



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Laboratorio de Inmunobiología

**“Evaluación del extracto etanólico del propóleo de
Chihuahua en un modelo de colitis experimental”**

Tesis

Para obtener el título de Bióloga

P r e s e n t a:

Pilar Domínguez Verano

Director de tesis:

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy

Los Reyes Iztacala, Edo. de México, 2017





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala

A los miembros del jurado:

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy

Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés

Dra. Ma. Margarita Canales Martínez

M. en C. Oscar de Jesús Nieto Yáñez

M. en C. Karla Stephanie Martínez Elizalde

Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) proyectos IN213713 y, IN211614 y por el proyecto 167799 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
Enfermedad inflamatoria intestinal	3
Colitis ulcerosa	3
Epidemiología	5
Manifestaciones clínicas	6
Relación Colitis ulcerosa – cáncer de colon	6
Respuesta inmunológica	6
Citocinas	7
Mieloperoxidasa	8
Enzimas antioxidantes	8
Tratamiento	9
Búsqueda de nuevas alternativas. Productos naturales derivados de plantas medicinales	10
Propóleo	10
Características químicas del propóleo	11
Usos medicinales del propóleo	12
Modelo experimental de Colitis ulcerosa	13
Dextran sulfato de sodio	13
ANTECEDENTES	15
JUSTIFICACIÓN	17
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
HIPÓTESIS	17
OBJETIVOS	18
Objetivo general	18
Objetivos particulares	18
MATERIALES Y MÉTODOS	18
Obtención del extracto etanólico de propóleo	18
Animales	19
Protocolo experimental	19
Porcentaje de sobrevida	20
Evaluación del índice de actividad de la enfermedad	20
Obtención y medición de la longitud del intestino	20
Determinación del efecto del extracto etanólico de propóleo sobre el tamaño e integridad de las crestas intestinales	21
Índice de daño histológico	21
Determinación de la concentración de fenoles totales del extracto etanólico de propóleo	21
Determinación de la concentración de flavonoides del extracto etanólico de propóleo	21
Determinación de la capacidad antioxidante del extracto etanólico de propóleo	22
Efecto del extracto etanólico del propóleo sobre la actividad de la mieloperoxidasa	22

Caracterización química del extracto etanólico del propóleo	22
Análisis por Cromatografía líquida de alta resolución del extracto etanólico del propóleo	23
Análisis por GC-SM del extracto etanólico del propóleo	23
Análisis estadístico	23
RESULTADOS.....	24
El extracto etanólico de propóleo de Chihuahua prolonga la sobrevida	24
El extracto etanólico del propóleo de Chihuahua retarda el incremento en el DAI	24
El extracto etanólico de propóleo de Chihuahua atenúa el acortamiento del colon debido al daño generado por el DSS.....	26
El extracto etanólico de propóleo de Chihuahua disminuye el daño histológico generado por el DSS.	28
Capacidad antioxidante fenoles y flavonoides totales del extracto etanólico de propóleo de Chihuahua	30
El extracto etanólico del propóleo de Chihuahua disminuye la actividad de la Mieloperoxidasa	32
Composición química del propóleo de Chihuahua	33
Cromatografía Líquida De Alta Resolución (HPLC).....	33
Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS)	41
DISCUSIÓN	51
CONCLUSIONES.....	57
REFERENCIAS	58
APÉNDICE 1.....	65
Técnica de maceración.....	65
APÉNDICE 2.....	65
Técnica histológica	65
APÉNDICE 3.....	68
Determinación de la concentración de fenoles totales.	68
APÉNDICE 4.....	69
Cuantificación de flavonoides Totales	69
APÉNDICE 5.....	72
Actividad antioxidante. Método de reducción del radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidracil	72

Índice de figuras

Figura 1. Clasificación de la colitis por la extensión en el colon	4
Figura 2. Respuesta exacerbada de la mucosa ante agentes microbianos.....	7
Figura 3. Distribución de algunos tipos de propóleos.....	12
Figura 4. Protocolo experimental	19
Figura 5. Prolongación de la sobrevida generada por administración del extracto etanólico de propóleo de Chihuahua en el modelo de colitis inducido por DSS.....	24
Figura 6. Retraso del establecimiento del índice de actividad por efecto del extracto etanólico de propóleo de Chihuahua.....	25
Figura 7. Índice de actividad, registro de sangrado colorrectal del día 9	25
Figura 8. Observaciones macroscópicas de la protección en la longitud del intestino generado por la administración del extracto etanólico del propóleo de Chihuahua.....	26
Figura 9. Longitud de intestino	27
Figura 10. Efecto del extracto etanólico del propóleo de Chihuahua y del DSS sobre los cambios histológicos	29
Figura 11. Efecto del extracto etanólico del propóleo de Chihuahua sobre el índice de daño histológico. 30	
Figura 12. Capacidad antioxidante del extracto de propóleo de Chihuahua.	31
Figura 13. Efecto del extracto etanólico del propóleo sobre la actividad de la MPO	32
Figura 14. Cromatograma de la partición con Hexano del EEP de Chihuahua obtenido por HPLC.	34
Figura 15. Cromatograma de la partición con diclorometano del EEP de Chihuahua obtenida por HPLC. .	36
Figura 16. Cromatograma de la partición con metanol del EEP de Chihuahua obtenido por HPLC.	39
Figura 17. Cromatograma de la partición con Hexano del EEP de Chihuahua obtenido por GC-MS	42
Figura 18. Cromatograma de la partición con diclorometano del EEP de Chihuahua obtenido por GC-MS.45	
Figura 19. Cromatograma de la partición con metanol del EEP de Chihuahua obtenido por GC-MS.	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efectos adversos de los tratamientos de EII	9
Tabla 2. Composición básica de los propóleos.	11
Tabla 3. Propiedades biológicas del propóleo.	13
Tabla 4. Características organolépticas del propóleo de Chihuahua	18
Tabla 5. Síntomas del índice de actividad.....	20
Tabla 6. Parámetros del índice del daño histológico	21
Tabla 7. Capacidad antioxidante, fenoles y flavonoides totales del extracto etanólico de propóleo de Chihuahua	31
Tabla 8. Compuestos químicos identificados en la partición con hexano del EEP de Chihuahua	35
Tabla 9. Compuestos químicos identificados en la partición con diclorometano del extracto EEP de Chihuahua.	37
Tabla 10. Compuestos químicos identificados en la partición con diclorometano del EEP de Chihuahua .	40
Tabla 11. Compuestos químicos identificados en la partición con hexano del EEP de Chihuahua	43
Tabla 12. Compuestos químicos identificados en la partición con diclorometano del EEP Chihuahua	46
Tabla 13. Compuestos químicos identificados en la partición con metanol del EEP de Chihuahua.....	48
Tabla 14. Actividades biológicas reportadas para los compuestos identificados mediante	49
HPLC en las particiones con hexano, diclorometano y metanol del EEP de Chihuahua.	49
Tabla 15. Actividades biológicas reportadas para los compuestos identificados por GC-MS en las particiones con hexano, diclorometano y metanol del EEP de Chihuahua.	50

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grados Celcius
µg	Microgramos
µL	Microlitro
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
AlCl₃	Cloruro de aluminio
ANOVA	Análisis de varianza
CA₅₀	Capacidad antioxidante media
CAPE	Ester fenólico del ácido cafeico
CAT	Catalasa
CCR	Cáncer colorectal
COX2	Ciclooxigenasa tipo 2
CU	Colitis ulcerosa
DAD	Detector de arreglo de diodos
DAI	Índice de actividad de la enfermedad
DPPH	2,2-Difenil-1-Picrilhidracil
DSS	Dextran sulfato de sodio
EC	Enfermedad de Crohn
EEP	Extracto etanólico de propóleo
EII	Enfermedad Inflamatoria Intestinal
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA por sus siglas en ingles)
eqAG	Equivalentes de ácido galico
eqQ	Equivalente de quercetina
EROS	Especies reactivas del oxígeno
EtOH	Etanol
FESI	Facultad de Estudios Superiores Iztacala
GC-MS	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas(Gas Chromatography- Mass Spectrometry por sus siglas en ingles)
GPX	Glutación peroxidasa
H₂O	Agua
H₂O₂	Peróxido de hidrogeno
H₃PO₄	Ácido fosfórico
HOCl	Acido hipocloroso
HPLC	Cromatografía Liquida de Alta Resolución(High Performance Liquid Chromatography, por sus siglas en ingles)
IFN-γ	Interferón gamma
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible

KDa	Kilodalton
Kg	Kilogramo
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
mL	Mililitro
MPO	Mieloperoxidasa
N.I.	No identificado
NK	Célula asesina natural (Natural killer, por sus siglas en ingles)
nm	Nanómetro
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Buffer de fosfatos
PLAT2	Fosfolipasa A tipo 2
rpm	Revoluciones por minuto
SOD	Superoxido dismutasa
TGF	Factor de crecimiento transformante
TH	Linfocitos T cooperadores
TNBS	Acido del 2,4,6 trinitrobenzensulfónico
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa

Resumen

La colitis ulcerosa es una enfermedad inflamatoria intestinal cuya etiología es desconocida, se caracteriza por la inflamación y ulceración difusa de la mucosa del colon, esta enfermedad afecta a la población en general misma que padece el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal. Los principales síntomas son diarrea, dolor abdominal, pérdida de peso y evacuaciones con moco y sangre. El tratamiento convencional se basa en la supresión del proceso inflamatorio, sin embargo éste es inespecífico con eficacia limitada y suele presentar múltiples efectos secundarios. Una alternativa para tratar o controlar esta enfermedad es el uso de productos naturales derivados de plantas medicinales, tal es el caso del propóleo.

El propóleo es un producto elaborado por las abejas a partir de sustancias resinosas recolectadas de cortezas y brotes de varias plantas, éste varía en su composición, color y aroma dependiendo de la época, zona de recolección y el tipo de vegetación que circunda a la colmena. En el interior de la colmena las abejas lo utilizan para cerrar rendijas, recubrir el cuerpo de animales muertos y en la protección contra la proliferación de microorganismos. Para la composición química del propóleo se han descrito más de 300 sustancias, las cuales están relacionadas con las actividades biológicas que presenta, tales como antiinflamatoria, antioxidante, inmunomoduladora, antimicrobiana, antiulcerosa, anticancerígena, antiséptica, entre otras.

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto del propóleo sobre un modelo de colitis experimental inducido por DSS en ratones BALB/c a los cuales se les administró el DSS al 4% en el bebedero, estableciéndose tres grupos: Control, DSS y DSS+PROPÓLEO en una concentración de 150 mg/kg. Se observó que el extracto etanólico del propóleo de Chihuahua prolonga la supervivencia, retarda el índice de actividad de la enfermedad, disminuye el daño macroscópicamente sobre la longitud de los intestinos y microscópicamente en la histología al mantener la integridad de las crestas, criptas y células caliciformes, así como en la disminución del infiltrado inflamatorio relacionado con la disminución de la actividad de la MPO. Se determinó una buena capacidad antioxidante del propóleo de 15.75 µg/mL por el método de reducción del radical DPPH, misma capacidad que está relacionada por la presencia de fenoles determinados por el reactivo Folin-Ciocalteu (314 mg eqAG/g) y Flavonoides totales determinado por el método de Dowd (62.58 mg eqQ/g). La composición química se determinó mediante HPLC y GC-MS, obteniendo que el propóleo presenta compuestos como: pinocembrina, acacetina, crisina, catequina, quercetina,

kaempferol, naringina, naringenina, luteolina, tectocrisina, fenilacetona, α -bisabolol, chalcona-pinostrobin, éster metílico del ácido oleico y éster metílico del ácido 9 octadecenoico, compuestos reportados con actividades biológicas como antiinflamatorio, antioxidante, inmunomodulador y antimicrobiano, a los cuales se le puede atribuir los efectos observados en el modelo de colitis experimental.

Palabras clave: colitis ulcerosa, dextran sulfato de sodio, productos naturales, propóleo, antiinflamatorio, antioxidante.

Introducción

Enfermedad inflamatoria intestinal

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) comprende un grupo de desórdenes y recaídas crónicas caracterizadas por la inflamación del tracto gastrointestinal, que incluye la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU). Se desconoce su etiología, sin embargo se ha sugerido que su desarrollo es el resultado de la interacción de factores genéticos con factores ambientales, los cuales actúan sobre el sistema inmunomodulador presente en la mucosa gastrointestinal provocando un ciclo continuo de inflamación⁽¹⁻³⁾, tal es el caso de la microbiota intestinal en donde la desregulación de la respuesta inmunológica se caracteriza por la activación de linfocitos, macrófagos, enterocitos y células endoteliales, que causan la producción de mediadores inflamatorios como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e IL-1 β (citocinas proinflamatorias), mieloperoxidasa y especies reactivas de oxígeno (EROS)^(3, 4).

La EII se ha convertido casi en una enfermedad global que afecta a personas prácticamente de todas las edades, incluyendo a la población pediátrica⁽⁵⁾, es de gran importancia dentro de la práctica clínica debido al deterioro severo de la calidad de vida de quienes la padecen y al riesgo de desarrollar cáncer colorrectal (CCR)⁽⁶⁾.

Colitis ulcerosa

La CU es un tipo de EII crónica que afecta de forma difusa a la mucosa del colon. La inflamación habitualmente comienza en el recto y se extiende de forma proximal en continuidad hacia el ciego deteniéndose en la válvula ileocecal⁽²⁾. Histológicamente existe un importante infiltrado inflamatorio compuesto por linfocitos, células plasmáticas y neutrófilos que se disponen en torno a las criptas formando microabscesos, causando distorsión y disminuyendo sus ramificaciones y el número de células caliciformes⁽⁷⁻¹⁰⁾. Una vez activadas estas células, liberan citocinas que llevan a resistir la regulación correctora normal de la mucosa, esta resistencia provoca la ampliación de la cascada inflamatoria y de lesión tisular por varios mediadores inflamatorios localmente inducidos⁽⁹⁾.

La clasificación de Montreal define la CU por su severidad en: proctitis ulcerosa (5-10% de los casos) que afecta exclusivamente el recto; proctosigmoiditis o colitis distal (10-20% de los casos), comprometiendo entre 25 y 35 cm desde el margen anal; colitis izquierda, que afecta hasta el ángulo esplénico (50% de los casos); colitis extensa, cuando sobrepasa el ángulo esplénico hasta el ángulo hepático, denominándose también como pancolitis, comprometiendo todo el colon⁽⁹⁾ (Figura 1).

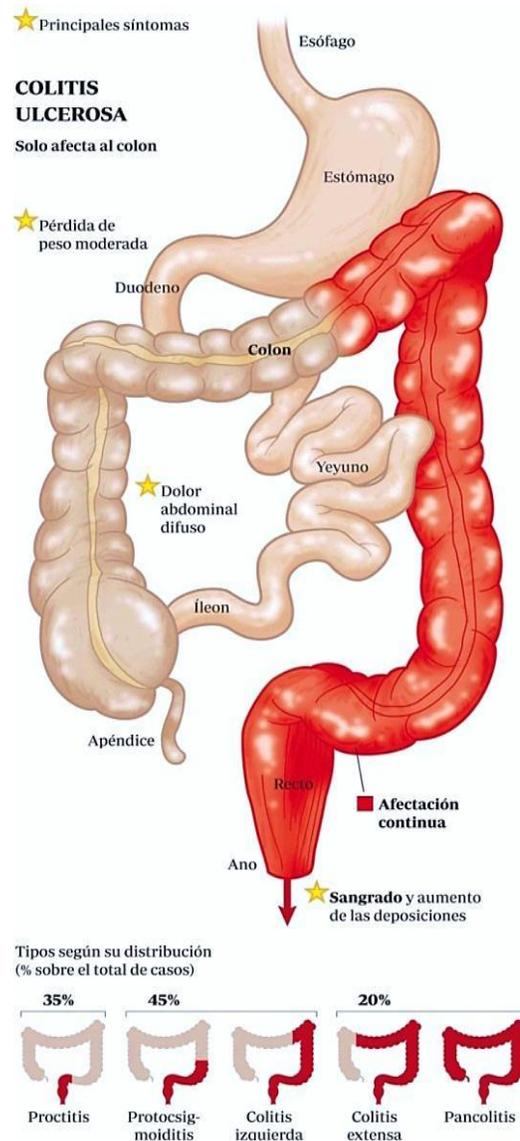


Figura 1. Clasificación de la colitis por la extensión en el colon (modifico de CUN)⁽¹¹⁾.

Por la extensión de los brotes se clasifican en: Colitis en remisión (colitis silente), no hay síntomas de la enfermedad; colitis leve, 4 o menos deposiciones al día con sangre, sin fiebre, leucocitosis y taquicardia; colitis moderada, criterios intermedios entre leve y grave, siempre con signos de afección sistémica leves; colitis grave, 6 o más deposiciones diarias con sangre, fiebre (mayor a 37.5 °C), taquicardia (mayor a 90 latidos/min) y/o anemia^(12, 13).

Según el curso clínico, pueden distinguirse tres subtipos: Aguda o fulminante, que aparece en el primer brote de colitis ulcerosa, representa entre el 5% y el 15% del total de casos y ocurre habitualmente en las pancolitis o colitis extensa. Es la más grave requiriendo internación y con frecuencia tratamiento quirúrgico de urgencia por falta de respuesta o por complicaciones como el megacolon tóxico. Crónica intermitente, es la más frecuente de todas las formas, afecta aproximadamente el 65% a 75% de los casos, y se caracteriza por presentar periodos de actividad con otros de remisión. Crónica continua, en este tipo no se logra la remisión clínica completa, dura después de 6 meses de tratamiento y se presenta en el 20% de los casos⁽¹³⁾.

Epidemiología

A nivel mundial, la incidencia de la CU varía desde 1.5 hasta 24.5 individuos por cada 100,000 habitantes, dependiendo de la región⁽¹³⁾, ésta se modifica en forma importante según la distribución geográfica y las variaciones étnicas y raciales⁽¹⁴⁾, sin embargo diferencias en el desarrollo socioeconómico de áreas urbano-rurales parecen ser factores más importantes, disminuyendo el impacto del origen étnico de los pacientes⁽¹²⁾. En general, las mayores tasas de incidencia y prevalencia, se han registrado en el norte de Europa, el Reino Unido y América del Norte, que son las regiones geográficas que han sido históricamente asociados con EII. Sin embargo, se ha informado sobre el aumento de la incidencia y la prevalencia en otras zonas del mundo como el sur o el centro de Europa, Asia, África y América Latina, destacando que la aparición de la EII es un proceso dinámico⁽¹⁵⁾. Se estima que de uno a dos millones de estadounidenses padecen EII; aproximadamente la mitad de ellos presentan CU la cual puede ocurrir en cualquier momento de la vida, pero por lo general se diagnostica antes de los 30 años. La enfermedad parece afectar a hombres y mujeres por igual. Aproximadamente el 20% de las personas con CU tienen un pariente cercano con EII⁽¹⁶⁾. Se ha observado que con el desarrollo y la modernización de una población específica, la EII emerge principalmente como CU y después de un periodo de tiempo variable se da el incremento de la EC⁽¹⁷⁾.

En América Latina existen pocos informes sobre la epidemiología de la EII, para el caso de México se ha reportado por parte del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán un aumento en la incidencia de la CU, comparada con la década anterior⁽¹⁷⁾. Actualmente se estima que entre el 16 y 30 % de la población padecen esta enfermedad, afectando principalmente a mujeres menores de 45 años de edad⁽¹⁸⁾.

Manifestaciones clínicas

El cuadro clínico de CU generalmente depende del segmento afectado y de la severidad del mismo. Los principales signos y síntomas son: evacuaciones con moco y sangre (disentería), diarrea con sangre, dolor abdominal, tenesmo rectal, aunque un pequeño porcentaje puede presentar sólo evacuaciones con diarrea⁽¹⁹⁾. El dolor surge habitualmente antes de realizar la deposición y puede ceder tras la deposición. Otros síntomas asociados son la fiebre, el malestar general y la pérdida de peso⁽²⁾.

La hemorragia masiva se presenta hasta en 3.5% de los pacientes y puede ser una indicación de colectomía de urgencia. El megacolon agudo puede presentarse hasta en 5% de los pacientes con ataques graves de CU. La perforación del colon es la complicación local más peligrosa y el índice de mortalidad alcanza el 16%⁽⁹⁾.

Relación Colitis ulcerosa – cáncer de colon

Los pacientes con CU presentan un riesgo significativamente mayor para el desarrollo del cáncer colorrectal. Los factores de riesgo incluyen la duración de la enfermedad, el grado y la extensión de la inflamación, y la presencia de colangitis esclerótica primaria⁽²⁰⁾. El riesgo llega a ser significativo después de 8 a 10 años de presentar la enfermedad e incrementa en un 0.5 a 1% entre la segunda y cuarta década de la enfermedad. Después de 40 años de pancolitis aproximadamente el 25 a 30% de los pacientes desarrollarán cáncer colorrectal⁽²¹⁾.

Respuesta inmunológica

La mucosa intestinal es una barrera funcional entre el medio interno y las bacterias localizadas en el lumen intestinal. La presencia constante de antígenos bacterianos mantiene al sistema inmunológico de la mucosa en un estado de inflamación controlada. El daño en la mucosa se debe al desequilibrio de la regulación inmunológica a este nivel por una respuesta inmune excesiva a los antígenos bacterianos o un déficit de esta respuesta después de una infección por un patógeno^(3,4)

(Figura 2). La mucosa colónica inflamada se caracteriza por la activación de linfocitos, macrófagos

y células endoteliales que causan la producción de mediadores inflamatorios tales como IL-1 β , IFN- γ , IL-6 y TNF- α , además de mieloperoxidasa (MPO), (EROS) y mediadores antioxidantes⁽⁴⁾.

