



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA  
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN  
PRODUCTOS NATURALES

**“Evaluación de la actividad gastroprotectora  
del extracto etanólico de un propóleo de  
México”**

**TESIS**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGO**

PRESENTA:

**Valentin Vanegas Saúl Ibran**

DIRECTOR DE TESIS:

**DR. MARCO AURELIO RODRÍGUEZ MONROY**



Los Reyes Iztacala, Edo. de México, Febrero, 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



## **Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México**

### **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, la cual me brindó todo lo necesario para la realización de este proyecto y mi formación profesional.

Al Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy, quien me abrió las puertas del laboratorio de Inmunobiología y me apoyó en todo momento para la realización de esta tesis.

Al Dr. Oscar de Jesús Nieto Yáñez y la bióloga Pilar Verano Domínguez, por las enseñanzas de ambos, consejos, paciencia, ayuda y compromiso demostrado a lo largo de este trabajo.

A la Dra. María Margarita Canales Martínez por su ayuda y apoyo durante el trabajo, su paciencia, consejos y compromiso con el proyecto.

Al Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés por sus opiniones, consejos, tiempo y ayuda con este proyecto.

A la Dra. Ana Bertha Hernández Hernández por su comprensión en este proyecto, su apoyo, consejos y opiniones.

A el LAE Guillermo Antonio Ruvalcaba Treviño y TLC Lucero Castañeda Cardona responsables de Apiarios del Colorado S. de RL de CV ubicado en el Ejido el Choropo, Baja California, México, por la aportación del propóleo para

la realización de este proyecto, sin su colaboración este proyecto no hubiera sido posible.

Este proyecto fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT). Proyecto IN210918.

## Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México

### Dedicatorias

Quisiera dedicar esta tesis principalmente a **mi familia**, los responsables de esta culminación, siempre apoyándome desde el momento en que decidí escoger esta carrera que sin duda alguna no cambiaría por nada y que volvería a elegir sin dudarlo, a mis primas favoritas **Diana** y **Adriana** para que anden peleando quien es la favorita y las únicas que me esperaban en la sala, mis perritas y principalmente para mí y mi esfuerzo.

**A mi madre**, no hay forma de describir algo que es tan evidente, porque toda persona que conoce a mi madre, sabe que de primera impresión es una madre excelente, comprometida, amable, tan comprensible y siempre de buen humor, cuantas veces no escuché decir ojalá mi madre fuera como la tuya, y es por eso y más que en este momento de mi vida, quiero dedicarte principalmente a ti este trabajo, porque siempre me apoyaste, me viste llegar tarde y cansado, no dormir, levantarme sin ganas e ir, sufrir por un examen, preocuparme, pero también me viste gozar la carrera, disfrutar cada salida de campo, mis avances, darme la oportunidad siempre de elegir mi próximo movimiento, siempre apoyándome. Quiero agradecerte todo y decirte que pronto será el momento de empezar a regresarte un poco de lo mucho que me has dado, te amo querida madre.

**A mi padre y hermanos**, la otra parte de mi motivación, mi padre una persona ejemplar, siempre correcta y responsable, me enseñó el valor de ser honestos y seguir adelante a pesar de las limitaciones que uno pudiera tener, pero mostrándome un apoyo incondicional para que nunca me faltara nada y todo ese esfuerzo ha resultado, quisiera agradecerte por todo no solo en la carrera, sino desde mis primeros años de escolaridad, muchas gracias papá. Mis hermanos a pesar de siempre mostrar diferencias y en ocasiones no parecer hermanos, siempre ha habido un cariño enorme, un afecto y una preocupación uno por el otro porque siempre les deseo lo mejor **Alejandro**

y **Oscar**, gracias por todos los favores durante la carrera y el apoyo, gracias a todos.

A mis compañeros de la carrera, los primeros en conocer y siempre estando ahí para lo que se necesite, **Oscar, Carlos, Pepe, Mario**, los pachucos, sin duda grandes amigos, todos culminando esta etapa de nuestra vida, gracias por estar siempre en las buenas, muy buenas, los favores, los consejos, las opiniones, las fiestas, las salidas y todo lo que involucra, también por las malas, esos exámenes, proyectos, echarnos la mano y burla también jajaja.

