al.*, (2017) utilizan, como en nuestro estudio, una solución hidroalcohólica de propóleo al 20 % evidenciando una mejora significativa en los resultados clínicos medidos en reducción de sondaje que se mantienen a los 90 días tras el tratamiento.

A falta de aumentar el número de pacientes en los ensayos clínicos y realizar un seguimiento a largo plazo, los resultados presentados sugieren que, además de utilizarse como agente de irrigación durante el TP, el EEP podría funcionar como un enjuague bucal antimicrobiano natural y confiable, que evite los efectos secundarios de la CHX. En este sentido se ha descrito que un protocolo postoperatorio que incluya CHX al 0.05% y extracto de hierbas puede tener el potencial de mejorar el cumplimiento de la pauta durante el mantenimiento postoperatorio ya que las tinciones y la alteración del gusto que refieren los pacientes que utilizan sólo colutorios con CHX son significativamente mayores que los que lo usan suplementado con extractos naturales, pudiendo ser una alternativa el usar colutorio con CHX con propóleo añadido (Ramseier *et al.*, 2016).

Esta formulación permite su uso mantenido en el tiempo, y teniendo en cuenta que la recolonización bacteriana tras el TP se produce entre los 3 y 6 meses (Magnusson *et al.*, 1984; Sbordone *et al.*, 1990), podría asegurarse el mantenimiento de un entorno microbiano no patógeno a largo plazo.

Como suplemento dietético el propóleo, a la vista de nuestros resultados preclínicos en los que comprobamos su acción antioxidante,

podría constituir un refuerzo de la terapia periodontal en el gabinete dental.

Varios estudios han demostrado el efecto positivo del propóleo en la reducción de los niveles de marcadores inflamatorios tras su ingesta concluyendo en una reducción estadística y clínica significativa de los niveles séricos de PCR y TNF- α después de la ingesta de propóleo (Jalali et al., 2020).

El Sharkawy et al. (2016) en su ECA administró suplementos de 400 mg de propóleo durante 6 meses a pacientes periodontales con diabetes mellitus tipo II. Los resultados fueron una reducción de la glucemia basal además de una reducción de profundidad en el sondaje y ganancia del nivel de inserción clínica significativa respecto del control.

En un reciente metanálisis también concluyeron que la ingesta de propóleos reduce significativamente el nivel de glucosa basal y la hemoglobinaA1c séricos en pacientes diabéticos, pero no altera la insulina sérica y ni el modelo homeostático para la resistencia a la insulina (HOMA-IR) (Mosallanezhad et al., 2021).

Los pacientes diabéticos tienen una alta concentración de albumina glicosilada que aumenta la respuesta proinflamatoria de los fibroblastos gingivales humanos al lipopolisacárido de *P. gingivalis* (Bender et al., 2020) dado el efecto antimicrobiano del EEP hacia *P. gingivalis* descrito en nuestros resultados podría ser uno de los motivos de la mejora de los parámetros clínicos periodontales.

Teniendo en cuenta que en los pacientes diabéticos la presencia de *P. gingivalis*, *A. actinomycetocomitans* y *Campylobacter spp* son más frecuentes y la pérdida de inserción es tres veces mayor que en los no

diabéticos estos suplementos dietéticos de propóleo tienen una gran aplicación clínica para ellos.

Si bien en los últimos años ha habido un aumento en las aplicaciones del propóleo, a partir de estos resultados y del conocimiento de sus propiedades en general, merece la pena impulsar la investigación y el desarrollo de nuevos productos que incorporen propóleo en el campo de los productos terapéuticos dentales.

6.3. DISCUSIÓN DEL ESTUDIO EN PACIENTES: EFECTO CICATRIZANTE

Nuestros resultados muestran diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre el grupo control y el grupo test en la cicatrización alveolar tras exodoncias en pacientes periodontales, en los tres momentos en los que se mide este parámetro (figuras 8, 9 y 10) (tabla 10).

Se ha descrito en la literatura la capacidad cicatrizante y antiulcerosa del propóleo, que se relaciona de forma directa con sus propiedades antiinflamatorias (Al-Shaher et al., 2004)(Song et al., 2008)(Paulino et al., 2008). Estos efectos se deben a su composición química, que varía según su origen y la estación del año (Moreno et al., 2000) (Teixeira et al., 2010). El propóleo tiene propiedades antiinflamatorias que aceleran el proceso de cicatrización y es muy utilizado. (Al-Shaher et al., 2004)(Song et al., 2008)(Paulino et al., 2008). Aunque la composición química es diferente entre distintas procedencias, hay autores que coinciden con nuestros resultados en cuanto al análisis del grupo fenólico y flavonoides totales, y que la capacidad antioxidante y antiinflamatoria es similar en todos los propóleos.

Según Song *et al.*, (2008), el ácido caféico es uno de los compuestos responsables de la acción antiinflamatoria y la aceleración de la cicatrización de las heridas quirúrgicas, concluyendo que este ácido inhibe significativamente la hidrólisis del ácido araquidónico y la producción de prostaglandina E₂ que son potentes mediadores inflamatorios (Egozi *et al.*, 2003) así como la liberación de histamina por los mastocitos en cultivos celulares. Las aplicaciones del propóleo se han evaluado de forma preliminar en el tratamiento de una variedad de afecciones inflamatorias y ulcerativas con bajas tasas de efectos secundarios (Curuțiu *et al.*, 2020)(Cosola *et al.*, 2019). En el tratamiento de las úlceras bucales es una terapia tradicional utilizada en el Medio Oriente (Samet *et al.*, 2007) donde los pacientes que tomaron una cápsula de 500 mg de suplemento diario de propóleo mostraron una disminución estadísticamente significativa en la frecuencia de brotes de estomatitis aftosa recurrente.

En la literatura científica se encuentran disponibles algunos estudios *in vitro* e *in vivo* en los que el propóleo, en varias formulaciones, ha demostrado actividad frente a patógenos periodontales (R. T. Gomes, s.f.; F. A. Santos *et al.*, 2003; Sonmez *et al.*, 2005) atribuyendo su propiedad antimicrobiana a la presencia de flavonoides, ácidos fenólicos y sus derivados en su composición (Przybyłek & Karpiński, 2019). El ácido caféico, el ácido benzoico y ácido cinámico, probablemente actúan sobre la membrana microbiana o la superficie de la pared celular, provocando daños estructurales y funcionales (Ozan *et al.*, 2007) en las bacterias siendo éste su posible mecanismo de acción bactericida.

Una reducción del número de microorganismos en la placa dental se traduce en una disminución de los factores de virulencia que éstos producen (Shabbir *et al.*, 2016). Las bacterias periodontopatógenas dan lugar a una destrucción tisular masiva además de activar los mecanismos defensivos del huésped, creando un infiltrado inflamatorio con potente actividad catabólica que da lugar a un aumento en el tiempo de cicatrización de los tejidos (Kato *et al.*, 2013).

Si tenemos en cuenta esto y el estado periodontal presente antes de la exodoncia en pacientes periodontales entenderemos el porqué del retraso en el proceso de cicatrización en el grupo control, ya que son pacientes muy susceptibles a la infección por la patología periodontal preexistente. Al aportar la pasta con propóleo usada en el grupo test un efecto antiinflamatorio, antioxidante, antibacteriano y cicatrizante que permite una mayor rapidez en la restitución del tejido impidiendo una sobreinfección y favoreciendo la cicatrización. Las exodoncias unirradiculares son procedimientos quirúrgicos simples pero implican un trauma inherente debido a la manipulación de los tejidos blandos orales, el hueso alveolar y el diente. Aunque la técnica es atraumática, siempre implica una reacción inflamatoria que probablemente se redujo para los pacientes del grupo test en los que se aplicó la pasta con propóleo ya que ésta además ayudó a la estabilización del coágulo observando que el recubrimiento mucoso se realizó antes que en el grupo control (tabla 10).

Además, se ha investigado previamente que el propóleo modula la expresión de proteínas enzimáticas antioxidantes, induciendo una captación directa de radicales libres, promoviendo la reparación del

ADN y provocando una reducción de los peróxidos que pueden dañar los ácidos grasos poliinsaturados, previniendo la peroxidación lipídica y daño tisular (Lisbona et al., 2013)(Lisbona-González et al., 2020), hecho que también puede explicar el mejor proceso de curación con la pasta de propóleo.

Scheller y Krol *et al.*, (1996) demostraron en sus estudios con células embrionarias que uno de los posibles mecanismos de acción podría ser la presencia en el propóleo de Fe y Zn elementos esenciales para la síntesis de colágeno estimulando así el metabolismo celular, la presencia de aminoácidos como la arginina y la prolina son importantes para la estimulación de la mitosis celular y como sustancia imprescindible para la síntesis proteica constituyendo así un acelerador en el proceso de cicatrización.

Lo que parece claro es que no es un componente individual el responsable de su actividad biológica, parece darse una acción combinada, lo que hace que el propóleo tenga un rendimiento biológico tan diverso.

Los efectos sinérgicos de diferentes compuestos parecen ser la razón más importante para explicar la actividad antibacteriana y cicatrizante del propóleo, ya que está bien establecido que un solo componente del propóleo no tiene una actividad mayor que los otros componentes del propóleo (F. A. Santos et al., 2003). Por ello empleamos propóleo puro adicionado a la pasta base, que permite la máxima adherencia de los principios activos sobre las superficies orales, además de una liberación prolongada en la cavidad bucal. Esta forma de administración sella el alveolo proporcionando un mayor tiempo de contacto y actuando de

tapón hemostático favoreciendo además de forma mecánica la primera fase de la cicatrización.

Serán necesarios ensayos clínicos futuros con un mayor número de pacientes y diferentes concentraciones para dilucidar los efectos de ambas formulaciones.

Por otra parte, poder realizar el control de las interleuquinas inflamatorias (IL-1B, IL-2, IL-12p70, IL-10, TNF- y antiinflamatorias (IL-4, IL-13, IL-10) en los pacientes nos daría la información necesaria para comprender el mecanismo de acción de este proceso, sus repercusiones en el sistema inmune y cómo éste reacciona ante un proceso quirúrgico.

6.4. RESUMEN DE LA DISCUSIÓN

Está descrito en la literatura que los pacientes con periodontitis presentan un riesgo dos veces mayor de sufrir IAM, 4,3 veces superior de sufrir ACV y 2,3 veces superior de padecer una enfermedad vascular periférica (Sanz et al., 2020) debido a la entrada de mediadores inflamatorios en sangre junto con los agentes periodontopatógenos que inducen la formación, maduración y exacerbación de las placas de ateroma. Estas patologías tienen como base una respuesta inflamatoria del sistema inmune, por ello se interrelacionan y se afectan mutuamente en su evolución y control.

Está estudiado que el tratamiento periodontal tiene un efecto beneficioso sobre algunos de los parámetros bioquímicos considerados de riesgo cardiovascular. El tratamiento periodontal reduce los niveles

Discusión

de proteína C reactiva (77,8% de los ensayos clínicos), factor de necrosis tumoral alfa (66,7%), interleucina 6 (100%) y leucocitos (50%). Los niveles de fibrinógeno también mejoraron considerablemente (66,7%) tras el tratamiento periodontal. Sin embargo los efectos sobre los parámetros lipídicos fueron más limitados, solo las lipoproteínas oxidadas de baja densidad y el colesterol de las lipoproteínas de muy baja densidad disminuyeron significativamente (Roca-Millan et al., 2018).

Esta comorbilidad fue el objeto de nuestro estudio, valorar la influencia de una ingesta de propóleo en el metabolismo glucídico y lipídico y así contribuir a mejorar los resultados periodontales.

El hígado tiene un papel clave como regulador de la glucemia y del metabolismo de los lípidos, y en la influencia del estrés oxidativo para el desarrollo de diversas patologías. Como hemos demostrado en nuestros resultados en el estudio animal el efecto de la suplementación oral con una sustancia antioxidante, como el propóleo, es capaz de disminuir la agresión oxidativa mejorando el perfil lipídico y glucémico. Por ello su aplicación dietética en pacientes podría contribuir a estabilizar la enfermedad periodontal.

Si tenemos en cuenta la prevalencia de la enfermedad periodontal, el gran número de implantes que se realizan cada año con el consiguiente riesgo de periimplantitis, las posibles resistencias de los antimicrobianos actuales que pueden llevar al fracaso un tratamiento periodontal (TP), los efectos adversos de la CHX (Gürgan et al., 2006) y debido a que el EEP no presenta toxicidad (Burdock, 1998), nuestro trabajo concluye que por su actividad antibacteriana, cicatrizante y

antioxidante tiene su posible aplicación clínica y dietética en los protocolos de mantenimiento periodontal.

Conclusiones

7. CONCLUSIONES

Tras la discusión de los resultados obtenidos se ha llegado a las siguientes conclusiones:

CONCLUSIÓN PRIMERA

El propóleo adicionado a la dieta en el modelo animal mejora el sistema de defensa antioxidante hepático y reduce la liberación de GOT y GPT indicando un efecto protector hepatocelular.

CONCLUSIÓN SEGUNDA

El efecto hepatoprotector de la dieta adicionada de propóleo repercute sobre el metabolismo lipídico, reduciendo la concentración de colesterol plasmático y la síntesis de ácidos grasos.

CONCLUSIÓN TERCERA

El suplemento de propóleo aumenta la secreción de insulina, disminuyendo los niveles de glucosa, así como los niveles de grelina y adiponectina provocando una mejora significativa del metabolismo glucídico y lipídico.

CONCLUSIÓN CUARTA

La mejora del metabolismo glucídico y lipídico tras administrar una dieta adicionada de propóleo tiene repercusión sobre la composición corporal reduciendo la grasa visceral y mejorando la masa magra.

CONCLUSIÓN QUINTA

La adición del propóleo a la dieta tiene un efecto positivo sobre el metabolismo mineral aumentando los niveles de calcio en los órganos diana, sin repercutir en el resto de minerales.

CONCLUSIÓN SEXTA

El extracto etanólico de propóleo como agente terapéutico periodontal tiene una acción bactericida frente a las bacterias periodontopatógenas evaluadas, siendo significativo su efecto en *P. gingivalis*, patógeno clave en el desarrollo de la enfermedad periodontal.

CONCLUSIÓN SÉPTIMA

La administración subgingival del extracto etanólico de propóleo tras el tratamiento periodontal mejora los parámetros clínicos, profundidad de sondaje y nivel de inserción clínica (PPD, CAL) y reduce el sangrado (BOP +) al mes de su aplicación.

CONCLUSIÓN OCTAVA

La aplicación de pasta dental formulada con propóleo al 10% tras una exodoncia, mejora la cicatrización del alveolo desde la primera revisión clínica de los pacientes periodontales.

Bibliografía

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aabed, K., Bhat, R. S., Al-Dbass, A., Moubayed, N., Algahtani, N., Merghani, N. M., Alanazi, A., Zayed, N., & El-Ansary, A. (2019). Bee pollen and propolis improve neuroinflammation and dysbiosis induced by propionic acid, a short chain fatty acid in a rodent model of autism. *Lipids in Health and Disease*, *18*(1), 200. <https://doi.org/10.1186/s12944-019-1150-0>
- Abd El Hady, F. K., & Hegazi, A. G. (2002). Egyptian propolis: 2. Chemical composition, antiviral and antimicrobial activities of East Nile Delta propolis. *Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, *57*(3-4), 386-394. <https://doi.org/10.1515/znc-2002-3-431>
- Abdulrhman, M., Elbarbary, N. S., Ahmed Amin, D., & Saeid Ebrahim, R. (2012). Honey and a mixture of honey, beeswax, and olive oil-propolis extract in treatment of chemotherapy-induced oral mucositis: A randomized controlled pilot study. *Pediatric Hematology and Oncology*, *29*(3), 285-292. <https://doi.org/10.3109/08880018.2012.669026>
- Acharya, A. B., Thakur, S., Muddapur, M. V., & Kulkarni, R. D. (2018). Systemic Cytokines in Type 2 Diabetes Mellitus and Chronic Periodontitis. *Current Diabetes Reviews*, *14*(2), 182-188. <https://doi.org/10.2174/1573399812666161220144011>

Bibliografía

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3)
- Aga, M., Arai, N., Ohashi, E., Ariyasu, T., Arai, S., Iwaki, K., Ohta, T., & Fukuda, S. (2009). Propolis Enhances Adipocyte Differentiation and Prevents Insulin Resistance in 3T3-L1 cells (Propolis improves insulin resistance *in vitro*). *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 56(1), 31-39. <https://doi.org/10.3136/nskkk.56.31>
- Aghel, S., Pouramir, M., Moghadamnia, A. A., Moslemi, D., Molania, T., Ghassemi, L., & Motalebnejad, M. (2014). Effect of Iranian Propolis on Salivary Total Antioxidant Capacity in Gamma-irradiated Rats. *Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects*, 8(4), 235-239. <https://doi.org/10.5681/joddd.2014.042>
- Aherne, W., & Hull, D. (1966). Brown adipose tissue and heat production in the newborn infant. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 91(1), 223-234. <https://doi.org/10.1002/path.1700910126>
- Ahmadinejad, F., Geir Møller, S., Hashemzadeh-Chaleshtori, M., Bidkhorji, G., & Jami, M.-S. (2017). Molecular Mechanisms behind Free Radical Scavengers Function against Oxidative Stress. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 6(3). <https://doi.org/10.3390/antiox6030051>

- Ahmed, R., Tanvir, E. M., Hossen, M. S., Afroz, R., Ahmmed, I., Rumpa, N.-E.-N., Paul, S., Gan, S. H., Sulaiman, S. A., & Khalil, M. I. (2017). Antioxidant Properties and Cardioprotective Mechanism of Malaysian Propolis in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2017, 5370545. <https://doi.org/10.1155/2017/5370545>
- Ahn, M.-R., Kumazawa, S., Hamasaka, T., Bang, K.-S., & Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(24), 7286-7292. <https://doi.org/10.1021/jf048726s>
- Akca, A. E., Akca, G., Topçu, F. T., Macit, E., Pıkdöken, L., & Özgen, I. Ş. (2016). The Comparative Evaluation of the Antimicrobial Effect of Propolis with Chlorhexidine against Oral Pathogens: An In Vitro Study. *BioMed Research International*, 2016, 3627463. <https://doi.org/10.1155/2016/3627463>
- Al Naggar, Y., Giesy, J. P., Abdel-Daim, M. M., Javed Ansari, M., Al-Kahtani, S. N., & Yahya, G. (2020). Fighting against the second wave of COVID-19: Can honeybee products help protect against the pandemic? *Saudi Journal of Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.12.031>
- Al-Ani, I., Zimmermann, S., Reichling, J., & Wink, M. (2018). Antimicrobial Activities of European Propolis Collected from Various Geographic Origins Alone and in Combination with Antibiotics. *Medicines (Basel, Switzerland)*, 5(1). <https://doi.org/10.3390/medicines5010002>

Bibliografía

- Alazemi, A. M., Jamal, W., Al Khabbaz, A., & Rotimi, V. O. (2020). Prevalence of target anaerobes associated with chronic periodontitis. *Access Microbiology*, 2(12), acmi000177. <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000177>
- Al-Shaher, A., Wallace, J., Agarwal, S., Bretz, W., & Baugh, D. (2004). Effect of propolis on human fibroblasts from the pulp and periodontal ligament. *Journal of Endodontics*, 30(5), 359-361. <https://doi.org/10.1097/00004770-200405000-00012>
- Alshehri, M., Alshail, F., & Alshehri, F. A. (2017). Effect of scaling and root planing with and without adjunctive use of an essential-oil-based oral rinse in the treatment of periodontal inflammation in type-2 diabetic patients. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 8(1). <https://doi.org/10.1111/jicd.12188>
- Al-Zahrani, M. S., Bissada, N. F., & Borawski, E. A. (2003). Obesity and periodontal disease in young, middle-aged, and older adults. *Journal of Periodontology*, 74(5), 610-615. <https://doi.org/10.1902/jop.2003.74.5.610>
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(17), 7915-7922. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.17.7915>

- ANAUATE-NETTO, C., ANIDO-ANIDO, A., LEEGOY, H. R., MATSUMOTO, R., ALONSO, R. C. B., MARCUCCI, M. C., PAULINO, N., & BRETZ, W. A. (2014). Randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial on the effects of propolis and chlorhexidine mouthrinses on gingivitis. *Brazilian dental science*, *17*(1), 11-15.
- Andrade, D. P. de, Carvalho, I. C. S., Gadoi, B. H., Rosa, L. C. L., Barreto, L. M. R. C., & Pallos, D. (2017). Subgingival Irrigation with a Solution of 20% Propolis Extract as an Adjunct to Non-Surgical Periodontal Treatment: A Preliminary Study. *Journal of the International Academy of Periodontology*, *19*(4), 145-151.
- Anjum, S. I., Ullah, A., Khan, K. A., Attaullah, M., Khan, H., Ali, H., Bashir, M. A., Tahir, M., Ansari, M. J., Ghramh, H. A., Adgaba, N., & Dash, C. K. (2019). Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *26*(7), 1695-1703. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.08.013>
- Auger, C., Alhasawi, A., Contavadoo, M., & Appanna, V. D. (2015). Dysfunctional mitochondrial bioenergetics and the pathogenesis of hepatic disorders. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *3*, 40. <https://doi.org/10.3389/fcell.2015.00040>
- Bachevski, D., Damevska, K., Simeonovski, V., & Dimova, M. (2020). Back to the basics: Propolis and COVID-19. *Dermatologic Therapy*, *33*(4), e13780. <https://doi.org/10.1111/dth.13780>

- Baeza, M., Morales, A., Cisterna, C., Cavalla, F., Jara, G., Isamitt, Y., Pino, P., & Gamonal, J. (2020). Effect of periodontal treatment in patients with periodontitis and diabetes: Systematic review and meta-analysis. *Journal of Applied Oral Science: Revista FOB*, 28, e20190248. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2019-0248>
- Bakker, L. E. H., Boon, M. R., van der Linden, R. A. D., Arias-Bouda, L. P., van Klinken, J. B., Smit, F., Verberne, H. J., Jukema, J. W., Tamsma, J. T., Havekes, L. M., van Marken Lichtenbelt, W. D., Jazet, I. M., & Rensen, P. C. N. (2014). Brown adipose tissue volume in healthy lean south Asian adults compared with white Caucasians: A prospective, case-controlled observational study. *The Lancet. Diabetes & Endocrinology*, 2(3), 210-217. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(13\)70156-6](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(13)70156-6)
- Bankova, V., Christov, R., Kujungiev, A., Marcucci, M. C., & Popov, S. (1995). Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. *Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, 50(3-4), 167-172. <https://doi.org/10.1515/znc-1995-3-402>
- Bankova, Vassya. (2005). Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2(1), 29-32. <https://doi.org/10.1093/ecam/neh059>
- Bapat, S., Nagarajappa, R., Ramesh, G., & Bapat, K. (2021). Effect of propolis mouth rinse on oral microorganisms—A randomized controlled trial. *Clinical Oral Investigations*. <https://doi.org/10.1007/s00784-021-03913-9>

- Bartelt, A., Bruns, O. T., Reimer, R., Hohenberg, H., Ittrich, H., Peldschus, K., Kaul, M. G., Tromsdorf, U. I., Weller, H., Waurisch, C., Eychmüller, A., Gordts, P. L. S. M., Rinninger, F., Bruegelmann, K., Freund, B., Nielsen, P., Merkel, M., & Heeren, J. (2011). Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nature Medicine*, *17*(2), 200-205. <https://doi.org/10.1038/nm.2297>
- Bazmandegan, G., Boroushaki, M. T., Shamsizadeh, A., Ayoobi, F., Hakimizadeh, E., & Allahtavakoli, M. (2017). Brown propolis attenuates cerebral ischemia-induced oxidative damage via affecting antioxidant enzyme system in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, *85*, 503-510. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.057>
- Behnke, A. R. (1942). Physiologic Studies Pertaining to Deep Sea Diving and Aviation, Especially in Relation to the Fat Content and Composition of the Body: The Harvey Lecture, March 19, 1942. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, *18*(9), 561-585.
- Bender, O., Weinberg, E., Moses, O., Nemcovsky, C. E., & Weinreb, M. (2020). Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide and glycated serum albumin increase the production of several pro-inflammatory molecules in human gingival fibroblasts via NFκB. *Archives of Oral Biology*, *116*, 104766. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104766>
- Björkner, B. E. (1994). Industrial airborne dermatoses. *Dermatologic Clinics*, *12*(3), 501-509.

Bibliografia

- Borges, I., Moreira, E. A. M., Filho, D. W., de Oliveira, T. B., da Silva, M. B. S., & Fröde, T. S. (2007). Proinflammatory and oxidative stress markers in patients with periodontal disease. *Mediators of Inflammation*, 2007, 45794. <https://doi.org/10.1155/2007/45794>
- Boström, P., Wu, J., Jedrychowski, M. P., Korde, A., Ye, L., Lo, J. C., Rasbach, K. A., Boström, E. A., Choi, J. H., Long, J. Z., Kajimura, S., Zingaretti, M. C., Vind, B. F., Tu, H., Cinti, S., Højlund, K., Gygi, S. P., & Spiegelman, B. M. (2012). A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*, 481(7382), 463-468. <https://doi.org/10.1038/nature10777>
- Burdock, G. A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 36(4), 347-363. [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(97\)00145-2](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(97)00145-2)
- Cannon, B., & Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: Function and physiological significance. *Physiological Reviews*, 84(1), 277-359. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2003>
- Castaldo, S., & Capasso, F. (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73 Suppl 1, S1-6. [https://doi.org/10.1016/s0367-326x\(02\)00185-5](https://doi.org/10.1016/s0367-326x(02)00185-5)

- Chan, G. C.-F., Cheung, K.-W., & Sze, D. M.-Y. (2013). The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 44(3), 262-273. <https://doi.org/10.1007/s12016-012-8322-2>
- Claycombe, K. J., Wang, Y., Jones, B. H., Kim, S., Wilkison, W. O., Zemel, M. B., Chun, J., & Moustaid-Moussa, N. (2000). Transcriptional regulation of the adipocyte fatty acid synthase gene by agouti: Interaction with insulin. *Physiological Genomics*, 3(3), 157-162. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.2000.3.3.157>
- Cornier, M.-A., Després, J.-P., Davis, N., Grossniklaus, D. A., Klein, S., Lamarche, B., Lopez-Jimenez, F., Rao, G., St-Onge, M.-P., Towfighi, A., Poirier, P., American Heart Association Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity and Metabolism, Council on Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, Council on Cardiovascular Disease in the Young, Council on Cardiovascular Radiology and Intervention, Council on Cardiovascular Nursing, Council on Epidemiology and Prevention, & Council on the Kidney in Cardiovascular Disease, and Stroke Council. (2011). Assessing adiposity: A scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, 124(18), 1996-2019. <https://doi.org/10.1161/CIR.0b013e318233bc6a>
- Coskun, O., Kanter, M., Korkmaz, A., & Oter, S. (2005). Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. *Pharmacological Research*, 51(2), 117-123. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2004.06.002>

- Cosola, S., Giammarinaro, E., Marconcini, S., Lelli, M., Lorenzi, C., & Genovesi, A. M. (2019). Prevention of bacterial colonization on suture threads after oral surgery: Comparison between propolis- and chlorhexidine-based formulae. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 33(4), 1275-1281.
- Coutinho, A. (2012). Honeybee propolis extract in periodontal treatment: A clinical and microbiological study of propolis in periodontal treatment. *Indian Journal of Dental Research: Official Publication of Indian Society for Dental Research*, 23(2), 294. <https://doi.org/10.4103/0970-9290.100449>
- Crispe, I. N. (2003). Hepatic T cells and liver tolerance. *Nature Reviews. Immunology*, 3(1), 51-62. <https://doi.org/10.1038/nri981>
- Cui-ping, Z., Shuai, H., Wen-ting, W., Shun, P., Xiao-ge, S., Ya-jing, L., & Fu-liang, H. (2014). Development of high-performance liquid chromatographic for quality and authenticity control of Chinese propolis. *Journal of Food Science*, 79(7), C1315-1322. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12510>
- Curuțiu, C., Dițu, L. M., Grumezescu, A. M., & Holban, A. M. (2020). Polyphenols of Honeybee Origin with Applications in Dental Medicine. *Antibiotics*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9120856>
- Debiaggi, M., Tateo, F., Pagani, L., Luini, M., & Romero, E. (1990). Effects of propolis flavonoids on virus infectivity and replication. *Microbiologica*, 13(3), 207-213.