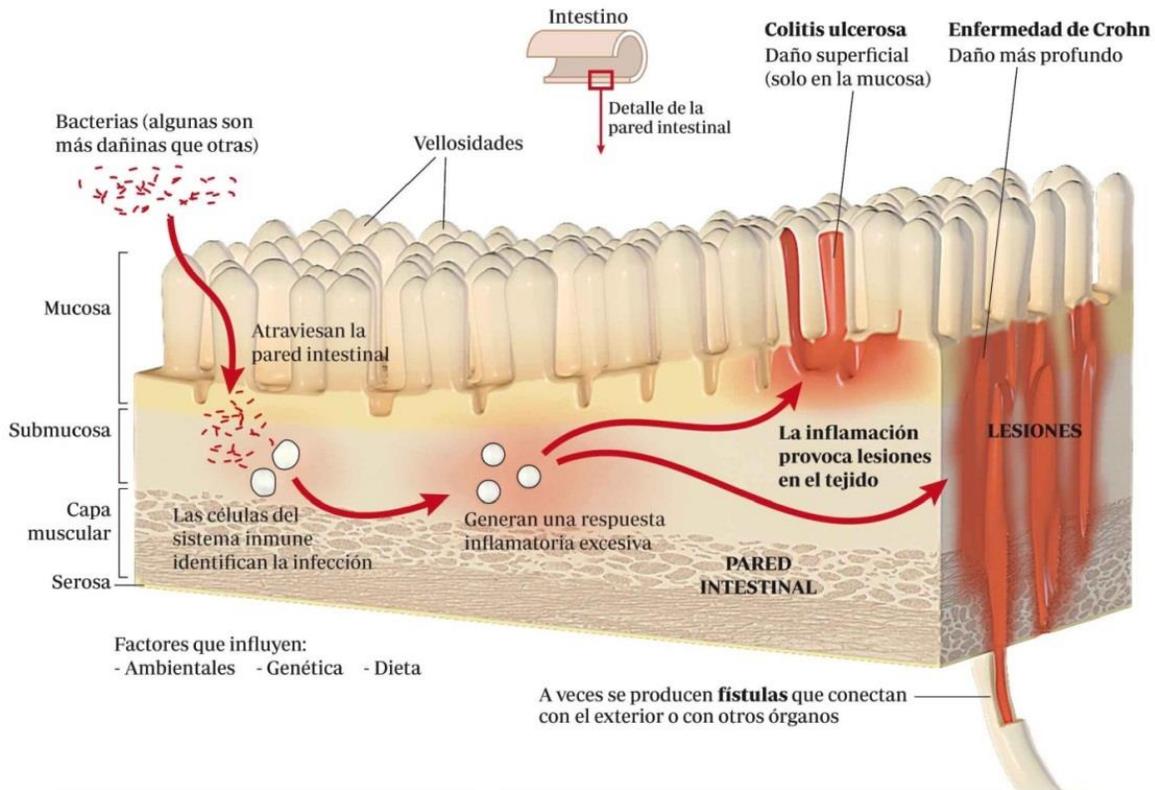


Figura 2. Respuesta exacerbada de la mucosa ante agentes microbianos (modificado de CUN)⁽¹¹⁾.

Citocinas

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular secretadas por macrófagos, linfocitos y neutrófilos polimorfonucleares, facilitan la comunicación celular, estimulan la proliferación y actúan como mediadores locales y sistémicos de la inflamación. De acuerdo a la función que realizan durante el proceso inflamatorio han sido divididas en dos grupos, como antiinflamatorias y proinflamatorias, estas desarrollan su actividad a partir de uniones a receptores específicos en la superficie celular⁽²²⁾.

El TNF- α es una de las más importantes citocinas proinflamatorias y puede influenciar directamente sobre el epitelio intestinal. La secreción del TNF- α resulta en la disrupción de la barrera epitelial y la inducción de apoptosis en las células epiteliales. IL-1 β es un mediador clave

en el progreso de la EII. Las acciones biológicas de la IL-1 β se basan en la inducción de genes que codifican para la ciclooxigenasa tipo 2 (COX2), la fosfolipasa A tipo 2 (PLAT2) y la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS). Las consecuencias biológicas de esta inducción se traducen en una clara respuesta inflamatoria, ya que estas sustancias aumentan la expresión de moléculas de adhesión celular en los sitios de inflamación^(23, 24).

Interferón gama (IFN- γ) es producido por los linfocitos Th1 y células natural killer (NK), activan a los fagocitos mononucleares, incrementa la expresión de MHC clase I y II, promueve la diferenciación de células T y B⁽²⁵⁾.

Mieloperoxidasa

La MPO (peróxido de hidrógeno oxidoreductasa) es una enzima distribuida ampliamente en el organismo, es generada en los leucocitos (neutrófilos y monocitos), aunque el origen más común es en los granulos azurófilos de los neutrófilos, constituyendo del 2-5 % de las proteínas de esta célula. Existen 4 formas de MPO, las cuales son denominadas, compuesto I, compuesto II, compuesto III y MPO nativa o férrica. Funge como oxidasa, catalizando la conversión del peróxido de hidrógeno y el ion cloro (Cl⁻) a ácido hipocloroso (HOCl). Es un potente agente oxidante que contribuye al mecanismo de defensa contra los agentes infecciosos, como bacterias y virus, sin embargo puede ser capaz de actuar sobre las células del hospedero durante una activación incontrolable o excesiva^(22, 26, 27).

El incremento de la actividad de la MPO está directamente relacionado con el número de neutrófilos infiltrados en el tejido, por lo que su actividad puede ser utilizada como índice de migración leucocitaria y por lo tanto de inflamación y estrés oxidativo, como en el caso de las enfermedades infecciosas y las enfermedades inflamatorias⁽²⁶⁾.

Enzimas antioxidantes

El organismo posee mecanismos a través de los cuales produce y a la vez limita las especies reactivas de oxígeno que pueden generarse a partir de un proceso inflamatorio como es el caso de la EII antes ya mencionado. La defensa antioxidante protege a los tejidos del daño oxidativo a través de enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPX) y la catalasa (CAT). Este mecanismo de protección comienza con la SOD, la cual transforma el oxígeno en peróxido de hidrogeno (H₂O₂) y después la GPX y la CAT actúan convirtiendo el H₂O₂ en agua (H₂O)⁽²⁸⁾.

Tratamiento

El estándar actual de la terapia para la EII incluye aminosalicilatos (sulfasalazina y mesalamina), glucocorticosteroides (prednisolona y budesonida), inmunosupresores (azatioprina, 6-mercaptopurina y metotrexato) y agentes biológicos (infliximab)⁽¹⁾. Todos estos fármacos producen una supresión inespecífica de los procesos inflamatorios, eficacia limitada y no se encuentran exentos de efectos secundarios⁽²⁶⁾ (**Tabla 1**).

Tabla 1. Efectos adversos de los tratamientos de EII

Aminosalicilatos	<p>Síntomas generales como dolor de cabeza, náuseas, dolor abdominal, fatiga, fiebre. Neuropatías. Raros casos de exacerbación de la enfermedad, pancreatitis, pericarditis, neumonitis, enfermedad hepática, nefritis, depresión de la médula ósea.</p> <p>Efectos únicos de la Sulfasalazina: gastrointestinales (vómitos, anorexia, mala absorción). Hematológicos (hemólisis). Infertilidad en hombres.</p> <p>Efectos únicos de la olsalazina: diarrea acuosa⁽²⁹⁾.</p>
Corticoides	<p>Esteroidedependencia, esteroideresistencia,</p> <p>Toxicidad aguda: acné, aumento de vello, estrías, redistribución de la grasa, irritabilidad, insomnio, psicosis, Hipertensión arterial, hiperglicemia, hipercolesterolemia, leucocitosis, aumento susceptibilidad a infecciones⁽³⁰⁾.</p> <p>Toxicidad crónica: osteoporosis, necrosis de cabeza de fémur, cataratas, glaucoma, miopatía (atrofia muscular), atrofia suprarrenal, susceptibilidad a infecciones⁽³⁰⁾.</p>
Inmunosupresores Azatioprina Y Mercaptopurina	<p>Los principales efectos secundarios son la mielosupresión, a corto plazo los efectos dosis-independiente, como reacciones alérgicas, pancreatitis o hepatitis, y a largo plazo el aumento de incidencia de infecciones, sobre todo, víricas. Náuseas-vómito, supresión medular, neoplasia (linfoma, tumores cutáneos)⁽³⁰⁾.</p>
Terapias Biológicas	<p>Complicaciones infecciosas, inmunogenicidad contra el propio fármaco que puede conllevar la aparición de reacciones agudas a la infusión o taquifilaxia^(13, 31).</p>

Búsqueda de nuevas alternativas. Productos naturales derivados de plantas medicinales

La inclinación del hombre hacia el aprovechamiento de los productos naturales se ha convertido en la actualidad en una opción insuperable para satisfacer las carencias en nutrimentos, o para ser empleados en el tratamiento de diversas enfermedades debido a los efectos adversos que pueden llegar a presentar^(26, 32). Dicha costumbre se ha observado, principalmente en poblaciones rurales, lo que ha permitido acumular un amplio conocimiento etnofarmacológico, punto importante de partida en las investigaciones dirigidas a la búsqueda de productos naturales con actividad biológica⁽³³⁾. La organización mundial de la salud (OMS) realiza esfuerzos para promover y desarrollar el uso racional de la medicina tradicional en todo el mundo⁽³⁴⁾, estima que el 80% de la población en países en vías de desarrollo utiliza medicinas herbarias tradicionales como fuente primaria para tratar y controlar diferentes enfermedades⁽³⁵⁾. Este conocimiento popular está basado en la eficacia, es decir, se acepta y adopta lo que se ve que sirve, lo demás cae en desuso⁽³⁶⁾.

Un producto natural es considerado como cualquier compuesto orgánico con actividad biológica producido por organismos vivos⁽³⁷⁾, además de ser una fuente prometedora para el descubrimiento de nuevos productos farmacéuticos. En las últimas décadas, se han publicado varias obras que se ocupan de la composición y propiedades biológicas de los propóleos, revelando el interés de los investigadores en este producto de las abejas^(38, 39).

Propóleo

Gran parte de las civilizaciones antiguas, como la Inca, China, Tibetana, Egipcia y Greorromana empleaban los productos de abejas en sus terapias milenarias, como recursos medicinales valiosos en la cura o prevención de enfermedades. Historias de estas civilizaciones contienen innumerables menciones a estos productos, destacándose el propóleo⁽⁴⁰⁾. Etimológicamente su nombre deriva del griego “*pro*” que significa en defensa de; y “*polis*” ciudad, indicando de esta manera que el material se encuentra a la entrada del panal⁽⁴¹⁾.

El propóleo es un producto elaborado por las abejas de la especie *Apis mellifera*, utilizando sustancias resinosas recolectadas de varias plantas⁽⁴²⁾. Durante la colecta, las abejas mezclan cera y las resinas con la enzima β -glucosidasa, producida en las glándulas salivales, provocando la

hidrólisis de los flavonoides glicosados en flavonoides agliconas, posteriormente lo transportan al interior de la colmena^(42, 43), donde tiene un papel importante para cerrar rendijas, mantener estable la temperatura interna, recubrir el cuerpo de animales muertos dentro de la colmena y en la protección contra la proliferación de microorganismos⁽⁴⁰⁾.

Características químicas del propóleo

El propóleo puede ser de color ocre, rojo, pardo, marrón claro o verde, algunos son friables y firmes, mientras que otros son gomosos y elásticos⁽⁴⁴⁾. La composición química y sus propiedades físicas dependen de las características fitogeográficas del sitio de recolección. Las diferencias genéticas entre las razas de abejas de la misma región pueden llevar a una composición distinta del propóleo, posiblemente debido a las preferencias hacia las distintas fuentes vegetales. Este aspecto dificulta la estandarización de propóleos, extrayéndose diferentes compuestos que influyen en su actividad⁽³⁹⁾.

A pesar de las posibles diferencias en la composición, la mayoría de las muestras de propóleo comparten considerable similitud en su naturaleza general⁽⁴²⁾ (**Tabla 2**).

Tabla 2. Composición básica de los propóleos.

Resinas y bálsamos	50 – 55 %
Cera de abejas	30 – 40%
aceites esenciales o volátiles	5 – 10%
Polen	5%
Materiales orgánicos y minerales	5%

Más de 300 sustancias han sido identificadas como parte de la composición química del propóleo, compuestos fenólicos (flavonoides, ácidos aromáticos, y benzopirenos), diterpenos, triterpenos, ésteres, aldehídos y cetonas, son de los principales identificados. El potencial biológico del propóleo es probablemente el resultado de la sinergia entre sus componentes debido a que los compuestos aislados no inducen el mismo efecto que el extracto total⁽⁴⁵⁾.

Distintos tipos de propóleos han sido definidos de acuerdo al origen botánico y a su composición química, entre ellos se describen los de tipo álamo, tipo abedul, provenientes de Rusia, propóleos

verde de Brasil, propóleos rojo en Venezuela y Cuba⁽⁴³⁾. Aunque la diversidad de sustancias de propóleos es grande, los patrones químicos característicos permanecen⁽⁴⁶⁾ (**Figura 3**).

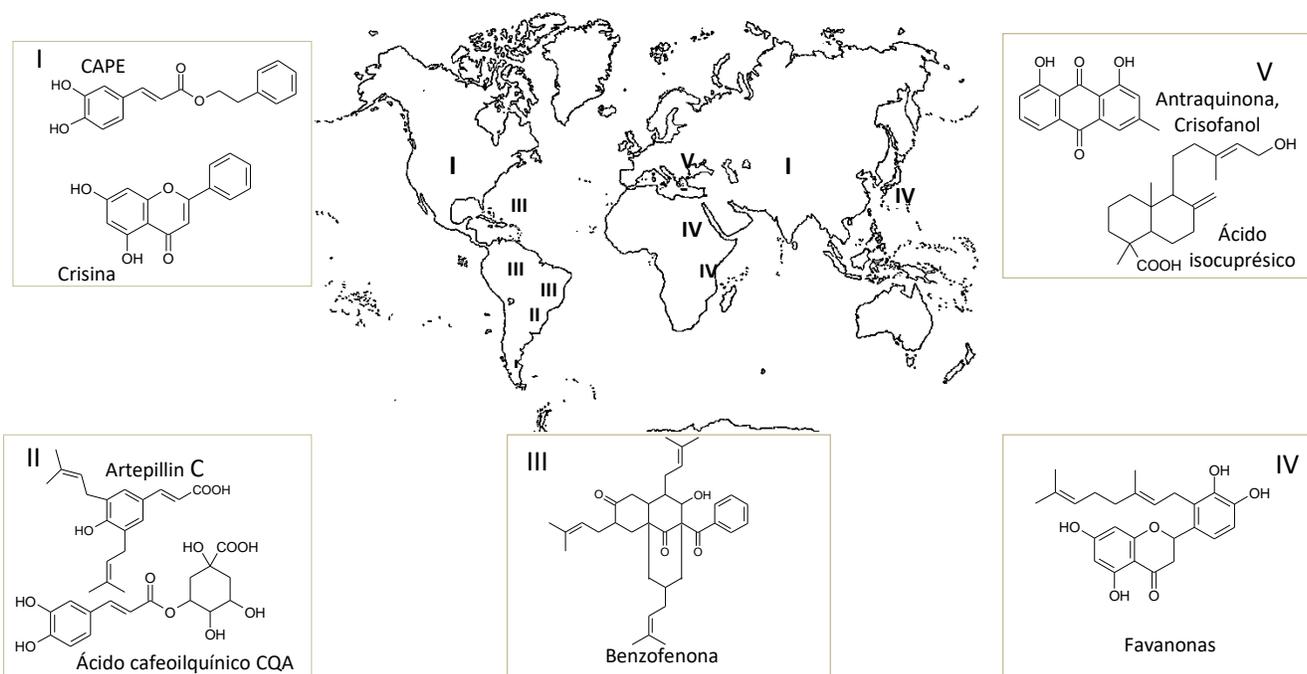


Figura 3. Distribución de algunos tipos de propóleos. I) Propóleo de álamo, con flavonoides sin sustituyentes del anillo B (por ejemplo, crisina) y ésteres de fenilpropanoide (por ejemplo, el éster fenólico del ácido cafeico "CAPE"). II) Propóleo verde de Brasil, con fenilpropanoides prenilados (por ejemplo, artepillin C) y ácidos cafeoilquínicos. III) Propóleos derivados de *Clusia sp.*, con benzofenonas polipreniladas. IV) propóleos derivados de *Macaranga sp.*, con flavanonas. V: griegos, cretenses y turcos, que contienen antraquinonas y algunos con ácido isocuprésico (Modificado de Salantino)⁽⁴⁶⁾

Usos medicinales del propóleo

Existen diversos estudios en Europa como en Latinoamérica que describen numerosas propiedades medicinales del propóleo⁽⁴¹⁾ tales como, anticancerígena, antioxidante, antiinflamatoria, antiséptica, antimicótica, antimicrobianas, antineoplásicas, bacteriostática, astringente, antiulcerosa, colerética, espasmolítica, propiedades anestésicas entre otras (**Tabla 3**), mismas que dependen de la composición química⁽⁴⁷⁾.

Tabla 3. Propiedades biológicas del propóleo.

Propiedad biológica	<i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>	Concentración de propóleo
Inmunomodulador	<i>in vivo</i>	200 mg/Kg
	<i>in vitro</i>	3-300 µg/100 µL
Antitumoral	<i>in vivo</i>	50 y 150 mg/ Kg
	<i>in vitro</i>	5-100 µg/ 100 µL
Antibacterial	<i>in vitro</i>	0.4-14.0% v/v.
Antifúngico	<i>in vitro</i>	0.4-14.0% v/v
Antiviral	<i>in vitro</i>	5-100 µg/100 µL
Antidiabético	<i>in vivo</i>	100 y 300 mg/Kg
Antiúlceras	<i>in vivo</i>	50, 250 y 500 mg/Kg

(Adaptado de Sforcin y Bankova⁽³⁹⁾).

Modelo experimental de Colitis ulcerosa

El estudio de modelos animales de inflamación de la mucosa como un medio para sondear la patogénesis de la EI y probar nuevos tratamientos, se ha realizado desde hace medio siglo⁽⁴⁸⁾. Actualmente existe una gran variedad de modelos experimentales de colitis, genéticos o inducidos por agentes químicos. La mayoría de estos modelos han sido desarrollados en roedores especialmente en rata o en ratón, debido a las características clínicas que en ellos se puede generar⁽²²⁾.

Los modelos de inflamación intestinal químicamente inducidos son de los más comúnmente usados debido a que son simples de inducir. El comienzo, la duración y la severidad de la inflamación es inmediata y controlable⁽⁴⁹⁾. En estos se incluyen el ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS), dextran sulfato de sodio (DSS), oxazolona, ácido acético, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), carragenina y peptidoglicanos-polisacáridos. De estos el modelo de DSS es el que más asemeja morfológica y sintomáticamente la CU de los seres humanos, es ampliamente utilizado ya que puede desarrollarse fácilmente⁽⁵⁾.

Dextran sulfato de sodio

El DSS es un polímero sulfatado con un peso molecular variable, que va desde 5 KDa hasta un máximo de 1400 KDa^(22, 49), presenta efecto tóxico directo sobre las células epiteliales, provoca erosión con pérdida complementaria de la superficie del epitelio, deforma la integridad epitelial y

aumenta la permeabilidad de la mucosa del colon permitiendo la penetración de moléculas grandes⁽⁵⁾.

La colitis es inducida por la adición del DSS al agua potable. El desarrollo de la colitis aguda, crónica o lesiones displásicas dependerá de la concentración, duración y frecuencia de la administración del DSS⁽⁴⁹⁾.

El DSS causa significativamente un incremento en la producción de todas las citocinas proinflamatorias en ambas mitades del intestino, siendo más severo el daño en el colon distal. La elevación en los niveles de TNF- α es la característica principal de este modelo. Se ha reportado que los cambios patológicos crónicos se desarrollan después de la inducción de la inflamación aguda que implica cambios en la morfología de las criptas en relación con los cambios en el perfil de citocinas Th1/ Th2⁽⁴⁹⁾. Las paredes del colon son afectadas produciéndose un engrosamiento además de la aparición de úlceras que no suelen verse a simple vista. En el estudio histológico se presenta una afectación difusa y casi siempre superficial de la mucosa del colon, con un infiltrado leucocitario compuesto de neutrófilos y macrófagos⁽²²⁾.

La colitis aguda usualmente es inducida por la administración continua de DSS de 2-5% por periodos cortos (4-9 días), en cambio la colitis crónica puede ser inducida por tratamientos continuos de bajas concentraciones de DSS o administración cíclica de DSS. Las manifestaciones clínicas de la fase aguda incluyen pérdida de peso, diarrea, sangre oculta en las heces, piloerección, anemia y finalmente la muerte. La fase crónica usualmente no refleja la severidad de la inflamación o las características histológicas encontradas en el intestino grueso de la fase aguda⁽⁴⁹⁾.

Antecedentes

La actividad antimicrobiana del propóleo, está relacionada con la presencia de diversos compuestos entre ellos los flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres⁽⁴⁰⁾, en pruebas *in vitro* ha presentado actividad sobre distintas especies como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Elizabethkingia meningoséptica* entre otras, se presenta mayor eficacia sobre bacterias Gram positivas y en menor grado sobre bacterias Gram negativas, esta actividad fue correlacionada con la presencia de algunos compuestos como acetina, CAPE, crisina, galangina, pinocembrina, pinobanksina y naringenina. Se ha reportado que compuestos como quercetina y naringenina incrementan la permeabilidad de la membrana y disminuyen la resistencia de las bacterias a los antibióticos, además de inhibir la motilidad de las bacterias⁽⁴¹⁾.

Además de la actividad antibacteriana también se ha reportado actividad antimicótica sobre *Candida albicans* y en virus del herpes y de la gripe⁽⁵⁰⁾. Algunos estudios han demostrado la capacidad antiparasitaria del propóleo contra trichomonas, *Trypanosoma cruzi* (responsable de la enfermedad del sueño), *Leishmania* y *Giardia lamblia*, parásitos encontrados en países tropicales y subtropicales⁽⁵¹⁾.

Las EROS están implicadas en una amplia gama de enfermedades, cuando se produce un desequilibrio entre la generación de EROS y los antioxidantes, se contribuye al daño oxidativo de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos⁽⁵²⁾. En los últimos años diversas investigaciones han destacado al propóleo como un antioxidante de origen natural, para la prevención y tratamiento de diversas enfermedades de origen oxidativo. Los flavonoides y ácidos fenólicos tienen la propiedad de interceptar y reaccionar con agentes oxidantes como enzimas, metales y radicales libres. Se establece que el mecanismo antioxidante más común para flavonoides y ácidos fenólicos presentes en los propóleos, es su capacidad de inhibir radicales libres y de quelación de iones metálicos manteniendo así un equilibrio entre oxidantes y sustancias antioxidantes. Algunos compuestos antioxidantes identificados incluyen ácido ferúlico, kaemferol, quercetina, ácido cafeico y ácido p-cumárico^(1, 44, 53).

Ensayos *in vitro* han demostrado la acción citotóxica de propóleos y sus compuestos aislados en diversas células tumorales. Tales constituyentes también ejercen efectos antitumorales *in vivo*, causado por una acción inmunomoduladora, principalmente debido a un aumento de la

inmunidad antitumoral no específica a través de la activación de macrófagos, que a su vez podría producir factores solubles e interferir directamente con las células tumorales o en la función de otras células inmunes⁽⁵⁰⁾.

La acción antiinflamatoria de los propóleos se ha reportado por varios investigadores, usando diferentes modelos experimentales⁽³⁹⁾. La inflamación es un proceso mediante el cual los leucocitos y sustancias químicas nos protegen de las infecciones y agente como bacterias y virus. Este proceso está asociado con la liberación de mediadores inflamatorios, como las prostaglandinas, interleucinas, entre otras. Se menciona que el efecto antiinflamatorio se debe a la presencia de flavonoides, que inhiben el desarrollo de esta respuesta⁽³³⁾.