Al resto de mis compañeros de la carrera que también fueron importantes para mí, **Mafercita, Tony, Coco, Sara, Ángeles, Lalo, Jprro, Erik, Alex, Armando, Samara, Alma** también sin duda al trio que nunca se separaba, **Coyote, Edith** y **Shari** gracias a cada uno por todos los momentos, porque a algunos los conocí literalmente el primer día de clases, algunos el tercer día y otros más durante la carrera, porque supimos encontrar una combinación muy buena entre lo que es el estudio, las tareas, exámenes, proyectos y las salidas, fiestas y diversión, además de siempre ayudarnos en situaciones diferentes pero siempre apoyo, gracias amigos.

A mis amigos de toda la vida, aquellos que pasan los años y no dejan de ser importantes en mi vida, me vieron crecer, entrar a la UNAM y ahora me verán titularme, **David, Chinin** y **Cokis**, a pesar de que cada uno de ustedes ya tiene cosas muy claras respecto a su vida, siguen presentes en los momentos importantes, me da gusto que pase el tiempo y no dejemos de hacer tonterías, les agradezco todo el tiempo, apoyo y comprensión por las ocasiones en que no salía por tener tarea, examen o algún proyecto pero que a la siguiente semana sin pedos estaba ahí, gracias amigos.

## **Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México**

A ustedes tres por ser especiales e importantes para mí, **Sara, Cryzelle** y **Evelin** las tres han sido de gran apoyo para mí, durante mucho tiempo, años prácticamente de muy buena amistad, tiempo, apoyo, diversión, comprensión y buenos ratos, muchas gracias por estar al pendiente y ayudarme cuando les llegué a requerir, a pesar del tiempo espero sigan cerca de mí, las quiero.

Los últimos en conocer, pero no por eso menos importantes, los chicos del laboratorio, sino mal recuerdo bastó dos semanas para ya tener una buena comunicación tal vez un poco tímido en un principio, pero ahí encontré a grandes amigos, la primera en conocer **Pilar**, mi maestra y compañera, muchas gracias por todos los consejos, haberme mostrado todo lo que había en el laboratorio, técnicas, trucos, paciencia, aguantarme no debe ser nada fácil, gracias por todo María. Al **sensei Oscar**, no solo como compañero sino como uno de mis asesores, también como amigo, siempre honesto, dispuesto a ayudar y sin duda alguna siempre brillante, muchas gracias. **Nelly**, me dio mucho gusto poder coincidir contigo durante mi desarrollo, eres una excelente persona y siempre que lo necesité dispuesta a ayudarme, muchas gracias por ello y por último **Alonso** por tu ayuda, consejos, paciencia y apoyo para la realización de los trabajos en conjunto, siempre en la mejor disposición para realizar los trabajos y con excelentes tips, muchas gracias.

**Gus, Mario, Dany, Tavo, Alma, Judith** y **Less** personas que rápidamente me cayeron muy bien, buenos amigos y compañeros de laboratorio, quisiera agradecerles a todos su paciencia, ayuda en los momentos que la haya requerido y sus buenos y sabios consejos, además de ese gusto exquisito que tienen por la comida y siempre hacer compañía para desayunar chilaquiles, unos tacos o echarnos una gordita, sé que vendrán más momentos, pero hasta el momento gracias a todos por su presencia.



Los más viejos del laboratorio **Fany** y **Don Ru** ambos demostraron que a pesar de la edad y a su manera pueden ser personas muy amables, tal vez muy serios al principio, pero nada que no se les quite con el tiempo, Fany la verdad siempre sentí confianza para contarte las cosas y eso lo aprecio mucho a pesar de que ya no estés diario, **Don Ru** usted siempre amable y dispuesto a ayudar, siempre con un útil consejo y con observaciones muy valiosas y que siempre fueron de ayuda, muchas gracias a ambos.

A la **Dra. Margarita Canales**, por abrirme las puertas de **Farmacognosia**, la facilidad para trabajar, la disponibilidad y toda esa amabilidad que la caracteriza, siempre con una sonrisa, viendo las cosas buenas en cada situación, pero nunca dejando el trabajo y esfuerzo, muchas gracias por todo profesora, usted sin lugar a duda es una excelente persona y le agradezco por todo para llegar a este momento.

A mis amigos y compañeros de Farma, a pesar de que creí que eran más serios, resultaron ser excelentes personas con las que siempre es agradable convivir, gracias a todos y cada uno, **Mary, Uriel, Jprro, Lalo, Brenda, Lucero, Yatziry, Paola, Hatziry**, la profesora **Karlita, Ana, Judith, Rebe** y obviamente **Samara**. Gracias por el apoyo, amistad, consejos y admirable trabajo que ejerce cada uno.