- del Mar Romero, M., Fernández-López, J. A., Esteve, M., & Alemany, M. (2009). Site-related white adipose tissue lipid-handling response to oleoyl-estrone treatment in overweight male rats. *European Journal of Nutrition*, 48(5), 291-299. <https://doi.org/10.1007/s00394-009-0013-2>
- Denisow, B., & Denisow-Pietrzyk, M. (2016). Biological and therapeutic properties of bee pollen: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(13), 4303-4309. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7729>
- Diniz, D. P., Lorencini, D. A., Berretta, A. A., Cintra, M. A. C. T., Lia, E. N., Jordão, A. A., & Coelho, E. B. (2020). Antioxidant Effect of Standardized Extract of Propolis (EPP-AF®) in Healthy Volunteers: A «Before and After» Clinical Study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2020, 7538232. <https://doi.org/10.1155/2020/7538232>
- Dobrowolski, J. W., Vohora, S. B., Sharma, K., Shah, S. A., Naqvi, S. A., & Dandiya, P. C. (1991). Antibacterial, antifungal, antiamoebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *Journal of Ethnopharmacology*, 35(1), 77-82. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(91\)90135-z](https://doi.org/10.1016/0378-8741(91)90135-z)
- Donaldson, I. M. L. (2014). Celsus: De medicina, Florence 1478. Part 2. *The Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh*, 44(4), 344-346. <https://doi.org/10.4997/JRCPE.2014.420>
- Dr. Vivek Kumar Adlakha. (s. f.).

- Dulloo, A. G., & Miller, D. S. (1984). Energy balance following sympathetic denervation of brown adipose tissue. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 62(2), 235-240. <https://doi.org/10.1139/y84-035>
- Egozi, E. I., Ferreira, A. M., Burns, A. L., Gamelli, R. L., & Dipietro, L. A. (2003). Mast cells modulate the inflammatory but not the proliferative response in healing wounds. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 11(1), 46-54. <https://doi.org/10.1046/j.1524-475x.2003.11108.x>
- E.I, G. (1979). Propolis: A review [honey-bees]. *Bee World*. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=GB19800562207>
- El Rabey, H. A., Al-Seeni, M. N., & Bakhashwain, A. S. (2017). The Antidiabetic Activity of *Nigella sativa* and Propolis on Streptozotocin-Induced Diabetes and Diabetic Nephropathy in Male Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2017, 5439645. <https://doi.org/10.1155/2017/5439645>
- Eyler, R. F., & Shvets, K. (2019). Clinical Pharmacology of Antibiotics. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 14(7), 1080-1090. <https://doi.org/10.2215/CJN.08140718>
- Fasshauer, M., & Blüher, M. (2015). Adipokines in health and disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(7), 461-470. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.04.014>

- Fei, J., Ling, Y.-M., Zeng, M.-J., & Zhang, K.-W. (2019). Shixiang Plaster, a Traditional Chinese Medicine, Promotes Healing in a Rat Model of Diabetic Ulcer Through the receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE)/Nuclear Factor kappa B (NF-κB) and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)/Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1)/Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Signaling Pathways. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 25, 9446-9457. <https://doi.org/10.12659/MSM.918268>
- Ferreira, F. B. de A., Torres, S. A., Rosa, O. P. da S., Ferreira, C. M., Garcia, R. B., Marcucci, M. C., & Gomes, B. P. F. A. (2007). Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 104(5), 709-716. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2007.05.019>
- Fiorini, A. C., Scorza, C. A., de Almeida, A.-C. G., Fonseca, M. C. M., Finsterer, J., Fonseca, F. L. A., & Scorza, F. A. (2021). Antiviral activity of Brazilian Green Propolis extract against SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome - Coronavirus 2) infection: Case report and review. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, 76, e2357. <https://doi.org/10.6061/clinics/2021/e2357>
- Flohé, L., & Günzler, W. A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, 105, 114-121. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05015-1](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05015-1)

- Fokt, H., Pereira, A., Ferreira, A., Cunha, A., & Almeida Aguiar, C. (2010). How do bees prevent hive infections? The antimicrobial properties of propolis. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 1.
- Forrester, S. J., Kikuchi, D. S., Hernandez, M. S., Xu, Q., & Griendling, K. K. (2018). Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circulation Research*, 122(6), 877-902. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311401>
- Fuller, M. F., Fowler, P. A., McNeill, G., & Foster, M. A. (1990). Body composition: The precision and accuracy of new methods and their suitability for longitudinal studies. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 49(3), 423-436. <https://doi.org/10.1079/pns19900050>
- Garlet, G. P., Cardoso, C. R., Silva, T. A., Ferreira, B. R., Avila-Campos, M. J., Cunha, F. Q., & Silva, J. S. (2006). Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiology and Immunology*, 21(1), 12-20. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2005.00245.x>
- Gartenmann, S. J., Dörig, I., Sahrman, P., Held, U., Walter, C., & Schmidlin, P. R. (2016). Influence of different post-interventional maintenance concepts on periodontal outcomes: An evaluation of three systematic reviews. *BMC Oral Health*, 17(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s12903-016-0244-6>

- Gastaldelli, A., & Basta, G. (2010). Ectopic fat and cardiovascular disease: What is the link? *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, 20(7), 481-490. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2010.05.005>
- Genco, R. J., Grossi, S. G., Ho, A., Nishimura, F., & Murayama, Y. (2005). A proposed model linking inflammation to obesity, diabetes, and periodontal infections. *Journal of Periodontology*, 76(11 Suppl), 2075-2084. <https://doi.org/10.1902/jop.2005.76.11-S.2075>
- Ghisalberti: Propolis: A review—Google Académico*. (s. f.). Recuperado 10 de febrero de 2021, de https://scholar.google.com/scholar_lookup?journal=Bee+World&title=Propolis:+a+review&author=E.+Ghisalberti&volume=60&publication_year=1979&pages=59-84&
- Giammarinaro, E., Marconcini, S., Genovesi, A., Poli, G., Lorenzi, C., & Covani, U. (2018). Propolis as an adjuvant to non-surgical periodontal treatment: A clinical study with salivary anti-oxidant capacity assessment. *Minerva Stomatologica*, 67(5), 183-188. <https://doi.org/10.23736/S0026-4970.18.04143-2>
- Gomes, J. M. G., Costa, J. A., & Alfenas, R. C. (2015). Could the beneficial effects of dietary calcium on obesity and diabetes control be mediated by changes in intestinal microbiota and integrity? *The British Journal of Nutrition*, 114(11), 1756-1765. <https://doi.org/10.1017/S0007114515003608>

- Gomes, Júnia Maria Geraldo, Costa, J. de A., & Alfenas, R. de C. G. (2017). Metabolic endotoxemia and diabetes mellitus: A systematic review. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 68, 133-144. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2016.12.009>
- Gomes, R. T. (s. f.). Susceptibility of oral pathogenic bacteria and fungi to brazilian green propolis extract. *Pharmacology*. Recuperado 25 de noviembre de 2020, de https://www.academia.edu/715811/Susceptibility_of_oral_pathogenic_bacteria_and_fungi_to_brazilian_green_propolis_extract
- Gotsman, I., Lotan, C., Soskolne, W. A., Rassovsky, S., Pugatsch, T., Lapidus, L., Novikov, Y., Masrawa, S., & Stabholz, A. (2007). Periodontal destruction is associated with coronary artery disease and periodontal infection with acute coronary syndrome. *Journal of Periodontology*, 78(5), 849-858. <https://doi.org/10.1902/jop.2007.060301>
- Gürkan, C. A., Zaim, E., Bakirsoy, I., & Soykan, E. (2006). Short-term side effects of 0.2% alcohol-free chlorhexidine mouthrinse used as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: A double-blind clinical study. *Journal of Periodontology*, 77(3), 370-384. <https://doi.org/10.1902/jop.2006.050141>
- Gusberti, F. A., Sampathkumar, P., Siegrist, B. E., & Lang, N. P. (1988). Microbiological and clinical effects of chlorhexidine digluconate and hydrogen peroxide mouthrinses on developing plaque and gingivitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 15(1), 60-67. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1988.tb01556.x>

- Hägi, T. T., Hofmänner, P., Salvi, G. E., Ramseier, C. A., & Sculean, A. (2013). Clinical outcomes following subgingival application of a novel erythritol powder by means of air polishing in supportive periodontal therapy: A randomized, controlled clinical study. *Quintessence International (Berlin, Germany: 1985)*, *44*(10), 753-761. <https://doi.org/10.3290/j.qi.a30606>
- Hajishengallis, G., Darveau, R. P., & Curtis, M. A. (2012). The keystone-pathogen hypothesis. *Nature Reviews. Microbiology*, *10*(10), 717-725. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2873>
- Han, L.-K., Sumiyoshi, M., Zhang, J., Liu, M.-X., Zhang, X.-F., Zheng, Y.-N., Okuda, H., & Kimura, Y. (2003). Anti-obesity action of *Salix matsudana* leaves (Part 1). Anti-obesity action by polyphenols of *Salix matsudana* in high fat-diet treated rodent animals. *Phytotherapy Research: PTR*, *17*(10), 1188-1194. <https://doi.org/10.1002/ptr.1404>
- Hanahan, D. J., & Ekholm, J. E. (1974). The preparation of red cell ghosts (membranes). *Methods in Enzymology*, *31*, 168-172. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(74\)31018-x](https://doi.org/10.1016/0076-6879(74)31018-x)
- Haro, A., López-Aliaga, I., Lisbona, F., Barrionuevo, M., Alférez, M. J., & Campos, M. S. (2000). Beneficial effect of pollen and/or propolis on the metabolism of iron, calcium, phosphorus, and magnesium in rats with nutritional ferropenic anemia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(11), 5715-5722. <https://doi.org/10.1021/jf000635h>

- Heymsfield, S. B., & Waki, M. (1991). Body composition in humans: Advances in the development of multicompartiment chemical models. *Nutrition Reviews*, 49(4), 97-108. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1991.tb02997.x>
- Heyward, V. H. (1996). Evaluation of body composition. Current issues. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*, 22(3), 146-156. <https://doi.org/10.2165/00007256-199622030-00002>
- Huang, D. (2018). Dietary Antioxidants and Health Promotion. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 7(1). <https://doi.org/10.3390/antiox7010009>
- Huang, S., Zhang, C.-P., Wang, K., Li, G. Q., & Hu, F.-L. (2014). Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19(12), 19610-19632. <https://doi.org/10.3390/molecules191219610>
- Hyder, M. A., Hasan, M., & Mohieldein, A. (2016). Comparative Study of 5'-Nucleotidase Test in Various Liver Diseases. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 10(2), BC01-03. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/12754.7163>
- Ichi, I., Hori, H., Takashima, Y., Adachi, N., Kataoka, R., Okihara, K., Hashimoto, K., & Kojo, S. (2009). The beneficial effect of propolis on fat accumulation and lipid metabolism in rats fed a high-fat diet. *Journal of Food Science*, 74(5), H127-131. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01147.x>

- Irako, T., Akamizu, T., Hosoda, H., Iwakura, H., Ariyasu, H., Tojo, K., Tajima, N., & Kangawa, K. (2006). Ghrelin prevents development of diabetes at adult age in streptozotocin-treated newborn rats. *Diabetologia*, *49*(6), 1264-1273. <https://doi.org/10.1007/s00125-006-0226-3>
- Jalali, M., Ranjbar, T., Mosallanezhad, Z., Mahmoodi, M., Moosavian, S. P., Ferns, G. A., Jalali, R., & Sohrabi, Z. (2020). Effect of Propolis Intake on Serum C-Reactive Protein (CRP) and Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) Levels in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials. *Complementary Therapies in Medicine*, *50*, 102380. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2020.102380>
- Janas-Kozik, M., Krupka-Matuszczyk, I., & Tomasik-Krótki, J. (2006). [Ghrelin—The guardian of energy balance]. *Psychiatria Polska*, *40*(1), 119-128.
- Kato, G.-F., Lopes, R.-N., Jaguar, G.-C., Silva, A.-P., & Alves, F.-A. (2013). Evaluation of socket healing in patients undergoing bisphosphonate therapy: Experience of a single Institution. *Medicina Oral, Patologia Oral Y Cirugia Bucal*, *18*(4), e650-656. <https://doi.org/10.4317/medoral.18787>
- Kelley, D. E., Thaete, F. L., Troost, F., Huwe, T., & Goodpaster, B. H. (2000). Subdivisions of subcutaneous abdominal adipose tissue and insulin resistance. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *278*(5), E941-948. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2000.278.5.E941>

- Kew, M. C. (2000). Serum aminotransferase concentration as evidence of hepatocellular damage. *Lancet (London, England)*, 355(9204), 591-592. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)00219-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)00219-6)
- Khalil, M. L. (2006). Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 7(1), 22-31.
- Khayrani, A. C., Irdiani, R., Aditama, R., Pratami, D. K., Lischer, K., Ansari, M. J., Chinnathambi, A., Alharbi, S. A., Almoallim, H. S., & Sahlan, M. (2021). Evaluating the potency of Sulawesi propolis compounds as ACE-2 inhibitors through molecular docking for COVID-19 drug discovery preliminary study. *Journal of King Saud University. Science*, 33(2), 101297. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.101297>
- Kitamura, H., Naoe, Y., Kimura, S., Miyamoto, T., Okamoto, S., Toda, C., Shimamoto, Y., Iwanaga, T., & Miyoshi, I. (2013). Beneficial effects of Brazilian propolis on type 2 diabetes in ob/ob mice: Possible involvement of immune cells in mesenteric adipose tissue. *Adipocyte*, 2(4), 227-236. <https://doi.org/10.4161/adip.25608>
- Koo, H., Gomes, B. P., Rosalen, P. L., Ambrosano, G. M., Park, Y. K., & Cury, J. A. (2000). In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Archives of Oral Biology*, 45(2), 141-148. [https://doi.org/10.1016/s0003-9969\(99\)00117-x](https://doi.org/10.1016/s0003-9969(99)00117-x)

- Kosalec, I., Bakmaz, M., Pepeljnjak, S., & Vladimir-Knezević, S. (2004). Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta Pharmaceutica (Zagreb, Croatia)*, 54(1), 65-72.
- Kosalec, I., Pepeljnjak, S., Bakmaz, M., & Vladimir-Knezević, S. (2005). Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. *Acta Pharmaceutica (Zagreb, Croatia)*, 55(4), 423-430.
- Koya-Miyata, S., Arai, N., Mizote, A., Taniguchi, Y., Ushio, S., Iwaki, K., & Fukuda, S. (2009). Propolis prevents diet-induced hyperlipidemia and mitigates weight gain in diet-induced obesity in mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 32(12), 2022-2028. <https://doi.org/10.1248/bpb.32.2022>
- Król, W., Bankova, V., Sforcin, J. M., Szliszka, E., Czuba, Z., & Kuropatnicki, A. K. (2013). Propolis: Properties, application, and its potential. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2013, 807578. <https://doi.org/10.1155/2013/807578>
- Krol, W., Scheller, S., Czuba, Z., Matsuno, T., Zydowicz, G., Shani, J., & Mos, M. (1996). Inhibition of neutrophils' chemiluminescence by ethanol extract of propolis (EEP) and its phenolic components. *Journal of Ethnopharmacology*, 55(1), 19-25. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(96\)01466-3](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(96)01466-3)

- Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., & Popov, S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, 64(3), 235-240. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(98\)00131-7](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(98)00131-7)
- Kuropatnicki, A. K., Szliszka, E., & Krol, W. (2013). Historical aspects of propolis research in modern times. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2013, 964149. <https://doi.org/10.1155/2013/964149>
- Lang, N. P., Adler, R., Joss, A., & Nyman, S. (1990). Absence of bleeding on probing. An indicator of periodontal stability. *Journal of Clinical Periodontology*, 17(10), 714-721. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1990.tb01059.x>
- Lavoie, F., Frisch, F., Brassard, P., Normand-Lauzière, F., Cyr, D., Gagnon, R., Drouin, R., Baillargeon, J.-P., & Carpentier, A. C. (2009). Relationship between total and high molecular weight adiponectin levels and plasma nonesterified fatty acid tolerance during enhanced intravascular triacylglycerol lipolysis in men. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 94(3), 998-1004. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-1021>
- Li, S., Tan, H.-Y., Wang, N., Zhang, Z.-J., Lao, L., Wong, C.-W., & Feng, Y. (2015). The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 26087-26124. <https://doi.org/10.3390/ijms161125942>

- Lima, W. G., Brito, J. C. M., & da Cruz Nizer, W. S. (2020). Bee products as a source of promising therapeutic and chemoprophylaxis strategies against COVID-19 (SARS-CoV-2). *Phytotherapy Research: PTR*. <https://doi.org/10.1002/ptr.6872>
- Lisbona, C., Díaz-Castro, J., Alférez, M. J. M., Guisado, I. M., Guisado, R., & López-Aliaga, I. (2013). Positive influence of a natural product as propolis on antioxidant status and lipid peroxidation in senescent rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 69(4), 919-925. <https://doi.org/10.1007/s13105-013-0270-7>
- Lisbona-González, M. J., Reyes-Botella, C., Muñoz-Soto, E., Vallecillo-Rivas, M., Moreno Fernandez, J., & Díaz Castro, J. (2020). Positive effect of a propolis supplement on lipid profile, glycemia, and hepatic antioxidant status in an experimental animal model. *Nutrición Hospitalaria*. <https://doi.org/10.20960/nh.03060>
- Liu, J. X., Werner, J., Kirsch, T., Zuckerman, J. D., & Virk, M. S. (2018). Cytotoxicity evaluation of chlorhexidine gluconate on human fibroblasts, myoblasts, and osteoblasts. *Journal of Bone and Joint Infection*, 3(4), 165-172. <https://doi.org/10.7150/jbji.26355>
- Liu, Y., Liang, X., Zhang, G., Kong, L., Peng, W., & Zhang, H. (2018). Galangin and Pinocembrin from Propolis Ameliorate Insulin Resistance in HepG2 Cells via Regulating Akt/mTOR Signaling. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2018, 7971842. <https://doi.org/10.1155/2018/7971842>

- López-Valverde, N., Pardal-Peláez, B., López-Valverde, A., Flores-Fraile, J., Herrero-Hernández, S., Macedo-de-Sousa, B., Herrero-Payo, J., & Ramírez, J. M. (2021). Effectiveness of Propolis in the Treatment of Periodontal Disease: Updated Systematic Review with Meta-Analysis. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/antiox10020269>
- Lourido Pérez, H. de la C., Martínez Sánchez, G., Fleitas Vigoa, D. de la C., & Fernández Becerra, J. (2009). Ambiente redox salival: Comparación entre pacientes con enfermedad periodontal inflamatoria y pacientes periodontalmente sanos. *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río*, 13(2), 123-134.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
- Luo, C., Yang, H., Tang, C., Yao, G., Kong, L., He, H., & Zhou, Y. (2015). Kaempferol alleviates insulin resistance via hepatic IKK/NF- κ B signal in type 2 diabetic rats. *International Immunopharmacology*, 28(1), 744-750. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.07.018>
- Machann, J., Horstmann, A., Born, M., Hesse, S., & Hirsch, F. W. (2013). Diagnostic imaging in obesity. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 27(2), 261-277. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2013.02.003>

- Madrazo-Jiménez, M., Rodríguez-Caballero, Á., Serrera-Figallo, M.-Á., Garrido-Serrano, R., Gutiérrez-Corrales, A., Gutiérrez-Pérez, J.-L., & Torres-Lagares, D. (2016). The effects of a topical gel containing chitosan, 0,2% chlorhexidine, allantoin and despanthenol on the wound healing process subsequent to impacted lower third molar extraction. *Medicina Oral, Patología Oral Y Cirugía Bucal*, *21*(6), e696-e702. <https://doi.org/10.4317/medoral.21281>
- Magnusson, I., Lindhe, J., Yoneyama, T., & Liljenberg, B. (1984). Recolonization of a subgingival microbiota following scaling in deep pockets. *Journal of Clinical Periodontology*, *11*(3), 193-207. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1984.tb01323.x>
- Marcucci, M. C. (1995). Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, *26*(2), 83-99. <https://doi.org/10.1051/apido:19950202>
- Mariotti, A. J., & Rumpf, D. A. (1999). Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-collagen protein production. *Journal of Periodontology*, *70*(12), 1443-1448. <https://doi.org/10.1902/jop.1999.70.12.1443>
- Martinotti, S., & Ranzato, E. (2015). Propolis: A new frontier for wound healing? *Burns & Trauma*, *3*, 9. <https://doi.org/10.1186/s41038-015-0010-z>
- Maruta, H., & He, H. (2020). PAK1-blockers: Potential Therapeutics against COVID-19. *Medicine in Drug Discovery*, *6*, 100039. <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2020.100039>

- Masuzaki, H., Paterson, J., Shinyama, H., Morton, N. M., Mullins, J. J., Seckl, J. R., & Flier, J. S. (2001). A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5549), 2166-2170. <https://doi.org/10.1126/science.1066285>
- Mathieu, P., Poirier, P., Pibarot, P., Lemieux, I., & Després, J.-P. (2009). Visceral obesity: The link among inflammation, hypertension, and cardiovascular disease. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 53(4), 577-584. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.110320>
- Matsushita, M., Yoneshiro, T., Aita, S., Kameya, T., Sugie, H., & Saito, M. (2014). Impact of brown adipose tissue on body fatness and glucose metabolism in healthy humans. *International Journal of Obesity (2005)*, 38(6), 812-817. <https://doi.org/10.1038/ijo.2013.206>
- Mazia, R. S., de Araújo Pereira, R. R., de Francisco, L. M. B., Natali, M. R. M., Dias Filho, B. P., Nakamura, C. V., Bruschi, M. L., & Ueda-Nakamura, T. (2016). Formulation and Evaluation of a Mucoadhesive Thermoresponsive System Containing Brazilian Green Propolis for the Treatment of Lesions Caused by Herpes Simplex Type I. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105(1), 113-121. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2015.11.016>
- Mazzoccoli, G., Copetti, M., Dagostino, M. P., Grilli, M., Fontana, A., Pellegrini, F., & Greco, A. (2012). Epicardial adipose tissue and idiopathic deep venous thrombosis: An association study. *Atherosclerosis*, 223(2), 378-383. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.05.033>

- Mazzoccoli, G., Dagostino, M. P., Vinciguerra, M., Ciccone, F., Paroni, G., Seripa, D., Addante, F., Montella, R. C., De Cosmo, S., Sera, F., & Greco, A. (2014). An association study between epicardial fat thickness and cognitive impairment in the elderly. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *307*(9), H1269-1276. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00175.2014>
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*, *244*(22), 6049-6055.
- Metzner, J., & Schneidewind, E. M. (1978). [Effect of pinocembrin on the course of experimental candida infections in mice]. *Mykosen*, *21*(8), 257-262.
- Metzner, J., Schneidewind, E. M., & Friedrich, E. (1977). [Effect of propolis and pinocembrin on fungi]. *Die Pharmazie*, *32*(11), 730.
- Miricescu, D., Totan, A., Calenic, B., Mocanu, B., Didilescu, A., Mohora, M., Spinu, T., & Greabu, M. (2014). Salivary biomarkers: Relationship between oxidative stress and alveolar bone loss in chronic periodontitis. *Acta Odontologica Scandinavica*, *72*(1), 42-47. <https://doi.org/10.3109/00016357.2013.795659>
- Mishima, S., Yoshida, C., Akino, S., & Sakamoto, T. (2005). Antihypertensive effects of Brazilian propolis: Identification of caffeoylquinic acids as constituents involved in the hypotension in spontaneously hypertensive rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, *28*(10), 1909-1914. <https://doi.org/10.1248/bpb.28.1909>

- Moreno, M. I. N., Isla, M. I., Sampietro, A. R., & Vattuone, M. A. (2000). Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, 71(1), 109-114. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00189-0](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00189-0)
- Mosallanezhad, Z., Clark, C., Bahreini, F., Motamed, Z., Mosallanezhad, A., Hosseini, S. F., Shaban-Khalaf, A., & Sohrabi, Z. (2021). Effect of propolis on glycemic control in patients with type 2 diabetes: An updated systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrition & Food Science, ahead-of-print*(ahead-of-print). <https://doi.org/10.1108/NFS-01-2021-0026>
- Mujica, V., Orrego, R., Pérez, J., Romero, P., Ovalle, P., Zúñiga-Hernández, J., Arredondo, M., & Leiva, E. (2017). The Role of Propolis in Oxidative Stress and Lipid Metabolism: A Randomized Controlled Trial. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2017, 4272940. <https://doi.org/10.1155/2017/4272940>
- Nakao, R., Senpuku, H., Ohnishi, M., Takai, H., & Ogata, Y. (2020). Effect of topical administration of propolis in chronic periodontitis. *Odontology*, 108(4), 704-714. <https://doi.org/10.1007/s10266-020-00500-4>

- Nie, J., Chang, Y., Li, Y., Zhou, Y., Qin, J., Sun, Z., & Li, H. (2017). Caffeic Acid Phenethyl Ester (Propolis Extract) Ameliorates Insulin Resistance by Inhibiting JNK and NF- κ B Inflammatory Pathways in Diabetic Mice and HepG2 Cell Models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(41), 9041-9053. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02880>
- Nna, V. U., Abu Bakar, A. B., Md Lazin, M. R. M. L., & Mohamed, M. (2018). Antioxidant, anti-inflammatory and synergistic anti-hyperglycemic effects of Malaysian propolis and metformin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 120, 305-320. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.07.028>
- Orava, J., Nuutila, P., Lidell, M. E., Oikonen, V., Noponen, T., Viljanen, T., Scheinin, M., Taittonen, M., Niemi, T., Enerbäck, S., & Virtanen, K. A. (2011). Different metabolic responses of human brown adipose tissue to activation by cold and insulin. *Cell Metabolism*, 14(2), 272-279. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.06.012>
- Ouchi, N., Kihara, S., Funahashi, T., Nakamura, T., Nishida, M., Kumada, M., Okamoto, Y., Ohashi, K., Nagaretani, H., Kishida, K., Nishizawa, H., Maeda, N., Kobayashi, H., Hiraoka, H., & Matsuzawa, Y. (2003). Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. *Circulation*, 107(5), 671-674. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000055188.83694.b3>

Bibliografía

- Ozan, F., Sümer, Z., Polat, Z. A., Er, K., Ozan, U., & Deger, O. (2007). Effect of mouthrinse containing propolis on oral microorganisms and human gingival fibroblasts. *European Journal of Dentistry*, *1*(4), 195-201.
- Pahlavani, N., Sedaghat, A., Bagheri Moghaddam, A., Mazloumi Kiapay, S. S., Gholizadeh Navashenaq, J., Jarahi, L., Reazvani, R., Norouzy, A., Nematy, M., Safarian, M., & Ghayour-Mobarhan, M. (2019). Effects of propolis and melatonin on oxidative stress, inflammation, and clinical status in patients with primary sepsis: Study protocol and review on previous studies. *Clinical Nutrition ESPEN*, *33*, 125-131. <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2019.06.007>
- Palombo, E. A. (2011). Traditional Medicinal Plant Extracts and Natural Products with Activity against Oral Bacteria: Potential Application in the Prevention and Treatment of Oral Diseases. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, *2011*, 680354. <https://doi.org/10.1093/ecam/nep067>
- Papakonstantinou, E., Flatt, W. P., Huth, P. J., & Harris, R. B. S. (2003). High dietary calcium reduces body fat content, digestibility of fat, and serum vitamin D in rats. *Obesity Research*, *11*(3), 387-394. <https://doi.org/10.1038/oby.2003.52>
- Paraskevas, S., Huizinga, J. D., & Loos, B. G. (2008). A systematic review and meta-analyses on C-reactive protein in relation to periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, *35*(4), 277-290. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2007.01173.x>

- Park, Y. K., Alencar, S. M., & Aguiar, C. L. (2002). Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(9), 2502-2506. <https://doi.org/10.1021/jf011432b>
- Parolia, A., Kumar, H., Ramamurthy, S., Davamani, F., & Pau, A. (2020). Effectiveness of chitosan-propolis nanoparticle against *Enterococcus faecalis* biofilms in the root canal. *BMC Oral Health*, *20*. <https://doi.org/10.1186/s12903-020-01330-0>
- Pasupuleti, V. R., Sammugam, L., Ramesh, N., & Gan, S. H. (2017). Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*, 1259510. <https://doi.org/10.1155/2017/1259510>
- Paulino, N., Abreu, S. R. L., Uto, Y., Koyama, D., Nagasawa, H., Hori, H., Dirsch, V. M., Vollmar, A. M., Scremin, A., & Bretz, W. A. (2008). Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. *European Journal of Pharmacology*, *587*(1-3), 296-301. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.02.067>
- Pepeljnjak, S., Jalsenjajak, I., & Maysinger, D. (1985). Flavonoid content in propolis extracts and growth inhibition of *Bacillus subtilis*. *Die Pharmazie*, *40*(2), 122-123.
- Pitskelauri, G. Z. (1960). [Karabadini-a medical book of the 15th century]. *Vestnik Akademii meditsinskikh nauk SSSR*, *15*(7), 94-95.