Los componentes tales como el CAPE y 3,5-difenil-4- ácido hidroxicinámico (artepillin C) y extractos de propóleos completos son alternativas prometedoras debido a que sus actividades biológicas (que incluye antiinflamatorio, antioxidante, inmunomodulador, antimicrobiano y efectos de sanación de heridas) están directamente relacionados con el tratamiento de procesos inflamatorios, como la EII⁽⁴⁵⁾.

En nuestro equipo de trabajo se evaluó la capacidad antimicrobiana, antiinflamatoria, antioxidante, fenoles totales y citotoxicidad, de diferentes propóleos de la República Mexicana, reportando que existen diferencias entre cada uno, mostrando una variación en la actividad biológica que depende del origen geográfico y la zona de floración de cada región⁽³³⁾.

Se ha reportado que el extracto de propóleo reduce moderadamente la respuesta inflamatoria en un modelo de colitis experimental en ratas Wistar producido por la administración rectal de 2,4,6-ácido trinitrobenzensulfónico debido a la presencia de compuestos fenólicos, particularmente flavonoides⁽⁴⁵⁾.

Otros estudios reportan que compuestos fenólicos del jengibre (*Zingiber officinale*), reducen el índice de la actividad de la enfermedad a partir diferentes concentraciones, 50, 100 y 200mg/Kg, administradas por vía oral durante 14 días, (7 días pre tratados con propóleo y 7 días propóleo + DSS) en un modelo de colitis ulcerosa inducida por DSS, este compuesto suprime las concentraciones de IL-1 β y el TNF- α , además demuestra un potencial quimiopreventor suprimiendo el establecimiento de la enfermedad a través de la actividad antioxidante y antiinflamatoria⁽⁵²⁾.

Justificación

La colitis ulcerosa se ha convertido en una enfermedad global que afecta a personas prácticamente de todas las edades, incluyendo la población pediátrica⁽⁵⁾, de la cual los tratamientos convencionales son ineficientes y presentan efectos adversos⁽²⁶⁾, por lo que es importante implementar la búsqueda de nuevas alternativas.

La medicina tradicional y los productos naturales son candidatos a nuevos tratamientos los cuales han sido reconocidos debido a sus efectos y a su baja toxicidad, es por eso que pueden ser utilizados como alternativa o complemento en el tratamiento de la colitis ulcerosa. Tal es el caso del propóleo, que es un producto natural que presenta diferentes propiedades medicinales que pueden contribuir al aminoramiento de la enfermedad.

Planteamiento del problema

Tomando en cuenta las propiedades biológicas del propóleo, nos planteamos el siguiente problema:

¿EL extracto etanólico del propóleo de chihuahua disminuirá las alteraciones generadas por la colitis en un modelo experimental inducido por DSS.

Hipótesis

La colitis ulcerosa es una enfermedad inflamatoria intestinal caracterizada por un proceso inflamatorio de la mucosa, se ha reportado que el propóleo presenta diversas actividades biológicas como son antioxidante, antibacteriano y antiinflamatorio, conferido por su variable composición química, encontrando como grupo abundante a los flavonoides, grupo al cual se le atribuye diversas actividades biológicas, con base en esto se piensa que el extracto etanólico de propóleo de Chihuahua disminuirá las alteraciones generadas por la enfermedad.

Objetivos

Objetivo general

- Evaluar la actividad del extracto etanólico del propóleo de Chihuahua en un modelo experimental de colitis inducida por DSS.

Objetivos particulares

- Determinar el efecto del extracto etanólico de propóleo de Chihuahua en la sobrevida y el índice de actividad.
- Determinar el efecto del extracto etanólico de propóleo de Chihuahua sobre el colon tanto macroscópicamente como microscópicamente en el modelo de colitis experimental con DSS.
- Determinar la capacidad antioxidante del extracto de propóleo de Chihuahua.
- Realizar la caracterización química del extracto de propóleo de Chihuahua.

Materiales y métodos

Obtención del extracto etanólico de propóleo

El extracto de propóleo fue donado por el laboratorio de Farmacognosia de la UBIPRO (Unidad de Biotecnología y Prototipos) de la FES-Iztacala, obtenido por el método de maceración⁽⁵⁴⁾ (Apéndice 1), el cual presentó las siguientes características organolépticas (**Tabla 4**).

Tabla 4. Características organolépticas del propóleo de Chihuahua

Color	Marrón
Aroma	Resinoso
Sabor	Balsámico
Consistencia	Rígido

Animales

Se utilizaron ratones (*Mus musculus*) hembras de la cepa BALB/c de 5-6 semanas de edad, que fueron obtenidos y mantenidos en el bioterio de la FES Iztacala, UNAM, en un ambiente libre de patógenos según la Norma Oficial Mexicana para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio NOM-062-ZOO-1999⁽⁵⁵⁾. Se mantuvieron en jaulas y se dejaron aclimatar durante una semana antes del experimento

Protocolo experimental

El estudio consistió en tres grupos (Control, DSS y DSS+PROPÓLEO) con una n=6 distribuidos aleatoriamente (Figura 4).

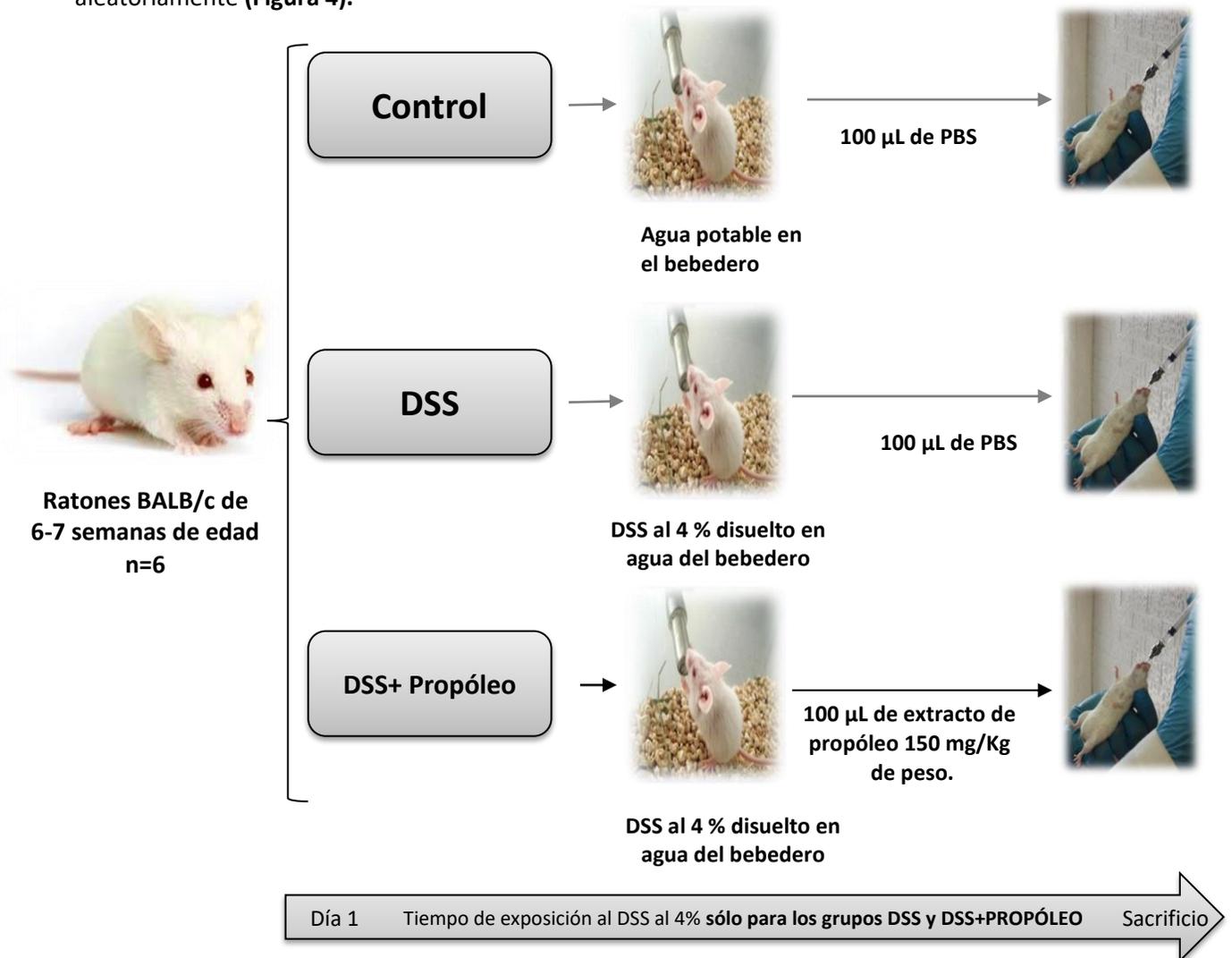


Figura 4. Protocolo experimental.

El extracto etanólico de propóleo fue disuelto en alcohol etílico al 50 % y posteriormente se le agregó agua, para llegar a una proporción final de 1:1 (alcohol 50 %: agua) a una concentración de 150 mg/Kg de ratón.

Porcentaje de sobrevida

Se administraron los tratamientos establecidos, los ratones de cada grupo fueron monitoreados y se registró el día en el que mueren los animales de cada grupo.

Evaluación del índice de actividad de la enfermedad (DAI)

Se utilizó el índice de actividad de la enfermedad modificado de Azuma⁽⁵⁶⁾ y posteriormente se graficaron los valores obtenidos (Tabla 5).

Tabla 5. Síntomas del índice de actividad.

Pérdida de peso	Diarrea	Sangrado
0- No hay pérdida de peso	0- sin diarrea	0- sin sangrado
1- Del 1-5%	2- Pérdida de la consistencia pero	2- Sangrado ligero
2- Del 6-10%	no de la forma	4-Sangrado abundante
3- Del 10-15%	4- Pérdida de la consistencia y	
4- Mayor al 15%	forma.	

Obtención y medición de la longitud del intestino

Los ratones se sacrificaron el día 9 del tratamiento mediante dislocación cervical. Se expuso la parte ventral del ratón y se aseguraron sus extremidades para evitar la obstrucción al abdomen. Se limpió el abdomen del animal con alcohol etílico al 70%, se realizó un corte en la base del abdomen, extendiendo la piel hasta descubrir por completo el contenido abdominal. Se identificó el ciego gástrico, el intestino delgado y el colon, cuidando de no dañar los tejidos, una vez identificados se extrajo haciendo una incisión en la base del ano y cuando éste se liberó el intestino grueso se cortó en la base del ciego. Una vez obtenido el intestino, éste fue lavado con PBS frío utilizando una jeringa y una cánula hasta que el efluente salió limpio de heces. Finalmente se extendió el tejido y se midió con un vernier electrónico marca Mitutoyo modelo CD-12. Esta medida es un indicador de la gravedad de la lesión ya que la colitis aumenta el edema y reduce la longitud total del colón⁽⁵⁷⁾.

Determinación del efecto del extracto etanólico de propóleo sobre el tamaño e integridad de las crestas intestinales

Para determinar el efecto del extracto etanólico de propóleo sobre las crestas, se procesó el intestino para realizar la técnica histológica. Después de haber obtenido y lavado el intestino, se cortó la parte distal (aprox. 5 mm) y se dejó en formol al 4%. Se utilizó la técnica convencional de histología Hematoxilina y Eosina⁽⁵⁸⁾ (Apéndice 2).

Índice de daño histológico

Para evaluar el daño histológico sobre los intestinos se asignaron valores en dos categorías: infiltrado inflamatorio y ulceración. El infiltrado inflamatorio fue evaluado en cada capa del colon, el epitelio superficial, criptas, estroma, submucosa y la capa transmural. Los valores asignados en escala de 0 a 3, y la suma de los tres parámetros es el valor final del índice, arrojando como valores máximos y mínimos entre 0 y 9⁽⁵⁹⁾ (Tabla 6).

Tabla 6. Parámetros del índice del daño histológico

Infiltrado inflamatorio		Extensión del daño		Daño en la cripta	
0	No hay	0	No hay	0	No hay
1	Leve	1	En la capa mucosa	1	Primer tercio basal del daño
2	Moderado	2	En la capa submucosa	2	Dos tercios dañados
3	Severo	3	En la capa transmural	3	Pérdida total de la cripta

Determinación de la concentración de fenoles totales del extracto etanólico de propóleo

Del extracto etanólico de propóleo se determinó los fenoles totales por el método modificado de Singleton y Rosi. La concentración de fenoles totales se midió por espectrofotometría con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción, utilizando como agente oxidante el reactivo de Follin-Ciocalteu, y se reporta como mg eq AG/g de muestra⁽⁶⁰⁾ (Apéndice 3).

Determinación de la concentración de flavonoides del extracto etanólico de propóleo

Se determinaron los flavonoides totales por el método de Dowd usando una curva patrón de quercetina (0-100 mg/mL) así mismo se reportaron como mg eqQ/ g de muestra⁽⁶¹⁾ (Apéndice 4).

Determinación de la capacidad antioxidante del extracto etanólico de propóleo

Se evaluó la actividad antioxidante mediante el método basado en la reducción del radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH) modificado de Murillo, el dato obtenido fue la concentración a la cual el extracto reduce la mitad del DPPH ($CA_{50}^{(62)}$) (Apéndice 5).

Efecto del extracto etanólico del propóleo sobre la actividad de la mieloperoxidasa

La actividad de la MPO se midió en el homogeneizado del colon, utilizando el kit OxiselectMT Mieloperoxidase Chlorination Activity Assay Kit (Colorimetric) (Cell Biolabs: número de catálogo STA-803).

La MPO cataliza la reacción H_2O_2 con los iones de cloro para crear el HOCl que al reaccionar con la taurina genera un compuesto estable de cloramina de taurina, esto hace que se neutralice el HOCl e impide que la MPO se inactive, después de esto se añade la solución de parada que contiene catalasa la cual elimina el H_2O_2 para detener la actividad de la MPO. La cloramina taurina reacciona con el cromógeno TNB generando una disminución del color indicando una mayor actividad de la MPO. La tasa de reducción del cromógeno TNB es proporcional a la concentración de la actividad de la MPO dentro de la muestra. La actividad de la MPO se determina por la comparación con la curva estándar del Cromógeno TNB.

Obtención del homogeneizado

Se obtuvieron los intestinos y se lavaron con PBS frío, esto es antes de homogeneizar para eliminar sangre y heces. Se homogeneizaron 100 mg de tejido en 1.2 mL de PBS frío, después se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante.

Caracterización química del extracto etanólico del propóleo

Se fraccio el extracto etanólico del propóleo de Chihuahua con solventes de diferentes polaridades para ello se empleó, hexano (baja polaridad), diclorometano (mediana polaridad) y metanol (alta polaridad). Se realizó la caracterización química para cada fracción por medio de un análisis con una Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), así como una Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-SM).

Análisis por Cromatografía líquida de alta resolución del extracto etanólico del propóleo

Mediante HPLC se realizó la caracterización química del propóleo de Chihuahua y ésta fue comparada con los estándares de la biblioteca del equipo, se pesó 3mg de la muestra y se disolvieron en 500 µL de metanol del cual se inyectó 30 µL utilizando una columna Allsphere ODS-1, de 250 mm largo x 4.6 mm diámetro, tamaño de partícula 5 µm. Corrida isocrática con mezcla de Metanol-acetonitrilo-agua (25-25-50) y ácido fosfórico (H₃PO₄) al 0.1%, flujo de 1 mL/min. Detector de arreglo de diodos (DAD) a longitud de onda de 260 nm con barrido completo de 200-400 nm.

Análisis por GC-SM del extracto etanólico del propóleo

Se utilizó un Cromatógrafo de Gases Modelo 6850 y un Espectrómetro de Masas Modelo 5975 C. Columna RTX 30 m de largo por 0.25 mm de diámetro interno por 25 micras de película a las siguientes condiciones. Temperatura del inyector a 250°C con modo de inyección tipo Splitless de un radio de 33.5:1, con flujo de Splitless de 29.9 mL/min. El Flujo de corrida es de 35 cm/seg, temperatura inicial del horno de 70°C con una primer rampa de calentamiento de 8°C/min hasta 270°C y la segunda rampa es de 10°C por minuto hasta 290°C, se mantiene 6 min. El tiempo de corrida total fue de 35 minutos, con una línea de transferencia de 290°C. Se inyectó 1 µL de la muestra (3 mg/200 µL).

Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico con un ANOVA de una vía y una P<0.05, para el DAI, longitud de intestino, índice de daño histológico y actividad de la MPO, para saber si existen diferencias significativas entre los grupos de cada resultado.

Resultados

El extracto etanólico de propóleo de Chihuahua prolonga la sobrevida.

De la curva de sobrevida se observó que el grupo control no presentó pérdida en la sobrevida, como era lo esperado. En el grupo DSS descendió el porcentaje de sobrevivencia a partir del décimo día y la muerte de todos los ratones al doceavo día, mientras que el grupo DSS+PROPÓLEO mantuvo el 80% de sobrevida al día 13 y prolongó la sobrevivencia hasta el día del sacrificio (Figura 5).

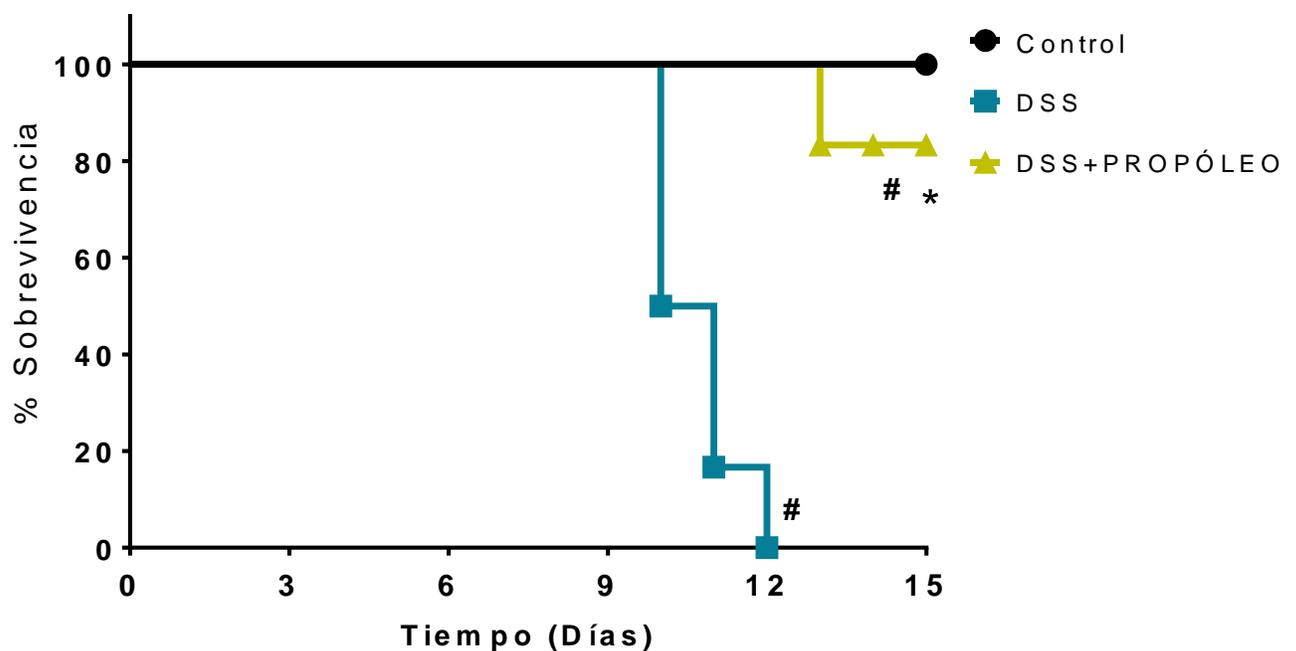


Figura 5. Prolongación de la sobrevida generada por administración del extracto etanólico de propóleo de Chihuahua en el modelo de colitis inducido por DSS. Grupo control (tratados con agua potable estéril) sin pérdida en el porcentaje de sobrevida; Grupo DSS (DSS al 4 %) con el 100% de mortalidad al doceavo día y grupo DSS+ PROPÓLEO (DSS al 4 % y propóleo a una concentración de 150 mg /kg).# Diferencia respecto al control. * Diferencia respecto al grupo DSS (P<0.05).

El extracto etanólico del propóleo de Chihuahua retarda el incremento en el DAI

Durante el experimento se observaron diferentes cambios en la pérdida de peso, diarrea y sangrado representados en la curva del DAI. Los grupos DSS y DSS+PROPÓLEO en comparación con el grupo control mantienen niveles bajos del índice. Hasta el día 5 el grupo DSS y DSS+PROPÓLEO se comportaron de manera similar, sin embargo a partir del día 6, el grupo tratado con propóleo

presentó un retraso en el curso del DAI en comparación con el grupo sin tratamiento (DSS), el cual alcanzó el nivel máximo de índice al día 9, día del sacrificio, mientras que el grupo tratado con propóleo tan sólo alcanzó el nivel 6 al mismo día (**Figura 6 y 7**).