Para cerrar como se debe, al **Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy**, profesor, muchas gracias por todo el apoyo que usted me ha brindado, desde el primer día que hablé con usted me explicó todo lo que se trabajaba, me ofreció un proyecto en conjunto, el apoyo a realización de más trabajo, inclusive el ofrecimiento para usar el laboratorio para actividades escolares, la posibilidad de crecer, quiero agradecerle todo ese apoyo, un poco alejado de lo académico, también me brindó su confianza personal, consejos, juegos,

## **Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México**

chistes, conocer más sobre temas que no tenía conocimiento alguno, si en algún momento fui un padawan insolente profe, este el momento de decir que seguramente no lo hice a propósito, usted es una persona que admiro mucho así que le agradezco y espero haya sido agradable tenerme como alumno, por todo eso y mucho más, muchas gracias por abrirme las puertas del equipo de trabajo.

## Índice General

<b>Resumen .....</b>	<b>11</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>12</b>
<b>Antecedentes.....</b>	<b>29</b>
<b>Justificación.....</b>	<b>30</b>
<b>Planteamiento del problema .....</b>	<b>31</b>
<b>Hipótesis .....</b>	<b>31</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>32</b>
<b>Objetivo General .....</b>	<b>32</b>
<b>Objetivos particulares.....</b>	<b>32</b>
<b>Material y Método .....</b>	<b>32</b>
<b>Colecta del material.....</b>	<b>32</b>
<b>Obtención del extracto etanólico .....</b>	<b>32</b>
<b>Capacidad antioxidante .....</b>	<b>33</b>
<b>Concentración de fenoles totales (CFT).....</b>	<b>33</b>
<b>Cuantificación de flavonoides .....</b>	<b>33</b>
<b>Caracterización química .....</b>	<b>33</b>
<b>Actividad Antibacteriana .....</b>	<b>34</b>
<b>Actividad Anti-inflamatoria.....</b>	<b>34</b>
<b>Animales de laboratorio .....</b>	<b>35</b>
<b>Inducción de gastritis mediante indometacina.....</b>	<b>35</b>
<b>Administración del extracto de propóleo.....</b>	<b>35</b>
<b>Evaluación del área de lesión .....</b>	<b>36</b>
<b>Evaluación del índice de daño histológico.....</b>	<b>36</b>
<b>Evaluación de citocinas pro-inflamatorias.....</b>	<b>36</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>37</b>
<b>Colecta del propóleo .....</b>	<b>37</b>
<b>Rendimiento del extracto .....</b>	<b>37</b>
<b>Pruebas organolépticas.....</b>	<b>38</b>
<b>Capacidad antioxidante .....</b>	<b>38</b>
<b>Determinación de fenoles y flavonoides totales.....</b>	<b>39</b>
<b>Caracterización Química .....</b>	<b>39</b>
<b>Compuestos identificados por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).....</b>	<b>39</b>

## Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México

Compuestos identificados por GC-MS .....	43
<b>Actividad Antibacteriana .....</b>	<b>45</b>
<b>Actividad Anti-inflamatoria.....</b>	<b>47</b>
<b>Modelo de gastritis por Indometacina .....</b>	<b>49</b>
<b>Histología .....</b>	<b>51</b>
<b>Tinción de PAS.....</b>	<b>55</b>
<b>Citocinas pro-inflamatorias.....</b>	<b>57</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>60</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>67</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>68</b>
<b>Apéndices.....</b>	<b>79</b>
<b>Apéndice 1 .....</b>	<b>79</b>
Técnica de maceración .....	79
<b>Apéndice 2 .....</b>	<b>79</b>
Determinación de la concentración de fenoles totales (CFT) .....	79
<b>Apéndice 3 .....</b>	<b>81</b>
Cuantificación de flavonoides totales .....	81
<b>Apéndice 4 .....</b>	<b>83</b>
Capacidad antioxidante (DPPH) .....	83
<b>Apéndice 5 .....</b>	<b>85</b>
Técnica histológica.....	85
Tinción con Hematoxilina-Eosina.....	86
Tinción de Azul de Alcian .....	87
Tinción de P.A.S. o Reacción del Ácido Peryódico de Schiff .....	88