- Poher, A.-L., Tschöp, M. H., & Müller, T. D. (2018). Ghrelin regulation of glucose metabolism. *Peptides*, *100*, 236-242. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.12.015>
- Przybyłek, I., & Karpiński, T. M. (2019). Antibacterial Properties of Propolis. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *24*(11). <https://doi.org/10.3390/molecules24112047>
- Raff, H., Bruder, E. D., Jankowski, B. M., & Colman, R. J. (2001). Effect of neonatal hypoxia on leptin, insulin, growth hormone and body composition in the rat. *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Metabolisme*, *33*(3), 151-155. <https://doi.org/10.1055/s-2001-14929>
- Ramfjord, S. P., Knowles, J. W., Nissle, R. R., Burgett, F. G., & Shick, R. A. (1975). Results following three modalities of periodontal therapy. *Journal of Periodontology*, *46*(9), 522-526. <https://doi.org/10.1902/jop.1975.46.9.522>
- Ramseier, C. A., Salvi, G. E., Hägi, T. T., Bürgin, W., Eick, S., & Sculean, A. (2016). Effects of two different post-surgical protocols including either 0.05 % chlorhexidine herbal extract or 0.1 % chlorhexidine on post-surgical plaque control, early wound healing and patient acceptance following standard periodontal surgery and implant placement. *Clinical Oral Investigations*, *20*(8), 2175-2183. <https://doi.org/10.1007/s00784-016-1713-7>

- Reeves, P. G., Nielsen, F. H., & Fahey, G. C. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The Journal of Nutrition*, *123*(11), 1939-1951. <https://doi.org/10.1093/jn/123.11.1939>
- Reimer, M. K., Pacini, G., & Ahrén, B. (2003). Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse. *Endocrinology*, *144*(3), 916-921. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220819>
- Richards, D. (2014). Review finds that severe periodontitis affects 11% of the world population. *Evidence-Based Dentistry*, *15*(3), 70-71. <https://doi.org/10.1038/sj.ebd.6401037>
- Roca-Millan, E., González-Navarro, B., Sabater-Recolons, M.-M., Marí-Roig, A., Jané-Salas, E., & López-López, J. (2018). Periodontal treatment on patients with cardiovascular disease: Systematic review and meta-analysis. *Medicina Oral, Patología Oral Y Cirugía Bucal*, *23*(6), e681-e690. <https://doi.org/10.4317/medoral.22725>
- Rodríguez, A., Ezquerro, S., Méndez-Giménez, L., Becerril, S., & Frühbeck, G. (2015). Revisiting the adipocyte: A model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *309*(8), E691-714. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00297.2015>

- Sakai, T., Ohhata, M., Fujii, M., Oda, S., Kusaka, Y., Matsumoto, M., Nakamoto, A., Taki, T., Nakamoto, M., & Shuto, E. (2017). Brazilian Green Propolis Promotes Weight Loss and Reduces Fat Accumulation in C57BL/6 Mice Fed A High-Fat Diet. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 40(4), 391-395. <https://doi.org/10.1248/bpb.b16-00577>
- Salatino, A., Fernandes-Silva, C. C., Righi, A. A., & Salatino, M. L. F. (2011). Propolis research and the chemistry of plant products. *Natural Product Reports*, 28(5), 925-936. <https://doi.org/10.1039/c0np00072h>
- Salmerón, C., Johansson, M., Asaad, M., Angotzi, A. R., Rønnestad, I., Stefánsson, S. O., Jönsson, E., Björnsson, B. T., Gutiérrez, J., Navarro, I., & Capilla, E. (2015). Roles of leptin and ghrelin in adipogenesis and lipid metabolism of rainbow trout adipocytes in vitro. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 188, 40-48. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.06.017>
- Salomão, K., Pereira, P. R. S., Campos, L. C., Borba, C. M., Cabello, P. H., Marcucci, M. C., & de Castro, S. L. (2008). Brazilian propolis: Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 5(3), 317-324. <https://doi.org/10.1093/ecam/nem058>
- Samet, N., Laurent, C., Susarla, S. M., & Samet-Rubinsteen, N. (2007). The effect of bee propolis on recurrent aphthous stomatitis: A pilot study. *Clinical Oral Investigations*, 11(2), 143-147. <https://doi.org/10.1007/s00784-006-0090-z>

- Sanghani, N. N., Bm, S., & S, S. (2014). Health from the hive: Propolis as an adjuvant in the treatment of chronic periodontitis - a clinicomicrobiologic study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 8(9), ZC41-44. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/8817.4856>
- Santos, F. A., Bastos, E. M. a. F., Maia, A. B. R. A., Uzeda, M., Carvalho, M. a. R., Farias, L. M., & Moreira, E. S. A. (2003). Brazilian propolis: Physicochemical properties, plant origin and antibacterial activity on periodontopathogens. *Phytotherapy Research: PTR*, 17(3), 285-289. <https://doi.org/10.1002/ptr.1117>
- Santos, F. A., Bastos, E. M. A., Uzeda, M., Carvalho, M. a. R., Farias, L. M., Moreira, E. S. A., & Braga, F. C. (2002). Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 80(1), 1-7. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(02\)00003-x](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(02)00003-x)
- Santos, L. M., Fonseca, M. S., Sokolonski, A. R., Deegan, K. R., Araújo, R. P., Umsza-Guez, M. A., Barbosa, J. D., Portela, R. D., & Machado, B. A. (2020). Propolis: Types, composition, biological activities, and veterinary product patent prospecting. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(4), 1369-1382. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10024>

Sanz, M., Marco Del Castillo, A., Jepsen, S., Gonzalez-Juanatey, J. R., D'Aiuto, F., Bouchard, P., Chapple, I., Dietrich, T., Gotsman, I., Graziani, F., Herrera, D., Loos, B., Madianos, P., Michel, J.-B., Perel, P., Pieske, B., Shapira, L., Shechter, M., Tonetti, M., ... Wimmer, G. (2020). Periodontitis and cardiovascular diseases: Consensus report. *Journal of Clinical Periodontology*, 47(3), 268-288. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13189>

Satyanarayana, K., Sravanthi, K., Shaker, I. A., Ponnulakshmi, R., & Selvaraj, J. (2015). Role of chrysin on expression of insulin signaling molecules. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 6(4), 248-258. <https://doi.org/10.4103/0975-9476.157951>

Savino, F., Liguori, S. A., & Lupica, M. M. (2010). Adipokines in breast milk and preterm infants. *Early Human Development*, 86 Suppl 1, 77-80. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2010.01.011>

Sbordone, L., Ramaglia, L., Gulletta, E., & Iacono, V. (1990). Recolonization of the subgingival microflora after scaling and root planing in human periodontitis. *Journal of Periodontology*, 61(9), 579-584. <https://doi.org/10.1902/jop.1990.61.9.579>

Scheller, S., Dworniczak, S., Waldemar-Klimmek, K., Rajca, M., Tomczyk, A., & Shani, J. (1999). Synergism between ethanolic extract of propolis (EEP) and anti-tuberculosis drugs on growth of mycobacteria. *Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, 54(7-8), 549-553. <https://doi.org/10.1515/znc-1999-7-814>

- Scheller, S., Szaflarski, J., Tustanowski, J., Nolewajka, E., & Stojko, A. (1977). Biological properties and clinical application of propolis. I. Some physico-chemical properties of propolis. *Arzneimittel-Forschung*, 27(4), 889-890.
- Schmidt, A. M., Yan, S. D., Brett, J., Mora, R., Nowygrod, R., & Stern, D. (1993). Regulation of human mononuclear phagocyte migration by cell surface-binding proteins for advanced glycation end products. *The Journal of Clinical Investigation*, 91(5), 2155-2168. <https://doi.org/10.1172/JCI116442>
- Schulz, K. F., Altman, D. G., Moher, D., & CONSORT Group. (2010). CONSORT 2010 statement: Updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 340, c332. <https://doi.org/10.1136/bmj.c332>
- Scorza, C. A., Gonçalves, V. C., Scorza, F. A., Fiorini, A. C., de Almeida, A.-C. G., Fonseca, M. C. M., & Finsterer, J. (2020). Propolis and coronavirus disease 2019 (COVID-19): Lessons from nature. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 41, 101227. <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2020.101227>
- Sforcin, J. M. (2016). Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. *Phytotherapy Research: PTR*, 30(6), 894-905. <https://doi.org/10.1002/ptr.5605>
- Shabbir, A., Rashid, M., & Tipu, H. N. (2016). Propolis, A Hope for the Future in Treating Resistant Periodontal Pathogens. *Cureus*, 8(7), e682. <https://doi.org/10.7759/cureus.682>

- Shahinozzaman, M., Basak, B., Emran, R., Rozario, P., & Obanda, D. N. (2020). Artepillin C: A comprehensive review of its chemistry, bioavailability, and pharmacological properties. *Fitoterapia*, *147*, 104775. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104775>
- Shimizu, T., Hino, A., Tsutsumi, A., Park, Y. K., Watanabe, W., & Kurokawa, M. (2008). Anti-influenza virus activity of propolis in vitro and its efficacy against influenza infection in mice. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, *19*(1), 7-13. <https://doi.org/10.1177/095632020801900102>
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., & Kent, R. L. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, *25*(2), 134-144. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x>
- Son, M. J., Rico, C. W., Nam, S. H., & Kang, M. Y. (2011). Effect of oryzanol and ferulic acid on the glucose metabolism of mice fed with a high-fat diet. *Journal of Food Science*, *76*(1), H7-H10. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01907.x>
- Song, H. S., Park, T. W., Sohn, U. D., Shin, Y. K., Choi, B. C., Kim, C. J., & Sim, S. S. (2008). The Effect of Caffeic Acid on Wound Healing in Skin-incised Mice. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology: Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, *12*(6), 343-347. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2008.12.6.343>

- Sonmez, S., Kirilmaz, L., Yucesoy, M., Yücel, B., & Yilmaz, B. (2005). The effect of bee propolis on oral pathogens and human gingival fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology*, 102(3), 371-376. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.06.035>
- Stanford, K. I., Middelbeek, R. J. W., Townsend, K. L., An, D., Nygaard, E. B., Hitchcox, K. M., Markan, K. R., Nakano, K., Hirshman, M. F., Tseng, Y.-H., & Goodyear, L. J. (2013). Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(1), 215-223. <https://doi.org/10.1172/JCI62308>
- Stern, J. H., Rutkowski, J. M., & Scherer, P. E. (2016). Adiponectin, Leptin, and Fatty Acids in the Maintenance of Metabolic Homeostasis through Adipose Tissue Crosstalk. *Cell Metabolism*, 23(5), 770-784. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.04.011>
- Sun, Y., Asnicar, M., Saha, P. K., Chan, L., & Smith, R. G. (2006). Ablation of ghrelin improves the diabetic but not obese phenotype of ob/ob mice. *Cell Metabolism*, 3(5), 379-386. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.04.004>
- Targher, G., Day, C. P., & Bonora, E. (2010). Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *The New England Journal of Medicine*, 363(14), 1341-1350. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0912063>

- Tchkonia, T., Tchoukalova, Y. D., Giorgadze, N., Pirtskhalava, T., Karagiannides, I., Forse, R. A., Koo, A., Stevenson, M., Chinnappan, D., Cartwright, A., Jensen, M. D., & Kirkland, J. L. (2005). Abundance of two human preadipocyte subtypes with distinct capacities for replication, adipogenesis, and apoptosis varies among fat depots. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 288(1), E267-277. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00265.2004>
- Teixeira, E. W., Message, D., Negri, G., Salatino, A., & Stringheta, P. C. (2010). Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian propolis samples. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 7(3), 307-315. <https://doi.org/10.1093/ecam/nem177>
- Tomšič, K., Rodič, K., Sotošek, A., Videmšek, P., Seme, K., Herrera, D., Sanz, M., & Gašperšič, R. (2021). Do Differences in Cultivable Subgingival Species Exist between Different Periodontitis Stages and Grades? *Oral Health & Preventive Dentistry*, 19(1), 15-24. <https://doi.org/10.3290/j.ohpd.b875525>
- Tonetti, M. S., Greenwell, H., & Kornman, K. S. (2018). Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of Periodontology*, 89 Suppl 1, S159-S172. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0006>

- Tong, J., Prigeon, R. L., Davis, H. W., Bidlingmaier, M., Kahn, S. E., Cummings, D. E., Tschöp, M. H., & D'Alessio, D. (2010). Ghrelin suppresses glucose-stimulated insulin secretion and deteriorates glucose tolerance in healthy humans. *Diabetes*, *59*(9), 2145-2151. <https://doi.org/10.2337/db10-0504>
- Toreti, V. C., Sato, H. H., Pastore, G. M., & Park, Y. K. (2013). Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, *2013*, 697390. <https://doi.org/10.1155/2013/697390>
- Totani, N., Tateishi, S., Takimoto, T., Shinohara, R., & Sasaki, H. (2012). Ferulic acid esters and weight-loss promoting effects in rats. *Journal of Oleo Science*, *61*(6), 331-336. <https://doi.org/10.5650/jos.61.331>
- Trayhurn, P. (2005). Endocrine and signalling role of adipose tissue: New perspectives on fat. *Acta Physiologica Scandinavica*, *184*(4), 285-293. <https://doi.org/10.1111/j.1365-201X.2005.01468.x>
- Trayhurn, Paul, & Wood, I. S. (2004). Adipokines: Inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *The British Journal of Nutrition*, *92*(3), 347-355. <https://doi.org/10.1079/bjn20041213>
- Ueda, M., Hayashibara, K., & Ashida, H. (2013). Propolis extract promotes translocation of glucose transporter 4 and glucose uptake through both PI3K- and AMPK-dependent pathways in skeletal muscle. *BioFactors (Oxford, England)*, *39*(4), 457-466. <https://doi.org/10.1002/biof.1085>

Bibliografía

- Umeda, M., Hiramoto, M., Watanabe, A., Tsunoda, N., & Imai, T. (2015). Arginine-induced insulin secretion in endoplasmic reticulum. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 466(4), 717-722. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.09.006>
- Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., & Mahajan, R. T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*, 7(1), 65-74. <https://doi.org/10.2174/157015909787602823>
- Vaughan, M. (1962). The production and release of glycerol by adipose tissue incubated in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*, 237, 3354-3358.
- Viel, C., & Doré, J.-C. (2003). [History and uses of honey, mead and hive products]. *Revue D'histoire De La Pharmacie*, 51(337), 7-20.
- Wagh, V. D. (2013). Propolis: A wonder bees product and its pharmacological potentials. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2013, 308249. <https://doi.org/10.1155/2013/308249>
- Wang, H., Chen, Y. E., & Eitzman, D. T. (2014). Imaging body fat: Techniques and cardiometabolic implications. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34(10), 2217-2223. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303036>

- Wang, Q., Zhang, M., Ning, G., Gu, W., Su, T., Xu, M., Li, B., & Wang, W. (2011). Brown adipose tissue in humans is activated by elevated plasma catecholamines levels and is inversely related to central obesity. *PloS One*, 6(6), e21006. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021006>
- Wang, Y., Andrukhov, O., & Rausch-Fan, X. (2017). Oxidative Stress and Antioxidant System in Periodontitis. *Frontiers in Physiology*, 8, 910. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00910>
- Wei, D., Zhang, X.-L., Wang, Y.-Z., Yang, C.-X., & Chen, G. (2010). Lipid peroxidation levels, total oxidant status and superoxide dismutase in serum, saliva and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis patients before and after periodontal therapy. *Australian Dental Journal*, 55(1), 70-78. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2009.01123.x>
- Whitworth, N. S., & Meeks, G. R. (1985). Hormone metabolism: Body weight and extraglandular estrogen production. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 28(3), 580-587.
- Wronkowitz, N., Romacho, T., Sell, H., & Eckel, J. (2014). Adipose tissue dysfunction and inflammation in cardiovascular disease. *Frontiers of Hormone Research*, 43, 79-92. <https://doi.org/10.1159/000360560>

Bibliografía

- Xie, W., Zhang, S., Lei, F., Ouyang, X., & Du, L. (2014). Ananas comosus L. Leaf Phenols and p-Coumaric Acid Regulate Liver Fat Metabolism by Upregulating CPT-1 Expression. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2014, 903258. <https://doi.org/10.1155/2014/903258>
- Xu, X., Yang, B., Wang, D., Zhu, Y., Miao, X., & Yang, W. (2020). The Chemical Composition of Brazilian Green Propolis and Its Protective Effects on Mouse Aortic Endothelial Cells against Inflammatory Injury. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(20). <https://doi.org/10.3390/molecules25204612>
- Xue, B., Greenberg, A. G., Kraemer, F. B., & Zemel, M. B. (2001). Mechanism of intracellular calcium ($[Ca^{2+}]_i$) inhibition of lipolysis in human adipocytes. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(13), 2527-2529. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0278fje>
- Yildirim, A., Duran, G. G., Duran, N., Jenedi, K., Bolgul, B. S., Miraloglu, M., & Muz, M. (2016). Antiviral Activity of Hatay Propolis Against Replication of Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 22, 422-430. <https://doi.org/10.12659/msm.897282>
- Yoshimasu, Y., Ikeda, T., Sakai, N., Yagi, A., Hirayama, S., Morinaga, Y., Furukawa, S., & Nakao, R. (2018). Rapid Bactericidal Action of Propolis against *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Dental Research*, 97(8), 928-936. <https://doi.org/10.1177/0022034518758034>

- Yudkin, J. S., Eringa, E., & Stehouwer, C. D. A. (2005). «Vasocrine» signalling from perivascular fat: A mechanism linking insulin resistance to vascular disease. *Lancet (London, England)*, 365(9473), 1817-1820. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66585-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66585-3)
- Zamami, Y., Takatori, S., Koyama, T., Goda, M., Iwatani, Y., Doi, S., & Kawasaki, H. (2007). [Effect of propolis on insulin resistance in fructose-drinking rats]. *Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 127(12), 2065-2073. <https://doi.org/10.1248/yakushi.127.2065>
- Zeitoun, R., Najjar, F., Wehbi, B., Khalil, A., Fayyad-Kazan, M., Dagher-Hamalian, C., Faour, W. H., & El-Makhour, Y. (2019). Chemical Composition, Antioxidant and Anti-inflammatory Activity Evaluation of the Lebanese Propolis Extract. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 20(1), 84-96. <https://doi.org/10.2174/1389201020666190206201241>
- Zhang, F., Ye, J., Meng, Y., Ai, W., Su, H., Zheng, J., Liu, F., Zhu, X., Wang, L., Gao, P., Shu, G., Jiang, Q., & Wang, S. (2018). Calcium Supplementation Enhanced Adipogenesis and Improved Glucose Homeostasis Through Activation of Camkii and PI3K/Akt Signaling Pathway in Porcine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (pBMSCs) and Mice Fed High Fat Diet (HFD). *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 51(1), 154-172. <https://doi.org/10.1159/000495171>

Bibliografía

- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372(6505), 425-432. <https://doi.org/10.1038/372425a0>
- Zheng, Y.-Z., Deng, G., Liang, Q., Chen, D.-F., Guo, R., & Lai, R.-C. (2017). Antioxidant Activity of Quercetin and Its Glucosides from Propolis: A Theoretical Study. *Scientific Reports*, 7(1), 7543. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08024-8>
- Zhu, A., Wu, Z., Zhong, X., Ni, J., Li, Y., Meng, J., Du, C., Zhao, X., Nakanishi, H., & Wu, S. (2018). Brazilian Green Propolis Prevents Cognitive Decline into Mild Cognitive Impairment in Elderly People Living at High Altitude. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 63(2), 551-560. <https://doi.org/10.3233/JAD-170630>

Publicaciones



Trabajo Original

Obesidad y síndrome metabólico

Efecto positivo de un suplemento de propóleo sobre el perfil lipídico, la glucemia y el estado antioxidante hepático en un modelo animal experimental

Positive effect of a propolis supplement on lipid profile, glycemia, and hepatic antioxidant status in an experimental animal model

María Jesús Lisbona-González¹, Candela Reyes-Botella¹, Esther Muñoz-Soto¹, Marta Vallecillo-Rivas¹, Jorge Moreno-Fernández^{2,3} y Javier Díaz-Castro^{2,3}

¹Departamento de Estomatología. Facultad de Odontología. Universidad de Granada. Granada. ²Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos "José Mataix". Universidad de Granada. Granada. ³Departamento de Fisiología. Universidad de Granada. Granada

Resumen

Introducción: el uso de suplementos nutricionales naturales puede ser una terapia complementaria ya que tienen fitoquímicos con posibles efectos antioxidantes que pueden mejorar la regulación del metabolismo lipídico y glucémico.

Objetivos: determinar el efecto de la suplementación con propóleo natural sobre el metabolismo lipídico y la actividad antioxidante hepática.

Material y métodos: 20 ratas albinas Wistar macho (8 semanas) se dividieron en dos grupos de 10 animales cada uno y se sometieron a un período de 90 días en el que se alimentaron con dos tipos diferentes de dietas: estándar para el grupo de control (dieta C) y dieta estándar + 2 % de propóleo (dieta P). Se determinaron los parámetros hematológicos y bioquímicos. Se extrajeron los hígados, se lavaron con solución salina y las fracciones citosólicas se prepararon frescas para análisis adicionales de las enzimas antioxidantes catalasa, superóxido-dismutasa, glutatión-peroxidasa y glutatión-reductasa.

Resultados: tras el consumo de la dieta con suplemento de propóleo, encontramos una reducción de la glucosa ($p < 0,01$), el colesterol total ($p < 0,001$), la GOT ($p < 0,05$) y la GPT ($p < 0,01$), mientras que dicha dieta indujo un incremento en la actividad hepática de SOD ($p < 0,001$), CAT ($p < 0,01$) y GR ($p < 0,05$).

Conclusión: el presente estudio revela que el suplemento nutricional de propóleo al 2 % puede mejorar significativamente el perfil lipídico, el glucémico y las enzimas antioxidantes, y reducir la liberación de GOT y GPT hepáticas.

Palabras clave:

Propóleo. Perfil lipídico. Perfil glucémico. Estrés oxidativo. Transaminasas.

Abstract

Introduction: the use of natural nutritional supplements can be used as a coadjuvant therapy since they have several phytochemicals with potential antioxidant effects that could influence lipid and glycemic metabolism.

Objectives: to determine the effect of natural propolis supplementation on lipid metabolism and liver antioxidant activity.

Material and methods: 20 male Wistar albino rats (8 weeks) were divided into two groups of 10 animals each. Subsequently, they were fed two different types of diet for 90 days: a standard diet for the control group (diet C) and a standard diet + 2 % propolis (diet P). Hematological and biochemical parameters were assessed. The livers were extracted and washed with saline solution, and the cytosolic fractions were prepared fresh for additional analysis of antioxidant enzymes catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase.

Results: after consuming the diet supplemented with propolis, we found a reduction in glucose ($p < 0,01$), total cholesterol ($p < 0,001$), GOT ($p < 0,05$) and GPT ($p < 0,01$), whereas the propolis supplement induced an increase in the hepatic activity of SOD ($p < 0,001$), CAT ($p < 0,01$) and GR ($p < 0,05$).

Conclusion: the present study reveals that a dietary propolis supplement (2 %) can improve the lipid and glycemic profiles, also increasing antioxidant enzymes and reducing the release of liver transaminases.

Keywords:

Propolis. Lipid profile. Glycemic profile. Oxidative stress. Transaminases.

Recibido: 28/02/2020 • Aceptado: 24/04/2020

Agradecimientos: Jorge Moreno-Fernández desea mostrar nuestro agradecimiento al Programa de Doctorado Nutrición y Ciencias de los Alimentos.

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Lisbona-González MJ, Reyes-Botella C, Muñoz-Soto E, Vallecillo-Rivas M, Moreno-Fernández J, Díaz-Castro J. Efecto positivo de un suplemento de propóleo sobre el perfil lipídico, la glucemia y el estado antioxidante hepático en un modelo animal experimental. Nutr Hosp 2020;37(4):770-775

DOI: <http://dx.doi.org/10.20960/nh.03060>

Correspondencia:

Javier Díaz-Castro. Departamento de Fisiología e Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos José Mataix. Centro de Investigación Biomédica. Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud. Avda. del Conocimiento, s/n. 18100 Armilla, Granada
e-mail: javierdc@ugr.es

INTRODUCCIÓN

La acumulación de grasa visceral generalmente resulta de un desequilibrio energético que implica la combinación de un exceso de calorías de la dieta junto con un gasto energético insuficiente. El aumento de la adiposidad visceral puede inducir resistencia a la insulina y conducir a la diabetes mellitus de tipo 2, la dislipidemia, la hipertensión y la enfermedad cardiovascular (1).

Las modificaciones del estilo de vida, en particular el manejo de la dieta, pueden ser útiles para controlar los factores de riesgo de la diabetes y la enfermedad cardiovascular. El uso de suplementos fitoterápicos se reconoce como terapia complementaria ya que los compuestos fitoquímicos poseen efectos antioxidantes que podrían mejorar la regulación del metabolismo lipídico y glucémico (2).

Muchos estudios han demostrado que el hígado desempeña un papel primordial en la regulación de la homeostasis de la glucosa durante el ayuno y el período posprandial. En este sentido, la elevación de las transaminasas se ve comúnmente en la diabetes mellitus de tipo II, siendo la glutamil-oxaloacético-transaminasa (GOT) y la glutamil-piruvato-transaminasa (GPT) marcadores fiables de daño hepático (3).

El propóleo es una sustancia resinosa de árboles y arbustos silvestres que las abejas extraen con el fin de taponar herméticamente la colmena e impedir que se produzca dentro de ella cualquier tipo de infección, manteniéndola así aséptica. Su composición química es compleja y varía según los cambios regionales, estacionales y las fuentes vegetales que visitan las abejas. Los constituyentes químicos más comunes del propóleo son principalmente flavonoides, compuestos fenólicos, ácidos cafeoilquínicos, derivados del ácido cinámico, ácido diterpenoico, lignano, ácido cumarínico y otros compuestos (4).

Además, el hígado es un órgano central en la homeostasis del organismo que está expuesto a productos bacterianos, toxinas y antígenos derivados de los alimentos, con una notable capacidad para el metabolismo de ácidos grasos, tanto propios como procedentes del tejido adiposo, influyendo así en el metabolismo glucídico y lipídico (5). El fallo hepático causa consecuencias críticas para la desintoxicación de metabolitos, la síntesis de proteínas, el metabolismo y el proceso digestivo (5). Las especies reactivas de oxígeno (ERO) oxidan las proteínas celulares, los lípidos y los ácidos nucleicos, lo que conduce a daño y disfunción celular general y puede iniciar la muerte celular a través de varias cascadas de señalización (6).

Teniendo en cuenta el papel clave del hígado como regulador de la glucemia y del metabolismo de los lípidos, y la influencia del estrés oxidativo en el desarrollo de diversas patologías, sería interesante evaluar el efecto de la suplementación oral con una sustancia antioxidante capaz de disminuir la agresión oxidativa y mejorar el perfil lipídico y glucémico. Por lo tanto, el propósito del presente estudio fue determinar si la suplementación con propóleo natural puede ser eficiente para regular el metabolismo lipídico y la actividad antioxidante hepática.