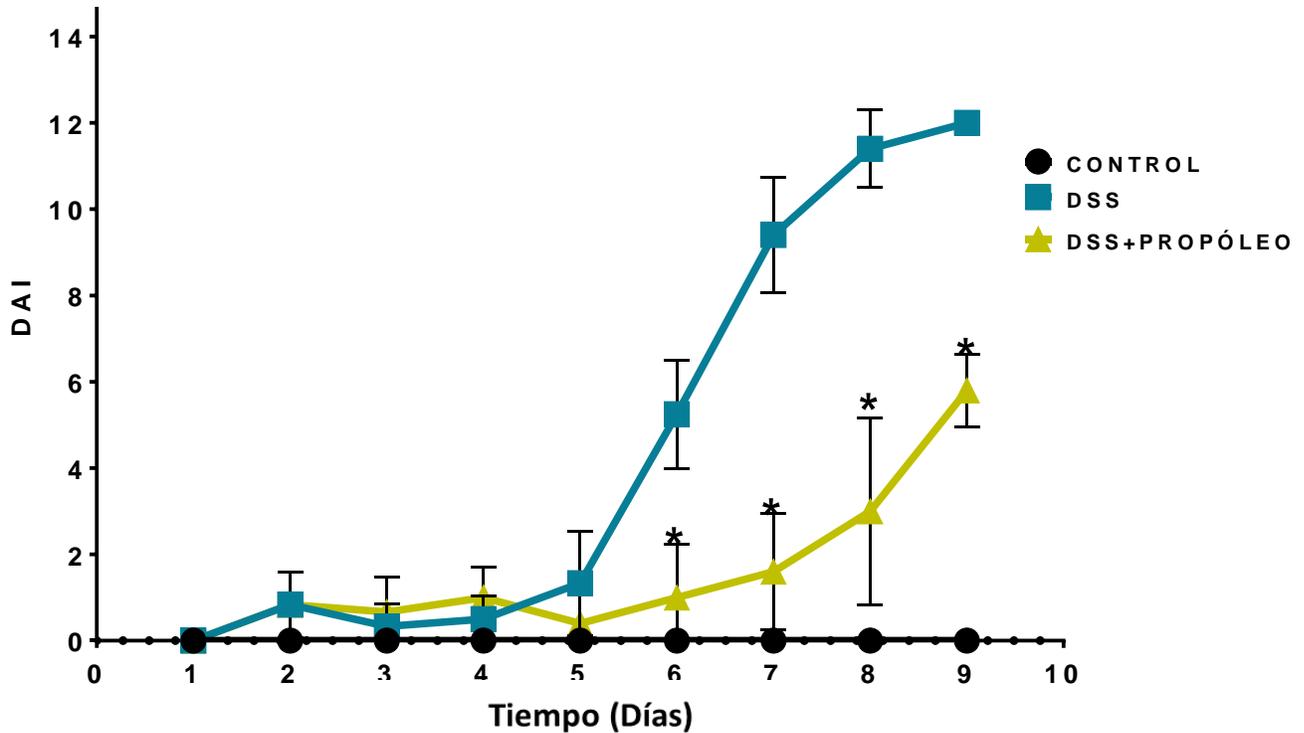


Figura 6. Retraso del establecimiento del índice de actividad por efecto del extracto etanólico de propóleo de Chihuahua. Grupo control (agua potable), grupo DSS (DSS al 4%) y grupo DSS+PROPÓLEO (DSS al 4% y propóleo a una concentración de 150 mg /kg). *Diferencia significativa entre los grupos de DSS y DSS + PROPÓLEO ($P < 0.05$).

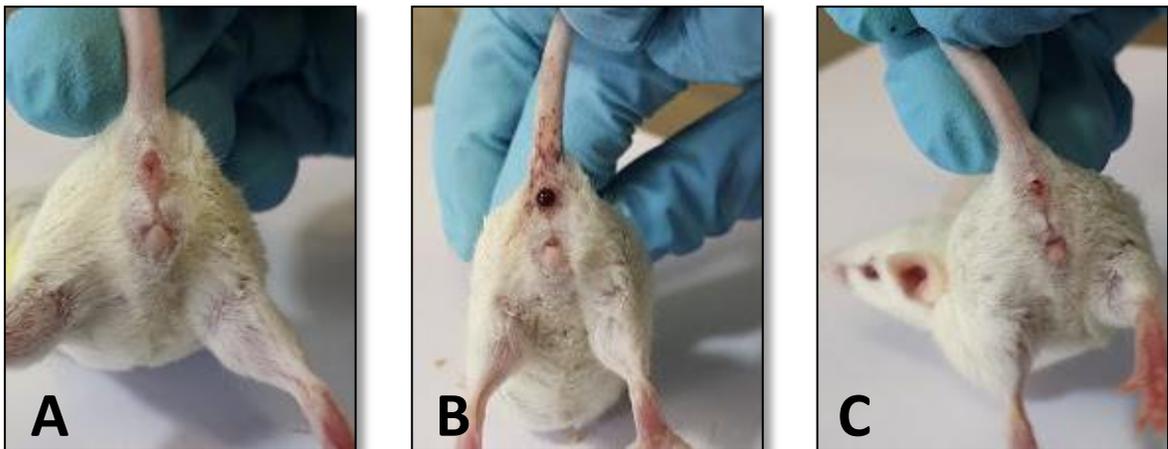


Figura 7. Índice de actividad, registro de sangrado colorrectal del día de sacrificio (día 9). A; Control (Agua potable). B; DSS (DSS al 4%) con sangrado abundante. C; DSS+PROPÓLEO (Administrado con 100 μ L de extracto de propóleo a una concentración de 150 mg/ kg), con ligero enrojecimiento de la zona perianal.

El extracto etanólico de propóleo de Chihuahua atenúa el acortamiento del colon debido al daño generado por el DSS.

Una de las consecuencias de la colitis ulcerosa es el acortamiento del intestino generado por la inflamación exacerbada, es por ello que se considera una característica de la gravedad de la enfermedad. Los ratones fueron sacrificados al día 9 del tratamiento y posteriormente se midieron los intestinos de cada grupo obteniendo que el grupo DSS ($52.9425\text{mm} \pm 2.626\text{mm}$) presentó un acortamiento significativo, en comparación con el grupo control ($84.6075\text{mm} \pm 4.752\text{mm}$), sin embargo el grupo tratado con propóleo ($70.01\text{mm} \pm 1.915\text{mm}$) a pesar de que la longitud fue menor que la del grupo control, ésta fue mayor que la del grupo DSS, es decir que el propóleo protege al intestino a nivel macroscópico del daño ocasionado por el DSS, estas diferencias son estadísticamente significativas ($P < 0.05$) (Figura 8 y 9).

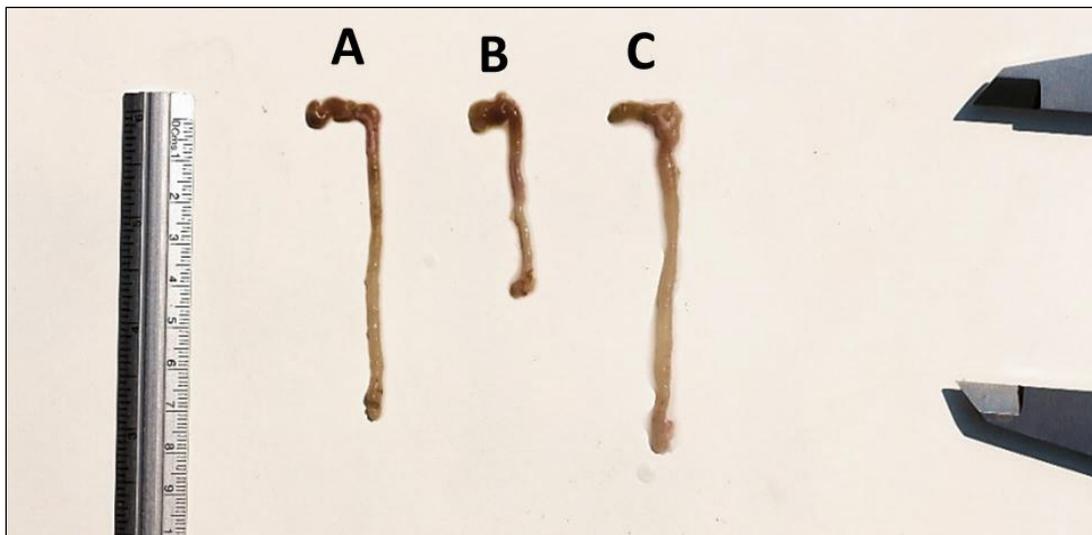


Figura 8. Observaciones macroscópicas de la protección en la longitud del intestino generado por la administración del extracto etanólico del propóleo de Chihuahua. A; DSS+PROPÓLEO (Administrado con 100 μL de extracto de propóleo a una concentración de 150 mg/ kg). B; DSS (DSS al 4%). C; Control (agua potable).

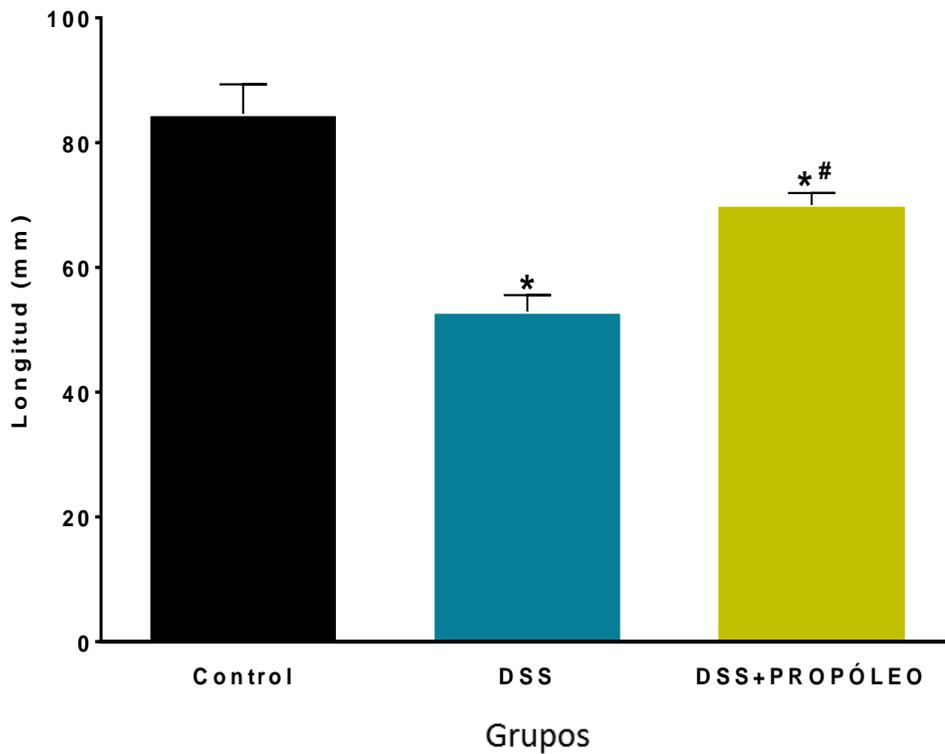


Figura 9. Longitud de intestino de los grupos control ($84.6075\text{mm} \pm 4.752\text{mm}$), DSS ($52.9425\text{mm} \pm 2.626\text{mm}$) y DSS+PROPÓLEO ($70.01\text{mm} \pm 1.915\text{mm}$). Se observó que la longitud de los intestinos en el grupo tratado con propóleo es mayor que el grupo de DSS. *Diferencias significativas respecto al control. #Diferencias significativas respecto al grupo DSS. ($P < 0.05$)

El extracto etanólico de propóleo de Chihuahua disminuye el daño histológico generado por el DSS.

El daño en las criptas del intestino es característico de la colitis ulcerosa debido a la gran cantidad de infiltrado inflamatorio, éste genera pérdida en la arquitectura de las criptas y ulceración, con base en esto se decidió realizar la evaluación por medio de cortes histológicos (tinción de hematoxilina y eosina, y tinción de azul de Alcian para células caliciformes) (**Figura 10**), en ellas se pudo observar que el grupo DSS presenta infiltrado inflamatorio, distorsión en la integridad de las criptas, crestas y disminución en el número de células caliciformes, que conlleva a una pérdida en la arquitectura, como era de esperarse; sin embargo, en el grupo tratado con propóleo se disminuyó el infiltrado inflamatorio y la distorsión de las criptas no fue tan severo, además de conservar las células caliciformes (células productoras de moco). El propóleo presenta actividad antiinflamatoria al reducir el daño en las crestas y criptas causado por el infiltrado. El índice del daño histológico mostró diferencias significativas entre todos los grupos experimentales, cabe destacar que el daño en el grupo tratado con propóleo fue menor al grupo DSS, alcanzando el nivel 3 en una escala en donde 9 significa el mayor daño (**Figura 11**).

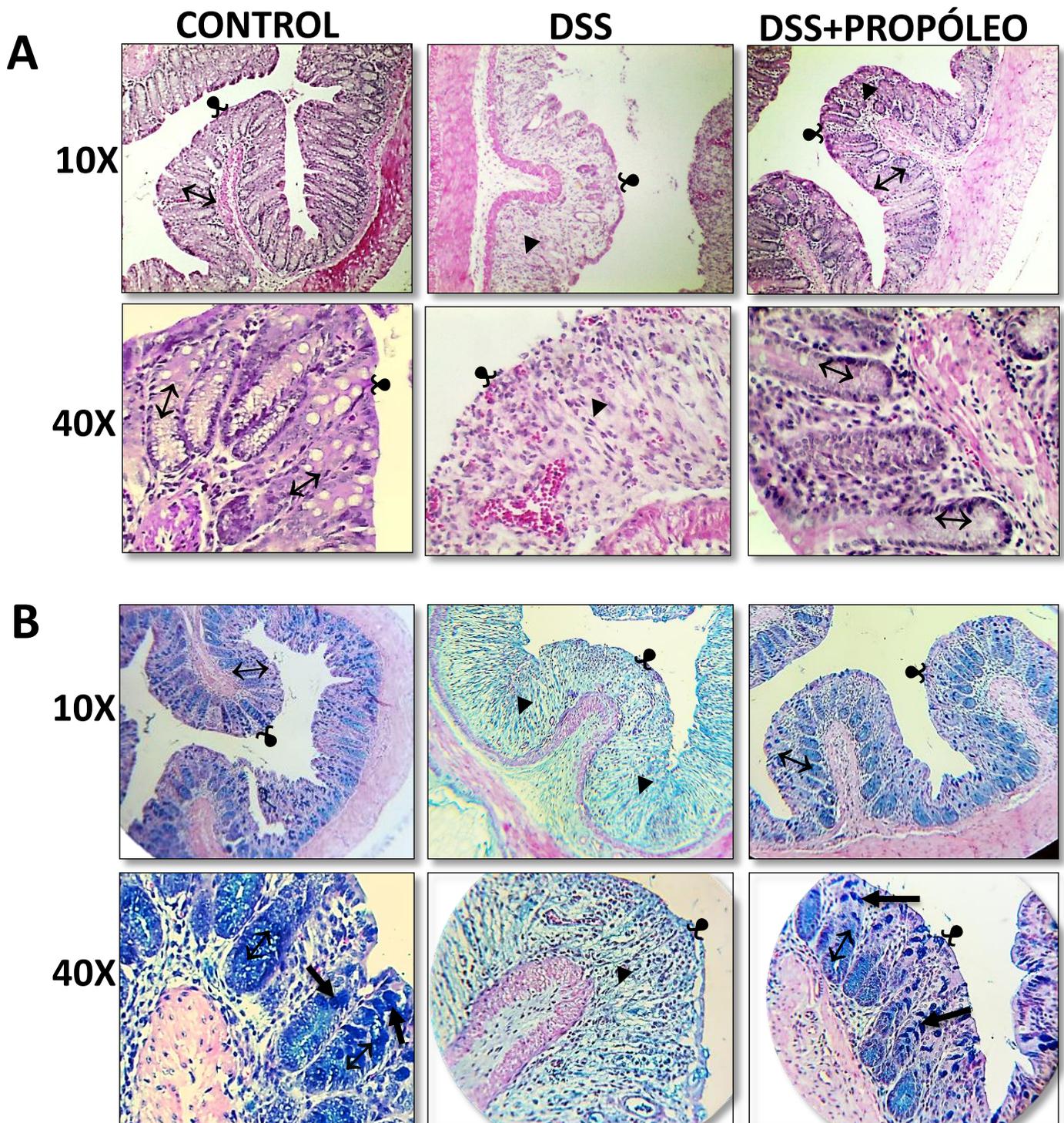


Figura 10. Efecto del extracto etanólico del propóleo de Chihuahua y del DSS sobre los cambios histológicos. A; Tinción de Hematoxilina y Eosina. B; Tinción de azul de Alcian. Grupo control. Grupo DSS (DSS administrado al 4%). Grupo DSS+PROPÓLEO (Extracto etanólico de propóleo de Chihuahua a una concentración de 150mg/kg). \leftrightarrow : Cripta. \blacktriangle : Infiltrado inflamatorio. \bullet : Crestas. \prime : Células caliciformes.

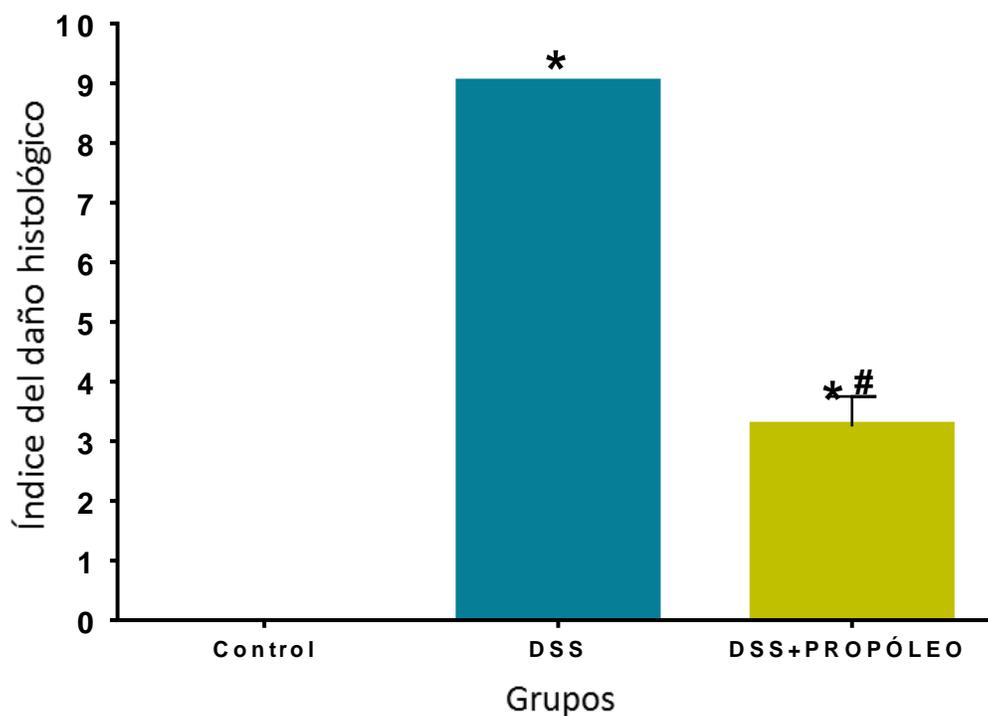


Figura 11. Efecto del extracto etanólico del propóleo de Chihuahua sobre el índice de daño histológico registrado en los grupos control, DSS (DSS al 4%) y DSS+PROPÓLEO (Extracto etanólico de propóleo de Chihuahua a una concentración de 150mg/kg). *Diferencias significativas respecto al control. #Diferencias significativas respecto al grupo DSS. (P<0.05).

Capacidad antioxidante fenoles y flavonoides totales del extracto etanólico de propóleo de Chihuahua

Una de las consecuencias de la inflamación es la presencia de EROS, las cuales suelen generar daño a nivel celular, debido a esta característica se decidió evaluar la capacidad antioxidante del extracto, reportada como CA_{50} . Los fenoles y flavonoides son metabolitos secundarios a los cuales se le atribuyen dicha capacidad además de antiinflamatoria y antimicrobiana, por tal motivo se decidió cuantificar la presencia de estos compuestos. El extracto de propóleo de Chihuahua presentó una CA_{50} de 15.75 $\mu\text{g/mL}$, (**Figura 12**). El 31.4% del extracto etanólico del propóleo de Chihuahua son fenoles y el 6.25% son flavonoides. La concentración de fenoles totales se determinó usando una curva de Ácido Gálico y para flavonoides una curva patrón de quercetina, se obtuvo que el 31.4% del extracto son fenoles y el 6.25% son flavonoides (**Tabla 7**).

Tabla 7. Capacidad antioxidante, fenoles y flavonoides totales del extracto etanólico de propóleo de Chihuahua

Parámetros	Valores	Porcentaje
CA ₅₀ del propóleo de Chihuahua	15.75 µg/mL	-
CA ₅₀ de la Quercetina	4µg/mL	-
Fenoles	314 mg eqAG/g	31.4%
Flavonoides	62.58 mg eqQ/g	6.25%

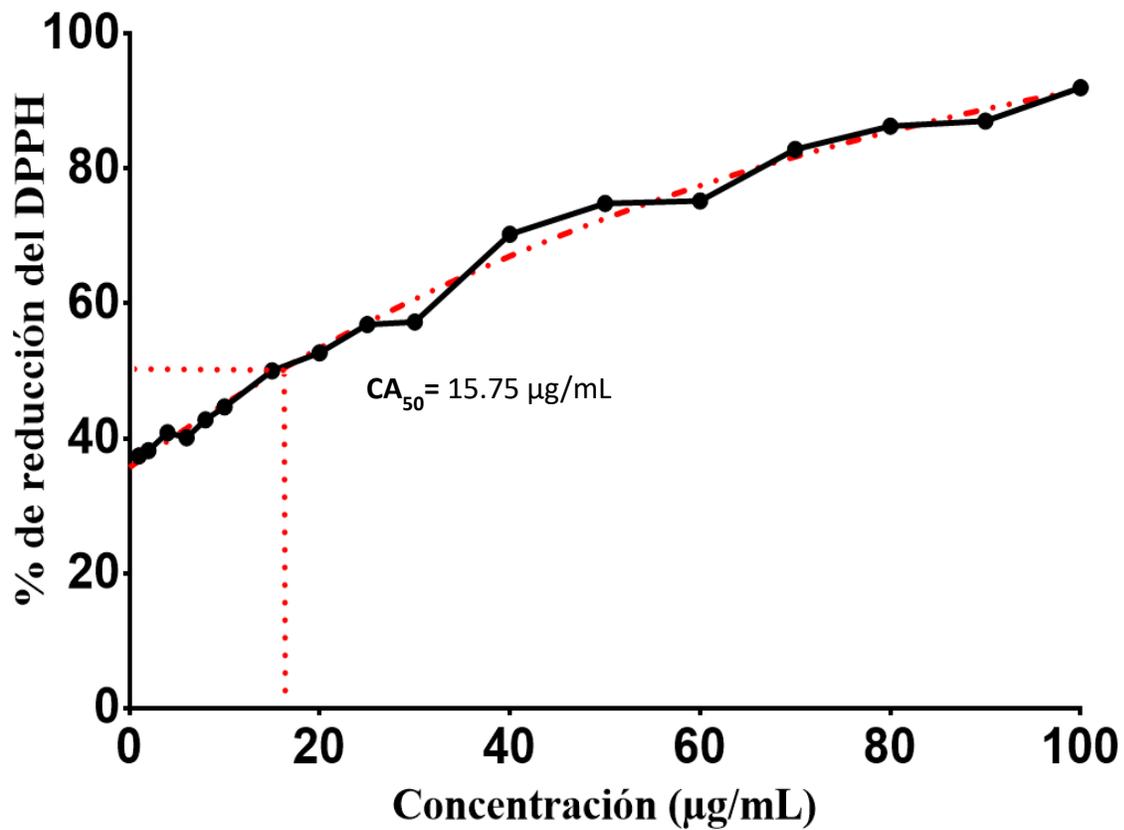


Figura 12. Capacidad antioxidante del extracto de propóleo de Chihuahua.