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Regiones y capas del estómago.....	16
<b>Figura 2.</b> Composición del estómago .....	17
<b>Figura 3.</b> Mecanismos de los AINEs.....	18
<b>Figura 4.</b> Cascada del ácido araquidónico metabolizado por COX-1 o COX-2 .....	20
<b>Figura 5.</b> Acciones de COX-1 y COX-2 .....	21
<b>Figura 6.</b> Omeprazol, principio activo en los inhibidores de protones.....	23
<b>Figura 7.</b> Composición general del propóleo .....	26
<b>Figura 8.</b> Principales metabolitos secundarios responsables de las principales actividades biológicas del propóleo.....	28
<b>Figura 9.</b> Rendimiento del extracto etanólico del propóleo de Mexicali .....	37

<b>Figura 10.</b> Cromatograma de HPLC correspondiente al EEPMe.....	40
<b>Figura 11.</b> Cromatografía de gases de la partición metanólica del EEPMe. ....	44
<b>Figura 12.</b> Halos de inhibición del EEPMe contra cuatro bacterias.....	47
<b>Figura 13.</b> Efecto anti-inflamatorio del EPPMe. Cortes histológicos de las orejas de ratón .....	48
<b>Figura 14.</b> Fotografías de los estómagos correspondientes a los grupos experimentales. ..	50
<b>Figura 15.</b> Daño macroscopico., área de lesión en los grupos experimentales .....	51
<b>Figura 16.</b> Microfotografías de estómago, tinción H-E.....	53
<b>Figura 17.</b> Índice de daño histológico de los grupos experimentales.....	54
<b>Figura 18.</b> Técnica de Schiff empleada en cortes histológicos de estómago. ....	56
<b>Figura 19.</b> Detección de TNF- $\alpha$ en suero y homogenizado mediante la técnica de ELISA	58
<b>Figura 20.</b> Detección de la citocina IL-1 $\beta$ en suero y homogenizado mediante la técnica de ELISA.....	59

## Índice de cuadros

<b>Cuadro 1.</b> Pruebas organolépticas del Propóleo crudo.....	38
<b>Cuadro 2.</b> Resultados de capacidad antioxidante, fenoles y flavonoides del EEPMe .....	39
<b>Cuadro 3.</b> Compuestos identificados en el cromatograma de HPLC .....	41
<b>Cuadro 4.</b> Actividades biomédicas presentes en los compuestos identificados mediante HPLC .....	42
<b>Cuadro 5.</b> Compuestos identificados en la partición metanólica. ....	45
<b>Cuadro 6.</b> Actividades biomédicas encontradas en los compuestos encontrados mediante GC-MS.....	45
<b>Cuadro 7.</b> Actividad antibacteriana del extracto de propóleo de Mexicali. ....	46

## **Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México**

### **Resumen**

La úlcera péptica (UP) es un padecimiento que se caracteriza por la inflamación y la pérdida de la barrera mucosa del estómago. Su sintomatología se basa en náuseas, dolor abdominal y reflujo, si no se atiende adecuadamente puede complicarse a perforación y sangrado estomacal. El tratamiento actual sólo se basa en reducir los síntomas y no en aliviar la lesión, además la mayoría de estos tratamientos ocasionan efectos secundarios, por lo cual en muchas regiones se ha estado recurriendo a la medicina tradicional, principalmente a los productos naturales derivados de plantas medicinales como lo es el propóleo. Por lo anterior mencionado se propuso al propóleo como un candidato para tratar y aliviar a la UP. El propóleo es una sustancia resinosa elaborada por las abejas, sus características dependen de la zona de colecta, el tipo de vegetación y la temporada de recolección. Se han identificado más de 300 sustancias como parte de su composición química, misma que está relacionada con diversas propiedades biomédicas como, antibacteriana, anti-inflamatoria, inmunomoduladora, antioxidante y cicatrizante. Las lesiones gástricas se realizaron mediante el modelo de lesión de úlcera inducido por indometacina usando ratones de 4-6 semanas CD1. Se observó que el propóleo disminuye considerablemente, el daño gástrico a nivel macroscópico, a nivel histológico mantuvo la arquitectura del estómago y evito la pérdida de las capas del estómago, a su vez, mantuvo en su lugar el moco básico esencial para la protección contra los jugos gástricos. También demostró tener actividad anti-inflamatoria mediante el modelo de edema auricular y a nivel de citocinas, no mostró diferencias respecto al grupo Omeprazol en citocinas proinflamatorias tales como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Además, se determinó por el método de reducción del radical DPPH la capacidad antioxidante, dicha capacidad fue buena. Esta actividad, está relacionada con la presencia de fenoles y de flavonoides. La composición química se determinó mediante HPLC y GC-MS, obteniendo como principales a pinocembrina, catequina, naringenina, crisina, catecol, éster metílico del ácido palmítico, chalcona pinostrobina, octadecanona, heptadecanona y eicosano, a los cuales se le pueden atribuir los efectos antes mencionados.