MATERIAL Y MÉTODOS

PROPÓLEO

Las muestras de propóleo fueron suministradas por Verbiotech I + D + i S.L. (Granada, España). El análisis de constituyentes revela que contiene aproximadamente 50 % de resina y bálsamo vegetal, 30 % de cera, 10 % de aceites esenciales y aromáticos, 5 % de polen y 5 % de otros compuestos. Los flavonoides son abundantes e incluyen la crisina, apigenina, luteolina, rutina, morina, quercetina, myricetina, kaempferol, quercetina, galangina, naringina, naringenina, hesperidina, daidzeína y genisteína.

ENSAYO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

Se pesó una muestra liofilizada de 0,5 g de propóleo crudo y se sometió a extracción de productos fenólicos y flavonoides con 50 ml de metanol acuoso al 80 % en un baño ultrasónico Modelo 2510 EMS (Hatfield, EE. UU.) durante 20 min. Una alícuota (1 ml) de los extractos se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 min. El contenido fenólico total del propóleo se determinó mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu (7). Los extractos se oxidaron con el reactivo de Folin-Ciocalteu y la reacción se neutralizó con carbonato de sodio. La absorbancia del color azul resultante se midió a 760 nm después de 60 min. El uso de ácido gálico como contenido fenólico total estándar (la curva estándar se preparó usando concentraciones de 2,5-50 mg/l) se expresó como mg de equivalentes de ácido gálico (GAE)/100 g de peso fresco. Los datos se obtuvieron por triplicado.

ENSAYO DE FLAVONOIDES TOTALES

El contenido total de flavonoides se midió mediante el ensayo colorimétrico de cloruro de aluminio (8). Se añadió una alícuota (1 ml) de extractos (0,5 g de propóleo en 50 ml de metanol acuoso al 80 %) o solución estándar de catequina (20, 40, 60, 80, 100 mg/l) a un matraz volumétrico con 4 ml de H₂O bidestilada. Al matraz se añadieron 0,3 ml de NaNO₂ al 5 %. Después de 5 min se añadieron 0,3 ml de AlCl₃ al 10 %. Al sexto minuto se añadieron 2 ml de solución de NaOH 1 M y el volumen total se completó hasta 10 ml con H₂O bidestilada. La solución se mezcló bien y se midió la absorbancia frente al blanco a 510 nm. El contenido total de flavonoides se expresó en mg de equivalentes de catequina (CE)/100 g de masa fresca. Las muestras se analizaron por triplicado.

ANIMALES, DISEÑO EXPERIMENTAL Y DIETAS

Para este estudio se utilizaron veinte ratas albinas Wistar macho (8 semanas de edad), con un peso medio de 215 ± 10 g, obtenidas en el Servicio de Animales de Laboratorio de la Univer-

sidad de Granada. Los procedimientos de cuidado animal y los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Granada de acuerdo con las directrices de la Comunidad Europea. Las ratas se dividieron en dos grupos de 10 animales cada uno y se sometieron a un período de 90 días en el que se alimentaron con dos tipos diferentes de dietas: una dieta estándar AIN-93M (9) para el grupo de control (dieta C) y dieta AIN-93M + 2 % de propóleo para el grupo de propóleo (dieta P). La tabla I muestra la composición de las dietas experimentales. Los animales se colocaron en jaulas metabólicas individuales en una habitación ambientalmente controlada con una temperatura constante de 22 ± 1 °C, un ciclo de luz-oscuridad de 12 h y un 55 ± 10 % de humedad. La dieta y el agua bidestilada estaban disponibles *ad libitum*. En el día 90, todos los animales fueron sometidos a un periodo de ayuno durante la noche y luego anestesiados por inyección intraperitoneal de 5 mg de pentobarbital sódico/100 g de peso corporal (St Louis, MO, EE. UU.). Los animales se desangraron completamente mediante canulación aórtica y se analizaron alícuotas de sangre con EDTA para medir los parámetros hematológicos y bioquímicos. El resto de la sangre se centrifugó (1500 x g, 4 °C, 15 min) sin anticoagulante para separar los glóbulos rojos del suero y el posterior análisis del Fe, la TIBC, la ferritina y la hepcidina. Se extrajeron los hígados, se lavaron con solución salina y las fracciones citosólicas se prepararon frescas el mismo día mediante centrifugación diferencial con hemólisis hipotónica y centrifugaciones diferenciales sucesivas según el método de Hanahan y Ekholm (10), preservando estas fracciones citosólicas a -80 °C para análisis adicionales de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT), superóxido-dismutasa (SOD), glutatión-peroxidasa (GPx) y glutatión-reductasa (GR). El contenido de proteínas en las fracciones citosólicas se midió siguiendo el método descrito por Lowry y cols. (11).

Tabla I. Dietas ensayadas

PPE	
Componente	Cantidad (g/kg)
Dieta AIN 93 Ma	
Proteína (caseína)	140
Grasa (aceite de oliva virgen)	40
Fibra (celulosa micronizada)	50
Suplemento mineral ^b	35
Suplemento vitamínico ^c	10
Cloruro de colina	2.5
Almidón de maíz	621
Sacarosa	100
L-Cistina	1,8

^aA la dieta del grupo con propóleo (dieta P) se le agregó un 2 % de propóleo (que contenía $168,7 \pm 3,9$ mg de GAE/100 g como compuestos fenólicos totales y $31,7 \pm 1,1$ mg de CE/100 g como flavonoides totales). ^bEl suplemento mineral se preparó de acuerdo con las recomendaciones del Instituto Americano de Nutrición (9). ^cEl suplemento vitamínico se preparó según las recomendaciones del Instituto Americano de Nutrición (9).

PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

La glucosa, la urea, la creatinina, el colesterol total, los triglicéridos, la glutamil-oxalacético-transaminasa (GOT), la glutamil-piruvato-transaminasa (GPT), la fosfatasa alcalina y la amilasa se determinaron utilizando kits comerciales (Spinreact, Barcelona, España) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

DETERMINACIONES HEMATOLÓGICAS

Todos los parámetros hematológicos estudiados se midieron utilizando un analizador de hematología automático Mythic 22CT (C2 Diagnostics, Grabels, Francia).

HIERRO SÉRICO, CAPACIDAD DE UNIÓN TOTAL DE HIERRO (TIBC) Y SATURACIÓN DE TRANSFERRINA

Para calcular la tasa de saturación de transferrina se determinaron la concentración sérica de Fe y TIBC utilizando los reactivos Sigma Diagnostics Iron y TIBC (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, EE. UU.). La absorbancia de las muestras se leyó a 550 nm en un lector de microplacas (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, EE. UU.). El porcentaje de saturación de transferrina se calculó usando la ecuación: Saturación de transferrina (%) = concentración sérica de Fe ($\mu\text{g/l}$) / TIBC ($\mu\text{g} / \text{L}$) x 100.

FERRITINA SÉRICA

La concentración de ferritina en suero se determinó usando el kit Rat Ferritin ELISA (Biovendor GmbH, Heidelberg, Alemania). La absorbancia de la reacción se determinó a 450 nm usando un lector de microplacas (Bio-tek, Vermont, EE. UU.). La intensidad de color desarrollada fue inversamente proporcional a la concentración de ferritina sérica.

HEPCIDINA SÉRICA

La hepcidina 25 se determinó usando un kit DRG ELISA (DRG Instruments GmbH, Alemania). Este kit es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas en fase sólida (ELISA), basado en el principio de la unión competitiva. Los pocillos de microtitulación estaban recubiertos con un anticuerpo monoclonal (de ratón) dirigido hacia un sitio antigénico de la molécula de hepcidina-25. Después de la incubación, el conjugado no unido se retiró por lavado y se añadió un complejo de enzima estreptavidina-peroxidasa a cada pocillo. Después de la incubación, el complejo de enzima no unido se separó por lavado y se añadió el sustrato. La reacción se detuvo con la solución de detención y la microplaca se leyó a 450 nm con un lector de placas ((Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, EE. UU.). La intensidad del color desarrollada es inversamente proporcional a la concentración de hepcidina en la muestra.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se muestran como medias \pm error estándar de la media (SEM). Los análisis estadísticos se realizaron con el programa informático SPSS (versión 25.0, 2013, SPSS Inc., Chicago, Illinois, EE. UU.). Las diferencias entre el grupo alimentado con dieta de control (C) y el suplementado con propóleo (P) se evaluaron con la prueba de la t de Student. Se estableció el nivel de significación en el valor de $p < 0,05$. Se realizó un análisis de potencia para estimar el número de ratas necesarias para obtener un 80 % de potencia con un nivel de confianza del 95 %. Se requerirían ocho animales para obtener una diferencia del 8 % en los parámetros hematológicos entre las dietas. De forma similar, se requerirían 7 animales por grupo para obtener una diferencia del 10 % en los parámetros bioquímicos entre las dietas. Para garantizar la potencia estadística, se usaron 10 ratas por grupo.

ACTIVIDADES DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES HEPÁTICAS

La actividad de la superóxido-dismutasa (SOD) se determinó de acuerdo con el método de Crapo y cols. (12), basado en la inhibición de la reducción del citocromo c, medido por espectrofotometría (Thermo Spectronic, Rochester, EE. UU.) a 550 nm.

La actividad de catalasa (CAT) se determinó siguiendo el método descrito por Aebi (13), monitorizando a 240 nm por espectrofotometría (Thermo Spectronic, Rochester, EE. UU.) la descomposición del H_2O_2 como consecuencia de la actividad catalítica de CAT.

La actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) se midió por el método de Flohé y Gunzler (14), basado en la formación instantánea de glutatión oxidado durante la reacción catalizada por la glutatión-peroxidasa. La oxidación de NADPH a $NADP^+$ se controló espectrofotométricamente (Thermo Spectronic, Rochester, EE. UU.) a 340 nm.

La actividad de la glutatión-reductasa (GR) se determinó utilizando el método de Worthington y Rosemeyer (15), basado en la oxidación de NADPH a NADP, catalizada por una concentración limitante de GR. En esta reacción, la reducción del glutatión oxidado se determinó indirectamente midiendo el consumo de NADPH espectrofotométricamente a 340 nm (Thermo Spectronic, Rochester, EE. UU.).

RESULTADOS

Después de la ingesta de la dieta C o P, no se encontraron diferencias significativas en los parámetros hematológicos estudiados (Tabla II).

El suplemento de propóleo indujo una reducción de la glucosa ($p < 0,01$), el colesterol total ($p < 0,001$), la GOT ($p < 0,05$) y la GPT ($p < 0,01$), en comparación con el grupo control (sin propóleo) (Tabla III).

Tras el consumo de la dieta con suplemento de propóleo, encontramos un incremento en la actividad hepática de la SOD ($p < 0,001$), CAT ($p < 0,01$) y la GR ($p < 0,05$) en comparación con el grupo control (Tabla IV).

Tabla II. Parámetros hematológicos en ratas alimentadas con dieta control o suplementada con propóleo

	Dieta C (n = 10)	Dieta P (n = 10)
Sangre total		
Concentración de Hb (g/L)	121,27 \pm 2,81	122,35 \pm 2,36
Eritrocitos ($10^{12}/L$)	7,03 \pm 0,21	7,11 \pm 0,32
Hematocrito (%)	40,88 \pm 1,12	41,07 \pm 1,26
VCM (fL)	54,38 \pm 0,49	55,43 \pm 0,54
HCM (pg)	19,81 \pm 0,17	18,88 \pm 0,43
CHCM (g/dL)	35,01 \pm 0,32	34,65 \pm 0,57
ADE (%)	16,31 \pm 0,34	15,87 \pm 0,39
Plaquetas ($10^9/L$)	761 \pm 74,02	756 \pm 71,21
Glóbulos blancos ($10^9/L$)	8,56 \pm 0,37	8,67 \pm 0,76
Linfocitos ($10^6/mL$)	7,75 \pm 0,51	7,67 \pm 0,63
Suero		
Fe ($\mu g/L$)	1332 \pm 88,53	1325 \pm 58,50
TIBC ($\mu g/L$)	2677 \pm 165	2521 \pm 165
Saturación de Tf (%)	47,83 \pm 3,75	46,48 \pm 3,25
Ferritina ($\mu g/L$)	79,01 \pm 2,12	78,98 \pm 2,59
Hepcidina (ng/mL)	15,89 \pm 0,53	14,93 \pm 0,61

Hb: hemoglobina; VCM: volumen corpuscular medio; HCM: Hb corpuscular media; CHCM: concentración de Hb corpuscular media; ADE: ancho de distribución de eritrocitos; Tf: Transferrina; TIBC: Capacidad total de fijación al Fe. *Diferencias estadísticamente significativas del grupo control ($p < 0,001$, test de la t de Student).

Tabla III. Parámetros bioquímicos en ratas alimentadas con dieta control o suplementada con propóleo

	Dieta C (n = 10)	Dieta P (n = 10)
Glucosa (mg/dL)	126,12 \pm 6,11	98,46 \pm 5,91**
Urea (mg/dL)	31,12 \pm 2,87	32,35 \pm 3,85
Creatinina (mg/dL)	0,57 \pm 0,14	0,62 \pm 0,15
Colesterol total (mg/dL)	85,3 \pm 6,2	60,1 \pm 6,9***
Triglicéridos (mg/dL)	77,61 \pm 7,23	75,8 \pm 7,54
GOT (IU/L)	125,21 \pm 9,14	103,67 \pm 10,24*
GPT (IU/L)	33,11 \pm 2,98	25,24 \pm 3,11**
Fosfatasa alcalina (IU/L)	407,54 \pm 30,24	411,12 \pm 31,76
Amilasa (IU/L)	1811 \pm 188	1875 \pm 176

*Diferencia estadísticamente significativa del grupo C ($p < 0,05$).

**Diferencia estadísticamente significativa del grupo C ($p < 0,01$).

***Diferencia estadísticamente significativa del grupo C ($p < 0,001$).

Tabla IV. Enzimas antioxidantes hepáticas ((U/mg proteína) en ratas alimentadas con dieta control o suplementada con propóleo

	Dieta C (n = 10)	Dieta P (n = 10)
SOD	1,003 ± 0,185	1,956 ± 0,134***
CAT	10,123 ± 0,628	12,395 ± 0,636**
GPx	0,820 ± 0,064	0,881 ± 0,071
GR	26,445 ± 0,886	28,445 ± 0,714*

*Diferencia estadísticamente significativa del grupo C ($p < 0,05$).

**Diferencia estadísticamente significativa del grupo C ($p < 0,01$).

***Diferencia estadísticamente significativa del grupo C ($p < 0,001$).

DISCUSIÓN

En el estudio actual, hemos encontrado que el propóleo tuvo un efecto significativo, reduciendo los niveles de colesterol total y la glucemia, mientras que produjo un incremento de las enzimas antioxidantes hepáticas y una reducción en las transaminasas, sin embargo no tuvo ningún efecto sobre los parámetros hematológicos estudiados, en comparación con el grupo control.

El propóleo es efectivo para reducir la glucemia por diferentes mecanismos. Aga y cols. (16) han encontrado que el extracto de propóleo inhibe la resistencia a la insulina de adipocitos diferenciados *in vitro*. Estos resultados sugieren que el extracto de propóleo puede regular el metabolismo glucémico y lipídico, además de mejorar la sensibilidad a la insulina. Adicionalmente, otro estudio sugiere que el propóleo evita el desarrollo de resistencia a la insulina inducida en animales de experimentación que consumen elevadas cantidades de fructosa (17). La mejora del perfil glucémico y presión arterial inducida por el propóleo es atribuible al ácido cafeoilquinico, uno de los principales componentes bioactivos de esta sustancia natural (18). Adicionalmente, Ueda y cols. (19) mostraron que el propóleo tiene el potencial de prevenir la hiperglucemia a través de la promoción de la translocación del transportador GLUT4 en el músculo esquelético.

Por otro lado, un estudio informó que la administración de propóleo redujo la proteína HMG-CoA reductasa, lo que sugiere que inhibió la síntesis de colesterol hepática (20). Otro posible mecanismo para reducir el colesterol total podría atribuirse a los compuestos resinosos presentes en el propóleo (21). Estos compuestos actúan como quelantes de las sales biliares en el intestino, aumentando así su eliminación fecal. Esto podría dar como resultado un aumento de la síntesis de sales biliares hepáticas a partir del colesterol para compensar las mayores pérdidas a través de la circulación enterohepática de las sales biliares. La combinación de estos efectos podría explicar el efecto hipocolesterolémico del propóleo. Otro estudio mostró que los polifenoles como del propóleo reducen los triglicéridos plasmáticos después del consumo de una dieta alta en grasas (22). Además, algunos componentes del propóleo atenúan la

acumulación de grasa a través de la represión del receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma (PPAR γ) en los adipocitos (20). Se ha demostrado que el agonista PPAR γ aumenta la masa de tejido adiposo en ratas Wistar alimentadas con una dieta alta en grasas (23). Estos datos sugieren que PPAR γ juega un papel importante papel en el tejido adiposo y su reducción por el suplemento de propóleo puede estar involucrado en la disminución de acumulación de grasa.

Uno de los índices más comunes para evaluar la función hepática son las transaminasas (24). La disminución marcada de estas dos aminotransferasas con el suplemento de propóleo indica que hay una menor liberación de las transaminasas intracelulares hepáticas a la circulación, en comparación con la dieta control (25). Sin embargo, hay que tener en cuenta que las enzimas hepáticas GOT y GPT, son marcadores frecuentemente utilizados para medir el daño hepatocelular y son muy útiles en el contexto de investigación con modelos animales, pero su valor al analizar el efecto de una intervención en hígados no patológicos es limitado. En este sentido, sería interesante validar cambios en los valores de estas enzimas en un modelo experimental de daño hepatocelular. Este trabajo pretende servir de modelo experimental basal para futuras líneas en las que evaluar el efecto de suplemento de propóleo (esteatosis, hiperlipidemia).

Por otra parte, la prevención del estrés oxidativo es un mecanismo clave para proteger el hígado de las lesiones inducidas por diversas sustancias. Para dilucidar el mecanismo del efecto protector del propóleo, determinamos SOD, CAT, GR y GPx, como índices para evaluar el estrés oxidativo (26). Las SOD cataliza la eliminación del anión superóxido y generan oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno (27). En nuestro estudio, el suplemento de propóleo aumentó significativamente las actividades de SOD, CAT y GR. Estos hallazgos sugieren que el tratamiento con propóleo redujo el estrés oxidativo hepático, activando las enzimas antioxidantes. La actividad antioxidante del propóleo puede atribuirse al alto contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en esta sustancia natural (28), hecho que incide de manera positiva en el aumento de las enzimas antioxidantes y la reducción de la liberación de transaminasas hepáticas.

CONCLUSIÓN

El presente estudio revela que el suplemento nutricional de propóleo al 2 % puede mejorar significativamente el perfil lipídico y glucémico, las enzimas antioxidantes y reducir la liberación de GOT y GPT hepáticas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Stolar MW. Insulin resistance, diabetes, and the adipocyte. *Am J Health Syst Pharm* 2014;59:S3-S8. DOI: 10.1093/ajhp/59.suppl_9.S3
2. Liu J, Zhang M, Wang W, Grimsgaard S. Chinese herbal medicines for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev* 2004;3:CD003642.
3. Al-Jameil N, Khan FA, Arjumand S, Khan MF, Tabassum H. Associated liver enzymes with hyperlipidemic profile in type 2 diabetes patients. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7:4345-9.

4. Tazawa S, Warashina T, Noro T. Studies on the Constituents of Brazilian Propolis. *Chem Pharm Bull* 1999;47:1388-92. DOI: 10.1248/cpb.47.1388
5. Crispe IN. Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003;3(1):51-62. DOI: 10.1038/nri981
6. Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol* 2009;7:65-74. DOI: 10.2174/157015909787602823
7. Singelton VR, Orthofer R, Lamuela-Raventos R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 1999;299:152-78. DOI: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1
8. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. Research on antioxidant activity of flavonoids from natural materials. *Food Chem* 1999;64:555-9. DOI: 10.1016/S0308-8146(98)00102-2
9. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition and Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993;123:1939-51. DOI: 10.1093/jn/123.11.1939
10. Hanahan DJ, Ekholm JE. The preparation of red cell ghosts (membranes). *Methods Enzymol* 1997;31:168-72.
11. Lowry OH, Rosenburgh NJ, Farr AL and Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-70.
12. Crapo JD, McCord JM and Fridovich I. Preparation and assay of superoxide dismutases. *Methods Enzymol* 1978;53:382-93. DOI: 10.1016/S0076-6879(78)53044-9
13. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121-6. DOI: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3
14. Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984;105:114-21. DOI: 10.1016/S0076-6879(84)05015-1
15. Worthington DJ, Rosemeyer MA. Human glutathione reductase: purification of the crystalline enzyme from erythrocytes. *Eur J Biochem* 1974;48:167-77. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03754.x
16. Aga M, Arai N, Ohashi E, Ariyasu T, Arai S, Iwaki K, et al. Propolis enhances adipocyte differentiation and prevents insulin resistance in 3T3-L1 cells (propolis improves insulin resistance in vitro). *J Japan Soc Food Sci Tech* 2009;56:31-9. DOI: 10.3136/hskkk.56.31
17. Zamami Y, Takatori S, Koyama T, Goda M, Iwatani Y, Doi S, et al. Effect of propolis on insulin resistance in fructose-drinking rats. *Yakugaku Zasshi* 2007;127:2065-73. DOI: 10.1248/yakushi.127.2065
18. Mishima S, Yoshida C, Akino S, Sakamoto T. Antihypertensive effects of brazilian propolis: Identification of caffeoylquinic acids as constituents involved in the hypotension in spontaneously hypertensive rats. *Biol Pharm Bull* 2005;28:1909-14. DOI: 10.1248/bpb.28.1909
19. Ueda M, Hayashibara K, Ashida H. Propolis extract promotes translocation of glucose transporter 4 and glucose uptake through both PI3K- and AMPK-dependent pathways in skeletal muscle. *Biofactors* 2013;39:457-66. DOI: 10.1002/biof.1085
20. Ichi I, Hori H, Takashima Y, Adachi N, Kataoka R, Okihara K, et al. The beneficial effect of propolis on fat accumulation and lipid metabolism in rats fed a high-fat diet. *J Food Sci* 2009;4:H127-31. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2009.01147.x
21. Salatino A, Fernandes-Silva CC, Righi AA, Salatino MLF. Propolis research and the chemistry of plant products. *Nat Prod Rep* 21;28:925-36. DOI: 10.1039/c0np00072h
22. Han LK, Sumiyoshi M, Zhang J, Liu MX, Zhang XF, Zheng YN. Anti-obesity action of *Salix matsudana* leaves (Part 1). Anti-obesity action by polyphenols of *Salix matsudana* in high fat-diet treated rodent animals. *Phytother Res* 2003;17:1188-94. DOI: 10.1002/ptr.1404
23. Pickavance LC, Tadayyon M, Widdowson PS, Buckingham RE, Wilding JP. Therapeutic index for rosiglitazone in dietary obese rats: separation of efficacy and haemodilution. *Br J Pharmacol* 1999;128:1570-6. DOI: 10.1038/sj.bjp.0702932
24. Kew MC. Serum aminotransferase concentration as evidence of hepatocellular damage. *The Lancet* 2000;355:591-2. DOI: 10.1016/S0140-6736(99)00219-6
25. Hyder MA, Hasan M, Mohieldein AH. Comparative levels of ALT, AST, ALP and GGT in liver associated diseases. *European Journal of Experimental Biology* 2013;3:280-4.
26. Li S, Tan HY, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CW, et al. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *Int J Mol Sci* 2015;16:26087-124. DOI: 10.3390/ijms161125942
27. Auger C, Alhasawi A, Contavadoo M, Appanna VD. Dysfunctional mitochondrial bioenergetics and the pathogenesis of hepatic disorders. *Frontiers Cell Develop Biol* 2015;3:1-8. DOI: 10.3389/fcell.2015.00040
28. Bazmandegan G, Boroushaki MT, Shamsizadeh A, Ayoobi F, Hakimzadeh E, Allahtavakoli M. Brown propolis attenuates cerebral ischemia-induced oxidative damage via affecting antioxidant enzyme system in mice. *Biomed Pharmacother* 2017;85:503-10. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.11.057

Research Article

Effect of Propolis-Supplemented Diet on Body Composition and Endocrine Function of Adipose Tissue

¹Maria Jesús Lisbona-González, ¹Candela Reyes-Botella, ¹Esther Muñoz-Soto, ¹Maria Victoria Olmedo-Gaya, ^{2,3}Jorge Moreno-Fernandez and ^{2,3}Javier Diaz-Castro

¹Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, University of Granada, Spain; ²Institute of Nutrition and Food Technology "José Mataix", University of Granada, Spain and ³Department of Physiology, University of Granada, Spain

Received August 26, 2020; Accepted November 16, 2020

Communicated by Prof. Rotimi Aluko

Adipose tissue is an endocrine organ and has central role in interaction with other organs or tissues while propolis can induce lipolysis. Therefore, the aim of this study is to provide detailed information about adipose tissue homeostasis modifications and body composition during propolis supplement consumption. Twenty male Wistar albino rats (8 weeks) were divided into two groups of 10 animals each and fed for 90 days with two different types of diets: standard for the control group (diet C) and standard diet + 2% propolis (diet P). Thyroid hormones did not show differences, while ghrelin and adiponectin decreased in the group that was fed propolis. Insulin, leptin, and non-esterified fatty acids also increased along with reduced body weight and fat, in addition to increased lean mass when propolis was in the diet. We conclude that propolis could decrease ghrelin and adiponectin but increase non-esterified fatty acids and insulin secretion, which improves body composition.

Keywords: Adipose tissue, Body composition, Hormones, Lean mass, Propolis, Body weight

Abbreviations Used: American Institute of Nutrition, AIN; Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA; Non-esterified fatty acids, NEFA; Reactive oxygen species, ROS; Standard error of the mean, SEM; Triiodothyronine, T₃; Thyroxine, T₄; Thyroid stimulating hormone, TSH

Corresponding Author: Dr. Javier Diaz-Castro. Department of Physiology and Institute of Nutrition and Food Technology José Mataix. Biomedical Research Center. Technology Park of Health Sciences. Avda. del Conocimiento, s/n. 18100 Armilla, Granada, Spain. E-mail: javierdc@ugr.es

INTRODUCTION

Obesity is a global problem that has increased dramatically in recent years in both children and adults (Spelta et al., 2015). It is well established in the scientific community that obesity is associated with a high number of comorbidities, and increased risk of mortality (Spelta et al., 2015). Obese people are susceptible to infections and more likely to develop serious complications from common infections (Spelta et al., 2015). Diet plays a key role in body composition, but there is still limited information on the influence of specific nutrients in food in this regard.

The adipose tissue has been considered as a passive organ that exclusively participates in lipid storage under conditions of excessive energy. The research on adipose tissue currently is triggered by the tremendous increase in obesity and type II diabetes. There is a new understanding of the biology of adipose tissue as an endocrine organ and the discovery of its central role in interaction with

other organs or tissues, playing a key role in whole-body energy metabolism, control of satiety and body composition (Trayhurn and Beattie, 2001; Lavoie et al., 2009).

On the other hand, propolis is a product produced in hives by the bees, which consists of a mixture of bee saliva, extracts of seeds and leaves, and exudates of plant flora. So far, more than 500 chemical compounds have been isolated from propolis (Huang et al., 2014). Since the main ingredients of propolis are derived from vegetables, the chemical composition is dependent on its geographical origin. Propolis has been used in traditional folk medicine and complementary therapies to treat a wide variety of diseases.

Propolis and its chemical components have outstanding therapeutic effects on infectious diseases, inflammation and cancer (Zabaiou et al., 2017). Furthermore, propolis also has beneficial effects for certain metabolic disorders (Kitamura, 2019). In addition, some components present in propolis such as isoflavones, genistein and naringenin induce lipolysis of the adipose tissue (Naaz et al., 2003).

These plant-derived components have been shown to decrease lipid accumulation in adipocytes (Takahashi & Ide, 2008).