El extracto etanólico del propóleo de Chihuahua disminuye la actividad de la Mieloperoxidasa

La actividad de la MPO es un indicador indirecto del grado de infiltración de neutrófilos en tejido, este es un marcador de inflamación severa o aguda. Los resultados obtenidos indican que la actividad de la MPO en el grupo control fue baja (8.853 ± 0.2804 nmol/min/mL) mientras que el grupo DSS presentó un gran aumento en la actividad (41.40 ± 2.428 nmol/min/mL). En el grupo tratado con propóleo a una concentración de 150 mg/kg se observó que la actividad de la enzima fue reducida (18.52 ± 0.524 nmol/min/mL) significativamente comparada con la del DSS ($P < 0.05$) sin embargo en este mismo tratamiento se observó que la MPO a pesar de estar disminuida es diferente significativamente respecto al control (**Figura 13**). Esto indica que el extracto etanólico de propóleo disminuye el reclutamiento de neutrófilos en el intestino grueso.

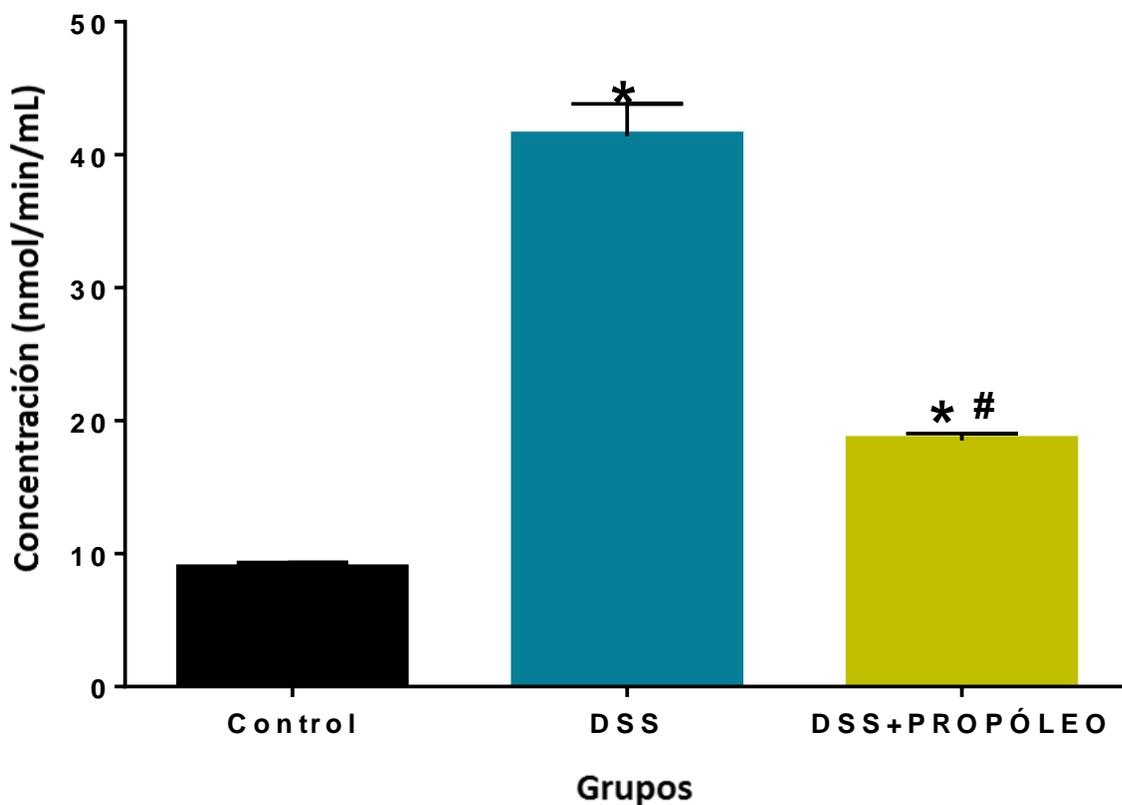


Figura 13. Efecto del extracto etanólico del propóleo sobre la actividad de la MPO de los grupos control, DSS (DSS al 4%) y DSS+ PROPÓLEO (DSS al 4% y extracto de propóleo a una concentración de 150 mg/kg). (*) Muestra diferencia significativa respecto al grupo control. (#) Diferencias significativas respecto al grupo DSS ($P < 0.05$).

Composición química del propóleo de Chihuahua

Cromatografía Líquida De Alta Resolución (HPLC)

Se inyectó al equipo cada una de las fracciones de diferentes polaridades (metanol, diclorometano y hexano) obteniendo distintos cromatogramas (**Figura 14, 15 y 16**), en cada fracción se encontraron compuestos fenólicos, para esto fue comparando el tiempo de retención y la máxima absorción bajo luz ultra violeta ($\lambda_{m\acute{a}x}$) del compuesto con los parámetros de los estándares del equipo. Con el análisis de las 3 fracciones se lograron identificar 9 compuestos: Naringenina, Pinocebrina, Crisina, Naringina, Acacetina, Catequina, Quercetina, Kaempferol y Luteolina, reportados en las **tablas 8, 9 y 10** junto con la $\lambda_{m\acute{a}x}$, el tiempo de retención y su estructura química. Se realizó una búsqueda bibliográfica sobre las actividades biológicas reportadas para los compuestos identificados por HPLC descritas en la **tabla 14**.

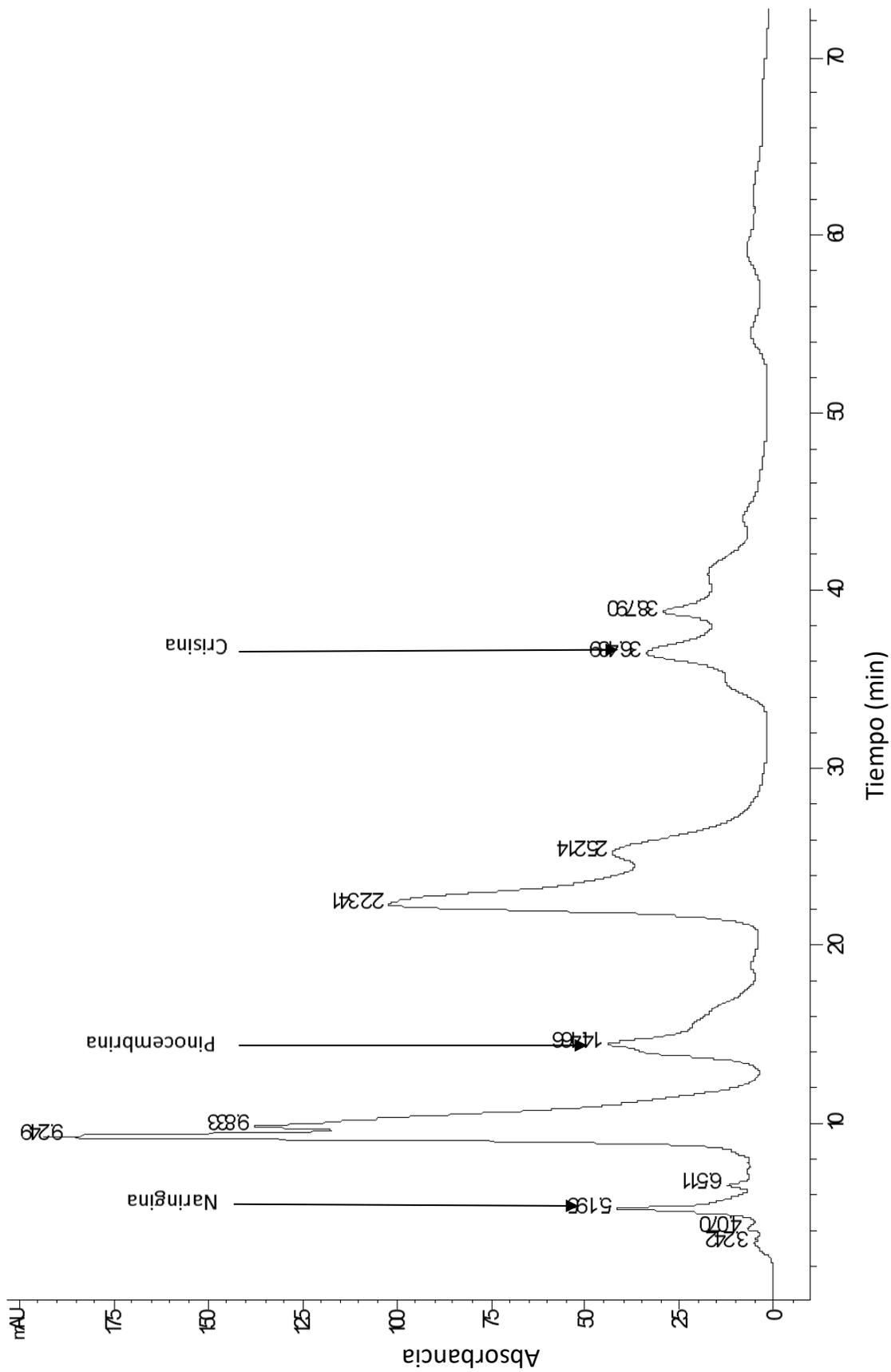
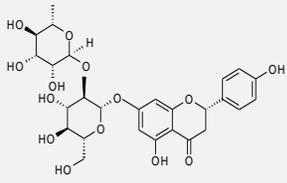
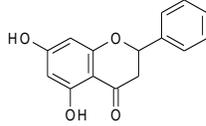
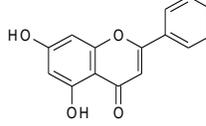


Figura 14 Cromatograma de la partición con hexano del EEP de Chihuahua obtenido por HPLC.

Tabla 8. Compuestos químicos identificados en la partición con hexano del EEP de Chihuahua

No. Compuesto	Nombre	Estructura química	Tiempo de retención	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
1	Fenol	N.I.	3.24	218, 280
2	Fenol	N.I.	4.07	228, 280
3	Naringina		6.51	222, 270, 288
4	Pinocembrina		14.46	210, 290
5	Flavonol	N.I.	36.48	266, 292, 360
6	Crisina		38.78	208, 268, 356

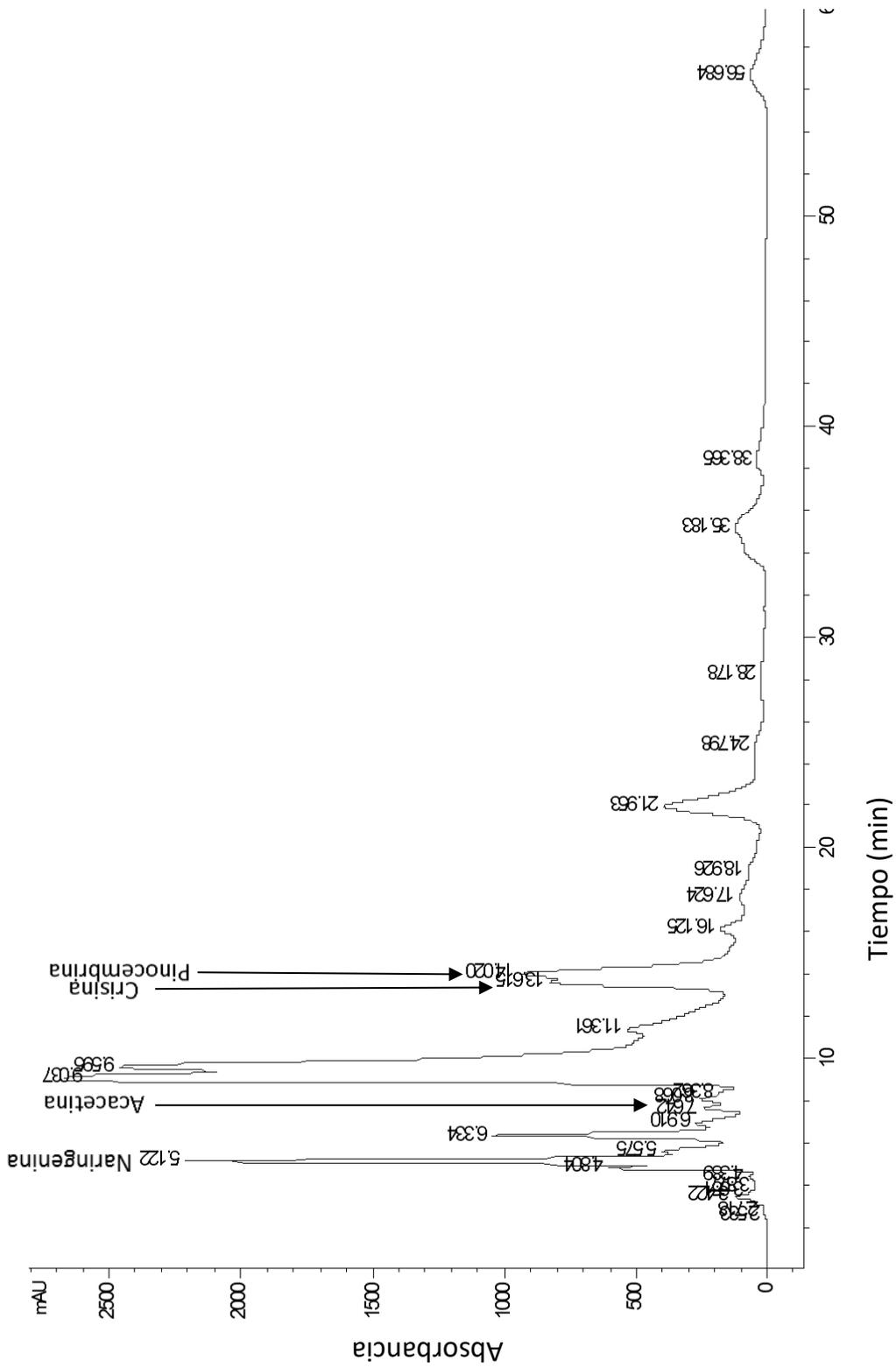
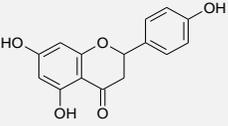
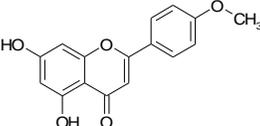
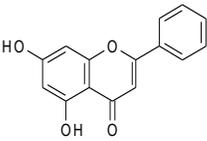
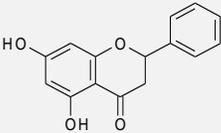


Figura 15. Cromatograma de la partición con diclorometano del EEP de Chihuahua obtenida por HPLC.

Tabla 9. Compuestos químicos identificados en la partición con diclorometano del extracto EEP de Chihuahua.

No. compuesto	Nombre	Estructura química	Tiempo de retención	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
1	Flavanona	N.I.	3.41	222, 298, 310
2	Fenol	N.I.	3.64	292
3	N. I.	N.I.	3.87	224, 288
4	N. I.	N.I.	4.37	228, 288
5	Naringenina		5.12	216, 294
6	Acacetina		7.63	210, 266, 350
7	Fenantreno	N.I.	8.36	254, 266, 294, 354
8	Flavanona	N.I.	9.03	274, 298, 332
9	Flavonol	N.I.	11.36	266, 292, 354
10	Crisina		13.60	210, 268, 312

11	Pinocembrina		14.012	210, 290
12	Flavonol	N.I.	16.13	266,296,368
13	Flavonol	N.I.	17.62	268,294,362
14	Flavonol	N.I.	19.92	270,294,368
15	Flavonol	N.I.	38.35	268,294,364

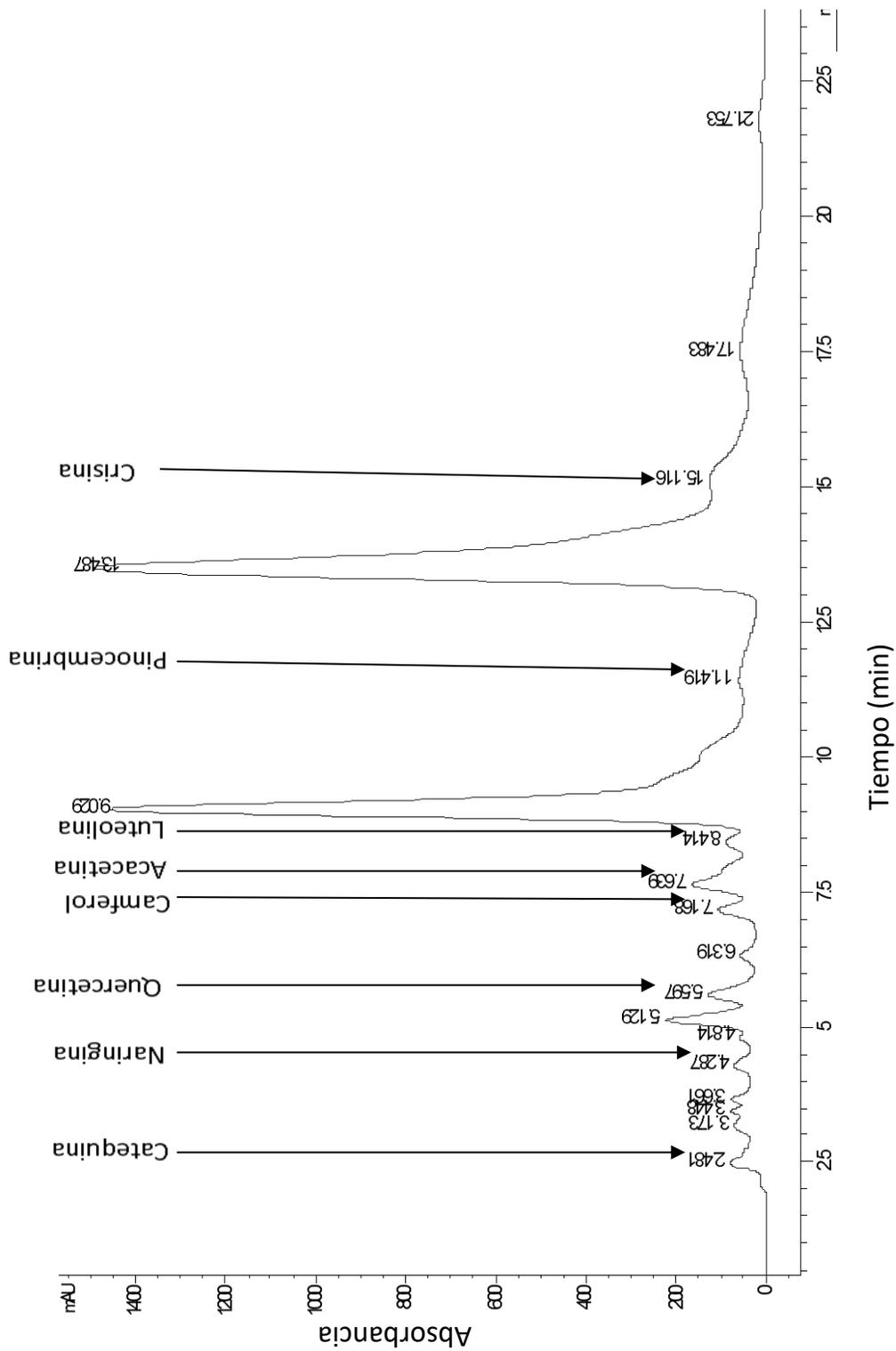
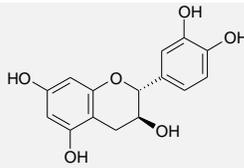
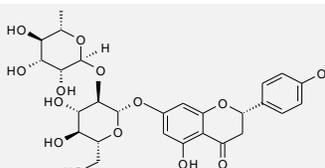
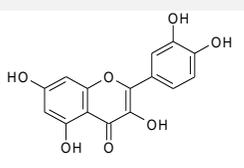
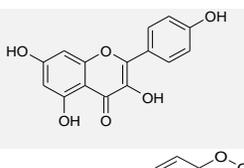
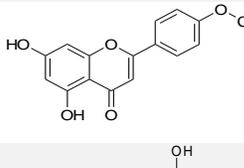
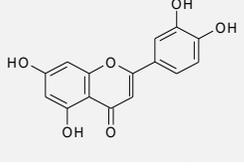
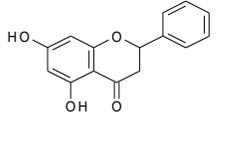
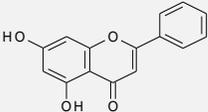


Figura 16. Cromatograma de la partición con metanol del EEP de Chihuahua obtenido por HPLC.

Tabla 10. Compuestos químicos identificados en la partición con diclorometano del EEP de Chihuahua

No. compuesto	Nombre	Estructura química	Tiempo de retención	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
1	Catequina		2.46	218, 276
2	Flavanona	N.I.	3.14	216, 288, 328
3	Flavanona	N.I.	3.44	218, 288, 320
4	Flavanona	N.I.	3.65	216, 294, 326
5	Naringina		4.27	208, 228, 284
6	Quercetina		5.59	202, 256, 356
7	Camferol		7.17	220, 266, 366
8	Acacetina		7.63	210, 266, 346
9	Luteolina		8.4	204, 254, 266, 356
10	Pinocembrina		11.41	210, 290

11	Crisina		15.11	210, 266, 312
----	---------	---	-------	---------------

Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS)

Fueron inyectadas y analizadas las tres fracciones del EEP de Chihuahua, obteniendo un espectro por cada fracción (**Figura 17, 18 y 19**) en el que se puede observar el tiempo de retención y el porcentaje de abundancia de cada compuesto, todos estos datos fueron plasmados en las **tablas 11, 12 y 13**, así como su estructura química y el tipo de compuesto al que pertenece. De la fracción hexánica se lograron identificar 12 compuestos de los cuales, los más abundantes son el éster metílico del ácido 9-octadecanoico (20.113%), el 14-metil-metil éster del ácido pentadecanoico (18.651%) y el 2-nonadecanona (14.466%), estos compuestos conforman más del 10% de la fracción analizada (**Figura 17 y tabla 11**). Para la fracción diclorometánica se identificaron 5 compuestos, en la cual pinocembrina es el más abundante, representando un 89.02% de la fracción (**Figura 18 y tabla 12**). Para la fracción metanólica fueron identificados 6 compuestos, en donde pinocembrina es nuevamente el compuesto de mayor abundancia (10.273%) (**Figura 19 y tabla 13**). Los compuestos resaltados en negritas en el cromatograma son los de mayor abundancia mientras que los resaltados en negritas son los compuestos que han sido reportados con actividades biológicas (antibacteriana, antiinflamatoria, antioxidante o gastroprotectora) (**Tabla 15**).