## Introducción

La gastritis es una enfermedad inflamatoria aguda o crónica de la mucosa gástrica, producida por factores exógenos y endógenos que provoca síntomas dispépticos atribuibles a la enfermedad y cuya existencia se sospecha clínicamente, se observa endoscópicamente y requiere confirmación histológica, cuando la gastritis no es tratada de forma adecuada, puede progresar y provocar una ulceración <sup>(1)</sup>.

La úlcera péptica (UP) es una de las dolencias humanas más comunes que afecta aproximadamente al 50% de la población mundial. La UP también conocida como úlcera estomacal, es una rotura en el revestimiento del estómago, la primera parte del intestino delgado, u ocasionalmente el esófago inferior, la mortalidad en pacientes con úlcera péptica y hemorragia es de 10% de los casos <sup>(2)</sup>.

La incidencia varía dependiendo de la edad, el género, la ubicación geográfica y se asocia con complicaciones severas, incluyendo hemorragias, perforaciones, obstrucción gastrointestinal y malignidad. Por lo tanto, esta condición clínica representa un problema de salud mundial debido a su alta morbilidad, mortalidad y pérdida económica <sup>(3)</sup>.

La prevalencia es mayor en países en vías de desarrollo, donde se estima en alrededor del 70% de la población, mientras que los países desarrollados muestran una proporción máxima del 40% debido al estilo de vida, esta tendencia va en aumento <sup>(2)</sup>.

En México, la frecuencia de pacientes con úlcera gástrica ha aumentado y se ha observado una disminución de la úlcera duodenal. La úlcera gástrica se presenta con mayor frecuencia en el sexo femenino, los pacientes suelen ser mayores de 60 años y generalmente se asocia a la ingesta de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) en más de 40% de los casos <sup>(4)</sup>.

El consumo de AINEs a largo plazo provoca erosiones y úlceras gástricas y duodenales. Aunque muchos de estos pacientes no tienen síntomas, presentan riesgo alto de desarrollar complicaciones severas, como sangrado y perforación del estómago. El riesgo anual de estas

## **Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México**

complicaciones severas es del 1% al 4% en el tratamiento crónico con AINEs, tales como la aspirina, ibuprofeno, indometacina, diclofenaco. Son más susceptibles de presentarlos los pacientes adultos mayores, del género femenino, con artritis reumatoide <sup>(5)</sup>.

La gastritis puede ser de dos tipos: aguda o crónica: la gastritis aguda comienza repentinamente y dura por un corto tiempo mientras que la gastritis crónica es de larga duración. Si la gastritis crónica no se trata, puede durar años o incluso toda la vida. Las causas más frecuentes de gastritis aguda son infecciosas. La infección aguda por *H. pylori* induce gastritis; sin embargo, la gastritis aguda provocada por esta causa no se ha estudiado de manera extensa. Se describe como un padecimiento de presentación súbita con dolor epigástrico, náusea y vómito. Si no se trata, el trastorno avanzará a gastritis crónica <sup>(6)</sup>.

Dentro de la gastritis aguda hay dos tipos: erosiva o infecciosa; la gastritis erosiva puede hacer que el revestimiento del estómago se desgaste: rupturas superficiales en el revestimiento del estómago o úlceras (llagas profundas en el revestimiento del estómago). La gastritis infecciosa causa inflamación en el revestimiento del estómago; sin embargo en este caso las úlceras y las erosiones no acompañan este tipo de gastritis.<sup>(7)</sup>

Existen tres tipos de gastritis crónica: bacteriana, química y autoinmune. La bacteriana es producida por la infección de *H. pylori* la cual es común, especialmente en los países en desarrollo, afecta a la producción de ácido del estómago, como resultado, se hace demasiado ácido, esto puede dañar el revestimiento y la pared del estómago <sup>(7)</sup>.

La química puede ser causada por anti-inflamatorios no esteroideos, un tipo de medicamentos de venta libre, la aspirina y el ibuprofeno son tipos comunes de AINEs. La ingesta de alcohol, así como por reacciones a estrés.