Taking into account all these considerations, this study was designed to evaluate the effect of oral supplementation with 2% (w/w) natural propolis on body composition and the endocrine function of adipose tissue. Therefore the aim of this study is to provide detailed information about adipose tissue homeostasis modifications and body composition during propolis supplement consumption. The work focused on physiological effects of these adipose depots by mean of several adipokines (ghrelin, leptin, insulin) in order to shed light on the effect of propolis on fat tissue. The link between these adipokines and plasma concentrations of non-esterified fatty acids (NEFA), an important marker of lipid mobilization from adipose tissue was also examined.

MATERIALS AND METHODS

Animals, Experimental Design and Diets

Twenty male Wistar albino rats (8 weeks), with an average weight of 215 ± 10 g, purchased from the Laboratory Animal Service of the University of Granada were used for this study. Animal care procedures and experimental protocols were approved by the Ethics Committee of the University of Granada in accordance with the European Community guidelines (Declaration of Helsinki; Directive 2010/63/EU for animal experiments). Rats were divided into two groups of 10 animals each and placed on either standard AIN-93M diet (Reeves et al., 1993) for the control group (diet C) or diet AIN-93M + 2% propolis (containing approximately 50% resin and plant balm, 30% wax, 10% essential and aromatic oils, 5% pollen and 5% other compounds such as flavonoids, which flavonoids are abundant, including chrysin, apigenin, luteolin, rutin, morin, quercetin, myricetin, kaempferol, quercetin, galangine, naringin, naringenin, and hesperidin, daidzein, and genistein) (diet P) for 90 days. Table 1 shows the composition of the two diets. Animals were housed in individual metabolic cages in an environmentally controlled room with a constant temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$, a light-dark cycle of 12 h and $55 \pm 10\%$ humidity. Diet intake was controlled by pair feeding and the animals ingested double distilled water. On day 90, all animals underwent an overnight fasting period and body composition was determined by magnetic resonance imaging (MRI). Subsequently, the rats were anesthetized by intraperitoneal injection of 5 mg of pentobarbital sodium/100 g of body weight (Sigma Chemicals, St Louis, MO). The blood was completely extracted by cannulation of the aorta and centrifuged with EDTA as anticoagulant ($1500 \times g$, 4°C , 15 min) to obtain plasma, which was used for the subsequent analysis of thyroid hormones, ghrelin, leptin, adiponectin, insulin and non-esterified fatty acids (NEFAs).

Assessment of Body Composition

The body composition of the whole organism (% of fat and % of lean mass) was determined using quantitative magnetic resonance imaging (QMR) with an Echo MRI Analyzer system from Echo Medical Systems (Houston, Texas, USA). All measurements of the QMR scans were performed during the light phase (09:00 AM to 06:00 PM). The animals were placed in a plastic cylinder of Thin walls (3 mm thick, 6.5 cm ID) to limit movement. Subsequently,

TABLE 1 | Composition of experimental diets. ^aThe diet for the propolis group (P diet) was supplemented with 2% of propolis (containing 1.687 ± 0.039 g GAE/Kg as total phenolics and 0.317 ± 0.011 g CE/Kg as total flavonoids). GAE gallic acid equivalents, CE catechin equivalents. ^bThe mineral premix was prepared according to the recommendations of the American Institute of Nutrition (Reeves et al., 1993). ^cThe vitamin premix were prepared according to the recommendations of the American Institute of Nutrition (Reeves et al., 1993).

Component ^a	Amount (g/kg dry weight)
Protein (casein)	140
Fat (Virgin olive oil)	40
Fiber (micronized cellulose)	50
Mineral premix ^b	35
Vitamin premix ^c	10
Choline chloride	2.5
Wheat starch	621
Sucrose	100
L-Cysteine	1.8

the animals were briefly subjected to a low electromagnetic field intensity (0.05 tesla) to measure fat, lean mass, free water and total body water. This system generates a signal which modifies the spin patterns of hydrogen atoms within the experimental subject and uses an algorithm to evaluate the four components measured. QMR scans are performed with accumulation times of 2 min.

Thyroid Hormones, Ghrelin, Leptin, Adiponectin, and Insulin

Thyroid stimulating hormone (TSH), triiodothyronine (T_3) and thyroxine (T_4) were determined using the RYYMAG-30K Milliplex MAP Rat panel. The active form of ghrelin, leptin and insulin, were determined using the Milliplex MAP Panel of RMHMAG-84K; Adiponectin levels were measured using the Milliplex MAP RADPCMAG-82K panel (Millipore Corporation, Missouri, USA), based on immunoassays on the surface of fluorescent magnetic microspheres, following the manufacturer's specifications (50 events per measurement, 50 μL sample, test setup: 8000–15,000, 60 seconds). The plate was read on the LABScan 100 analyzer (Luminex Corporation, Texas, USA), using xPONENT software for data acquisition. The average values for each set of duplicate samples or standards were within 10% of the mean. Thyroid hormone, ghrelin, leptin, adiponectin, and insulin concentrations in plasma samples were determined by comparing the mean of duplicate samples with the standard curve for each assay.

Non-Esterified Fatty Acids (NEFA)

NEFAs are released from triglycerides by the action of lipases, which provides a large part of metabolic energy. NEFA were measured using a commercial kit (Randox Laboratories Ltd., Crumlin, UK). For this purpose, 50 μL of standard solution or plasma samples were used. Then 1 mL of solution R1 was added to all tubes. The mixtures were shaken for 5–10 seconds and incubated at 37°C for 10 min. Immediately after, 2 mL of R2 solution was added and the tube was mixed and incubated at 37°C . After 10 min of incubation, the absorbance of the mixture at 550 nm was determined in a spectrophotometer (Bio-tek, Vermont, USA). Furthermore, all standards, plasma and control samples were analyzed in duplicate.

The NEFA concentration calculation was adjusted using the following equation:

$$\text{NEFA mmol / L} = (\text{sample Absorbance} / \text{standard Absorbance}) \times \text{standard concentration}$$

Statistical Analyses

Data are shown as mean ± standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed with the SPSS software (version 26.0, 2019, SPSS Inc., Chicago, Illinois). The differences between the groups fed with control diets (C) or supplemented with propolis (P) were evaluated with the Student's *t*-test. Differences were considered significant at *P* < 0.05. A power analysis was performed to estimate the number of rats necessary to obtain 80% power with a confidence level of 95%. Eight animals would be required to obtain an 8% difference in hematological parameters between diets. Similarly, 7 animals per group would be required to obtain a 10% difference in biochemical parameters between diets. To guarantee the power calculation, 10 rats per group were used.

RESULTS AND DISCUSSION

Endocrine regulators of basal metabolism after 90 days on both diets are shown in Table 2. Thyroid stimulating hormone (TSH) triiodothyronine (T₃) and thyroxine (T₄) showed no differences, while ghrelin and adiponectin decreased (*P* < 0.01 and *P* < 0.05 respectively) and insulin (*P* < 0.01), leptin (*P* < 0.05) and NEFA (*P* < 0.05) increased when 2% propolis supplement was supplied. After propolis supplementation, body weight and fat were lower (*P* < 0.05), while lean mass increased (*P* < 0.05) (Table 3).

In the current study, we have found that the 2% propolis supplementation produced decreases in ghrelin and adiponectin secretion. The results may explain the improvement in body composition, decreased adiposity and increased rate of insulin secretion, since these hormones act on the hypothalamic melanocortinergic system.

Ghrelin works on the anterior pituitary, pancreatic islets, the thyroid gland, the heart, and various regions of the brain. It stimulates appetite through activation of orexigenic hypothalamic neurocircuits and the independent stimulation of food intake from lipogenesis, which together lead to an increase in body weight and

TABLE 3 | Body composition in rats fed a control diet (C) or supplemented with propolis (P). *Statistically different from the control group (*P* < 0.05, Student's *t* test).

	C Diet (n = 10)	P Diet (n = 10)
Body weight (g)	372.25 ± 8.81	309.11 ± 7.29*
Fat (%)	8.12 ± 0.71	7.49 ± 0.79*
Lean mass (%)	87.13 ± 1.71	91.45 ± 1.76*
Free water (%)	0.36 ± 0.03	0.41 ± 0.08
Total water (%)	74.43 ± 0.49	75.29 ± 0.77

adiposity. The effects of ghrelin beyond the regulation of appetite and GH secretion include regulation of intestinal motility, sleep-wake rhythm, taste sensation, reward-seeking behavior, and regulation of glucose, improving insulin resistance and type II diabetes mellitus (Poher et al., 2018). The propolis supplement in the diet also produced a decrease in adiponectin, an adipokine with an important role in energy homeostasis and insulin sensitivity and is inversely correlated with the degree of adiposity (Raff et al., 2001), explaining the reduction in fat mass found. The decrease in ghrelin and adiponectin are in contrast to the leptin levels that increased with the propolis supplementation, which could have induced decreased in appetite. Furthermore, in agreement with other studies (Lavoie et al., 2009), there is an inverse association between circulating adiponectin and NEFA levels in plasma, indicating an increase in lipolytic capacity in adipose deposits induced by the propolis supplementation, which influences body composition through decreased fat mass.

Ghrelin causes an inhibition of insulin secretion (Reimer et al., 2003; Tong et al., 2010). The decrease in ghrelin causes a marked decrease in hyperglycemia and increases glucose-induced insulin secretion, thus improving insulin sensitivity in peripheral tissues (Sun et al., 2006). Rats carrying a loss-of-function mutation in the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 show a high number of ghrelin-producing ϵ cells, which coincides with a higher food intake, a higher fat mass and a lower stimulation of the insulin secretion by glucose (Wiedemann et al., 2016). Beyond its role as a negative regulator of insulin secretion, ghrelin also appears to have protective effects on β cells in conditions of type I diabetes (Irako et al., 2006).

In addition to the decrease in ghrelin, propolis also increases the rate of insulin secretion by other mechanisms. Several studies have evaluated the effects of propolis on serum insulin level in animal models of streptozotocin-induced diabetes. Since streptozotocin destroys β -pancreatic cells, blood insulin levels drop markedly. In this sense, propolis ethanolic extracts (300 mg/kg/day) partially protected streptozotocin-induced insulin deficiency, improving insulin sensitivity and pancreatic β -cell function (Nna et al., 2018). Propolis is capable of preventing the destruction of pancreatic β cells by various mechanisms. Flavonoids are capable of neutralizing and eliminating reactive oxygen species (ROS), and quercetin protects β cells from oxidative damage (El-Rabey et al., 2017). To support this mechanism, quercetin (15 mg/kg/day for 4 weeks) was found to partially recover streptozotocin-induced insulin deficiency in rats (Coskun et al., 2005).

Together with the ROS scavenging action in pancreas, propolis has a direct effect on the insulin secretion mechanism. Pancreatic β cells promote insulin secretion in response to arginine. Arginine interacts with its target complex for insulin secretion in the

TABLE 2 | Plasma concentration of hormones influencing basal metabolism and NEFA in rats fed a control diet (C) or supplemented with propolis (P). TSH, Thyroid Stimulating Hormone; T₃, triiodothyronine; T₄, thyroxine; NEFA, non-esterified fatty acids. *Statistically different from the control group (*P* < 0.05, Student's *t* test). **Statistically different from the control group (*P* < 0.01, Student's *t* test).

	C Diet (n = 10)	P Diet (n = 10)
TSH (pg/mL)	32.23 ± 2.26	32.09 ± 2.06
T ₃ (pg/mL)	13317 ± 395.88	13787 ± 309.87
T ₄ (pg/mL)	1332 ± 77.05	1334 ± 88.72
Ghrelin (pg/mL)	21.50 ± 1.39	16.65 ± 0.94**
Insulin (pg/mL)	643.82 ± 33.87	737.76 ± 37.03**
Adiponectin (ng/mL)	1332 ± 119.15	1114 ± 108.07*
Leptin (pg/mL)	1606 ± 103.11	1974 ± 112.01*
NEFA (mmol/L)	0.51 ± 0.08	0.63 ± 0.09*

endoplasmic reticulum of β -cells. Propolis was able to mimic the effects of arginine on NIT-1 pancreatic β -cell lines. Propolis (0.01%) showed a more prominent effect on insulin secretion compared to arginine, suggesting that it involves additional unidentified stimulatory effects for increased insulin secretion. The same authors also demonstrated that the administration of propolis increased the level of circulating insulin in non-diabetic mice, together with a decrease in blood glucose (Umeda et al., 2015). Various chemical compounds present in propolis improve the rate of insulin secretion. Caffeic acid (15–30 mg / kg 5 weeks) significantly improved fasting insulin level and glucose tolerance in mice treated with streptozotocin (Nie et al., 2017). Chrysin (100 mg / kg / day for 30 days) also improved insulin signaling (Satyanarayana et al., 2015). In terms of other compounds, galangine (10–80 M) and pinocembrin (1–4 M) improved insulin resistance and potentiated insulin-induced glycogen accumulation in insulin-resistant HepG2 cells (Liu et al., 2018).

The propolis supplement in the diet (2%) caused a reduction in weight and visceral adipose tissue, improving lean mass. Increased plasma lipids are known to cause obesity and insulin resistance, and the lipid profile is affected by diet and regulatory organs such as the liver, adipose tissue, and muscle. Previous studies (Koya-Miyata et al., 2009) have reported that propolis significantly reduces the activity of the fatty acid synthase enzyme in the groups of propolis extract, suggesting that one of the mechanisms responsible for the inhibitory effect in the accumulation of visceral adipose tissue is the decrease in fatty acid synthesis. Various studies have demonstrated a crucial role of adipose tissue immune cells in chronic inflammation and development of metabolic syndrome. Immune CD4 + T cells, CD8 + T cells, regulatory T cells and eosinophils have been shown to contribute to the differentiation of inflammatory macrophages and, in this regard, Kitamura et al. (2013) proposed that propolis improves blood glucose and plasma cholesterol levels through its effect on immune cells in adipose tissue. Sakai et al. (2017) showed that reduced infiltration of immune cells into adipose tissue results in reduced fat accumulation and/or attenuation of body weight gain during propolis treatment in mice. In this study, the weight and fat content of the feces of mice treated with propolis increased compared to that of the feces of mice that did not receive this compound. Propolis contains a variety of chemical compounds that may explain the decrease in adiposity found. Ferulic acid has been shown to promote weight loss in rats and improve blood glucose in mice fed a high fat diet (Son et al., 2011; Totani et al., 2012). Kaempferol improves hyperglycemia, hyperinsulinemia, and lipid profile (Luo et al., 2015). Furthermore, p-coumaric acid increases carnitine expression, improving hepatic lipid metabolism (Xie et al., 2015).

Finally, the improvement in body composition can also be attributed to the previously reported improvement in propolis-induced calcium bioavailability (Haro et al., 2000). The increased digestibility of calcium could be due to derivatives of benzoic acid, which favor the solubility of calcium in the diet (Haro et al., 2000). Another proposed mechanism for the effect of calcium on decreased body weight is that intracellular ionized calcium plays a key role in regulating adipocyte metabolism by modulating triglyceride stores. Because calciotropic hormones regulate intracellular calcium, suppressing these hormones by increasing calcium bioavailability can redirect dietary energy from adipose tissue to lean body mass

and thermogenesis (Claycombe et al., 2000; Xue et al., 2001) and also dietary calcium in the gastrointestinal tract leads to the precipitation of insoluble fatty acid compounds that make fat less available for absorption (Papakonstantinou et al., 2003).

CONCLUSIONS

In the present study, we have found that the 2% propolis-supplemented diet produced decreases in the secretion of ghrelin and adiponectin, increasing the release of non-esterified fatty acids and the rate of insulin secretion, which improved body composition by inducing a reduction in weight and visceral adipose tissue to enhance lean mass.

ACKNOWLEDGMENTS

Maria Jesús Lisbona-González is grateful to the “Medicina Clínica y Salud Pública Doctorate Program”. Jorge Moreno-Fernandez was supported by a post-doctoral contract (Contrato Puente) from the University of Granada.

REFERENCES

- Claycombe, K.J., Wang, Y., Jones, B.H., Kim S., Wilkison, W.O., Zemel, M.B., Chun, J. and Moustaid-Moussa, N. (2000). Transcriptional regulation of the adipocyte fatty acid synthase gene by the agouti gene product: interaction with insulin. *Physiological Genomics* 3:157–162.
- Coskun, O., Anter, M., Korkmaz, A. and Oter S. (2005). Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and cell damage in rat pancreas. *Pharmacological Research* 51: 117–123.
- El Rabey, H.A., Al-Seeni, M.N. and Bakhashwain, A.S. (2017). The antidiabetic activity of *Nigella sativa* and propolis on streptozotocin-induced diabetes and diabetic nephropathy in male rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2017:5439645. DOI: 10.1155/2017/5439645
- Haro, A., López-Aliaga, I., Lisbona F., Barrionuevo, M., Alférez, M.J. and Campos, M.S. (2000). Beneficial effect of pollen and/or propolis on the metabolism of iron, calcium, phosphorus, and magnesium in rats with nutritional ferropenic anemia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:5715–5722.
- Huang, S., Zhang, C.P., Wang, K., Li, G.Q. and Hu, F.L. (2014). Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules* 19:19610–19632.
- Irako, T., Akamizu, T., Hosoda, H., Iwakura, H., Ariyasu, H. and Tojo, K. (2006). Ghrelin prevents development of diabetes at adult age in streptozotocin-treated newborn rats. *Diabetologia* 49:1264–1273.
- Kitamura, H. (2019). Effects of propolis extract and propolis-derived compounds on obesity and diabetes: knowledge from cellular and animal models. *Molecules* 24: E4394. DOI:10.3390/molecules24234394
- Kitamura, H., Naoe, Y., Kimura, S., Miyamoto, T., Okamoto, S., Toda, C., Shimamoto, Y., Iwanaga, T. and Miyoshi, I. (2013). Beneficial effects of Brazilian propolis on type 2 diabetes in ob/ob mice: Possible involvement of immune cells in mesenteric adipose tissue. *Adipocyte* 2:227–236.
- Koya-Miyata S., Arai N., Mizote A., Taniguchi Y., Ushio S., Iwaki K. and Fukuda S. (2009) Propolis prevents diet-induced hyperlipidemia and mitigates weight gain in diet-induced obesity in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 32:2022–2028.
- Lavoie, F., Frisch, F., Brassard, P., Normand-Lauzière, F., Cyr, D., Gagnon, R., Drouin, R., Baillargeon, J.P. and Carpentier, A.C. (2009). Relationship between total and high molecular weight adiponectin levels and plasma nonesterified fatty acid tolerance during enhanced intravascular triacylglycerol lipolysis in men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 94:998–1004.
- Liu, Y., Liang, X., Zhang, G., Kong L., Peng, W. and Zhang, H. (2018). Galangin and pinocembrin from propolis ameliorate insulin resistance in HepG2 cells via regulating Akt/mTOR signaling. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2018:7971842. DOI: 10.1155/2018/7971842

- Luo, C., Yang, H., Tang, C., Yao, G., Kong, L., He, H. and Zhou, Y. (2015). Kaempferol alleviates insulin resistance via hepatic IKK/NF- κ B signal I type 2 diabetic rats. *International Immunopharmacology* **28**:744–750.
- Naaz, A., Yellayi, S., Zakroczymski, M.A., Bunick, D., Doerge, D.R., Lubahn, D.B., Helferich, W.G. and Cooke, P.S. (2003). The soy isoflavone genistein decreases adipose deposition in mice. *Endocrinology* **144**:3315–20.
- Nie, J., Chang, Y., Li, Y., Zhou, Y., Qin, J., Sun, Z. and Li H. (2017). Caffeic acid phenethyl ester (propolis extract) ameliorates insulin resistance by inhibiting JNK and NF- κ B inflammatory pathways in diabetic mice and HepG2 cell models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **65**:9041–9053.
- Nina, V.U., Abu Bakar, A.B., Lazin, M.R.M.L. and Mohamed, M. (2018). Antioxidant, anti-inflammatory and synergistic anti-hyperglycemic effects of Malaysian propolis and metformin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food Chemistry and Toxicology* **120**:305–320.
- Papakonstantinou, E., Flatt, W., Huth, P. and Harris, R. (2003). High dietary calcium reduces body fat content, digestibility of fat and serum vitamin D in rats. *Obesity Research* **11**:387–394.
- Poher A.L., Tschöp, M.H., and Müller, T.D. (2018). Ghrelin regulation of glucose metabolism. *Peptides* **100**:236–242.
- Raff, H., Bruder, E.D., Jankowski, B.M. and Colman, R.J. (2001). Effect of neonatal hypoxia on leptin, insulin, growth hormone and body composition in the rat. *Hormone and Metabolic Research* **33**:151–155.
- Reeves, P.G., Nielsen, F.H. and Fahey, G.C. (1993). AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition and Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal of Nutrition* **123**:1939–1951.
- Reimer, M.K., Pacini, G. and Ahren, B. (2003). Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse. *Endocrinology* **144**:916–921.
- Sakai, T., Ohhata M., Fujii, M., Oda, S., Kusaka, Y., Matsumoto, M., Nakamoto, A., Taki, T., Nakamoto, M. and Shuto, E. (2017). Brazilian green propolis promotes weight loss and reduces fat accumulation in C57BL/6 mice fed a high-fat diet. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **40**:391–395.
- Satyanarayana, K., Sravanthi, K., Shaker, I.A., Ponnulakshmi, I.R. and Selvaraj, J. (2015). Role of chrysin on expression of insulin signaling molecules. *Journal of Ayurveda Integrative Medicine* **6**:248–258.
- Son, M.J., Rico, C.W., Nam, S.H. and Kang, M.Y. (2011). Effect of oryzanol and ferulic acid on the glucose metabolism of mice fed with a high-fat diet. *Journal of Food Science* **76**:H7–H10.
- Spelta, F., Fratta Pasini, A.M., Cazzoletti, L. and Ferrari, M. (2015). Body weight and mortality in COPD: focus on the obesity paradox. *Eat and Weight Disorders* **23**:15–22.
- Sun, Y., Asnicar, M., Saha, P.K., Chan, L. and Smith, R.G. (2006). Ablation of ghrelin improves the diabetic but not obese phenotype of ob/ob mice. *Cell Metabolism* **3**:379–386.
- Takahashi, Y. and Ide, T. (2008). Effects of soy protein and isoflavone on hepatic fatty acid synthesis and oxidation and mRNA expression of uncoupling proteins and peroxisome proliferator-activated receptor gamma in adipose tissues of rats. *Journal of Nutritional Biochemistry* **19**:682–689.
- Tong, J., Prigeon, R.L., Davis, H.W., Bidlingmaier, M., Kahn, S.E. and Cummings, D.E. (2010). Ghrelin suppresses glucose-stimulated insulin secretion and deteriorates glucose tolerance in healthy humans. *Diabetes* **59**:2145–2151.
- Totani, N., Tateishi, S., Takimoto, T., Shinohara, R. and Sasaki, H. (2012). Ferulic acid esters and weight-loss promoting effects in rats. *Journal of Oleo Science* **61**: 331–336.
- Trayhurn, P. and Beattie, J.H. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ (2001). *Proceedings of the Nutrition Society* **60**:329–339.
- Umeda, M., Hiramoto, M., Watanabe, A., Tsunoda, N., and Imai, T. (2015). Arginine-induced insulin secretion in endoplasmic reticulum. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **466**:717–722.
- Wiedemann, T., Bielhuby, M., Muller, T.D., Bidlingmaier, M. and Pellegata, N.S. (2016). Obesity in MENX rats is accompanied by high circulating levels of ghrelin and improved insulin sensitivity. *Diabetes* **65**:406–420.
- Xie, W., Zhang, S., Lei, F., Quyang, X. and Du, L. (2015). Ananas comosus L leaf phenols and p-coumaric acid regulate liver fat metabolism by upregulating CPT-1 expression. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2015**:903258. DOI: 10.1155/2014/903258
- Xue, B., Greenberg, A., Kraemer, F. and Zemel, M. (2001). Mechanism of intracellular calcium inhibition of lipolysis in human adipocytes. *FASEB Journal* **15**: 2527–2529.
- Zabaïou, N., Fouache, A., Trousson, A., Baron, S., Zellagui, A., Lahouel, M. and Lobaccaro, J.A. (2017). Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. *Chemistry and Physics of Lipids* **207**:214–222.

Article

Effect of Propolis Paste and Mouthwash Formulation on Healing after Teeth Extraction in Periodontal Disease

Maria Jesús Lisbona-González ¹, Esther Muñoz-Soto ¹, Cristina Lisbona-González ¹, Marta Vallecillo-Rivas ¹, Javier Diaz-Castro ^{2,3,4,*†} and Jorge Moreno-Fernandez ^{2,3,*†}

¹ Department of Stomatology, School of Dentistry, University of Granada, 18071 Granada, Spain; mjlisbona@hotmail.com (M.J.L.-G.); esther@msotodental.es (E.M.-S.); cristina.lisbona@gmail.com (C.L.-G.); mvallecillo@correo.ugr.es (M.V.-R.)

² Department of Physiology, Faculty of Pharmacy, Campus Universitario de Cartuja, University of Granada, 18071 Granada, Spain

³ Institute of Nutrition and Food Technology “José Mataix Verdú”, University of Granada, 18071 Granada, Spain

⁴ Instituto de Investigación Biosanitaria IBS, 18016 Granada, Spain

* Correspondence: javierdc@ugr.es (J.D.-C.); jorgemf@ugr.es (J.M.-F.)

† Co-senior authors.

Abstract: This study investigated the antimicrobial effects of a mouthwash containing propolis and the effect of a propolis paste formulation on dental healing after teeth extraction in patients with periodontal disease. In the mouthwash experience, the population comprised 40 patients, which were divided as follows: the control mouthwash, 0.2% chlorhexidine (v/v) mouthwash, 2% (w/v) propolis mouthwash, and propolis + chlorhexidine mouthwash. The study of the propolis paste comprised a population of 60 patients with periodontal disease, and a total of 120 symmetric tooth extractions were performed. Propolis showed antimicrobial activity by itself, and especially with the chlorhexidine association. Three days after surgery in the teeth treated with control paste, only 13.4% had completely healed; however, with propolis paste, in 90% of the periodontal sockets, healing was complete. In addition, a reduction in *Mutans Streptococci* and *Lactobacilli* cfu was observed with propolis, and especially with the association of chlorhexidine + propolis. Propolis mouthwash reduced bacterial proliferation, especially in association with chlorhexidine. Propolis paste is a viable alternative for socket healing after dental extraction. The knowledge gained from these findings will provide a foundation for similar propolis therapies in order to improve the healing process after dental surgery.

Keywords: periodontal disease; propolis; chlorhexidine; teeth extraction; oral healing

Citation: Lisbona-González, M.J.; Muñoz-Soto, E.; Lisbona-González, C.; Vallecillo-Rivas, M.; Diaz-Castro, J.; Moreno-Fernandez, J. Effect of Propolis Paste and Mouthwash Formulation on Healing after Teeth Extraction in Periodontal Disease. *Plants* **2021**, *10*, 1603. <https://doi.org/10.3390/plants10081603>

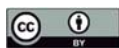
Academic Editor: Otilia Bobis

Received: 13 July 2021

Accepted: 3 August 2021

Published: 4 August 2021

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Periodontal disease (PD) is a chronic infectious inflammatory disease that affects periodontium and gradually destroys the tooth-supporting alveolar bone.

The periodontium is a supporting structure that surrounds and supports the teeth. It consists of different tissues, including the gums, the cementum, the periodontal ligament, and the alveolar supporting bone. Periodontal diseases are caused by periodontopathic bacteria-derived factors and antigens that stimulate a local inflammation of gingival tissues resulting from dental-plaque-induced infection and activation of the innate immune system [1,2]. The characteristic tissue destruction results not from the pathogenic microorganisms, but from the host immune response; therefore, the aim of therapy is to attenuate neutrophil-mediated tissue injury and monocyte infiltration and restore periodontal tissue health [3].

Prevention of bacterial contamination of the operated area is essential to prevent wound infection and create a favorable environment for the healing process. The colonization of oral microorganisms and accumulation acids from bacterial metabolic activity, particularly *Streptococcus mutans* and other non-streptococcus species, such as *Lactobacillus acidophilus*, produce acid and bring the plaque to the critical pH. Plaque control is critical to maintaining good oral health, and it represents the gold standard to prevent periodontal health. If plaque formation is hindered, periodontal wound healing will be faster and with less complications.