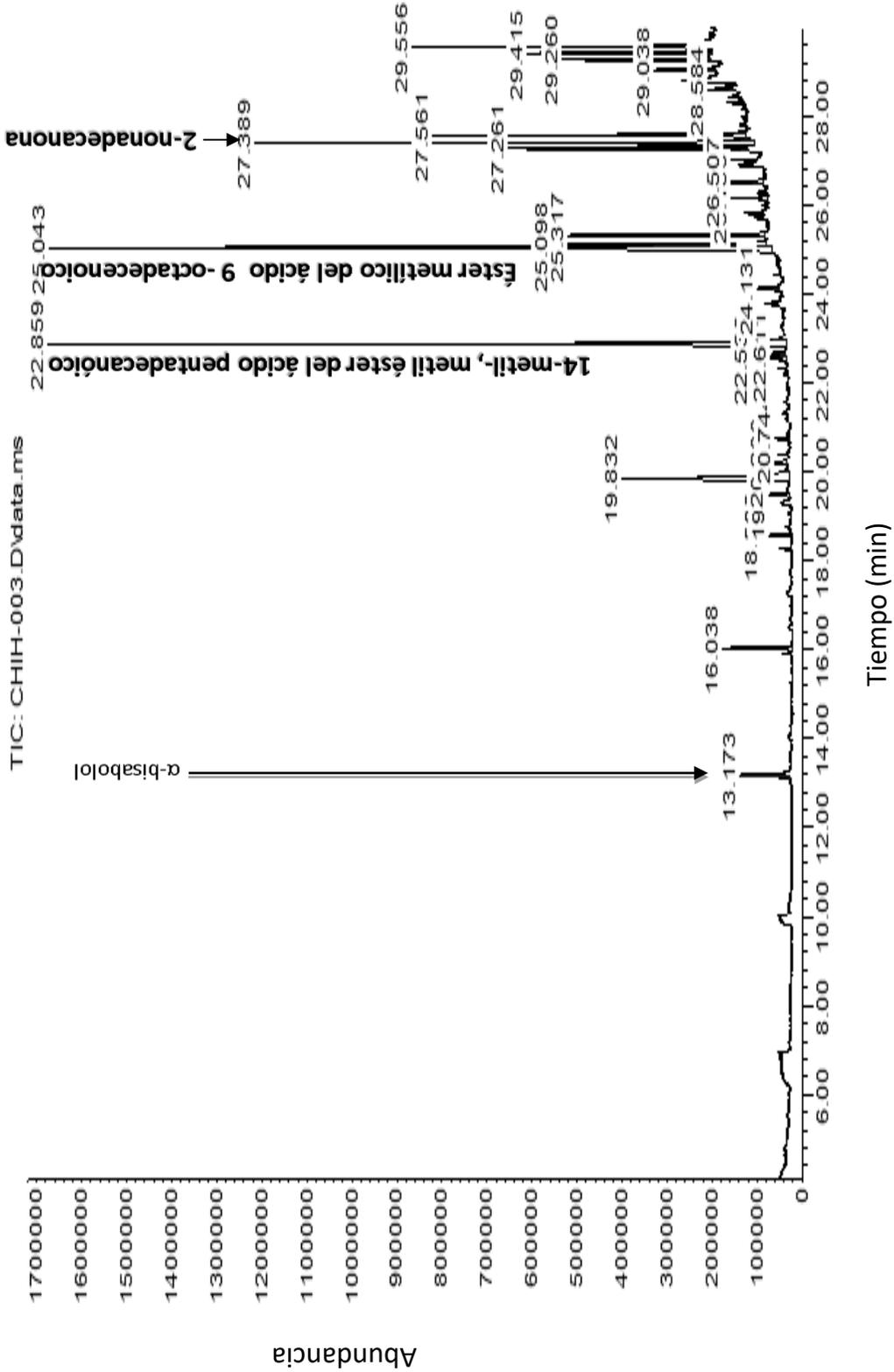
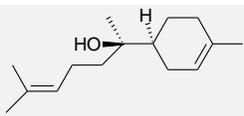
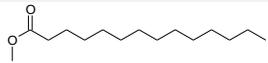
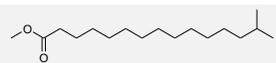
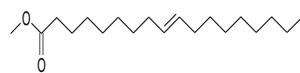
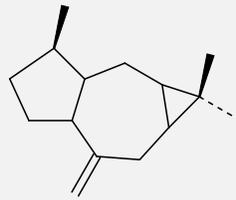
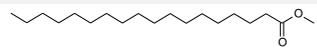
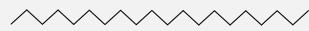
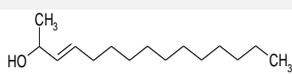
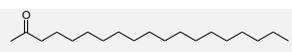
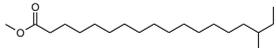
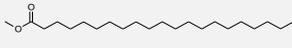
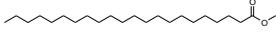


Figura 17. Cromatograma de la partición de Hexano del EEP de Chihuahua obtenido por GC-MS. Los compuestos resaltados en negritas son los de mayor abundancia (14-metil-, metil éster del ácido pentadecanoico, ácido oleico y 2-nonadecanona). α -bisabolol, compuesto reportado con actividad biológica.

Tabla 11. Compuestos químicos identificados en la partición con hexano del EEP de Chihuahua

No. compuesto	Nombre	Estructura química	Tipo de compuesto	Tiempo de retención (Min)	Porcentaje de abundancia
1	α -bisabolol		Sesquiterpeno	19.832	7.529%
2	Miristato de metilo		Ácido graso	20.200	0.664%
3	14-metil-, metil éster del ácido pentadecanóico		Ácido graso (éster)	22.859	18.651%
4	Éster metílico del ácido 9-octadecanoico		Ácido graso (éster)	25.043	20.113%
5	2-heptadecanona		Hidrocarburo	25.098	5.144%
6	Éster metílico del ácido oleico		Ácido graso (éster)	25.317	4.550%
7	eicosano		Alcano	26.156	7.806%
8	e-3-pentadecen-2-ol		Alcohol	26.507	1.112%
9	2-nonadecanona		Cetona	27.389	14.466%

10	Metil 18- metilnonadecano ato		Ácido graso (éster)	27.561	6.435%
11	Metil éster del ácido heneicosanoico		Ácido graso (Éster)	28.584	0.445%
12	Metil éster del ácido behenico		Ácido graso	29.556	5.999%

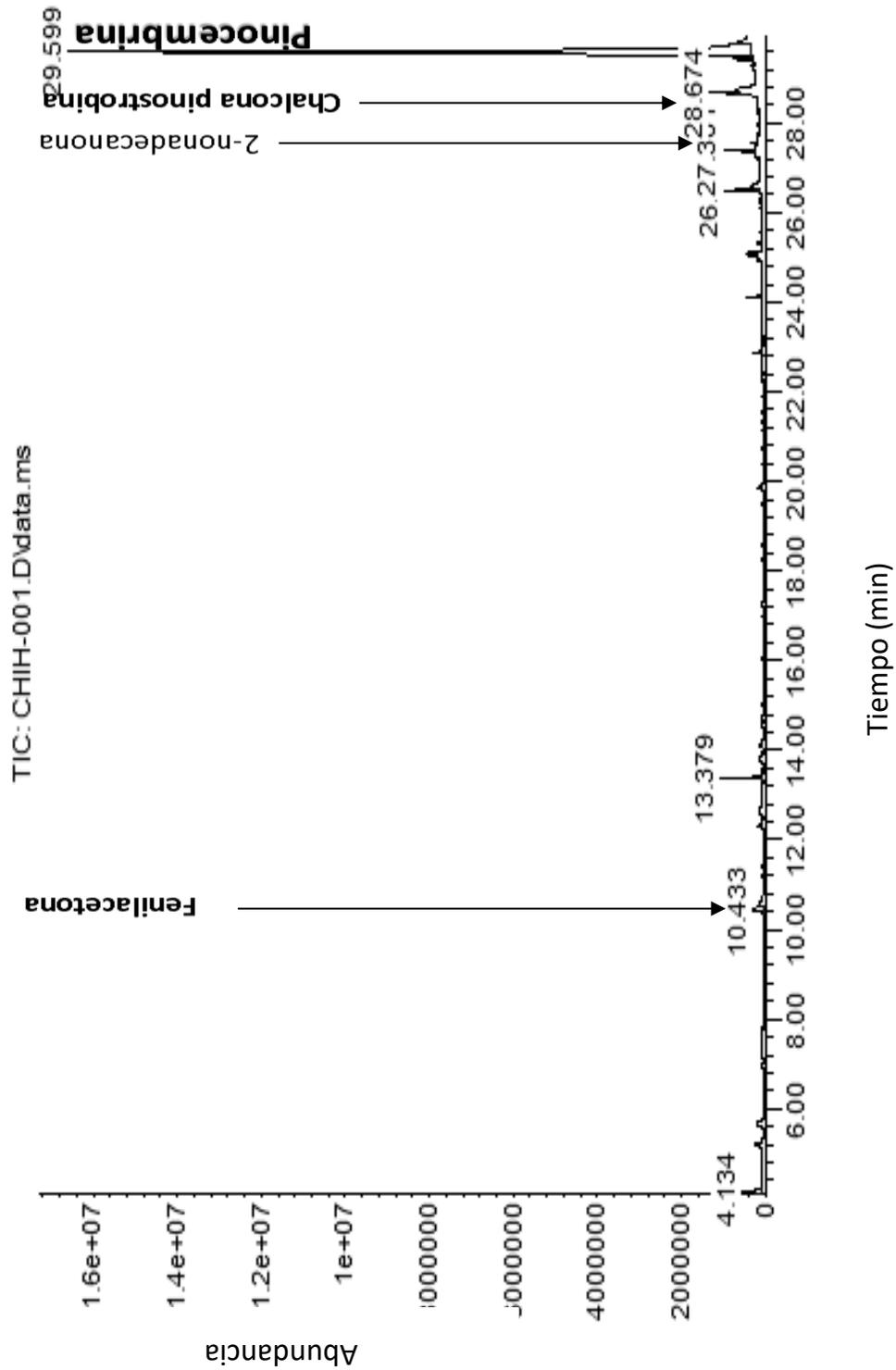


Figura 18. Cromatograma de la partición con diclorometano del EEP de Chihuahua obtenido por GC-MS.

Tabla 12. Compuestos químicos identificados en la partición con diclorometano del EEP Chihuahua

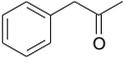
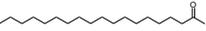
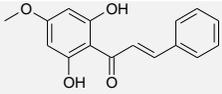
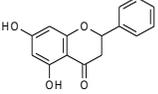
No.	Nombre	Estructura química	Tiempo de Retención min	Porcentaje de abundancia	Tipo de compuesto
1	Fenilacetona		10.433	1.55%	Fenol-Cetona
2	N.I.	N.I.	13.379	2.35%	N.I.
3	2-Nonadecanona		27.381	1.67 %	Cetona
4	Chalcona pinostrobina		28.674	1.62%	Chalcona
5	Pinocembrina		29.599	89.02%	Flavanona

Tabla 13. Compuestos químicos identificados en la partición con metanol del EEP de Chihuahua

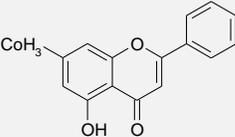
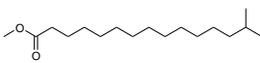
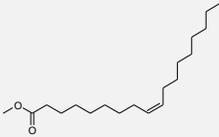
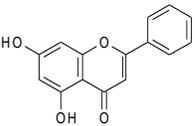
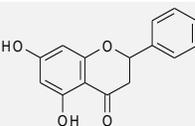
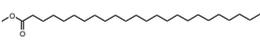
No. Compuesto	Nombre	Estructura química	Tiempo de Retención (min)	Porcentaje de abundancia	Tipo de compuesto
1	Tectocrisina		22.161	2.270%	Flavona
2	Isohexadecanoato de metilo		22.876	2.438%	Ácido graso
3	Éster metílico del ácido oleico		25.051	1.009%	Ácido graso
4	Crisina		26.400	2.275%	Flavona
5	Pinocembrina		26.589	10.273%	Flavanona
6	Tetracosanoato de metilo		26.871	2.954%	Ácido graso (monoglicérido)

Tabla 14. Actividades biológicas reportadas para los compuestos identificados mediante HPLC en las particiones con hexano, diclorometano y metanol del EEP de Chihuahua.

Compuesto	Actividad biológica	Referencias
Acacetina	<ul style="list-style-type: none"> • Antiinflamatoria • Antioxidante 	(51, 63) (64-66)
Catequina	<ul style="list-style-type: none"> • Antiinflamatoria • Antioxidante 	(67) (68)
Crisina	<ul style="list-style-type: none"> • Antiinflamatoria • Antioxidante • Antibacteriana 	(69-72) (68, 73-77) (78)
kaemferol	<ul style="list-style-type: none"> • Antiinflamatoria • Antioxidante • Antibacteriana 	(70) (64, 68, 75, 77, 78) (79)
Luteolina	<ul style="list-style-type: none"> • Antiinflamatoria • Antioxidante 	(80) (75, 80)
Naringenina	<ul style="list-style-type: none"> • Antiinflamatoria • Antioxidante • Antibacteriana 	(78, 81-83) (68, 77, 78, 84-87) (78)
Naringina	<ul style="list-style-type: none"> • Antiinflamatoria • Antioxidante 	(88) (89)
Pinocembrina	<ul style="list-style-type: none"> • Antiinflamatoria • Antioxidante • Antimicrobiana • Bacteriostática 	(71, 90-92) (71, 73, 75, 77) (78, 93) (93)
Quercetina	<ul style="list-style-type: none"> • Antiinflamatoria • Antioxidante • Antibacteriana 	(70, 91, 94) (75) (77) (86) (78)

Tabla 15. Actividades biológicas reportadas para los compuestos identificados por GC-MS en las particiones con hexano, diclorometano y metanol del EEP de Chihuahua.

Compuesto	Actividad biológica	Referencia
α-bisabolol	• Antiinflamatoria	(95, 96)
	• Antibacteriana	(97)
	• Gastroprotector	(98)
Fenilacetona	• Antiinflamatoria	(99)
	• Antioxidante	(100)
Chalcona pinostrobinina	• Antiinflamatoria	(101)
	• Antioxidante	(102)
Tectocrisina	• Antiinflamatoria	(71)
	• Antioxidante	(73)
	• Antibacteriano	(95)
Ester metílico del ácido oleico	• Antiinflamatoria	(103)
Éster metílico del ácido 9 – octadecenoico	• Antiinflamatoria	(104)

Discusión

En el presente estudio se demostró por primera vez el efecto de un propóleo mexicano proveniente del estado de Chihuahua sobre un modelo de colitis experimental inducido por DSS.

La EII se caracteriza por inflamación y ulceración continua de la mucosa, misma que afecta a gran parte de la población y cuando no es bien tratada tiende a desarrollarse en cáncer colorrectal. Su etiología es desconocida pero no así los eventos que se presentan durante el curso de la enfermedad^(1, 3, 4). En el intestino existe una constante interacción de la barrera gastrointestinal con los antígenos bacterianos del lumen, cuando se presenta una alteración en la permeabilidad de barrera se da el paso de los patógenos, mismos que son reconocidos por el sistema inmunológico desencadenando la cascada inflamatoria⁽¹⁰⁵⁾.

Durante la inflamación son activadas diversas células del sistema inmunológico, las cuales producen mediadores inflamatorios y EROS, que son causantes de la inflamación amplificada y del daño a la mucosa⁽¹⁰⁵⁾. Debido a esto, es que los tratamientos convencionales se enfocan en suprimir los procesos inflamatorios, sin embargo son inespecíficos y suelen desencadenar efectos secundarios^(1, 26, 29, 30). Por ello es que se buscan nuevas alternativas como los productos naturales para atenuar o disminuir los síntomas sin efectos colaterales.

Para el tratamiento de la EII ha sido reportado el uso de productos naturales con actividad antioxidante, inmunomoduladora, antimicrobiana y antiinflamatoria^(1, 105), estas actividades han sido reportadas para diferentes propóleos. La variación o las diferentes actividades de los propóleos va a estar relacionada con la composición química, la cual depende de la zona geográfica y de la floración de la zona de colecta^(33, 39, 46, 50). En este trabajo se propone el uso del extracto etanólico de propóleo de Chihuahua como un posible candidato para aliviar las manifestaciones clínicas de la colitis ulcerosa experimental.

El EEP de Chihuahua se administró a una concentración de 150 mg/Kg. La concentración se estableció con base en estudios realizados en nuestro equipo de trabajo y se encontró que a esta dosis no se alteran aspectos de la salud de los organismos, tales como pérdida de peso, sangrado rectal, o diarrea durante el tratamiento sólo con el extracto. Esta dosis es similar a las empleadas en otros modelos reportados en los cuales se analiza la actividad inmunomoduladora (200 mg /Kg)⁽¹⁰⁶⁾, antitumoral (50 y 150 mg/Kg)⁽¹⁰⁷⁾ y antiulcerativa (50, 250 y 500 mg/Kg)⁽¹⁰⁸⁾ de propóleos de diferentes regiones.

En la curva de supervivencia el grupo DSS alcanzó el 100% de mortalidad al día 12, mismo día en el cual el grupo tratado con propóleo presentó el 100% de supervivencia; sin embargo, al siguiente día, este grupo aumentó la mortalidad en un 20% y ésta se mantuvo hasta el día del sacrificio, esto es importante debido a que a pesar del severo daño que causa el DSS, el EEP fue capaz de prolongar la supervivencia hasta en un 80%, similar a lo reportado por Rodríguez⁽¹⁰⁹⁾, el cual administró un extracto natural de *Amphipterygium adstringens* en un modelo de colitis por DSS. Se monitoreó el establecimiento de la enfermedad y se observó que entre el segundo y el tercer día, después de haber recibido el DSS, los animales comenzaron a presentar pérdida de peso, sangrado rectal, diarrea y erizamiento del pelo, esto indica que se dio correctamente el establecimiento de la enfermedad lo que concuerda con estudios en donde se describe⁽⁴⁹⁾ e implementa el modelo de colitis aguda por DSS^(52, 109).

Para evaluar si el EEP era capaz de atenuar los signos de la enfermedad se implementó el DAI, este índice demostró la capacidad protectora del propóleo de Chihuahua, ya que disminuyó la pérdida de peso, sangrado y diarrea, lo que concuerda con Gonçalves⁽⁴⁵⁾, el cual evaluó un extracto de propóleo de Brasil en un modelo de colitis, mismo que presentó un retraso en el índice de actividad; sin embargo, en este estudio el modelo que se implementó fue el de TNBS, el cual se induce mediante la aplicación rectal del ácido 2, 4, 6 trinitrobencenosulfónico, en ese trabajo el efecto se atribuyó a la presencia de compuestos fenólicos, compuestos que se encuentran en el propóleo de Chihuahua. Ajayi⁽⁵²⁾ reporta el efecto protector del 6-Gingerol, compuesto fenólico del jengibre, en un modelo de colitis ulcerosa inducida por DSS, atribuyendo esta actividad a las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antibacterianas del compuesto, lo que presenta semejanzas con la disminución del DAI del presente estudio, para el cual el propóleo también ha sido reportado con dichas propiedades biológicas.

El DAI está relacionado con la longitud y la histología del colon, ésta normalmente se compone por la capa mucosa, submucosa, cerosa y muscular. La capa mucosa es formada por crestas que a su vez la conforman criptas, en éstas se encuentran los enterocitos, células ciliadas y las células caliciformes; células encargadas de producir la barrera mucosa que lubrica y protege impidiendo el acceso de agentes patógenos. Cuando se genera un daño en la mucosa, similar a lo observado para el grupo DSS, se pierde la arquitectura de las criptas y existe una disminución en el número de las células caliciformes, por lo que se pierde la barrera mucosa generada por las mismas permitiendo el paso a patógenos⁽¹¹⁰⁾. Se observó el efecto protector del extracto de propóleo al mantener parcialmente la arquitectura de la cripta por la disminución en el infiltrado inflamatorio

y un mayor número de células caliciformes así como en la longitud de los intestinos se atenuó el daño producido por el DSS, debido a que el grupo tratado con propóleo no difiere significativamente respecto al control. Estos resultados coinciden con lo reportado por Rodríguez⁽¹⁰⁹⁾, quien evaluó la actividad terapéutica del extracto de *Juliana adstringens* sobre un modelo de DSS, donde reporta características similares en el daño a nivel histológico producido por el DSS, así como el efecto protector del extracto. Dou⁽¹¹¹⁾ reporta la actividad de la mangiferina, compuesto fenólico presente en diversas frutas, hojas y cortezas de tallos de mango, sobre un modelo de colitis inducido por DSS, indica que este compuesto fenólico es capaz de atenuar tanto el DAI como el acortamiento y la lesión histológica; sin embargo, en este trabajo no se realizó tinción de azul de Alcian por lo que no es posible determinar el efecto directo sobre las células caliciformes. Davaatseren⁽⁵⁹⁾ reporta que el ácido poliglutámico (γ -PGA) en un modelo de colitis inducido por DSS al 3% es capaz de atenuar la pérdida de peso, DAI, acortamiento del colon, disminuir los niveles de la actividad de la MPO, traducido como el bajo reclutamiento de leucocitos así como en la reducción del daño histológico observado en la histología y en el índice de daño histológico, el cual indica que el tratamiento presenta diferencias significativas con el grupo DSS, lo que coincide con lo reportado en este trabajo. Khayyal⁽¹¹²⁾ reporta que un extracto acuoso de propóleo preserva la integridad funcional de la mucosa después de haber sido expuesta a radiación por ionización. El extracto fue administrado a una concentración de 650mg/Kg en ratas, cinco días antes de la radiación y dos días después. En este estudio se le atribuye la actividad a los ácidos aromáticos orgánicos y no a los flavonoides, debido a que el extracto fue obtenido mediante una extracción acuosa y no etanólica, como se obtuvo el EEP en el presente estudio. Indican que con la extracción acuosa, se obtienen trazas de fenoles pero principalmente ácidos, como CAPE, ácido felúrico, ácido cinámico, ácido isofelúrico, y ácido metil-cinámico. A pesar de que no fueron identificados estos ácidos en el EEP si exhibe la presencia del éster metílico del ácido oleico, compuesto reportados con capacidad antiinflamatoria^(103, 104), el cual puede haber intervenido en la protección al intestino.

La actividad antiinflamatoria observada en el presente estudio difiere de lo reportado por Osartti⁽¹¹³⁾, en donde el propóleo aumenta la activación de receptores para la producción de citocinas proinflamatorias; sin embargo, como ya se ha mencionado, las actividades biológicas varían dependiendo del propóleo estudiado⁽³⁹⁾; por otra parte es similar a lo reportado por Osartti⁽¹¹⁴⁾, quien administró un extracto de propóleo durante 3 días, sugiere que su administración a corto plazo en ratones puede estar asociada con efectos antiinflamatorios *in vivo*,

y que otros ensayos podrían comprobar la eficacia de propóleos en las enfermedades inflamatorias, ya que no afecta la expresión y producción de citocinas antiinflamatorias e inhibe la producción de IFN- γ .