Por último, en la gastritis autoinmune, el sistema inmunitario ataca a las células sanas del revestimiento del estómago. El sistema inmune normalmente protege a las personas de la infección mediante la identificación y destrucción de bacterias, virus y otras sustancias extrañas potencialmente dañinas, las causas pueden incluir: la enfermedad de Crohn, que



causa inflamación e irritación de cualquier parte del tracto gastrointestinal (GI); sarcoidosis, una enfermedad que causa inflamación que no desaparece; la inflamación crónica hace que pequeños grupos de tejido anormal se formen en varios órganos del cuerpo. La enfermedad típicamente comienza en los pulmones, la piel y los ganglios linfáticos; infecciones con virus, parásitos, hongos y bacterias distintas, típicamente en personas con sistemas inmunológicos debilitados <sup>(7)</sup>.

Si la gastritis no ha sido tratada correctamente puede provocar una úlcera, la UP comprende las úlceras de localización tanto gástrica como duodenal. Las úlceras se definen como una rotura de la superficie de la mucosa mayor a 5 mm de tamaño, que en profundidad alcanza la submucosa. Las úlceras duodenales (UD) y las úlceras gástricas (UG) comparten muchos rasgos patógenos, diagnósticos y terapéuticos, aunque existen diversos factores que las diferencian <sup>(6)</sup>.

*H. pylori* y los AINEs son la causa de la mayor parte de las úlceras duodenales. En los pacientes con úlceras duodenales, se han descrito muchas alteraciones de la secreción ácida. Entre ellas, la secreción ácida media basal y nocturna se halla incrementada en los pacientes con úlceras duodenales en comparación con los pacientes sanos; sin embargo, el nivel de superposición entre los individuos con UD y los testigos es considerable. La causa de la alteración de este proceso secretor no está clara. En algunos pacientes con úlcera duodenal, se ha encontrado aumento de la velocidad del vaciamiento gástrico de líquidos, aunque no se trata de un dato constante; en todo caso, su cometido en la formación de la UD no está claro, si es que tiene alguno. La secreción de bicarbonato está notoriamente reducida en el bulbo duodenal de los enfermos con una UD activa en comparación con los pacientes sanos <sup>(6)</sup>.

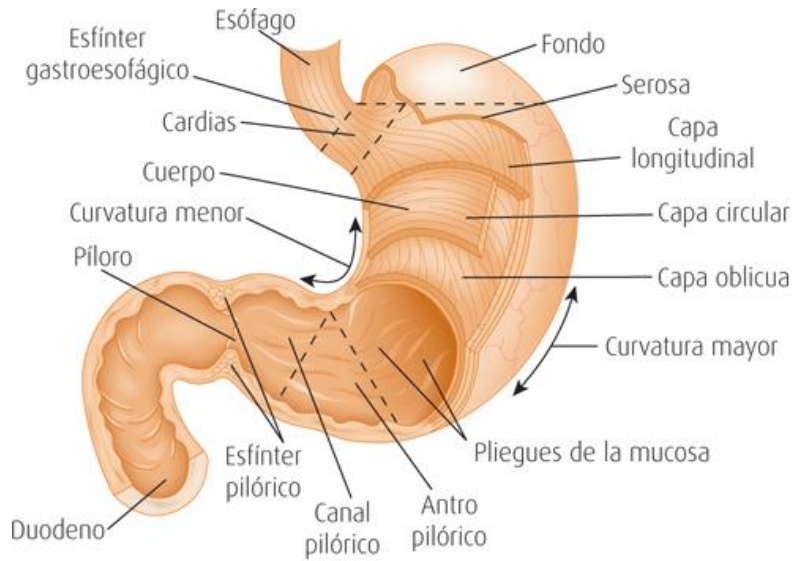
Las UG al igual que sucede en las UD, se pueden atribuir a una lesión de la mucosa inducida por AINEs. Las UG que aparecen en el área prepilórica o las del cuerpo relacionadas con úlcera duodenal o una cicatriz duodenal tienen patogenia similar a éstas. La secreción de ácido gástrico (basal y estimulada) tiende a ser normal o a estar disminuida en los pacientes con úlcera gástrica. Cuando ésta aparece en presencia de concentraciones mínimas de ácido, existe una alteración de los factores de defensa de la mucosa. Las úlceras gástricas se

## **Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México**

clasifican según su ubicación. Las tipo I aparecen en el cuerpo gástrico y tienden a acompañarse de una producción reducida de ácido gástrico; las tipo II aparecen en el antro y la cantidad de ácido gástrico es reducida o normal; las tipo III aparecen a 3 cm del píloro y suelen acompañarse de úlceras duodenales y una producción normal o excesiva de ácido gástrico; asimismo, las tipo IV aparecen en el cardias y se acompañan de hipo producción de ácido gástrico <sup>(6)</sup>.