The conventional treatment for periodontitis has focused on mechanical removal of bacterial agents, thus reducing infectious challenge and leading to resolution of inflammation and control of PD [4]. An alternative option was to enhance the regeneration of periodontal tissue through application of several substances, including the enamel matrix derivatives (Emdogain), antibiotics [5], and eritritol [6]; however, these treatments did not significantly promote the healing of periodontal ligament cells [7].

In an attempt to improve this situation, propolis is a natural therapy that could be promising. Propolis, a resinous hive substance made by the honeybee, is a potent antimicrobial and anti-inflammatory agent because it comprises plant exudates and substances secreted in the course of bee metabolism. The main chemical classes present in propolis are flavonoids [8], phenolics [9], and various aromatic compounds. Flavonoids are well-known plant compounds that have antioxidant, antibacterial, antifungal, antiviral, and anti-inflammatory properties [10–12]. As an anti-inflammatory agent, propolis is shown to inhibit synthesis of prostaglandins [13], activate the thymus gland, aid the immune system by promoting phagocytic activity, stimulate cellular immunity, and augment healing effects on epithelial tissues [14–18]. Additionally, propolis contains elements, such as iron and zinc, that are important for the synthesis of collagen [19].

Bioflavonoids are known to help bleeding periodontal tissue and stimulate enzymes that fortify the walls of the blood vessels in the periodontium. This function of flavonoids is mainly attributed to their ability to inhibit prostaglandin synthesis and disinfect the tissue [20].

The purpose of this study was to evaluate the effect of a propolis-based medication supports the healing and epithelialization process after dental extraction. In addition, another experiment was performed to assess the effect of a propolis mouthwash on oral microbiota.

2. Results

2.1. Toothpaste Assay

During the period available for the development of the study, a selection for convenience, in which 86 patients were eligible, was carried out. Because of the inclusion and exclusion criteria and availability, it was only possible to include a sample of 66 individuals. Finally, 60 subjects (28 males and 32 females) completed the period of study. One hundred and twenty extractions were performed, assigning them to the test or control group according to a randomization table. The study flow chart is shown in Figure 1.

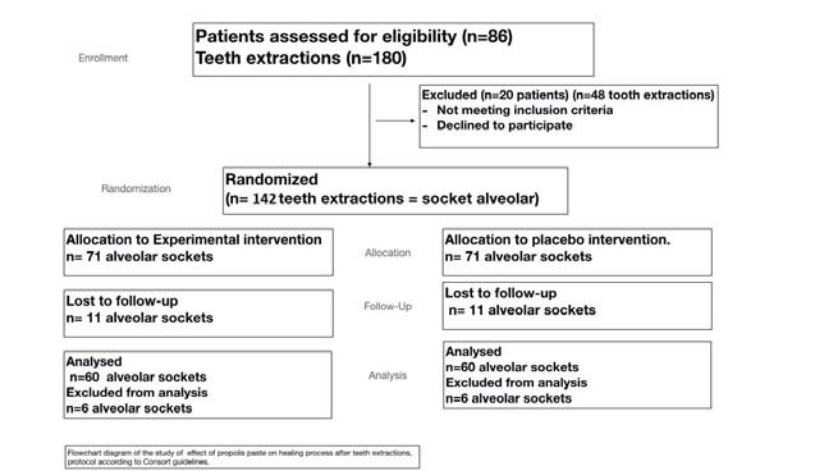


Figure 1. Flowchart of the toothpaste assay.

During the first visit (3 days after surgery) in the socket treated with control paste, 8 dental sockets (13.4%) had completely healed (total closure of the socket), 34 sockets (53.4%) showed granulations, and 18 sockets (33.4%) showed partial fill in with soft gum tissue (partial closure). In contrast, with propolis paste, in 38 dental sockets (63.3%), periodontal healing was complete, 6 dental sockets (10%) showed granulations, and 16 dental socket (26.7%) showed partial closure. During the second visit (4 days after surgery) with control paste, 14 dental sockets (23.4%) had completely healed, 8 dental sockets (13.3%) showed granulations, and 38 dental sockets (63.3%) showed partial closure. In contrast, with propolis paste in 42 dental sockets (70%), periodontal healing was complete, and 18 dental socket (30%) showed incomplete/partial closure. Finally, in the third visit (7 days after surgery) with control paste, 36 dental sockets (53.4%) had completely healed, and 24 dental sockets (46.6%) showed partial closure. However, in all the dental sockets (100%) treated with propolis paste, periodontal healing was complete (Table 1).

Table 1. Healing ratios and statistical significance of patients treated with control or propolis paste.

	Day 3			Day 4			Day 7					
	n (% Sockets)	Control	Test	p-Value	n (% Sockets)	Control	Test	p-Value	n (% Sockets)	Control	Test	p-Value
Completely healed	8 (13.3)	38 (63.3)	<0.001	14 (23.4)	42 (70.0)	<0.001	36 (60.0)	60 (100)	<0.001			
Partial closure	18 (30.0)	16 (26.7)	0.096	38 (60.0)	18 (30.0)	<0.001	24 (40.0)	-	<0.001			
Granulation tissue	34 (56.7)	6 (10.0)	<0.001	8 (13.3)	-	0.03	-	-	-			

2.2. Mouthwash Assay

A subsequent recruitment of another 40 subjects for the mouthwash clinical experiment was carried out. (Figure 2). All 40 patients were randomly assigned to the different mouthwashes. The baseline scores of *Mutans Streptococci* and *Lactobacillus* spp. were recorded after and before using the different mouthwashes.

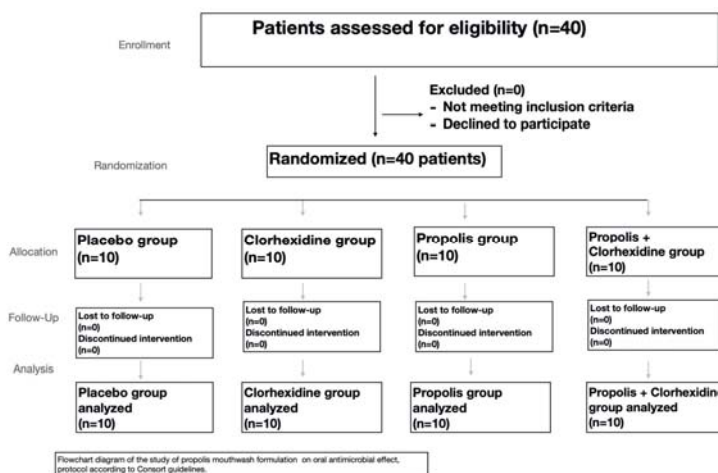


Figure 2. Flowchart of the mouthwash assay.

The baseline level of *Mutans Streptococci* score was 2 (colonies growth are > 105 but < 106 cfu), and Lactobacilli score was 3 (~105) ($n = 40$); 48 h after using the different mouthwashes three times per day, the results were as follows for *Mutans streptococcus*: in patients using control mouthwash, score 2 in 100% of the patients; in patients using chlorhexidine mouthwash, score 2 in 20% of the patients, and 1 in 80% of the patients; in patients using propolis mouthwash: score 2 in 40% of the patients, and score 1 in 60% of the patients; in patients using chlorhexidine + propolis mouthwash: score 1 in 100% of the patients. With regard to the *Lactobacillus* spp., the results were: in patients using control mouthwash, score 3 in 100% of the patients; in patients using chlorhexidine mouthwash, score 2 in 100% of the patients; in patients using propolis mouthwash: score 2 in 50% of the patients, and score 3 in 50% of the patients; in patients using chlorhexidine + propolis mouthwash: score 1 in 100% of the patients. The values are shown in Table 2.

Table 2. Results of different mouthwashes' formulation on oral antimicrobial effect.

Mouthwash	Baseline		48 h	
	Score (%)		Score (%)	
	<i>S. mutans</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>S. mutans</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.
Placebo $n = 10$	2 (100)	3 (100)	2 (100)	3 (100)
Chlorhexidine 0.2% $n = 10$	2 (100)	3 (100)	2 (20) 1 (80)	2 (100)
Propolis 2% $n = 10$	2 (100)	3 (100)	2 (40) 1 (60)	2 (50) 3 (50)
Chlorhexidina 0.2% + Propolis 2% $n = 10$	2 (100)	3 (100)	1 (100)	1 (100)

CRT® bacteria (CRT® Intro Pack—Caries Risk Test, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein). 1 = Low < 10⁵ cfu, 2 = Medium > 10⁵ < 10⁶ cfu, 3 = High > 10⁶ cfu.

Chemical analysis revealed that propolis used in the current study contained 169.8 ± 4.1 mg GAE/100g as total phenolics and 32.1 ± 1.2 mg CE/100g as total flavonoids. The pH of the mouthwash formulations (data reported of three replications ± SEM) was 5.9 ± 0.72, 6.1 ± 0.55, 6.3 ± 0.44, 6.4 ± 0.31 for the placebo, the chlorhexidine mouthwash, the propolis, and the propolis + chlorhexidine mouthwash, respectively. The pH of propolis paste formulations (mean of three replications ± SEM) was 5.9 ± 0.48 and 6.0 ± 0.51 for the propolis paste and placebo formulation, respectively.

3. Discussion

After using the propolis mouth rinse, an oral examination conducted by the researcher revealed no lesion, and no inflammation was observed in the majority of the subjects; therefore, we conclude that none of the patients had susceptibility of allergy to the propolis. However, some of the patients reported a burning feeling in the oral mucosa for a short period of time when they used the chlorhexidine mouthwash. Some other patients reported that, during the period using chlorhexidine mouth rinse, they had a dryness sensation in the mouth and increased tartar. These side effects are common in chlorhexidine, and, to avoid interferences, these subjects were excluded from the study. Most of the patients reported tooth/tongue staining after using mouthwash. None of the patients reported any of these symptoms with the control or propolis mouth rinse.

The pH of propolis paste can be considered a nonirritant to the buccal in healthy people. The teeth socket treated with propolis showed no allergic reaction.

Another interesting observation was that the association of chlorhexidine and propolis avoided staining of the mouth/tongue typical in this type of mouthwash in all the patients.

Propolis has anti-inflammatory properties that speeds up the healing process and is widely used in folk remedies [10,12,21–25]. Our results agree with them; they are significant ($p < 0.001$) for healing at 3, 4, and 7 days after using propolis paste. These effects are associated to its chemical components, which vary depending on seasonal conditions [26–30]. According to Song et al. [23], caffeic acid is one of the compounds responsible for the anti-inflammatory action and acceleration of the healing of surgical wounds, reporting that this acid significantly inhibits the hydrolysis of arachidonic acid and the production of prostaglandin E2, as well as the release of histamine by mast cells in cell cultures. These factors are potent inflammatory mediators [31,32]. The anti-inflammatory effect of propolis has been preliminarily assessed in the treatment of a variety of inflammatory and ulcerative conditions with low rates of minimal side effects [32–34]. The use of propolis for the treatment of mouth ulcers is a traditional therapy utilized by some communities in the Middle East. Samet et al. [35] reported that patients who took a 500 mg capsule of propolis daily supplement were shown to have a statistically significant decrease in the frequency of outbreaks of recurrent aphthous stomatitis. In addition, the effect in healing treatment may be also attributed to the presence of beeswax in the base, which was found to have anti-ulcer and anti-inflammatory effects, as stated in previous studies [11,36,37].

In the mouthwash clinical trial, a clear reduction in cfu was observed with chlorhexidine, propolis, and especially with the association of chlorhexidine + propolis, compared to the baseline scores Table 2. This finding is probably justified by the antibacterial and anti-inflammatory effects of propolis. The reduction of number of microorganisms in dental plaque resulted in decreasing of bulk. Some studies in vitro and in vivo are available in the scientific literature in which propolis, in several formulations, has demonstrated activity against periodontal pathogens [24,38–43]. The antimicrobial property of Brazilian propolis is attributed to the presence of flavonoids, phenolic acids, and their prenylated derivatives on its composition. Propolis has a complex chemical composition, considering the type of bee that produced it, the origin, and seasons of collection. Moreover, its action is dose time-dependent, and, in this study, we took into account the time of use, evaluation times, and the concentration of the mouth rinse. Some components present in propolis as flavonoids (quercetin, galangin, and pinocembrin), caffeic acid, benzoic acid, and cinnamic acid probably act on the microbial membrane or surface of the cell wall, causing structural and functional damage [44]. Synergistic effects of different compounds seem to be the most important process to explain the antibacterial activity of propolis, since it is well established that a single propolis component does not have an activity greater than the other components of propolis isolated [38]. As previously mentioned, propolis, to produce the anti-inflammatory effect, acts in the modulation of cytokines and inflammatory enzymes, such as the suppression of the production of prostaglandins, leukotrienes, and histamine [45,46]. Therefore, a reduction in the number of microorganisms in dental

plaque results in the reduction of products released by them, which act as trigger of gingival inflammation, reducing the severity of plaque [47]. The results of the present study are similar to the study of Awawdeh et al. [48] and Kandaswamy et al. [49], who compared the antimicrobial activity of propolis with calcium hydroxide as intracanal medicament and determined that propolis was effective in eliminating the microorganism. In addition, it has been previously reported that propolis modulates the expression of antioxidative enzyme proteins, inducing a direct scavenge of free radicals, promoting DNA repair, and causing a reduction of the peroxides that can damage polyunsaturated fatty acids, preventing lipid peroxidation and tissue damage [50,51], a fact that can also explain the better healing process with the propolis paste. However, limitations of the study include: by limiting propolis, as with some other hive products, its composition varies with the flora of a given area, the time of collection, and the inclusion of wax contaminants, in addition the number of patients enrolled and the short duration of the study. Future clinical trials with a high number of patients and longer time periods will be necessary to elucidate the final effects of both formulations.

4. Materials and Methods

4.1. Study Protocol and Patients

The clinical trials were designed in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki, following CONSORT guidelines [52] with approval by the Clinical Research Ethics Committee of the University of Granada (protocol number 819). Informed consent was obtained from all individual participants included in both studies.

A randomized, controlled clinical study was used in the mouthwash experience. Forty patients agreed to participate in the study, and 40 patients were screened for eligibility; they were in accordance with the inclusion and exclusion criteria and were then divided into four groups assigned randomly using a computer generated randomization (table 2) $n = 10$ used the control mouthwash, $n = 10$ used the mouthwash containing 0.2% chlorhexidine (v/v), $n = 10$ used the propolis mouthwash containing 2% (w/v) of propolis, and $n = 10$ used the propolis + chlorhexidine mouthwash, containing 2% (w/v) of propolis and 0.2% chlorhexidine (v/v) (Figures 2 and 3).

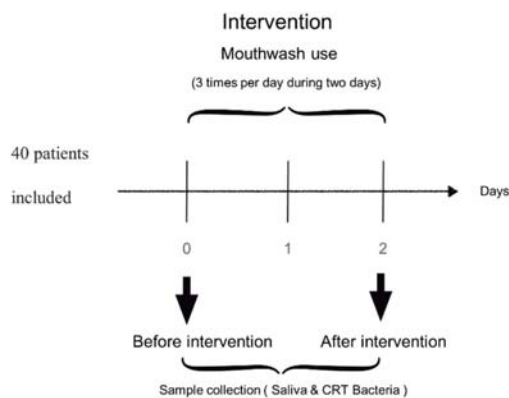


Figure 3. Study design. Visit protocol on mouthwash experience. The registered participants were 40 patients who had signed the informed consent and understood the procedure. They were randomly divided into four groups and were instructed to use mouthwash three times a day for two days. Sample of saliva and CRT bacteria were performed just before intervention, on the same day, and two days later.

Patients were instructed to strictly follow oral hygiene instructions before entry into the study. The levels *Mutans Streptococci* and *Lactobacilli* were measured before and after using the different mouthwashes, with commercial caries risk test, Vivacare line CRT (Caries Risk Test) bacteria 2 in 1 kit (Vivadent, Liechtenstein, Europe). The kit is comprised of a slide attached to the cover of the vial. The commercial product had one side of the slide coated with a solid selective culture medium (mitis salivarius agar enriched with sucrose) for the cultivation of *Mutans Streptococci*, while the medium on the other side of the slide (Rogosa agar) was for the cultivation of lactobacilli. The salivary samples were used per the instructions of the manufacturer. The samples were incubated at 37 °C for 48 h. Growth density of the bacteria was evaluated under good lighting conditions by the naked eye and as per manufacturer's instructions. Bacterial growth was then scored by comparing with standards expressed in colony forming units (cfu) provided by the manufacturers as follows: *Mutans Streptococci* Scoring (0 = Very low colonies are detected; 1 = Low, colonies growth are <105 cfu; 2 = Medium, colonies growth are >105 but <106 cfu; 3 = High, colonies growth are >106 cfu) and *Lactobacilli* Scoring (0 = Very low colonies are detected; 1 = Low, colonies are ~<103 cfu; 2 = Medium, colonies are <104 cfu; 3 = High, colonies are >105 cfu). Raw propolis chunks scraped directly from the frames and boxes of bee hives were provided by Verbiotech I+d+i S.L. (Granada, Spain). Four alcohol-free mouthwashes were designed: the control mouthwash (placebo) containing glycerin, sodium benzoate, and purified water, the chlorhexidine mouthwash containing 0.2% chlorhexidine (v/v) added to the control solution, the propolis mouthwash containing 2% (w/v) of propolis, and the propolis + chlorhexidine mouthwash, containing 2% (w/v) of propolis and 0.2% chlorhexidine (v/v) added to the control solution. All the mouthwashes used in that study were prepared under aseptic conditions according to our request within the requirements of ISO 9001 and GMP International by Euronatur S.L. (Granada, Spain).

The second controlled clinical trial was designed following the same protocols, and it was approved by the same Ethics Committee (protocol number 819). Informed consent was obtained from all individual participants.

Patients with chronic periodontitis were assessed for eligibility at the Department of Stomatology, School of Dentistry, University of Granada (Spain). Based on the guidelines for determining grade of periodontitis [53], in a total of 60 patients, a total of 120 symmetric tooth extractions were performed (Figures 1 and 4). The follow-up period ranged during one week inclusion criteria were: patients giving informed consent, needing dental extraction with advanced periodontal disease, major bone loss, high dental mobility, and age between 50 and 60 years. Exclusion criteria were: lack of informed consent, systemic disease, allergies to any of the products tested, pregnancy or lactation, and use of antibiotics or anti-inflammatory drugs.

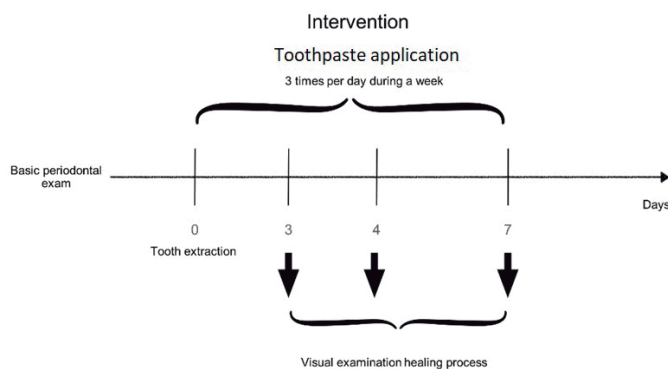


Figure 4. Study design. Visit protocol on healing process. The registered participants were 60 chronic periodontitis patients who had two or more teeth with high dental mobility, and they would

need to have the extraction performed. Patients received test or control paste depending on randomization and were instructed to use it three times a day for one week on the dental socket after extraction.

The propolis paste formulation was prepared under aseptic conditions. The required weight of dried components: pectin, carboxymethylcellulose, gelatin, methyl paraben, propyl paraben were mixed together to form a homogenous mixture. Beeswax was melted in water bath at 70–80° C and continuously stirred with heating for 30 min. Subsequently, the homogenous mixture of the dried materials was gradually added to beeswax with continuous stirring and heating. Finally, the alcoholic extract of raw propolis (1 propolis: 3 ethanol) 10% w/w was added to the base gradually with continuous stirring till homogenous propolis paste was attained. The paste was poured into the collapsible tubes, closed properly, and stored in dry, cool place. Control paste formula (placebo) was prepared as the previously mentioned formula but free of the active constituent (alcoholic extract of propolis); both formulations used in the study were handled according to our request by Euronatur S.L. (Granada, Spain). For pH measurement, ten milliliters of each mouthwash were tested. One gram each of the paste formulations and the control was accurately weighed and dispersed in 10 mL of purified water. The pH of the dispersions and the mouthwashes were measured with a pH meter (Crison Instruments, Barcelona, Spain).

4.2. Propolis

Propolis samples were supplied by Verbiotech I+D+i S.L. (Granada, Spain). Its composition approximately contains 50% resin and vegetable balsam, 30% wax, 10% essential and aromatic oils, 5% pollen, and 5% other compounds [30].

4.3. Total Phenolic Assay

A freeze-dried sample of 0.5 g of raw propolis chunks was weighed and phenolic and flavonoid products were extracted with 50 mL 80% aqueous methanol on an ultrasonic bath Model 2510 EMS (Hatfield, PA, USA) for 20 min. An aliquot (1 mL) of the extracts was centrifuged at 14000 rpm for 5 min. The total phenolic content of propolis and vegetable product was determined by the Folin-Ciocalteu assay [54]. The extracts were oxidized with Folin-Ciocalteu reagent, and the reaction was neutralized with sodium carbonate. The absorbance of the resulting blue color was measured at 760 nm after 60 min. Using gallic acid as standard, total phenolic content (standard curve was prepared using concentrations 2.5–50 mg/L) was expressed as mg gallic acid equivalents (GAE)/100g of fresh weight. Data are reported of three replications.

4.4. Total Flavonoid Assay

Total flavonoid content was measured by the aluminum chloride colorimetric [37]. An aliquot (1 mL) of extracts (0.5 g of propolis) was extracted in 50 mL 80% aqueous methanol, or standards solution of catechin (20, 40, 60, 80, 100 mg/L) was added to 10 mL volumetric flask containing 4 mL bidistilled H₂O. To the flask, 0.3 mL 5% NaNO₂ was added. After 5 min, 0.3 mL 10% AlCl₃ was added. At the 6th min, 2 mL 1M NaOH solution was added, and the total volume was made up to 10 mL with bidistilled H₂O. The solution was mixed well, and the absorbance was measured against prepared reagent blank at 510 nm. Total flavonoid content was expressed as mg catechin equivalents (CE)/100 g fresh mass. Samples were analyzed in triplicates.

4.5. Treatment Methods

Immediately after arrival of the patient in the department, the patients were diagnosed, and clinical and radiographic examinations were performed. A patient history was taken, which included duration and conditions of oral hygiene. The examination baseline consisted of a complete soft and hard tissues examination that was performed to register

the condition of oral mucosa, so that any changes in the course of the study could be identified, making an assessment as to whether these changes could be related to the mouthwash. The mouth rinses were allocated according to groups to ensure balance. All subjects were instructed to rinse three times a day with the mouth rinse for one min and to refrain from all other oral hygiene measures until the final examination, two days later. The levels of *Mutans Streptococci* and *Lactobacilli* were measured using commercial caries risk test, Vivacare line CRT (Caries Risk Test) bacteria 2 in 1 kit (Vivadent, Liechtenstein, Europe).

In the second clinical trial, exodontias will be assigned according to a randomization table carried out on the website www.random.org to two groups (Test and Control), in which the only difference in protocolized action will be the topical application of an orabase paste added with 10% propolis, 2 times a day for 7 days on the socket alveolar after dental extraction (T), versus the application of orabase paste after dental extraction (placebo) (C). The investigator evaluating the postoperative period will be blinded for this assignment, while the patient and operator will not. Investigator and operator will be the same for all procedures. The same protocol was followed in all patients. Articaine anesthesia at 4% with adrenaline 1:100,000 (Laboratorios Normon; Tres Cantos, Madrid, Spain) and a simple dental extraction with drift and forceps. The patients did not receive antibiotic or anti-inflammatory treatment. The patients brought the amount of leftover gel to the check-ups to confirm its application.

4.6. Follow-Up Examination

All examinations were conducted by a single examiner trained to optimize the consistency of the study. Prior to the study, the adviser trained the dental examiner, as a “gold standard”, directing him to introduce the periodontal probe, gently, into the gingival sulcus, keeping the instrument parallel to the long axis of the tooth, and sliding it from the distal to the mesial so delicately in the buccal and lingual surface of each evaluated tooth. Eighteen dental extractions were performed prior to the study in ten patients to ensure the consistency of the method. The following information from the patient documentation (dental records and radiographs from treating dentists) was analyzed: type and number of injured teeth, age of the patients, and occurrence of complications. The clinical examination included inspection, palpation, periodontogram results, mobility grade, intraoral photographs, and radiographic examination of all teeth by using periapical bisecting angle exposures. Follow-up examinations were performed daily at two days into the mouthwash experiment. The patients used mouthwash three times per day, and they came back after 48 h to measure the bacterial concentration again according to protocol CRT bacteria®.

Follow up examinations in the wound healing study were at one week. During the postoperative week, the test group patients applied the 10% propolis paste added to the surgical wound three times a day for 7 days, and the control group patients applied the placebo paste) in the same way.

The healing variables measured at 3, 4, and 7 days will be the following, according to the modified table of Madrazo et al. [55].

4.7. Statistical Analysis

Since the survey comprised only 120 teeth in 60 patients and 4 mouthwashes in 40 patients, a comparative statistical analysis was performed with test “contrast of differences between proportions” (Chi-square test). Therefore, a descriptive analysis was performed using a frequency analysis, which is adequate for a survey sample of this size. A level of $p < 0.05$ was considered to indicate statistical significance. SPSS version 18.0, 2010 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), software was used for data treatment.

5. Conclusions

In summary, based on the obtained results, this study shows that the propolis mouth-wash is effective in reducing the bacterial proliferation, especially in association with chlorhexidine, and with the added benefit that the association of propolis and chlorhexidine avoided the typical staining of the mouth/tongue when using this type of mouth-wash. In addition, propolis paste is a viable alternative for socket healing after dental extraction and was more effective in controlling the inflammatory process over the experimental period. Therefore, the knowledge gained from these findings will provide a foundation for similar propolis therapies in order to improve the healing process after dental surgery.

Author Contributions: J.D.-C. and J.M.-F. designed the study. M.J.L.-G., E.M.-S., C.L.-G., and M.V.-R. performed the experiments. M.J.L.-G., E.M.-S., and J.M.-F. analyzed the data. M.J.L.-G., J.D.-C., M.V.-R., and J.M.-F. Writing—Original Draft Preparation. E.M.-S., C.L.-G., M.V.-R., and J.M.-F. revised and adapted the manuscript. M.J.L.-G., J.D.-C., and J.M.-F. Supervision and Project Administration. All the authors approved the final version of the manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. All persons designated as authors qualify for authorship, and all those who qualify for authorship are listed. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of University of Granada (reference 819).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding authors.

Acknowledgments: Jorge Moreno-Fernandez was supported by a Postdoctoral Contract (Contrato Puente) from the University of Granada and Maria Jesus Lisbona-Gonzalez thanks to the doctoral program in clinical medicine and public health.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Garlet, G.P.; Cardoso, C.R.; Silva, T.A.; Ferreira, B.R.; Ávila-Campos, M.J.; Cunha, F.Q.; Silva, J.S. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiol. Immunol.* **2006**, *21*, 12–20, doi:10.1111/j.1399-302x.2005.00245.x.
2. Lockhart, P.B.; Bolger, A.F.; Papananou, P.N.; Osinbowale, O.; Trevisan, M.; Levison, M.E.; Taubert, K.A.; Newburger, J.W.; Gornik, H.L.; Gewitz, M.H.; et al. Periodontal Disease and Atherosclerotic Vascular Disease: Does the Evidence Support an Independent Association? A scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* **2012**, *125*, 2520–2544, doi:10.1161/cir.0b013e31825719f3.
3. Elkhoul, A.M. The efficacy of host response modulation therapy (omega-3 plus low-dose aspirin) as an adjunctive treatment of chronic periodontitis (Clinical and biochemical study). *J. Periodontol. Res.* **2011**, *46*, 261–268, doi:10.1111/j.1600-0765.2010.01336.x.
4. Dziejzic, A.; Kubina, R.; Wojtyczka, R.D.; Kabala-Dzik, A.; Tanasiewicz, M.; Morawiec, T. The Antibacterial Effect of Ethanol Extract of Polish Propolis on Mutans Streptococci and Lactobacilli Isolated from Saliva. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2013**, *2013*, 681891, doi:10.1155/2013/681891.
5. Pretzl, B.; Sälzer, S.; Ehmke, B.; Schlagenhauf, U.; Dannewitz, B.; Dommisch, H.; Eickholz, P.; Jockel-Schneider, Y. Administration of systemic antibiotics during non-surgical periodontal therapy—a consensus report. *Clin. Oral Investig.* **2019**, *23*, 3073–3085, doi:10.1007/s00784-018-2727-0.
6. Hägi, T.; Hofmänner, P.; Salvi, G.; Ramseier, C.A.; Sculean, A. Clinical outcomes following subgingival application of a novel erythritol powder by means of air polishing in supportive periodontal therapy: A randomized, controlled clinical study. *Quintessence Int.* **2013**, *44*, 753–761, doi:10.3290/J.QI.A30606.