La liberación de EROS por células fagocíticas es un mecanismo normal en la defensa antimicrobiana del organismo, a ellos se les debe el gran daño tisular de la enfermedad cuando este es excesivo, debido a que los productos pueden afectar al ADN, fluidez de la membrana y las funciones de proteínas de membrana⁽⁵³⁾. Por lo antes mencionado, es que se determinó la capacidad antioxidante definida como la capacidad de un compuesto para inhibir la degradación oxidativa, y la presencia de fenoles y flavonoides totales en el extracto, ya que estos compuestos poseen varias actividades farmacológicas, incluidas antiinflamatorias, antimicrobianas, antiparasitarias, antioxidantes, importantes para evitar el desarrollo de la enfermedad. Se reporta en este estudio que el propóleo posee fenoles y flavonoides, similar a lo reportado por otros autores^(33, 42, 53), además de una buena capacidad antioxidante, tomando en cuenta el criterio de Al-Fatimi⁽¹¹⁵⁾ que establece que un extracto posee una buena capacidad antioxidante si su CA₅₀ es menor o igual a 96.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cabe destacar que aunque la capacidad antioxidante del propóleo de Chihuahua es buena, difiere al de la Quercetina, siendo ésta un compuesto puro. Rivera⁽³³⁾, analizó las propiedades biológicas de propóleo de regiones diferentes, reportando buenas capacidades antioxidantes, se puede resaltar que el propóleo del Estado de México presenta una capacidad antioxidante similar al del propóleo de Chihuahua a pesar de la variabilidad en su composición química ambos propoleos coinciden en el porcentaje de flavonoides que poseen, además de la capacidad antioxidante reportada por éste y otros autores^(73, 77).

Como se mencionó anteriormente el estrés oxidativo es un factor importante para el desarrollo de la enfermedad. Uno de los productos importantes en el daño al tejido es el ácido hipocloroso (HOCl), que se genera por la actividad de la MPO, enzima que utiliza como sustrato al H_2O_2 , molécula liberada por las células fagocitadas durante el reconocimiento de patógenos⁽²⁷⁾. Ésta enzima es un marcador indirecto de reclutamiento de neutrófilos generado por una severa inflamación. En el presente estudio se observó que el grupo control tiene bajos niveles de actividad de MPO, comparado con el grupo DSS el cual presentó elevados niveles de la enzima debido al exceso de infiltrado inflamatorio, mismo que se observó en los cortes histológicos; sin embargo, a pesar de que los niveles de la actividad de MPO del grupo tratado con propóleo presentan diferencias significativas con el grupo control ésta no es tan alta como en el grupo DSS, es decir que el extracto de propóleo disminuye el reclutamiento de neutrófilos, relacionados con

la inflamación, debido a que no aumenta la actividad de ésta enzima en el tejido analizado, esto concuerda con la buena actividad antiinflamatoria y antioxidante antes mencionada por la presencia de fenoles y flavonoides reportados para éste estudio. Su⁽¹¹⁶⁾ demuestra el efecto antiinflamatorio intestinal del extracto de rizoma de *Menispermum dauricum*, sobre un modelo de colitis ulcerosa inducido por TNBS, el cual indica que inhibe la actividad de la MPO comparado con el grupo sólo con TNBS, refiriendo que la reducción en el infiltrado de neutrófilos en el tejido colónico puede ser un efecto protector del extracto, mismo efecto observado por el extracto de propóleo.

El análisis de la composición química por HPLC y CG-MS demostró la presencia de compuestos fenólicos, y ácidos grasos, a los que se les puede atribuir el efecto protector del propóleo en el modelo de colitis debido a las capacidades biológicas reportadas para los mismos. Valenzuela-Barra⁽¹¹⁷⁾ reporta la presencia de diversos compuestos en propóleos de dos localidades de la zona metropolitana de Santiago Chile resaltando a quercetina y crisina mismos compuestos identificados en el propóleo de Chihuahua.

De los compuestos detectados en el propóleo de Chihuahua, el kaempferol es un importante flavonol reportado con actividad antiinflamatoria⁽¹¹⁸⁾, además de disminuir el NO, radical libre generado por las células epiteliales de la mucosa, en altas concentraciones este radical es capaz de aumentar la permeabilidad de la mucosa y se asocia con el desarrollo de lesiones⁽¹¹⁹⁾. El efecto del kaempferol sobre el NO se podría asociar con el mantenimiento de la arquitectura de las crestas observado en los cortes histológicos; así mismo este compuesto actúa sobre los niveles de actividad de la MPO^(118, 120), esta propiedad se observa en la baja actividad de la MPO reportada para éste estudio. Otro de los flavonoides detectado es la quercetina, compuesto reportado con una excelente capacidad antioxidante, esto se debe a la presencia de los grupos hidroxilo y a las dobles ligaduras en su estructura; también se ha reportado con actividad antiinflamatoria, antibacteriana, anticancerígena, además de prevenir la disrupción de las uniones celulares en la barrera intestinal, de esta manera impide que se lleve a cabo el ciclo de infección, inflamación y perpetuación de la enfermedad, importante en la patogenia de la colitis ulcerosa⁽¹²¹⁾. Como se mencionó anteriormente, la actividad antiinflamatoria es una propiedad importante para este modelo; los compuestos identificados luteolina y naringenina han sido reportados con esta actividad, actuando en la reducción de los niveles de TNF- α y en la producción de iNOS, mediadores proinflamatorios en la colitis experimental^(5, 122, 123). Con esto podríamos sugerir que

estos compuestos intervienen en el aminoramiento de la enfermedad, reduciendo el infiltrado inflamatorio, manteniendo la arquitectura intestinal y disminuyendo la gravedad de los síntomas.

Es importante que un propóleo o los compuestos que lo integran presenten actividad antimicrobiana, debido a que la microbiota intestinal está relacionada con un aumento en el daño a la mucosa, esto es debido a que generan un ciclo de infección exacerbando la inflamación y perpetuando la enfermedad impidiendo la correcta restauración de la mucosa^(7,9).

A pesar de que en este estudio no se analizó la capacidad antimicrobiana del extracto, dicha actividad ha sido reportada para propóleos de diferentes zonas. Gil⁽⁴¹⁾ reporta la actividad bacteriostática y bactericida *in vitro* de propóleos en *Salmonella entérica* subsp entérica serotipo paratyphi A, *Salmonella e.* subsp entérica serotipo paratyphi B, *Salmonella e.* subsp entérica serotipo typhi, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica* y *Escherichia coli* enterohemorrágica, todas bacterias enteropatógenas. Rivera⁽³³⁾ evaluó la actividad antimicrobiana de propóleos de diferentes regiones de México, reporta que el propóleo de Guanajuato, Estado de México y Veracruz presentan actividad antibacteriana contra *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio cholerae*. Al realizar el análisis de la composición química se observan diferencias, sin embargo los compuestos más abundantes fueron pinocembrina y naringenina.

En otros estudios ha sido reportada la capacidad antimicrobiana de compuestos que fueron determinados por el presente estudio en el EEP. Escandón⁽⁷⁹⁾ reporta el efecto antibacteriano del Kaemferol contra *E. coli* y *Helicobacter pylori*, bacterias de suma importancia presentes en el tracto digestivo. *H. pylori*, relacionada con el cáncer gástrico. Vargas-Sánchez⁽⁷⁸⁾ reporta que crisina, naringina y pinocembrina presentan actividad antibacteriana. Stangacius⁽⁹³⁾ hace una recopilación de los compuestos con actividades biológicas presentes en el propóleo de los cuales es reportado nuevamente pinocembrina pero con actividad bacteriostática y efectiva contra *H. pylori*.

Finalmente de acuerdo con los resultados obtenidos en la investigación, se puede proponer al propóleo de Chihuahua como un buen candidato para disminuir las manifestaciones de la colitis ulcerosa.

Conclusiones

El extracto etanólico del propóleo de Chihuahua:

- Prolonga la sobrevida en ratones con colitis experimental.
- Retrasa el establecimiento del índice de actividad de la enfermedad, aminorando los síntomas como diarrea, sangrado y pérdida de peso en los ratones con colitis experimental.
- Presenta un efecto protector al disminuir el daño en la longitud del intestino y a nivel histológico, mantiene la arquitectura de las crestas y las criptas.
- Tiene una buena capacidad antioxidante.
- Tiene actividad antiinflamatoria expresada por la reducción de la actividad de MPO.
- Presenta compuestos reportados con actividad antioxidante, antiinflamatoria y antimicrobiana importantes para el modelo de colitis: Pinocebrina, chalcona pinostrobrina, catequina, Kaemferol, narigenina, luteolina.

REFERENCIAS

1. Somani SJ, Modi KP, Majumdar AS, Sadarani BN. 2015. Phytochemicals and their potential usefulness in inflammatory bowel disease. *Phytother Res* 29: 339-50
2. Mendoza Hernández JL, Lana Soto R, Díaz-Rubio M. 2007. Enfermedad Inflamatoria Intestinal In *Definiciones y manifestaciones clínicas generales*, ed. FG M. A. Gassull, J. Hinojosa y A. Obrador pp. 21-8. Madrid, España: Arán
3. Quera RP, Palma RC. 2008. Enfermedades inflamatorias intestinales: Colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn. *Rev. Med. Clin* 19: 331-41
4. Lee IA, Bae EA, Hyun YJ, Kim DH. 2010. Dextran sulfate sodium and 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid induce lipid peroxidation by the proliferation of intestinal gram-negative bacteria in mice. *J Inflamm (Lond)* 7: 7
5. Randhawa PK, Singh K, Singh N, Jaggi AS. 2014. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. *Korean J Physiol Pharmacol* 18: 279-88
6. Sepúlveda SE, Beltrán CJ, Peralta A, Rivas P, Rojas N, Figueroa C, Quera R, Hermoso MA. 2008. Enfermedad inflamatoria intestinal: Una mirada inmunológica. *Rev. Méd. Chile* 136: 367-75
7. Fakhoury M, Negrulj R, Mooranian A, Al-Salami H. 2014. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and treatments. *Journal of inflammation research* 7: 113-20
8. Calvo FH, Hinojosa JV. 2008. Enfermedad inflamatoria del tubo digestivo. Enfermedad de Crohn. *Medicine* 10: 275-83
9. Royero HAG. 2003. Enfermedad inflamatoria intestinal. *Revista Colombiana de Gastroenterología* 18: 24-41
10. Neuman MG, Nanau RM. 2012. Inflammatory bowel disease: role of diet, microbiota, life style. *Translational Research* 160: 29-44
11. de CUdNR. 2011. Colitis ulcerosa, síntomas y tratamientos. <http://www.cun.es/enfermedades-tratamientos/enfermedades/colitis-ulcerosa>.
12. Gil AH, Sambuelli A. 2009. Colitis ulcerosa. Aspectos generales y clínicos. *Cirugía Digestiva* 3: 1-16
13. Gomollón F, Garcia LS. 2007. Tratamiento general del brote de colitis ulcerosa. In *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*, ed. Arán, pp. 265-80. Madrid, España
14. Salomón R. 2007. Enfermedad inflamatoria del intestino: colitis ulcerativa. . *Gac Méd Caracas* 115
183-202
15. Loftus EV. 2004. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 126: 1504-17
16. Head KA, Jurenka JS. 2003. Inflammatory bowel disease part I: ulcerative colitis—pathophysiology and conventional and alternative treatment options. *Alternative medicine review*. 8: 247-83
17. Bosques-Padilla FJ, Sandoval-García ER, Martínez-Vázquez MA, Garza-González E, Maldonado-Garza HJ. 2011. Epidemiología y características clínicas de la colitis ulcerosa crónica idiopática en el noreste de México. *Revista de Gastroenterología de México* 76: 34-8
18. Salud Sd. 2016. Entre el 16 y 30 por ciento de la población mexicana padece colitis <https://www.gob.mx/salud/prensa/entre16y30porcientoделapoblacionmexicanapadececolitis?idiom=es>.

19. Valencia-Romero A. 2007. Enfermedad inflamatoria intestinal. Epidemiología y manifestaciones clínicas. *Revista de Gastroenterología de México* 72: 82-5
20. Kiesslich R, Fritsch J, Holtmann M, Koehler HH, Stolte M, Kanzler S, Nafe B, M. J, Galle PP, Neurath MF. 2003. Methylene blue-aided chromoendoscopy for the detection of intraepithelial neoplasia and colon cancer in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 124: 880-8
21. Eaden J, Abrams K, Ekbom A, Jackson E, Mayberry J. 2000 Colorectal cancer prevention in ulcerative colitis: a case-control study. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 14: 145-54
22. Espitia PYL. 2010. *Evaluación de la actividad antiinflamatoria de las plantas medicinales Critoniella acuminata y Salvia rubescens. En un modelo de colitis ulcerativa experimental.* Universidad Nacional de Colombia, Colombia, Bogotá
23. Hur SJ, Kang SH, Jung HS, Kim SC, Jeon HS, Kim IH, Lee JD. 2012. Review of natural products actions on cytokines in inflammatory bowel disease. *Nutr Res* 32: 801-16
24. Vélez-Castrillón S, Camargo JF, Correa PA, Anaya JM. 2004. Bases moleculares de la familia de la interleuquina-1. *Revista Colombiana de Reumatología* 11: 11-39
25. Rogler GMD, Andus TMD. 1998. Cytokines in Inflammatory Bowel Disease. *World J. Surg.* 22: 382-98
26. Martínez-Montiel M, Muñoz-Yagüe M. 2006. Tratamientos biológicos en la enfermedad inflamatoria crónica intestinal. *Rev Esp Enferm Dig* 98: 279-91
27. García MOH, N. PR, Flores SRM. 1998. Enzimas generadoras de especies reactivas del oxígeno: Mieloperoxidasa. *Rev Cubana Invest Biomed* 17: 190-7
28. Venereo JRG. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit* 31: 126-33
29. Kanenguiser P, Goyheneche B, Filinger E. 2003. Aminosalicilatos: Características de las Formulaciones Orales Utilizadas en el Tratamiento de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal. *Latin American Journal of Pharmacy* 22 255-60
30. Gomollón F, García-López S, Sicilia B, Gisbert JP, Hinojosa J. 2013. The GETECCU clinical guideline for the treatment of ulcerative colitis: A guideline created using grade methodology. *Gastroenterología y hepatología* 36: 1-46
31. Mateu PN, Peris MA. 2012. Tratamiento médico de la colitis ulcerosa. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada acreditado* 11: 275-83
32. Orozco AL, Carrillo JGP, Tovar CGG, Carrillo L, Mora MLQ, Vásquez SEG, Saavedra MAM. 2008. Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja *Apis mellifera* proveniente del estado de México. *Tecnología en marcha* 21: 49-55
33. Rivera YN. 2013. *Comparación de las propiedades biológicas del propóleo de diferentes estados de la República Mexicana.* Instituto Politécnico Nacional, México, D.F. 156 pp.
34. Oramas DJ, Rodríguez LI. 1999. La información científica y la medicina tradicional y natural. *Resumed* 12: 39-46
35. Tamayo C. 2006. Fitoterapia basada en la evidencia. *Revista de Fitoterapia* 6: 55-60
36. Schlaepfer L, Mendoza-Espinoza JA. 2010. Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 41: 18-27
37. Jiménez C. 2013. El papel de los productos naturales en el mercado farmacéutico actual. *In Anales de la Real Sociedad Española de Química.* 2: 134-41
38. Simone-Finstrom M, Spivak M. 2010. Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie* 41: 295-311
39. Sforcin JM, Bankova V. 2011. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol* 133: 253-60

40. Alves FBEM, Guzmán D, Figueroa J, Tello J, Scoaris D. 2011. Caracterización antimicrobiana y fisicoquímica de propóleos de *Apis mellifera* L.(Hymenoptera: Apidae) de la región andina colombiana. *Acta biol. Colomb* 16: 175-84
41. Gil M, Perelli A, Riloarbert A, Arias Y, Blumenthal E. 2012. Actividad bacteriostática y bactericida de la tintura de propóleos sobre bacterias enteropatógenas. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo* 16: 21-5
42. Silva JC, Rodrigues S, Feás X, Estevinho LM. 2012. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. *Food and Chemical Toxicology* 50: 1790-5
43. Lozina LA, Peichoto ME, Acosta OC, Granero GE. 2010. Estandarización y caracterización organoléptica y físico-química de 15 propóleos argentinos. *Lat. Am. J. Pharm* 29: 102-10
44. Peña RC. 2008. Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. *Ciencia e investigación agraria* 35: 17-26
45. Goncalves CC, Hernandez L, Bersani-Amado CA, Franco SL, Silva JF, Natali MR. 2013. Use of propolis hydroalcoholic extract to treat colitis experimentally induced in rats by 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic Acid. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013: 853976
46. Salatino A, Fernandes-Silva CC, Righi AA, Salatino ML. 2011. Propolis research and the chemistry of plant products. *Nat Prod Rep* 28: 925-36
47. Teixeira EW, Message D, Negri G, Salatino A, Stringheta PC. 2010. Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian propolis samples. *Evid Based Complement Alternat Med* 7: 307-15
48. Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. 2002 The immunology of mucosal models of inflammation. *Annual review of immunology* 20: 495-549
49. Perse M, Cerar A. 2012. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *J Biomed Biotechnol* 2012: 718617
50. Watanabe MA, Amarante MK, Conti BJ, Sforcin JM. 2011. Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. *J Pharm Pharmacol* 63: 1378-86
51. Pinzon LC, Uy MM, Sze KH, Wang M, Chu IK. 2011. Isolation and characterization of antimicrobial, anti-inflammatory and chemopreventive flavones from *Premna odorata* Blanco. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5: 2729-35
52. Ajayi BO, Adedara IA, Farombi EO. 2015. Pharmacological activity of 6-gingerol in dextran sulphate sodium-induced ulcerative colitis in BALB/c mice. *Phytother Res* 29: 566-72
53. Gulcin I, Bursal E, Sehitoglu MH, Bilsel M, Goren AC. 2010. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food Chem Toxicol* 48: 2227-38
54. Domínguez A. 1979. *Métodos de la Investigación Fitoquímica* Mexico: Limusa. 45-7 pp.
55. NOM-062-ZOO-1999 NOM. 1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF>.
56. Azuma YT, Nishiyama K, Matsuo Y, Kuwamura M, Morioka A, Nakajima H, Takeuchi T. 2010. PPARalpha contributes to colonic protection in mice with DSS-induced colitis. *Int Immunopharmacol* 10: 1261-7
57. Whittam CG, Williams AD, Williams CS. 2010. Murine Colitis modeling using Dextran Sulfate Sodium (DSS). *J Vis Exp*
58. Prophet E, Mills B, Arrington J, Sobin L. 1992. *Métodos Histotecnológicos*. Instituto de Patología de las fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América. *AFIP*: 15-57
59. Davaatseren M, Hwang JT, Park JH, Kim MS, Wang S, Sung MJ. 2013. Poly-gamma-glutamic acid attenuates angiogenesis and inflammation in experimental colitis. *Mediators Inflamm* 2013: 982383

60. Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic* 16: 144-58
61. Ramamoorthy PK, Bono A. 2007. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. *Journal of Engineering Science and Technology* 2: 70-80
62. Murillo FE. 2006. Actividad antioxidante<<in vitro>> de las bebidas de frutas. *Bebidas. Alfa Editores Técnicos. Junio/ Julio* 1: 20-7
63. Carballo-Villalobos AI, Gonzalez-Trujano ME, Lopez-Munoz FJ. 2014. Evidence of mechanism of action of anti-inflammatory/antinociceptive activities of acacetin. *Eur J Pain* 18: 396-405
64. Ahn MR, Kunimasa K, Kumazawa S, Nakayama T, Kaji K, Uto Y, Hori H, Nagasawa H, Ohta T. 2009. Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis. *Mol Nutr Food Res* 53: 643-51
65. Sun J, Huang Y, Sun G, Sun X, Qin M, Zhao D. 2012. [Study on in vitro antioxidant activity of flavonoids contained in Hebei balmy chrysanthemum and structure-activity relationship]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 37: 1958-62
66. Boussouar A, Barette C, Nadon R, Saint-Leger A, Broucqsault N, Ottaviani A, Firozhoossen A, Lu Y, Lafanechere L, Gilson E, Magdinier F, Ye J. 2013. Acacetin and chrysin, two polyphenolic compounds, alleviate telomeric position effect in human cells. *Mol Ther Nucleic Acids* 2: e116
67. Afsar T, Khan MR, Razak S, Ullah S, Mirza B. 2015. Antipyretic, anti-inflammatory and analgesic activity of *Acacia hydaspica* R. Parker and its phytochemical analysis. *BMC Complement Altern Med* 15: 136
68. Kalogeropoulos N, Konteles SJ, Troullidou E, Mourtzinou I, Karathanos VT. 2009. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry* 116: 452-61
69. Ahad A, Ganai AA, Mujeeb M, Siddiqui WA. 2014. Chrysin, an anti-inflammatory molecule, abrogates renal dysfunction in type 2 diabetic rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 279: 1-7
70. Kurek-Gorecka A, Rzepecka-Stojko A, Gorecki M, Stojko J, Sosada M, Swierczek-Zieba G. 2013. Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules* 19: 78-101
71. Catchpole O, Mitchell K, Bloor S, Davis P, Suddes A. 2015. Antiproliferative activity of New Zealand propolis and phenolic compounds vs human colorectal adenocarcinoma cells. *Fitoterapia* 106: 167-74
72. Rauf A, Khan R, Raza M, Khan H, Pervez S, De Feo V, Maione F, Mascolo N. 2015. Suppression of inflammatory response by chrysin, a flavone isolated from *Potentilla evestita* Th. Wolf. In silico predictive study on its mechanistic effect. *Fitoterapia* 103: 129-35
73. Lima B, Tapia A, Luna L, Fabani MP, Schmeda-Hirschmann G, Podio NS, Wunderlin DA, Feresin GE. 2009. Main flavonoids, DPPH activity, and metal content allow determination of the geographical origin of propolis from the Province of San Juan (Argentina). *J Agric Food Chem* 57: 2691-8
74. Sathiavelu J, Senapathy GJ, Devaraj R, Namasivayam N. 2009. Hepatoprotective effect of chrysin on prooxidant-antioxidant status during ethanol-induced toxicity in female albino rats. *J Pharm Pharmacol* 61: 809-17
75. Zunini MP, Rojas C, Depaula S, Elingold I, Alvareda EM, Casanova MB, Iribarne FR, Aguilera SM, Dubin M. 2010. Phenolic contents and antioxidant activity in Central-Southern Uruguayan propolis extracts. *Journal of the Chilean Chemical Society* 55