7. Nilsson, B.O. Mechanisms involved in regulation of periodontal ligament cell production of pro-inflammatory cytokines: Implications in periodontitis. *J. Periodontol Res.* **2021**, *56*, 249–255, doi:10.1111/jre.12823.
8. Varoni, E.M.; Lodi, G.; Sardella, A.; Carrassi, A.; Iriti, M. Plant polyphenols and oral health: old phytochemicals for new fields. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 1706–1720, doi:10.2174/092986712799945012.
9. Curuțiu, C.; Dițu, L.M.; Grumezescu, A.M.; Holban, A.M. Polyphenols of Honeybee Origin with Applications in Dental Medicine. *Antibiotics* **2020**, *9*, 856, doi:10.3390/antibiotics9120856.
10. Al-Hatamleh, M.A.I.; Boer, J.C.; Wilson, K.L.; Plebanski, M.; Mohamud, R.; Mustafa, M.Z. Antioxidant-Based Medicinal Properties of Stingless Bee Products: Recent Progress and Future Directions. *Biomolecules* **2020**, *10*, 923, doi:10.3390/biom10060923.
11. Santiago, K.B.; Conti, B.J.; Cardoso, E.D.O.; Golim, M.D.A.; Sforcin, J.M. Immunomodulatory/anti-inflammatory effects of a propolis-containing mouthwash on human monocytes. *Pathog. Dis.* **2016**, *74*, ftw081, doi:10.1093/femspd/ftw081.
12. Sforcin, J.M. Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. *Phytother. Res.* **2016**, *30*, 894–905, doi:10.1002/ptr.5605.
13. Wade, C.; Friedrich, J.A. *Propolis Power Plus: The Health-Promoting Properties of the Amazing Beehive Energizer*; Keats Publishing: New Canaan, CT, USA, 1996.
14. González-Masís, J.; Cubero-Sesin, J.M.; Corrales-Ureña, Y.R.; González-Camacho, S.; Mora-Ugalde, N.; Baizán-Rojas, M.; Loaiza, R.; Vega-Baudrit, J.R.; Gonzalez-Paz, R.J. Increased Fibroblast Metabolic Activity of Collagen Scaffolds via the Addition of Propolis Nanoparticles. *Materials* **2020**, *13*, 3118.
15. Loureiro, K.C.; Barbosa, T.C.; Nery, M.; Chaud, M.V.; Da Silva, C.F.; Andrade, L.N.; Corrêa, C.B.; Jaguer, A.; Padilha, F.F.; Cardoso, J.C.; et al. Antibacterial activity of chitosan/collagen membranes containing red propolis extract. *Pharmazie* **2020**, *75*, 75–81.
16. Baumann, J.; Wurm, G.; Von Bruchhausen, F. Hemmung der Prostaglandinsynthetase durch Flavonoide und Phenolderivate im Vergleich mit deren O₂-•-Radikalfänger-eigenschaften. *Arch. Pharm.* **1980**, *313*, 330–337, doi:10.1002/ardp.19803130409.
17. Koo, H.; Gomes, B.P.; Rosalen, P.L.; G.M.B., Park, Y.K.; Cury, J.A. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Arch. Oral Biol.* **2000**, *45*, 141–148, doi:10.1016/s0003-9969(99)00117-x.
18. Przybyłek, I.; Karpiński, T.M. Antibacterial Properties of Propolis. *Molecules* **2019**, *24*, 2047, doi:10.3390/molecules24112047.
19. Marcucci, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* **1995**, *26*, 83–99.
20. Afra, B.; Mohammadi, M.; Soleimani, M.; Mahjub, R. Preparation, statistical optimization, in vitro characterization, and in vivo pharmacological evaluation of solid lipid nanoparticles encapsulating propolis flavonoids: a novel treatment for skin edema. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2020**, *46*, 1163–1176, doi:10.1080/03639045.2020.1779286.
21. Al-Shaher, A.; Wallace, J.; Agarwal, S.; Bretz, W.; Baugh, D. Effect of Propolis on Human Fibroblasts from the Pulp and Periodontal Ligament. *J. Endod.* **2004**, *30*, 359–361, doi:10.1097/00004770-200405000-00012.
22. Blonska, M.; Bronikowska, J.; Pietsch, G.; Czuba, Z.P.; Scheller, S.; Krol, W. Effects of ethanol extract of propolis (EEP) and its flavones on inducible gene expression in J774A.1 macrophages. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *91*, 25–30, doi:10.1016/j.jep.2003.11.011.
23. Song, H.S.; Park, T.W.; Sohn, U.D.; Shin, Y.K.; Choi, B.C.; Kim, C.J.; Sim, S.S. The Effect of Caffeic Acid on Wound Healing in Skin-incised Mice. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* **2008**, *12*, 343–347, doi:10.4196/kjpp.2008.12.6.343.
24. Almuhayawi, M.S. Propolis as a novel antibacterial agent. *Saudi J. Biol. Sci.* **2020**, *27*, 3079–3086, doi:10.1016/j.sjbs.2020.09.016.
25. Barroso, P.R.; Lopes-Rocha, R.; Pereira, E.M.; Marinho, S.A.; De Miranda, J.L.; Lima, N.L.; Verli, F.D. Effect of propolis on mast cells in wound healing. *Inflammopharmacology* **2012**, *20*, 289–294, doi:10.1007/s10787-011-0105-5.
26. Moreno, M.I.; Isla, M.I.; Sampietro, A.R.; Vattuone, M.A. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J. Ethnopharmacol.* **2000**, *71*, 109–114, doi:10.1016/s0378-8741(99)00189-0.
27. Castaldo, S.; Capasso, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* **2002**, *73* (Suppl. 1), S1–S6, doi:10.1016/s0367-326x(02)00185-5.
28. Paulino, N.; Abreu, S.R.; Uto, Y.; Koyama, D.; Nagasawa, H.; Hori, H.; Dirsch, V.; Vollmar, A.M.; Scremin, A.; Bretz, W.A. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, *587*, 296–301, doi:10.1016/j.ejphar.2008.02.067.
29. Teixeira, É.W.; Message, D.; Negri, G.; Salatino, A.; Stringheta, P.C. Seasonal Variation, Chemical Composition and Antioxidant Activity of Brazilian Propolis Samples. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2010**, *7*, 307–315, doi:10.1093/ecam/nem177.
30. Anjum, S.I.; Ullah, A.; Khan, K.; Attaullah, M.; Khan, H.; Ali, H.; Bashir, M.A.; Tahir, M.; Ansari, M.J.; Ghramh, H.A.; et al. Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi J. Biol. Sci.* **2019**, *26*, 1695–1703, doi:10.1016/j.sjbs.2018.08.013.
31. Egozi, E.I.; Bs, A.M.F.; Burns, A.L.; Gamelli, R.L.; DiPietro, L.A. Mast cells modulate the inflammatory but not the proliferative response in healing wounds. *Wound Repair Regen.* **2003**, *11*, 46–54, doi:10.1046/j.1524-475x.2003.11108.x.
32. Steinberg, D.; Kaine, G.; Gedalia, I. Antibacterial effect of propolis and honey on oral bacteria. *Am. J. Dent.* **1996**, *9*, 236–239.
33. Aabed, K.; Bhat, R.S.; Al-Dbass, A.; Moubayed, N.; Algahtani, N.; Merghani, N.M.; Alanazi, A.; Zayed, N.; El-Ansary, A. Bee pollen and propolis improve neuroinflammation and dysbiosis induced by propionic acid, a short chain fatty acid in a rodent model of autism. *Lipids Heal. Dis.* **2019**, *18*, 1–8, doi:10.1186/s12944-019-1150-0.
34. Ali, K.M.; Saleh, Z.; Jalal, J. Effect of local propolis irrigation in experimental periodontitis in rats on inflammatory markers (IL-1 β and TNF- α) and oxidative stress. *Indian J. Dent. Res.* **2020**, *31*, 893–898, doi:10.4103/ijdr.ijdr_909_19.
35. Samet, N.; Laurent, C.; Susarla, S.; Samet-Rubinsteen, N. The effect of bee propolis on recurrent aphthous stomatitis: A pilot study. *Clin. Oral Investig.* **2007**, *11*, 143–147, doi:10.1007/s00784-006-0090-z.

36. Carbajal, D.; Molina, V.; Valdés, S.; Arruzazabala, M.; Más, R.; Magraner, J. Anti-inflammatory activity of D-002: an active product isolated from beeswax. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **1998**, *59*, 235–238, doi:10.1016/s0952-3278(98)90135-1
37. Khayyal, M.T.; El-Ghazaly, M.A.; El-Khatib, A.; Hatem, A.M.; De Vries, P.J.F.; El-Shafei, S.; Khattab, M.M. A clinical pharmacological study of the potential beneficial effects of a propolis food product as an adjuvant in asthmatic patients. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2003**, *17*, 93–102, doi:10.1046/j.1472-8206.2003.00117.x.
38. Santos, F.A.; Bastos, E.M.; Uzeda, M.; Carvalho, M.A.; Farias, L.M.; Moreira, E.S.; Braga, F.C. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *J. Ethnopharmacol.* **2002**, *80*, 1–7, doi:10.1016/s0378-8741(02)00003-x.
39. Sonmez, S.; Kirilmaz, L.; Yucesoy, M.; Yücel, B.; Yilmaz, B. The effect of bee propolis on oral pathogens and human gingival fibroblasts. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *102*, 371–376, doi:10.1016/j.jep.2005.06.035.
40. Paula, A.M.B.; Gomes, R.T.; Santiago, W.K.; Dias, R.S.; Cortes, M.E.; Santos, V.R. Susceptibility of oral pathogenic bacteria and fungi to brazilian green propolis extract. *Pharm. Online* **2006**, *3*, 467–473.
41. Akca, A.E.; Akca, G.; Topçu, F.T.; Macit, E.; Pikköken, L.; Özgün, I.S. The Comparative Evaluation of the Antimicrobial Effect of Propolis with Chlorhexidine against Oral Pathogens: An In Vitro Study. *BioMed Res. Int.* **2016**, *2016*, 1–8, doi:10.1155/2016/3627463.
42. Al-Ani, I.; Zimmermann, S.; Reichling, J.; Wink, M. Antimicrobial Activities of European Propolis Collected from Various Geographic Origins Alone and in Combination with Antibiotics. *Medicines* **2018**, *5*, 2, doi:10.3390/medicines5010002.
43. De Luca, M.; Franca, J.R.; Macedo, F.A.F.F.; Grenho, L.; Cortés, M.E.; Faraco, A.A.G.; Moreira, A.; Santos, V.R. Propolis Varnish: Antimicrobial Properties against Cariogenic Bacteria, Cytotoxicity, and Sustained-Release Profile. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 1–6, doi:10.1155/2014/348647.
44. Özan, F.; Sümer, Z.; Polat, Z.A.; Er, K.; Özan, Ülkü; Değer, O. Effect of Mouthrinse Containing Propolis on Oral Microorganisms and Human Gingival Fibroblasts. *Eur. J. Dent.* **2007**, *1*, 195–201.
45. Galvao, J.; Abreu, J.; Cruz, T.; Machado, G.; Niraldo, P.; Dausch, A.; Moraes, C.; Fort, P.; Park, Y. Biological Therapy Using Propolis as Nutritional Supplement in Cancer Treatment. *Int. J. Cancer Res.* **2006**, *3*, 43–53.
46. De Moura, S.A.L.; Ferreira, M.A.N.D.; Andrade, S.P.; Reis, M.L.C.; Noviello, M.D.L.; Cara, D.C. Brazilian Green Propolis Inhibits Inflammatory Angiogenesis in a Murine Sponge Model. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2011**, *2011*, 197, doi:10.1093/ecam/nep197.
47. Elgamily, H.; Safy, R.; Makharia, R. Influence of Medicinal Plant Extracts on the Growth of Oral Pathogens Streptococcus Mutans and Lactobacillus Acidophilus: An In-Vitro Study. *Open Access Maced. J. Med. Sci.* **2019**, *7*, 2328–2334, doi:10.3889/oamjms.2019.653.
48. Awawdeh, L.; Al-Beitawi, M.; Hammad, M. Effectiveness of propolis and calcium hydroxide as a short-term intracanal medication against Enterococcus faecalis: A laboratory study. *Aust. Endod. J.* **2009**, *35*, 52–58, doi:10.1111/j.1747-4477.2008.00125.x.
49. Kandaswamy, D.; Venkateshbabu, N.; Gogulnath, D.; Kindo, A.J. Dentinal tubule disinfection with 2% chlorhexidine gel, propolis, morinda citrifolia juice, 2% povidone iodine, and calcium hydroxide. *Int. Endod. J.* **2010**, *43*, 419–423, doi:10.1111/j.1365-2591.2010.01696.x.
50. Lisbona, C.; Díaz-Castro, J.; Alférez, M.J.M.; Guisado, I.M.; Guisado, R.; López-Aliaga, I. Positive influence of a natural product as propolis on antioxidant status and lipid peroxidation in senescent rats. *J. Physiol. Biochem.* **2013**, *69*, 919–925, doi:10.1007/s13105-013-0270-7.
51. Lisbona-González, M.J.; Reyes-Botella, C.; Muñoz-Soto, E.; Vallecillo-Rivas, M.; Moreno-Fernández, J.; Díaz-Castro, J. Efecto positivo de un suplemento de propóleo sobre el perfil lipídico, la glucemia y el estado antioxidante hepático en un modelo animal experimental. *Nutr. Hosp.* **2020**, *37*, 770–775.
52. Schulz, K.F.; Altman, D.G.; Moher, D. CONSORT 2010 Statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMC Med.* **2010**, *8*, 18, doi:10.1186/1741-7015-8-18.
53. Tonetti, M.S.; Greenwell, H.; Kornman, K.S. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J. Periodontol.* **2018**, *89* (Suppl. 1), S159–S172, doi:10.1002/jper.18-0006.
54. Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in Enzymology*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 1999; Volume 299, pp. 152–178.
55. Madrazo-Jiménez, M.; Rodríguez-Caballero, Á.; Serrera-Figallo, M.; Garrido-Serrano, R.; Gutiérrez-Corrales, A.; Gutiérrez-Pérez, J.L.; Torres-Lagares, D. The effects of a topical gel containing chitosan, 0.2% chlorhexidine, allantoin and despanthenol on the wound healing process subsequent to impacted lower third molar extraction. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal* **2016**, *21*, e696–e702, doi:10.4317/medoral.21281.

Article

Study of the Antimicrobial Effect of an Ethanolic Extract of Propolis in Periodontal Disease

Maria Jesús Lisbona-González ¹, Esther Muñoz-Soto ¹, Candela Reyes-Botella ¹, Maria Victoria Olmedo-Gaya ¹, Javier Díaz-Castro ^{2,3,4,*} and Jorge Moreno-Fernandez ^{2,3,*} †

¹ Department of Stomatology, School of Dentistry, University of Granada, 18071 Granada, Spain; mjlisbona@hotmail.com (M.J.L.-G.); esther@msotodental.es (E.M.-S.); creyes@ugr.es (C.R.-B.); mvolmedo@ugr.es (M.V.O.-G.)

² Department of Physiology, Faculty of Pharmacy, Campus Universitario de Cartuja, University of Granada, 18071 Granada, Spain

³ Institute of Nutrition and Food Technology “José Mataix Verdú”, University of Granada, 18071 Granada, Spain

⁴ Instituto de Investigación Biosanitaria (IBS), 18016 Granada, Spain

* Correspondence: javierdc@ugr.es (J.D.-C.); jorgemf@ugr.es (J.M.-F.)

† Co-senior authors.

Citation: Lisbona-González, M.J.; Muñoz-Soto, E.; Reyes-Botella, C.; Olmedo-Gaya, M.V.; Díaz-Castro, J.; Moreno-Fernandez, J. Study of the Antimicrobial Effect of an Ethanolic Extract of Propolis in Periodontal Disease. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 7463. <https://doi.org/10.3390/app11167463>

Academic Editors: Urszula Szymanowska, Monika Karaś and Monica Gallo

Received: 17 June 2021

Accepted: 11 August 2021

Published: 13 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Periodontal disease encompasses gingivitis and periodontitis and is one of the most common chronic infections in the adult population. This study aimed to evaluate the influence of Spanish propolis extract (EEP) on the effect of the clinical and microbiological parameters as an adjuvant to scaling and root planning in patients undergoing supportive periodontal therapy (SPT). Forty chronic periodontitis patients were randomly assigned into two groups for the treatment. In the control group ($n = 20$), the sites were treated by scaling and root planing followed by gingival irrigation with physiological saline and in the test group ($n = 20$), the sites were treated by scaling and root planing followed by subgingival placement of EEP. At baseline (BL), bleeding on probing positive (BOP+) sites with probing pocket (PPD) ≥ 4 mm were defined as study sites. Plaque index, PPD, BOP, clinical attachment level (CAL), and subgingival plaque were evaluated at BL and 1 month later. The results showed a significant clinical improvement ($p < 0.05$) in the PPD, CAL and BOP+ comparing them with BL and one month after the periodontal treatment and a significant reduction ($p < 0.05$) for *Tannerella forsythensis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Treponema denticola* in both groups. In addition, the improvement of clinical parameters was observed with subgingival use of EEP and also statistically significant differences between groups were observed ($p < 0.05$) such as reductions of BOP+ % and reduced counts of *T. forsythensis* and *P. gingivalis*, considered as the “key pathogens” for the periodontal diseases. Our results suggest prophylactic and therapeutic potential for EEP against periodontal diseases, improving clinical parameters, reducing gingival bleeding and decreasing bacterial counts of *T. forsythensis* and *P. gingivalis*. The subgingival use of EEP represents a promising modality as an adjuvant in periodontal therapy to avoid microbial resistance and other adverse effects.

Keywords: propolis; oral healing; periodontal disease; antimicrobial effect

1. Introduction

Periodontal disease encompasses gingivitis and periodontitis. Gingivitis, or inflammation of the gums which leads to bleeding gums, is considered an early form of periodontal disease. Periodontal disease is one of the most common chronic infections in the adult population [1]. Periodontitis develops over time with the accumulation of dental plaque, bacterial dysbiosis, periodontal pockets formation, gingival recession, tissue destruction and alveolar bone resorption, which can ultimately lead to tooth loss.

Periodontal disease may contribute to the organism's overall inflammatory burden, worsening conditions such as diabetes mellitus and atherosclerosis [2] systemic inflammation being one of the main reasons for this association [3]. The immune response from the interaction between inflammatory cells and pathogenic bacteria like *P. gingivalis*, *T. forsythensis*, *P. Intermedia*, *B. forsythus* and *A. actinomycetemcomitans* can be crucial for the development of inflammatory processes in the surrounding tissue of the teeth.

All forms of periodontitis are treated by scaling and root planing (SRP) risk factor elimination or minimization, and daily home care and professional prophylaxis during the subsequent follow-up appointment with dentists. After clinical detection of periodontal bone adhesion and/or bone resorption, the goal of treatment is controlling inflammation and preventing disease progression and create the conditions that will help the patient to maintain healthy, functional and comfortable dentition in the long term [4] because when tissue and bone loss has occurred, it is permanent.

Scaling and root planning can be limited by the inability to reach deep areas, making it difficult to eliminate all bacteria. Therefore, the use of antibacterial agents is recommended to reduce the use of surgical approaches to periodontal pockets [5]. This helps to achieve effective drug levels at points where systemic drug intake is minimal and the risk of antibiotic-resistant strains is low [6].

The clinical use of antibiotics and other antimicrobial agents, as adjuvants for the treatment of periodontitis, is really common [7]. Recently, special attention has been paid to natural therapies. There is considerable evidence that herbal products, essential oils, and purified phytochemicals have proved to be an abundant source of biologically active compounds [8]. Approximately 80% of the population of the developing countries still use traditional medicines for their health care [9]. There have been many reports of traditional plants for the treatment of periodontal diseases. They showed the ability to inhibit the growth of oral pathogens and decreased bacterial adhesion responsible for the formation of dental plaque. Traditional plants could be the first step in developing gingivitis reducing risk factors and contributing to the maintenance of oral health to avoid bacterial recolonisation [5,10]. In this sense, Sakagami et al. [11] suggested the efficacy of GTF (glucosyltransferase) inhibitors and ARBs (Angiotensin II receptor blocker) to prevent biofilm formation and periodontitis, respectively. Different *Lactobacillus* species and the two-peptide bacteriocin PLNC8 $\alpha\beta$ on *P. gingivalis* have been investigated to study possible effects on supporting the host immune system against invading pathogens; the probiotics tested represent valid support for SRP and benefit several clinical indexes [12].

There should be still many unknown substances that are useful for treating oral diseases in the natural kingdom. Spanish propolis can be one of the natural substances used in periodontal disease because as previously reported [13].

Propolis is a non-toxic resinous substance produced by bees that has anti-inflammatory, antibacterial, antifungal, and antioxidant properties, among others [14,15], which has attracted the attention of researchers, in medical and dental care. Its composition is quite complex based on vegetable resins (50%), waxes (30%), essential and aromatic oils (10%) and pollen and other organic substances (10%). Its main components are flavonoids and phenolic esters such as artemisyl C, gallic acid, catechins, ursolic acid and bacarin showing bacteriostatic activity producing blisters in the bacterial membrane [13]. Its components have anti-inflammatory, antibacterial and immunomodulating properties too, which are very useful to treat candidiasis, aphthous ulcers, gingivitis and periodontitis [16–18].

The purpose of this study was to evaluate the effect of subgingivally delivered ethanolic extract of Spanish propolis as an adjuvant to scaling and root planning in the treatment and maintenance of periodontitis.

2. Materials and Methods

2.1. Ethanolic Extract of Spanish Propolis

Propolis samples were supplied by Verbiotech I+D+i S.L., (Granada, Spain). A broad analysis reveals approximately 50% resin and vegetable balsam, 30% wax, 10% essential and aromatic oils, and 5% pollen and 5% other compounds. Raw propolis chunks scraped directly from the frames and boxes of beehives were provided by Verbiotech I+D+i S.L. (Granada, Spain). The propolis formulation was prepared under aseptic conditions. 20 g of unrefined propolis was crushed and dissolved in 100 mL of 66% ethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The mixture was kept at room temperature (25 °C) for 28 days and subsequently filtered by gravity using a Whatman 1004125 Grade 4 Qualitative Filter Paper Standard (Whatman Maidstone, UK9 and Protran R nitrocellulose membrane (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

2.2. Total Phenolic Assay

A lyophilized sample of 0.5 g of raw propolis chunks was weighed and phenolic and flavonoid products were extracted with 50 mL 80% aqueous methanol on an ultrasonic bath Model 2510 EMS (Hatfield, MA, USA) for 20 min. A portion (1 mL) of the extracts was centrifuged at 14,000 rpm for 5 min. The total phenolic content of propolis and vegetable product was determined by the Folin–Ciocalteu assay [19]. The extract was oxidized with the Folin–Ciocalteu reagent, and the reaction was neutralized with sodium carbonate. The absorbance of the obtained blue colour was measured at 760 nm after 60 min. Using gallic acid as standard total phenolic content (the calibration curve was generated using a concentration of 2.5–50 mg/L) was expressed as mg gallic acid equivalents (GAE)/100 g of fresh weight. Data reported were from three replications.

2.3. Total Flavonoid Assay

Total flavonoid content was measured by the aluminium chloride colorimetric assay [20]. A fraction (1 mL) of the extract (0.5 g propolis) extracted with 50 mL of 80% aqueous methanol solution or a standard solution of catechins (20, 40, 60, 80, 100 mg/L) was added to 10 mL vial containing 4 mL bidistilled H₂O. Subsequently, 0.3 mL of 5% NaNO₂ was added to the flask. After 5 min, 0.3 mL of 10% AlCl₃ was added. After 6 min, 2 mL of 1M NaOH solution was added to bring the total volume to 10 mL with bidistilled H₂O. The solution was mixed and the absorbance at 510 nm was measured with a blank. Total flavonoid content was expressed in mg of catechin equivalent (CE) per 100 g of fresh weight. Samples were analysed in triplicates.

2.4. Participants and Enrolment

This is a randomized, controlled, parallel, double-blind study conducted at the Faculty of Dentistry, University of Granada. The study was approved by the Ethics Committee of the University of Granada (reference 819). Forty patients were included in the study (Figure 1). Written consent was obtained from all the subjects and the treatment procedure was explained to the patient before treatment was given. The inclusion criteria were: Patients have explicit consent, need tooth extraction with advanced periodontal disease, and have not received active periodontal treatment in the last 3 months, bleeding of two or more teeth (bleeding on probing positive, BOP+), depth of the periodontal pocket (probing pocket depth, PPD \geq 4 mm), significant tooth extraction, highly mobile teeth, and age between 50–60 years. Exclusion criteria were: lack of informed consent, systemic illness, allergy to one of the products tested, pregnancy or lactation, use of antibiotics or anti-inflammatory drugs. After enrolment, patients are randomly assigned to test or control groups using a computer-generated sequence. All clinical measurements were performed by the same researcher. This study included two groups. In the control group (n = 20), the site was treated scaling and root planning only, and in the experimental group (n = 20), the site was treated by scaling and root planing followed by subgingival placement of

ethanolic extract of Spanish propolis (EEP) (Figure 2). At the first visit, all patients had clinical measurements, bleeding on probe positive (BOP+), Periodontal pocket Deep (PPD) and Clinical attachment level (CAL). We selected the 5 deepest locations, removed the plaque on the surface with a cotton swab, and dried the area. Subsequently, a glass cylinder was inserted into the gum line for 1 min to avoid contact with the remaining oral tissue. The cylinder was then removed and placed in a test tube, air-dried for a few minutes with the cap open, and the sample was used for qualitative and quantitative microbiological studies by PCR of the following microorganisms: *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythensis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* and *T. denticola*. Periodontal ultrasound treatment was performed on each surface for 30 s. The device used was a Piezon® Master 400 from EMS Swiss Instrument Perio Slim, the power was adjusted to 75%. Polishing was done with Perio-Set® and rubber cups with low abrasive paste (Kerr Hawe®). The EEP gingival sulcus was then washed using a 3 mL UEETEK® graduated pipette in the Vitulia 0.9% physiological test and serum as a placebo in the control group. There was no anaesthesia or antibiotic treatment during the surgery.

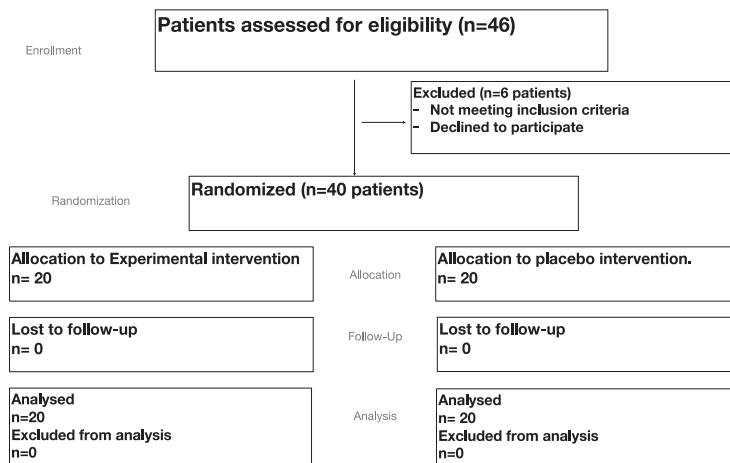


Figure 1. Flowchart diagram showing the process of the study.