76. Pushpavalli G, Kalaiarasi P, Veeramani C, Pugalendi KV. 2010. Effect of chrysin on hepatoprotective and antioxidant status in D-galactosamine-induced hepatitis in rats. *Eur J Pharmacol* 631: 36-41
77. Fabris S, Bertelle M, Astafyeva O, Gregoris E, Zangrando R, Gambaro A, Pereira GPL, Stevanato R. *ApacproEaBpPP*, 4(1), 46. 2013. Antioxidant properties and chemical composition relationship of Europeans and Brazilians propolis. *Pharmacology y Pharmacy* 4: 46-51
78. Vargas-Sánchez RD, Torrescano-Urrutia GR, Mendoza-Wilson AM, Vallejo-Galland B, Acedo-Félix E, Sánchez-Escalante JJ, Sánchez-Escalante A. 2014. Mecanismos involucrados en la actividad antioxidante y antibacteriana del propóleos. *Biotecnía* 16: 32-7
79. Escandon RAV. 2013. *Efecto antibacteriano de Kaempferol y (-)- Epicatequina sobre Helicobacter pylori y Escherichia coli*. Universidad de Chile Santiago Chile 73 pp.
80. Lopez-Lazaro M. 2009. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini Rev Med Chem* 9: 31-59
81. Bodet C, La VD, Epifano F, Grenier D. 2008. Naringenin has anti-inflammatory properties in macrophage and ex vivo human whole-blood models. *J Periodontal Res* 43: 400-7
82. Tsai SJ, Huang CS, Mong MC, Kam WY, Huang HY, Yin MC. 2012. Anti-inflammatory and antifibrotic effects of naringenin in diabetic mice. *J Agric Food Chem* 60: 514-21
83. Pinho-Ribeiro FA, Zarpelon AC, Fattori V, Manchope MF, Mizokami SS, Casagrande R, Verri WA, Jr. 2016. Naringenin reduces inflammatory pain in mice. *Neuropharmacology* 105: 508-19
84. Cavia-Saiz M, Busto MD, Pilar-Izquierdo MC, Ortega N, Perez-Mateos M, Muniz P. 2010. Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: a comparative study. *J Sci Food Agric* 90: 1238-44
85. Turkkan B, Ozyurek M, Bener M, Guclu K, Apak R. 2012. Synthesis, characterization and antioxidant capacity of naringenin-oxime. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 85: 235-40
86. Nishimura Fde C, de Almeida AC, Ratti BA, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Ximenes VF, Silva Sde O. 2013. Antioxidant effects of quercetin and naringenin are associated with impaired neutrophil microbicidal activity. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013: 795916
87. Alam MA, Subhan N, Rahman MM, Uddin SJ, Reza HM, Sarker SD. 2014. Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action. *Adv Nutr* 5: 404-17
88. Ribeiro IA, Rocha J, Sepodes B, Mota-Filipe H, Ribeiro MH. 2008. Effect of naringin enzymatic hydrolysis towards naringenin on the anti-inflammatory activity of both compounds. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 52: 13-8
89. Jeon SM, Bok SH, Jang MK, Lee MK, Nam KT, Park YB, Rhee SJ, Choi MS. 2001. Antioxidative activity of naringin and lovastatin in high cholesterol-fed rabbits. *Life Sci* 69: 2855-66
90. Rasul A, Millimouno FM, Ali Eltayb W, Ali M, Li J, Li X. 2013. Pinocembrin: a novel natural compound with versatile pharmacological and biological activities. *Biomed Res Int* 2013: 379850
91. Lima Cavendish R, de Souza Santos J, Belo Neto R, Oliveira Paixao A, Valeria Oliveira J, Divino de Araujo E, Berretta ESAA, Maria Thomazzi S, Cordeiro Cardoso J, Zanardo Gomes M. 2015. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. *J Ethnopharmacol* 173: 127-33

92. Lan X, Wang W, Li Q, Wang J. 2016. The Natural Flavonoid Pinocembrin: Molecular Targets and Potential Therapeutic Applications. *Mol Neurobiol* 53: 1794-801
93. Stangaciu S. 1998. Composición y propiedades del propóleos. *Apiacta* 33: 71-7
94. Kaidama WM, Gacche RN. 2015. Anti-Inflammatory Activity of Quercetin in Acute and Chronic Phases of Inflammation in Guinea Pigs. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics* 3: 129-36
95. Gupta V, Mittal P, Bansal P, Khokra SL, Kaushik D. 2010. Pharmacological potential of *Matricaria recutita*-A review. . *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*. 2: 12-6
96. Kamatou GPP, Viljoen AM. 2010. A review of the application and pharmacological properties of α -bisabolol and α -bisabolol-rich oils. . *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 87: 1-7
97. Uno M, Kokuryo T, Yokoyama Y, Senga T, Nagino M. 2016. alpha-Bisabolol Inhibits Invasiveness and Motility in Pancreatic Cancer Through KISS1R Activation. *Anticancer Res* 36: 583-9
98. Corpas-Lopez V, Morillas-Marquez F, Navarro-Moll MC, Merino-Espinosa G, Diaz-Saez V, Martin-Sanchez J. 2015. (-)-alpha-Bisabolol, a Promising Oral Compound for the Treatment of Visceral Leishmaniasis. *J Nat Prod* 78: 1202-7
99. Wang LW, Su HJ, Day SH, Tsao LT, Yang SZ, Wang JP, Lin CN. 2005. New phenylpropane and anti-inflammatory diterpene derivatives from *Amentotaxus formosana*. *Planta Med* 71: 344-8
100. Rahman ZA, Soory M. 2006. Antioxidant effects of glutathione and IGF in a hyperglycaemic cell culture model of fibroblasts: some actions of advanced glycaemic end products (AGE) and nicotine. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 6: 279-86
101. Tuchinda P, Reutrakul V, Claeson P, Pongprayoon U, Sematong T, Santisuk T, Taylor WC. 2002. Anti-inflammatory cyclohexenyl chalcone derivatives in *Boesenbergia pandurata*. *Phytochemistry* 59: 169-73
102. Tan BC, Tan SK, Wong SM, Ata N, Rahman NA, Khalid N. 2015. Distribution of Flavonoids and Cyclohexenyl Chalcone Derivatives in Conventional Propagated and In Vitro-Derived Field-Grown *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015: 451870
103. Harvey KA, Walker CL, Xu Z, Whitley P, Pavlina TM, Hise M, Zaloga GP, Siddiqui RA. 2010. Oleic acid inhibits stearic acid-induced inhibition of cell growth and pro-inflammatory responses in human aortic endothelial cells. *J Lipid Res* 51: 3470-80
104. Soumura M, Kume S, Isshiki K, Takeda N, Araki S, Tanaka Y, Sugimoto T, Chin-Kanasaki M, Nishio Y, Haneda M, Koya D, Kashiwagi A, Maegawa H, Uzu T. 2010. Oleate and eicosapentaenoic acid attenuate palmitate-induced inflammation and apoptosis in renal proximal tubular cell. *Biochem Biophys Res Commun* 402: 265-71
105. Algieri F, Rodriguez-Nogales A, Rodriguez-Cabezas ME, Risco S, Ocete MA, Galvez J. 2015. Botanical Drugs as an Emerging Strategy in Inflammatory Bowel Disease: A Review. *Mediators Inflamm* 2015: 179616
106. Orsolich N, Knezevic AH, Sver L, Terzic S, Basic I. 2004. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *J Ethnopharmacol* 94: 307-15
107. Orsolich N, Sver L, Terzic S, Basic I. 2005. Peroral application of water-soluble derivative of propolis (WSDP) and its related polyphenolic compounds and their influence on immunological and antitumour activity. *Vet Res Commun* 29: 575-93

108. de Barros MP, Sousa JP, Bastos JK, de Andrade SF. 2007. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. *J Ethnopharmacol* 110: 567-71
109. Rodríguez-Canales M, Jiménez-Rivas R, Canales-Martínez MM, García-López AJ, Rivera-Yañez N, Nieto-Yañez O, Ledesma-Soto Y, Sánchez-Torres LE, Rodríguez-Sosa M, Terrazas LI, Rodríguez-Monroy MA. 2016. Protective Effect of *Amphipterygium adstringens* Extract on Dextran Sulphate Sodium-Induced Ulcerative Colitis in Mice. *Mediators Inflamm* 2016: 8543561
110. Porrás PM. 2006. *Inflamación intestinal y dismotilidad en un modelo experimental de enfermedad inflamatoria intestinal en la rata: Mecanismos de acción implicados en la ciclicidad y cronicidad* Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Veterinaria 150 pp.
111. Dou W, Zhang J, Ren G, Ding L, Sun A, Deng C, Wu X, Wei X, Mani S, Wang Z. 2014. Mangiferin attenuates the symptoms of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice via NF- κ B and MAPK signaling inactivation. *Int Immunopharmacol* 23: 170-8
112. Khayyal MT, El-Hazek RM, El-Ghazaly MA. 2015. Propolis aqueous extract preserves functional integrity of murine intestinal mucosa after exposure to ionizing radiation. *Environ Toxicol Pharmacol* 40: 901-6
113. Orsatti CL, Missima F, Pagliarone AC, Bachiega TF, Bufalo MC, Araujo JP, Jr., Sforcin JM. 2010. Propolis immunomodulatory action in vivo on Toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. *Phytother Res* 24: 1141-6
114. Orsatti CL, Missima F, Pagliarone AC, Sforcin JM. 2010. Th1/Th2 cytokines' expression and production by propolis-treated mice. *J Ethnopharmacol* 129: 314-8
115. Al-Fatimi M, Wurster M, Schroder G, Lindequist U. 2007. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. *J Ethnopharmacol* 111: 657-66
116. Su Q, He J, Wang Z, Lv L, Suo Y, Wang J, Zheng Z, Huo C, Li J. 2016. Intestinal anti-inflammatory effect of the rhizome extracts of *Menispermum dauricum* DC. on trinitrobenzene sulfonic acid induced ulcerative colitis in mice. *J Ethnopharmacol* 193: 12-20
117. Valenzuela-Barra G, Castro C, Figueroa C, Barriga A, Silva X, de Las Heras B, Hortelano S, Delporte C. 2015. Anti-inflammatory activity and phenolic profile of propolis from two locations in Region Metropolitana de Santiago, Chile. *J Ethnopharmacol* 168: 37-44
118. Calderon-Montano JM, Burgos-Moron E, Perez-Guerrero C, Lopez-Lazaro M. 2011. A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini Rev Med Chem* 11: 298-344
119. García-González MA, y Peña, A. S. . 1998. Óxido nítrico y enfermedad inflamatoria intestinal *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 90: 870-6
120. Park MY, Ji GE, Sung MK. 2012. Dietary kaempferol suppresses inflammation of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Dig Dis Sci* 57: 355-63
121. Suzuki T, Hara H. 2009. Quercetin enhances intestinal barrier function through the assembly of zonula [corrected] occludens-2, occludin, and claudin-1 and the expression of claudin-4 in Caco-2 cells. *J Nutr* 139: 965-74
122. Kim JA, Kim DK, Kang OH, Choi YA, Park HJ, Choi SC, Kim TH, Yun KJ, Nah YH, Lee YM. 2005. Inhibitory effect of luteolin on TNF- α -induced IL-8 production in human colon epithelial cells. *Int Immunopharmacol* 5: 209-17
123. Azuma T, Shigeshiro M, Kodama M, Tanabe S, Suzuki T. 2013. Supplemental naringenin prevents intestinal barrier defects and inflammation in colitic mice. *J Nutr* 143: 827-34

APÉNDICE 1

Técnica de maceración⁽⁵⁴⁾

El propóleo en greña se pesa y se limpia de todos los restos de hojas y animales muertos que pueda tener, después de esto se pesa de nuevo el propóleo limpio e introduce en un matraz Erlenmeyer, posteriormente se agrega la cantidad de solvente necesario (etanol), el cual debe cubrir y sobrepasar el propóleo, el recipiente es cubierto para evitar la evaporación del solvente.

El propóleo se deja reposar como mínimo 1 día y máximo 2 semanas, la extracción de los compuestos se ve reflejado en la coloración del líquido, entre más oscuro, mayor es el rendimiento del propóleo. Por último se realiza una destilación a presión reducida en un rotavapor para obtener el extracto libre del solvente. Una vez obtenido el extracto libre de solvente se pesa para saber el rendimiento.

APÉNDICE 2

Técnica histológica⁽⁵⁸⁾

a) Deshidratación

Sumergir el tejido en formol al 4 %, después pasar el tejido en alcohol etílico siguiendo el orden de la tabla.

No.	Porcentaje %	Tiempo de exposición (Horas)
1	70	2 h
2	80	2 h
3	90	2 h
4	100	1 h

b) Impregnación en solvente (aclaración)

Sumergir en butanol. Retirar el exceso de butanol antes de pasar a parafina.

No.	Butanol	Tiempo De Exposición (Horas)
5	I	1 h
6	II	1 h

c) Infiltración

No.	Parafina	Tiempo (Horas)
7	I	24 h
8	II	24 h

Formación de bloques de parafina

Se llena el molde con parafina de inclusión caliente, con una pinza calentada en el mechero se toma el tejido orientándolo con la parte distal del colon hacia la base del molde, se sumerge y cubre totalmente con parafina.

Cortes en el micrótopo

Preparar el baño de flotación antes de cortar (agua destilada + gelatina). Colocar la navaja en el micrótopo, ajustar el portabloques, el bloque se refrigera antes de colocarlo, evitando así que se caliente rápido con la fricción de la navaja. Rebajar el bloque hasta alcanzar el tejido, los cortes finales tienen un grosor de 5 micras, una vez obtenidos los cortes se colocan en un portaobjetos y se agrega alcohol al 50 % para extender el tejido. El corte se coloca en el baño de flotación para extender el tejido y se recuperan con el portaobjetos.

Tinción con Hematoxilina-Eosina

Colocar las muestras (portaobjetos) en canastillas y desparafinarlas en la estufa durante 3 horas aproximadamente, después someterlas al tren de alcoholes.

No.	Alcohol	Tiempo
1	Xilol I	5 minutos
2	Xilol II	10 minutos
3	Alcohol etílico 100%	10 lavados
4	Alcohol etílico 90 %	10 lavados
5	Alcohol etílico 80%	10 lavados
6	Alcohol etílico 70 %	10 lavados
7	Agua corriente	10 lavados
8	Hematoxilina	5 minutos
9	Agua corriente	10 lavados
10	alcohol ácido	1 lavado
11	Agua corriente	10 lavados
12	Carbonato de litio	Hasta que vire
13	Agua corriente	1 lavado
14	Alcohol etílico 100%	10 lavados
15	Eosina	7 minutos
16	Alcohol etílico 70%	10 lavados
17	Alcohol etílico 80%	10 lavados
18	Alcohol etílico 90%	10 lavados
19	Alcohol etílico 100%	10 lavados
20	Xilol I	10 lavados
21	Xilol II	Hasta que se monte

APÉNDICE 3

Determinación de la concentración de fenoles totales (CFT)⁽⁶⁰⁾.

La concentración de fenoles totales (CFT) se mide por espectrofotometría con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción, para ello el agente oxidante que se utiliza es el reactivo de Folin-Ciocalteu. El reactivo consiste en una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato (coloración amarilla), en el cual el molibdeno y el tungsteno se encuentran en estado de oxidación 6⁺. La reducción con ciertos agentes reductores genera la formación de molibdeno y tungsteno con un promedio de estado de oxidación entre 5⁺ y 6⁺, formando una solución azul.

Se prepara una curva de calibración con ácido gálico, el cual es una pequeña molécula que por su estabilidad y su estructura fenólica, presenta un grupo benceno unido a un grupo -OH. Se utiliza para evaluar la cuantificación de fenoles totales.

Se utiliza una solución estándar de ácido gálico de 0.2 mg/mL. A partir de esta solución se toman las alícuotas correspondientes para obtener las concentraciones seriadas de ácido gálico (0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.2 mg/mL), a cada una se le agrega el volumen correspondiente de agua destilada para obtener las concentraciones mencionadas a un volumen final de 1 mL.

Para el análisis de fenoles totales del extracto, se prepara una solución estándar (0.2 mg/mL), se toma una alícuota de 250 µL y se agrega 750 µL de agua destilada, para obtener un volumen final de 1 mL a una concentración de 0.05 mg/mL.

Se toma 1mL de cada una de las concentraciones (ácido gálico y extracto) y se transfiere a un tubo de ensayo con 7 mL de agua destilada a continuación se adiciona 500 µL de reactivo Folin-Ciocalteu. Después de cinco minutos se añade 1.5 mL de una solución Na₂CO₃ (200 g/L) y agua hasta completar un volumen de 10mL. Después de dos horas de reacción a temperatura ambiente se determina la absorbancia a 760nm. Cada concentración se determina por triplicado.

Finalmente se grafica la concentración contra la absorbancia para obtener la curva patrón de ácido gálico, se realiza un análisis de regresión lineal y se interpola la absorbancia de la muestra a evaluar. Los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico o bien en porcentaje.

Curva patrón

Tubo B (blanco)	[Ácido gálico] mg/mL	µL patrón	µL agua destilada	mL Agua destilada
1	0.00625	31	968.5	7
2	0.0125	62.5	937.5	7
3	0.025	125	875	7
4	0.05	250	750	7
5	0.1	500	500	7
6	0.2	1000	0	7
P (problema)	-	250	750	7

APÉNDICE 4**Cuantificación de flavonoides Totales⁽⁶¹⁾**

La concentración de flavonoides se mide por espectrofotometría utilizando cloruro de aluminio (AlCl_3). El catión de aluminio forma complejos estables con los flavonoides en metanol, produciendo en el análisis espectrofotométrico un desvío a longitudes de onda más largas y una intensificación de la absorción. Por lo tanto es posible determinar la cantidad de flavonoides, evitando la interferencia de otras sustancias fenólicas, en particular los ácidos fenólicos que invariablemente acompañan a los flavonoides en los tejidos vegetales. Esto se hace en un espectrofotómetro de 425nm utilizando cloruro de aluminio al 2 % en metanol. En estas condiciones, el complejo flavonoide-aluminio absorbe a una longitud de onda mucho mayor que el flavonoide sin presencia del agente complejante. Los ácidos fenólicos, incluidos los que forman complejos con AlCl_3 absorben longitudes de onda mucho más bajas evitando así la interferencia con las medidas de absorbencia.

Se prepara una curva de calibración con quercetina, que es un flavonol muy abundante en la naturaleza dentro del grupo de los flavonoide y destaca por su elevada actividad antioxidante, consiste de 3 anillos y 5 grupos hidroxilo. Se utiliza una solución estándar de quercetina (1mg/1mL), a partir de esta solución se toman las alícuotas correspondientes para las diferentes

concentraciones (1-100ppm, a cada una se le agrega el volumen correspondiente de metanol para alcanzar el volumen de 1 mL, posteriormente se adiciona a cada una 1 mL de la solución de AlCl_3 al 2% en metanol, para alcanzar el final de 2 mL.

Para el análisis de fenoles totales del extracto, se prepara una solución estándar de 0.2 mg/mL en 1 mL de metanol. A la cual se le adiciona 1 mL de la solución de AlCl_3 al 2% en metanol, para alcanzar un volumen final de 2 mL. El blanco se prepara con un 1 mL del extracto en solución más 1 de metanol sin AlCl_3 . El control negativo se prepara con 1mL de metanol más 1mL de la solución de AlCl_3 al 2% en metanol. Después de 10 minutos de reacción a temperatura ambiente se determina la absorbancia a 415 nm. Los resultados se expresan como equivalentes de quercetina/g de extracto.

MÉTODO DOWD:

El contenido de flavonoides totales se determina usando una curva patrón con quercetina (0-100 mg/L).

PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN STOCK:

1 mg de quercetina 1 mL de MeOH

Considerando que el volumen total de solución STOCK es 1785 μL , se emplearán 2 mg de quercetina en 2 mL de MeOH.

[] ppm	μL STOCK	μL MeOH	(AlCl_3) al 2% mL
1	3	2997	3
2	6	2994	3
3	9	2991	3
4	12	2988	3
5	15	2985	3
6	18	2982	3
7	21	2979	3
8	24	2976	3
9	27	2973	3
10	30	2970	3

20	60	2940	3
30	90	2910	3
40	120	2880	3
50	150	2850	3
60	180	2820	3
70	210	2790	3
80	240	2760	3
90	270	2730	3
100	300	2700	3
problema	3 mL	0	3

PREPARACIÓN DEL EXTRACTO EN SOLUCIÓN:

0.2 mg –1 mL de MeOH

X - 3mL de MeOH

X= 0.6 mg de extracto a probar en 3 mL de MeOH

Para el análisis de flavonoides totales del extracto se prepara 3 mL de cloruro de aluminio (AlCl_3) al 2% en metanol, se mezcla con 3 mL del extracto en solución a probar (0.2mg/mL).

La prueba se hace por triplicado.

PREPARACIÓN DEL BLANCO:

3 mL del extracto en solución con 3 mL de metanol sin (AlCl_3).

LECTURA:

Después de 10 minutos de reacción a temperatura ambiente se determina la absorbancia a 415 nm.

Los resultados se expresan como equivalentes de quercetina/g de extracto (eqQ/g).

APÉNDICE 5**Actividad antioxidante. Método de reducción del radical 2.2-Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH) ⁽⁶²⁾**

La actividad antioxidante se evalúa midiendo el grado de decoloración (desvanecimiento del color violeta intenso a amarillo claro), de una solución metanólica de 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) por la adición del compuesto activo a diferentes concentraciones (2-30 ppm), por medio de espectrometría visible (VIS).

Método

Se prepara un stock del extracto con 5mg de muestra en 5ml de MeOH

Las concentraciones del extracto o fracción a probar son 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ppm. Las cuales se preparan siguiendo la tabla.

Del stock (5mg de muestra en 5mL) tomar 10 µL y disolverlos en 90 µL de MeOH

[] ppm	µL stock	µ MeOH
1	10	990
2	20	980
3	30	970
4	40	960
5	50	950

Del stock (5mg de muestra en 5mL)

6	6	994
7	7	993
8	8	992
9	9	991
10	10	990
20	20	980
30	30	970
40	40	960
50	50	950
60	60	940

70	70	930
80	80	920
90	90	910
100	100	900

Aplicación de extractos: En la placa de ELISA se adiciona 50µL de la solución problema a diferentes concentraciones (2-30ppm) por triplicado, el solvente utilizado es metanol grado HPLC. Posteriormente a cada pozo con las concentraciones señaladas, se adiciona 150 µL de una solución metanólica de DPPH cuya concentración final es de 100 µM; inmediatamente se protege de la luz y se mantiene en agitación constante durante 30 min a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo se determina la absorbancia a 540 nm en un lector de ELISA.

Blanco: pozos con 200µL de metanol

Control positivo: Se utiliza quercetina a las mismas concentraciones que el compuesto problema.

Interpretación de resultados: se reporta obteniendo el porcentaje de reducción y se calcula con la siguiente formula:

% de reducción= $(C-E/C)*100$ En donde: C= Abs del DPPH + metanol

E= Abs del experimental (Mezcla DPPH+ compuesto problema).