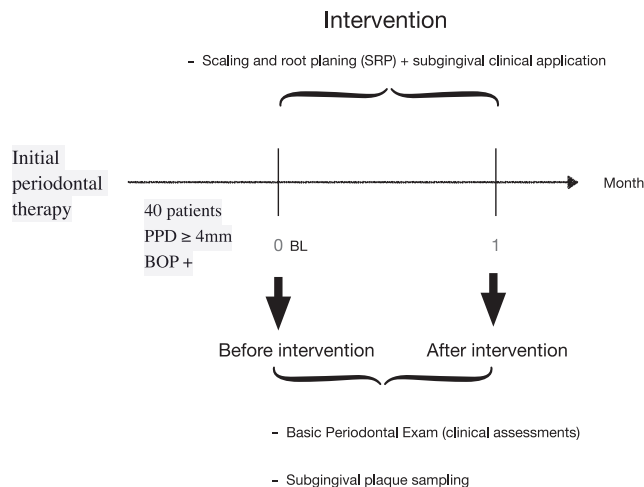


Figure 2. Study design. The registered participants were 40 chronic periodontitis patients who had signed the informed consent. They needed periodontal maintenance therapy and had at least two

teeth with bleeding on probing positive (BOP+), probing depths equal or greater than 4 mm (PPD \geq 4 mm) at baseline (BL). Subgingival plaque samples were obtained with sterile vials from test and control sites at baseline and 1-month follow-up.

2.5. Microbial Sampling

Gentle removal of surface plaque was performed with a sterile cotton swab, isolating the sample site with a cotton roll and air-dry prior to sampling. Baseline plaque samples were obtained from deeper pockets using sterile curettage at the test and control sites at baseline (before scaling and planning) and one month after treatment. Subgingival samples were collected in one injection after being gently inserted into the bottom of the sampling site. Samples were collected in sterile vials containing thioglycolate broth and transported to the laboratory for microbiological analysis.

2.6. DNA Extraction and Analysis

DNA extraction was performed according to Avila-Campos [21]. Samples were homogenized and washed twice at 12,000 \times g for 10 min. The pellet was resuspended in 300 μ L of ultra-pure water and boiled for 10 min. After centrifugation (14,000 \times g, 10 min), the supernatant (DNA) was stored and transferred to a new tube to be used as a slide. The quality of the DNA samples was confirmed by agarose gel electrophoresis and all were stored at -20 °C.

2.7. PCR Amplification

All the clinical samples were included in the PCR analysis. Species-specific primer pairs based on the sequence of the gene 16S rDNA were used according to Ashimoto et al. [22]. The amplification reaction was performed in 25 μ L containing 2.5 μ L of 10X PCR buffer, 1.25 μ L of MgCl₂ (50 mM), 1.0 μ L of dNTP (0.2 mM; Invitrogen do Brasil, Sao Paulo, SP, Brazil), 1.0 μ L of each primer (0.4 M), 0.25 μ L of Platinum Taq DNA polymerase (0.5 U; Invitrogen), 8 μ L of sterilized ultra-pure water and 10 ng of DNA. The amplifications were performed in a DNA thermal cycler (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 9700, Norwalk, CT, USA) programmed for 94 °C (5 min), followed by 30 cycles at 94 °C for 30 s; annealing temperature adequate for each primer pairs for 30 s; 72 °C for 30 s, then 72 °C (5 min) to allow the completion of the DNA extension. In each respective PCR amplification DNA from *T. forsythensis* ATCC 43037, *P. gingivalis* ATCC 33277, *P. intermedia* ATCC 25611, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29523, were used as positive controls. A negative control without template DNA was included in each PCR run. Amplified products were compared by electrophoresis in 1% of agarose gel in 1X TBE buffer (1 M Tris, 0.9 M boric acid, 0.01 M EDTA, pH 8.4) (Invitrogen, Waltham, MA, USA), at 60 V, for 2.5 h, stained with ethidium bromide (0.5 mg/mL) and photographed on a UV light transilluminator (Kodak Digital Science System 120 TM). A 1-kb plus DNA ladder (Invitrogen, Waltham, MA, USA) was used as a molecular marker.

2.8. Statistical Analysis

Data are represented as mean \pm standard error of the mean (SEM). A descriptive summary of the variables intra-treatment and between-treatments is carried out both before and after the intervention, using centralization and dispersion coefficients. The normality of the variables was checked by the Shapiro–Wilk test. The comparison within each treatment for the quantitative variables was performed using the Wilcoxon test. In the case of the qualitative variable, the comparison within each treatment was made using the McNemar test. The comparison between treatments for the quantitative variables was performed using the Mann–Whitney test. In the case of the qualitative variable, the comparison between treatments was made using the binomial proportions test. A level of $p < 0.05$ was considered to indicate statistical significance. Statistical analyses were performed using SPSS Version 24.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. Results

The pH of propolis formulations (mean of three replications \pm SEM) was 5.9 ± 0.48 . Chemical analysis revealed that propolis used in the current study contained 388.2 ± 8.2 mg GAE/100 g as total phenolics and 37.0 ± 1.3 mg CE/100 g as total flavonoids.

The results showed a significant clinical improvement ($p < 0.05$) in the PPD and CAL comparing them at the beginning and one month after the periodontal treatment. Although the reduction was more apparent in the test group than in the control group, the differences were not statistically significant when comparing PPD and CAL between the two groups at the follow-up appointment (Table 1).

Table 1. Effect of the intervention on periodontal status.

	Control			Test		
	Mean	SEM	Median	Mean	SEM	Median
BL-PPD (mm)	4.75	0.17	5.00	4.75	0.18	5.00
BL-CAL (mm)	5.75	0.29	5.50	5.80	0.33	5.50
1M-PPD (mm)	3.60	0.17	4.00	3.30	0.15	3.00
1M-CAL (mm)	4.55	0.28	5.00	4.45	0.26	4.00
VAR. PPD (mm)	1.20 *	0.14	1.00	1.45 *	0.15	1.00
VAR. CAL (mm)	1.20 *	0.17	1.00	1.35 *	0.18	1.00
VAR. PPD (%)	36.42 *	5.14	33.33	46.83 *	6.02	33.33
VAR. CAL (%)	30.63 *	5.72	25.00	31.46 *	4.24	25.00

SD. Standard deviation, SEM standard error of the mean. BL (Baseline) 1 M (one month later), PPD (probing pocket deep), CAL (clinical attachment level). Intra-treatment (Wilcoxon test) * $p < 0.05$ differences were significant when comparing PPD and CAL Intra-treatments. Between-groups (Mann-Whitney test) $p \geq 0.05$, differences were not significant when comparing PPD and CAL between groups.

One month later, the levels of bleeding on probe (BOP+) had been significantly reduced ($p < 0.05$) by 90% in the test group vs. control 75% (McNemar test) (Figure 3).

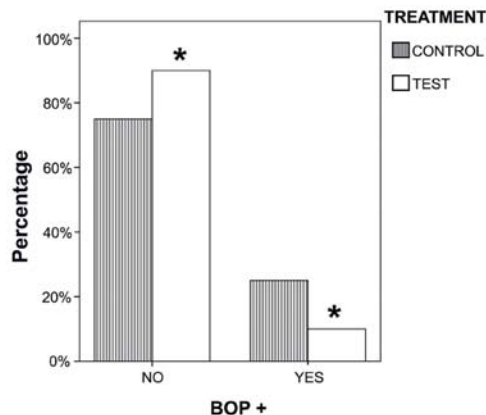


Figure 3. Levels of bleeding on probing positive (BOP+) both groups after 1 month. No bleeding (BOP) was statistically significant in the test group. * $p < 0.05$.

The presence of *A. actinomycetemcomitans* was not detected in any patients included in the study, so the antimicrobial effect of propolis extract for this bacterium could not be observed. Regarding the bacterial count of the other bacteria, after a month we observed a significant reduction ($p < 0.05$) for *T. forsythensis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. denticola*, in both groups. When comparing the percentage of decrease in bacteria between the

groups, to evaluate the effectiveness of the irrigated substances, we found significant differences, decreasing the number of colonies for *T. forsythensis* and *P. gingivalis* in the test group ($p < 0.05$) (Figure 4).

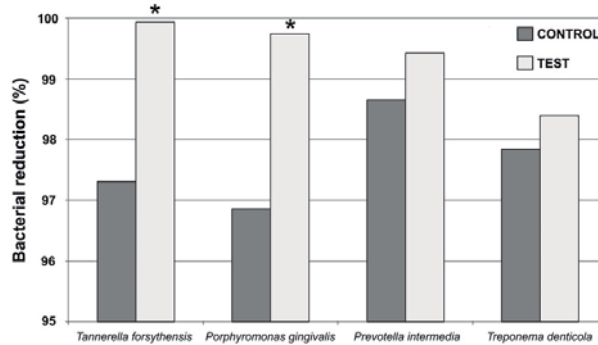


Figure 4. Percentage of bacterial reduction in both groups after one month of the intervention. (* $p < 0.05$).

4. Discussion

The oral cavity is rich in microbiota, and the overgrowth of bacteria can cause many pathologies. Several studies have shown that propolis can limit the growth of bacteria and pathogens responsible for periodontitis due to its antibacterial properties [23]. Propolis solution has a selectively weaker cytotoxic effect on human gingival fibroblasts than chlorhexidine. Additionally, mouthwashes containing propolis have been shown to be effective in healing surgical wounds, which facilitates the use of propolis in mouthwash solutions [24]. Propolis solution can also be used to disinfect toothbrushes [25]. The 3% ethanolic extract of propolis toothpaste was shown to be more effective than commercial toothpaste against periodontitis in a group of patients [26]. Propolis extracts also help treat halitosis, a condition in which patients experiences unpleasant breath predominantly due to poor oral hygiene. Propolis toothpaste or mouthwash is used to control the growth of bacterial plaques and pathogenic microbiota that cause gingivitis and periodontitis as a natural remedy [23].

The results of the current study show significant bactericidal action of Spanish propolis extract on *P. gingivalis* and *T. forsythensis* in bacterial counts one month after periodontal therapy. Regarding the clinical results, in the monthly review, we found a reduction in the average depth of the bags at the 46.83% probing of the test compared to 36.42% in the control group. A significant decrease in bleeding in 90% of the test compared to 75% in the control was also shown. The absence of bleeding is an indicator of periodontal stability [27].

These results agree with Coutinho [28] and Sanghani et al. [29] reporting an improvement in biological and clinical parameters in periodontal tissues and corroborate those of Yoshimasu and Ikeda [13], reporting that *P. gingivalis* bacteria at different concentrations were eliminated with the use of propolis in a dose-dependent manner, they suggested that propolis administration in the oral cavity, is an agent with selectivity action against *P. gingivalis* in the periodontal pockets while maintaining the homeostatic benefit produced by oral commensal bacteria. Nakao et al. [30] in a double-blind controlled clinical trial in 24 patients with chronic periodontitis investigated topical administration of propolis, curry leaf and minocycline in periodontal pockets, they concluded that propolis treatment significantly improved both PPD and CAL and reduced *P. gingivalis* burden in the gingival crevicular fluid. We agree with them although our results were better in the propolis group, although they were not significant with respect to PPD and CAL, fact that can be because the application time was longer than the used in the current study (three times

a day for 3 months). Giammarinaro et al. [31] evaluated the efficacy of an antioxidant based formula containing propolis and herbs as an adjuvant therapy to standard non-surgical periodontal treatment when compared to the domiciliary use of chlorhexidine-based formula. Propolis showed better results, although there was no significant difference between the groups.

Additionally, Propolis has been shown to exhibit good antimicrobial activity against a wide range of oral bacteria and inhibit the adherence to glass [32]. It was also shown to be a potent inhibitor of water-soluble glucan synthesis. Uzel et al. [33] also investigated the activity of propolis against several microorganisms. Ethanol extracts of four samples of propolis collected from different geographical regions prevented the appearance of visible growth of microorganisms, due to the presence of many flavonoids. Propolis showed an antibacterial activity similar to chlorhexidine in a study that evaluated the ability of these chemicals to inhibit microbial growth obtained from the saliva of healthy and those with chronic periodontitis [34], in agreement with the results of the current study.

Akca et al. [35] reported that an ethanolic extract of propolis (EEP) similar to the used in the current study inhibited the growth of all planktonic species as much as chlorhexidine. These authors discussed the antibacterial effects of propolis against many microorganisms. This effect is multifactorial, and as a result, the cytoplasm disintegrates cell membranes and cell walls collapse, bacteria are partially degraded and protein synthesis is inhibited. A previous study has shown that solvents and acidic solutions of propolis are more effective against bacteria and can change the pH and concentration of propolis [36]. In addition, bacterial cell wall and their biofilm properties were concluded as adjunct factors, which determine the bactericidal effect of propolis [37]. Furthermore, it was concluded that the cell walls of bacteria and the properties of their biofilms are supporting factors that determine the bactericidal effect of propolis.

Chlorhexidine is a widely used disinfectant and is included in various preparations to prevent infections, such as preoperative skin irrigation, incision preparation, and intraoperative irrigation, and hand antisepsis. However, there are several studies on the safety of chlorhexidine as a wound cleanser and as a local antiseptic around the incision. Previous studies have shown cytotoxicity against naturally proliferating cells [38] and also can be cytotoxic to human fibroblasts, osteoblasts, and lymphocytes in a time and dose-dependent manner [38], which may delay wound healing or lead to increased rates of wound dehiscence. Multiple *in vitro* studies with Chlorhexidine had demonstrated its cytotoxicity to fibroblast cells [39]. While fibroblasts are a critical cell type in wound healing, myoblasts, osteoblasts are crucial for skeletal muscle repair and bone healing, respectively [40]. Taking into account that the safety of propolis is assured not only by its long history of use as a traditional medicine but also by *in vitro* and *in vivo* assessment studies, it is a candidate as an adjunct in periodontal therapies. The use of standardized propolis preparations a safe and less toxic than many other synthetic preparations [41].

Due to the evidence of the link between poor oral hygiene, ongoing chronic inflammation, gingivitis, periodontitis, and systemic diseases such as diabetes, cardiovascular diseases, rheumatoid arthritis and osteoporosis [42], it is essential to achieve periodontal health and stability to avoid bacterial recolonization and bleeding in the oral cavity, using adjuvant therapies that can achieve this objective. It is noteworthy the involvement of the patient in their periodontal maintenance, performing correct oral hygiene at home. In this sense, it has been studied that sonic action heads (SAHs) powered toothbrushes appear to be more effective than brushes with oscillating heads [43], the use of products that do not stain the teeth as propolis and periodic check-ups to control plaque accumulation and gingival inflammation. Future clinical trials in which we test the different administrations of propolis, mouthwashes, toothpastes, chewing gums, ointments, gels to use at home and in the dental office are necessary to better understand their effects and applications.

5. Conclusions

Based on the results obtained, this study shows that the propolis extract has a bactericidal action against periodontopathogenic bacteria especially against *P. gingivalis*, a pathogen that has a key role in the development of periodontal disease. In addition, an improvement of clinical parameters and a reduction of microbiological counts was observed when subgingivally propolis extract was administered in patients with periodontal pockets, reducing specific risk factors for disease progression such as bleeding on probing. The topical use of propolis may be a promising complement to periodontal therapy to avoid microbial resistance and other adverse effects.

Author Contributions: J.D.-C. and J.M.-F. designed the study. M.J.L.-G., E.M.-S., C.R.-B. and M.V.O.-G. performed the experiments. M.J.L.-G., E.M.-S., and J.M.-F. analysed the data. M.J.L.-G., J.D.-C., M.V.O.-G. and J.M.-F. Writing—Original Draft Preparation. E.M.-S., C.R.-B., M.V.O.-G. and J.M.-F. revised and adapted the manuscript. M.J.L.-G., J.D.-C. and J.M.-F. Supervision and Project Administration. All the authors approved the final version of the manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. All persons designated as authors qualify for authorship, and all those who qualify for authorship are listed. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee from the University of Granada (reference 819).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding authors.

Acknowledgments: Jorge Moreno-Fernandez was supported by a Postdoctoral Contract (Contrato Punte) from the University of Granada and Maria Jesus Lisbona Gonzalez thanks to the doctoral program in clinical medicine and public health.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Richards, D. Review finds that severe periodontitis affects 11% of the world population. *Evidence Based Dent.* **2014**, *15*, 70–71, doi:10.1038/sj.ebd.6401037.
2. Gotsman, I.; Lotan, C.; Soskolne, W.A.; Rassovsky, S.; Pugatsch, T.; Lapidus, L.; Novikov, Y.; Masrawa, S.; Stabholz, A. Periodontal destruction is associated with coronary artery disease and periodontal infection with acute coronary syndrome. *J. Periodontol.* **2007**, *78*, 849–858, doi:10.1902/jop.2007.060301.
3. Sanz, M.; Marco Del Castillo, A.; Jepsen, S.; Gonzalez-Juanatey, J.R.; D’Aiuto, F.; Bouchard, P.; Chapple, I.; Dietrich, T.; Gotsman, I.; Graziani, F.; et al. Periodontitis and cardiovascular diseases: Consensus report. *J. Clin. Periodontol.* **2020**, *47*, 268–288, doi:10.1111/jcpe.13189.
4. Kinane, D.F.; Stathopoulou, P.G.; Papapanou, P.N. Periodontal diseases. *Nat. Rev. Dis. Prim* **2017**, *3*, 17038, doi:10.1038/nrdp.2017.38.
5. Alshehri, M.; Alshail, F.; Alshehri, F.A. Effect of scaling and root planing with and without adjunctive use of an essential-oil-based oral rinse in the treatment of periodontal inflammation in type-2 diabetic patients. *J. Investig. Clin. Dent.* **2017**, *8*, doi:10.1111/jicd.12188.
6. Wennström, J.L.; Dahlén, G.; Ramberg, P. Subgingival debridement of periodontal pockets by air polishing in comparison with ultrasonic instrumentation during maintenance therapy. *J. Clin. Periodontol.* **2011**, *38*, 820–827, doi:10.1111/j.1600-051X.2011.01751.x.
7. Gebara, E.C.; Lima Luiz, A.; Mayer Marcia, P.A. Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. *Braz. J. Microbiol.* **2002**, *33*, 365–369.
8. Palombo, E.A. Traditional Medicinal Plant Extracts and Natural Products with Activity against Oral Bacteria: Potential Application in the Prevention and Treatment of Oral Diseases. *Evidence Based Complement. Altern. Med.* **2011**, 680354, doi:10.1093/ecam/nep067.

9. Kim, H.S. Do not put too much value on conventional medicines. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *100*, 37–39, doi:10.1016/j.jep.2005.05.030.
10. Wińska, K.; Mączka, W.; Lyczko, J.; Grabarczyk, M.; Czubaszek, A.; Szumny, A. Essential Oils as Antimicrobial Agents—Myth or Real Alternative? *Molecules* **2019**, *24*, 2130.
11. Sakagami, H.; Watanabe, T.; Hoshino, T.; Suda, N.; Mori, K.; Yasui, T.; Yamauchi, N.; Kashiwagi, H.; Gomi, T.; Oizumi, T.; et al. Recent Progress of Basic Studies of Natural Products and Their Dental Application. *Medicines* **2018**, *6*, 4, doi:10.3390/medicines6010004.
12. Butera, A.; Gallo, S.; Maiorani, C.; Molino, D.; Chiesa, A.; Preda, C.; Esposito, F.; Scribante, A. Probiotic Alternative to Chlorhexidine in Periodontal Therapy: Evaluation of Clinical and Microbiological Parameters. *Microorganisms* **2020**, *9*, doi:10.3390/microorganisms9010069.
13. Yoshimasu, Y.; Ikeda, T.; Sakai, N.; Yagi, A.; Hirayama, S.; Morinaga, Y.; Furukawa, S.; Nakao, R. Rapid Bactericidal Action of Propolis against *Porphyromonas gingivalis*. *J. Dent. Res.* **2018**, *97*, 928–936, doi:10.1177/0022034518758034.
14. Martinello, M.; Mutinelli, F. Antioxidant Activity in Bee Products: A Review. *Antioxidants* **2021**, *10*, 71.
15. Przybyłek, I.; Karpiński, T.M. Antibacterial Properties of Propolis. *Molecules* **2019**, *24*, 2047, doi:10.3390/molecules24112047.
16. Ali, K.M.; Saleh, Z.; Jalal, J. Effect of local propolis irrigation in experimental periodontitis in rats on inflammatory markers (IL-1 β and TNF- α) and oxidative stress. *Indian J. Dent. Res.* **2020**, *31*, 893–898, doi:10.4103/ijdr.IJDR_909_19.
17. Almuhayawi, M.S. Propolis as a novel antibacterial agent. *Saudi J. Biol. Sci.* **2020**, *27*, 3079–3086, doi:10.1016/j.sjbs.2020.09.016.
18. Anauate-Netto, C.; Anido-Anido, A.; Leegoy, H.R.; Matsumoto, R.; Alonso, R.C.; Marcucci, M.C.; Paulino, N.; Bretz, W.A. Randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial on the effects of propolis and chlorhexidine mouthrinses on gingivitis. *Braz. Dent. Sci.* **2014**, *17*, 11–15, doi:10.14295/bds.2014.v17i1.947.
19. Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in Enzymology*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 1999; Volume 299, pp. 152–178.
20. Zhishen, J.; Mengcheng, T.; Jianming, W. Research on antioxidant activity of flavonoids from natural materials. *Food Chem.* **1999**, *64*, 555–559.
21. Avila-Campos, M.J. PCR detection of four periodontopathogens from subgingival clinical samples. *Braz. J. Microbiol.* **2003**, *34*, 34–81.
22. Ashimoto, A.; Chen, C.; Bakker, I.; Slots, J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol. Immunol.* **1996**, *11*, 266–273, doi:10.1111/j.1399-302x.1996.tb00180.x.
23. Pereira, E.M.; da Silva, J.L.; Silva, F.F.; De Luca, M.P.; Ferreira, E.F.; Lorentz, T.C.; Santos, V.R. Clinical Evidence of the Efficacy of a Mouthwash Containing Propolis for the Control of Plaque and Gingivitis: A Phase II Study. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* **2011**, *2011*, 750249, doi:10.1155/2011/750249.
24. Jain, S.; Rai, R.; V., S.; Batra, M. Propolis in oral health: A natural remedy. *World J Pharm. Sci.* **2014**, *2*, 90–94.
25. Bertolini, P.F.; Biondi Filho, O.; Pomilio, A.; Pinheiro, S.L.; Carvalho, M.S. Antimicrobial capacity of Aloe vera and propolis dentifrice against *Streptococcus mutans* strains in toothbrushes: An in vitro study. *J. Appl. Oral Sci.* **2012**, *20*, 32–37, doi:10.1590/s1678-77572012000100007.
26. Skaba, D.; Morawiec, T.; Tanasiewicz, M.; Mertas, A.; Bobela, E.; Szliszka, E.; Skucha-Nowak, M.; Dawiec, M.; Yamamoto, R.; Ishiai, S.; et al. Influence of the toothpaste with brazilian ethanol extract propolis on the oral cavity health. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* **2013**, *2013*, 215391, doi:10.1155/2013/215391.
27. Lang, N.P.; Adler, R.; Joss, A.; Nyman, S. Absence of bleeding on probing. An indicator of periodontal stability. *J. Clin. Periodontol.* **1990**, *17*, 714–721, doi:10.1111/j.1600-051x.1990.tb01059.x.
28. Coutinho, A. Honeybee propolis extract in periodontal treatment: A clinical and microbiological study of propolis in periodontal treatment. *Indian J. Dent. Res.* **2012**, *23*, 294, doi:10.4103/0970-9290.100449.
29. Sanghani, N.N.; Bm, S.; S, S. Health from the hive: Propolis as an adjuvant in the treatment of chronic periodontitis—a clinicomicrobiologic study. *J. Clin. Diagn. Res.* **2014**, *8*, ZC41–ZC44, doi:10.7860/JCDR/2014/8817.4856.
30. Nakao, R.; Senpuku, H.; Ohnishi, M.; Takai, H.; Ogata, Y. Effect of topical administration of propolis in chronic periodontitis. *Odontology* **2020**, *108*, 704–714, doi:10.1007/s10266-020-00500-4.
31. Giammarinaro, E.; Marconcini, S.; Genovesi, A.; Poli, G.; Lorenzi, C.; Covani, U. Propolis as an adjuvant to non-surgical periodontal treatment: A clinical study with salivary anti-oxidant capacity assessment. *Minerva Dent. Oral Sci.* **2018**, *67*, 183–188, doi:10.23736/s0026-4970.18.04143-2.
32. Koo, H.; Gomes, B.P.; Rosalen, P.L.; Ambrosano, G.M.; Park, Y.K.; Cury, J.A. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Arch. Oral Biol.* **2000**, *45*, 141–148, doi:10.1016/s0003-9969(99)00117-x.
33. Uzel, A.; Sorkun, K.; Onçağ, O.; Cogulu, D.; Gençay, O.; Salih, B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol. Res.* **2005**, *160*, 189–195, doi:10.1016/j.micres.2005.01.002.
34. Feres, M.; Figueiredo, L.C.; Barreto, I.M.; Coelho, M.H.; Araujo, M.W.; Cortelli, S.C. In vitro antimicrobial activity of plant extracts and propolis in saliva samples of healthy and periodontally-involved subjects. *J. Int. Acad. Periodontol.* **2005**, *7*, 90–96.
35. Akca, A.E.; Akca, G.; Topçu, F.T.; Macit, E.; Pıkdöken, L.; Özgen, I.Ş. The Comparative Evaluation of the Antimicrobial Effect of Propolis with Chlorhexidine against Oral Pathogens: An In Vitro Study. *BioMed Res. Int.* **2016**, *2016*, 3627463, doi:10.1155/2016/3627463.

36. Mello, B.C.B.S.; Hubinger, M.D. Antioxidant activity and polyphenol contents in Brazilian green propolis extracts prepared with the use of ethanol and water as solvents in different pH values. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2012**, *47*, 2510–2518, doi:10.1111/j.1365-2621.2012.03129.x.
37. Lemos, J.A.; Burne, R.A. A model of efficiency: Stress tolerance by *Streptococcus mutans*. *Microbiology* **2008**, *154*, 3247–3255, doi:10.1099/mic.0.2008/023770-0.
38. George, J.; Klika, A.K.; Higuera, C.A. Use of Chlorhexidine Preparations in Total Joint Arthroplasty. *J. Bone Jt. Infect.* **2017**, *2*, 15–22, doi:10.7150/jbji.16934.
39. Thomas, G.W.; Rael, L.T.; Bar-Or, R.; Shimonkevitz, R.; Mains, C.W.; Slone, D.S.; Craun, M.L.; Bar-Or, D. Mechanisms of delayed wound healing by commonly used antiseptics. *J. Trauma: Inj. Infect. Crit. Care* **2009**, *66*, 82–90.
40. Man, J.; Shelton, R.M.; Cooper, P.R.; Landini, G.; Scheven, B.A. Low intensity ultrasound stimulates osteoblast migration at different frequencies. *J. Bone Miner. Metab.* **2012**, *30*, 602–607, doi:10.1007/s00774-012-0368-y.
41. Björkner, B.E. Industrial Airborne Dermatoses. *Dermatol. Clin.* **1994**, *12*, 501–509, doi:10.1016/S0733-8635(18)30154-2.
42. Manoil, D.; Courvoisier, D.S.; Gilbert, B.; Möller, B.; Walker, U.A.; Muehlenen, I.V.; Rubbert-Roth, A.; Finckh, A.; Bostanci, N. Associations between serum antibodies to periodontal pathogens and preclinical phases of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **2021**, doi:10.1093/rheumatology/keab097.
43. Preda, C.; Butera, A.; Pelle, S.; Pautasso, E.; Chiesa, A.; Esposito, F.; Oldoini, G.; Scribante, A.; Genovesi, A.M.; Cosola, S. The Efficacy of Powered Oscillating Heads vs. Powered Sonic Action Heads Toothbrushes to Maintain Periodontal and Peri-Implant Health: A Narrative Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 1468, doi:10.3390/ijerph18041468.