El estómago es una región dilatada del tubo digestivo que está justo debajo del diafragma. Recibe el bolo de alimento macerado desde el esófago. Anatómicamente se divide en cuatro regiones (Figura 1), el cardias, rodea el orificio de desembocadura del esófago; el fundus o techo, se extiende por encima de un plano horizontal que atraviesa el orificio esofágico inferior; el cuerpo, está ubicado por debajo de este plano y la región pilórica o antro pilórica es la porción con forma de embudo que termina en el píloro. El estómago conserva en toda su extensión el mismo modelo estructural general que consiste en una mucosa, una submucosa, una muscular externa y una serosa <sup>(8)</sup>.

Desde el punto de vista histológico, el estómago se divide en tres regiones de acuerdo con el tipo de glándula que contiene cada una, la primera es la Región cardial (cardias), la parte cercana al orificio esofágico que contiene las glándulas cardiales, la segunda es la Región pilórica (antro), la parte proximal con respecto al esfínter pilórico que contiene las glándulas pilóricas o antrales y la última es la Región fúndica (fundus), la parte más grande del estómago que está situada entre el cardias y el antro pilórico y contiene las glándulas fúndicas o gástricas <sup>(8)</sup>.

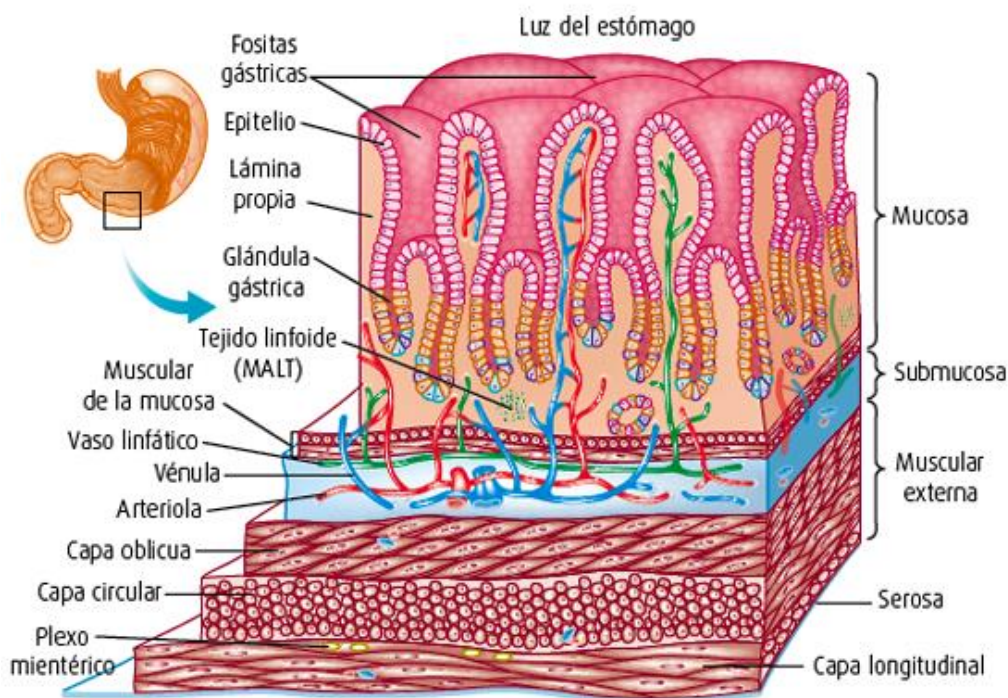


**Figura 1.** Regiones y capas del estómago (tomado de Texto Atlas de Histología. Biología celular y tisular, 2e) <sup>(9)</sup>.

La mucosa gástrica presenta una zona superficial (mucosa y submucosa) y otra profunda (muscular externa, serosa y capa longitudinal). La zona superficial consta de epitelio secretor de moco neutro, sufre invaginaciones en la lámina propia y constituye las fosillas, foveas y foveolas, que representan 25% del espesor de la mucosa del fondo y cuerpo y 50% del grosor del cardias y antro. La zona profunda, a nivel del fondo y el cuerpo, está formada por numerosas glándulas o túbulos rectos adosados, que se ponen en contacto con la capa muscular de la mucosa. El tercio más superficial de los túbulos está tapizado por células mucosas del cuello y por células parietales u oxínticas, productoras de ácido clorhídrico y factor intrínseco; el resto está revestido por células principales secretoras de pepsinógeno y algunas células parietales; también se identifican escasas células mucosecretoras y endocrinas (figura 2) <sup>(10)</sup>.

## Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México

A

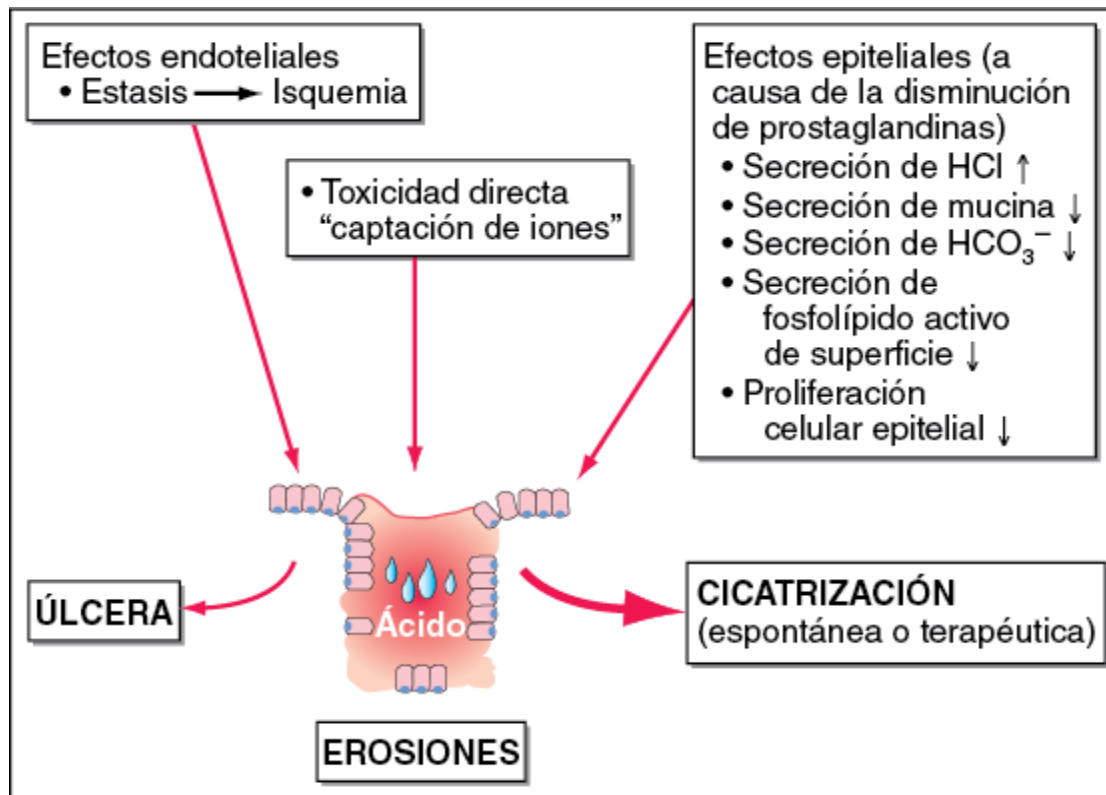


**Figura 2.** Composición del estómago, capas del estómago (tomado de Texto Atlas de Histología. Biología celular y tisular, 2e) <sup>(9)</sup>.

Durante la gastritis las células principales y parietales, normales en el fondo y cuerpo, están disminuidas en número o llegan incluso a desaparecer y son sustituidas por células indiferenciadas; además, se aprecia reducción en la cantidad de glándulas. La mucosa puede sufrir metaplasia intestinal y pseudopilórica; la primera consiste en la presencia de células caliciformes productoras de moco ácido, células de absorción o enterocitos, de Paneth, endocrinas y vellosidades semejantes a las de intestino delgado <sup>(10)</sup>.

El epitelio que reviste la superficie general de la mucosa del estómago y las fositas gástricas es simple cilíndrico. Las células cilíndricas reciben el nombre de células mucosas superficiales. Cada célula posee una gran dilatación apical llena de gránulos de mucinógeno y en su conjunto todo el epitelio forma una superficie secretora. En los cortes de rutina con hematoxilina y eosina (H-E) de manera característica aparece vacía porque el mucinógeno se pierde durante la fijación y la deshidratación. La secreción mucosa de las células mucosas superficiales se conoce como moco visible a causa de su aspecto turbio. Forma una gruesa

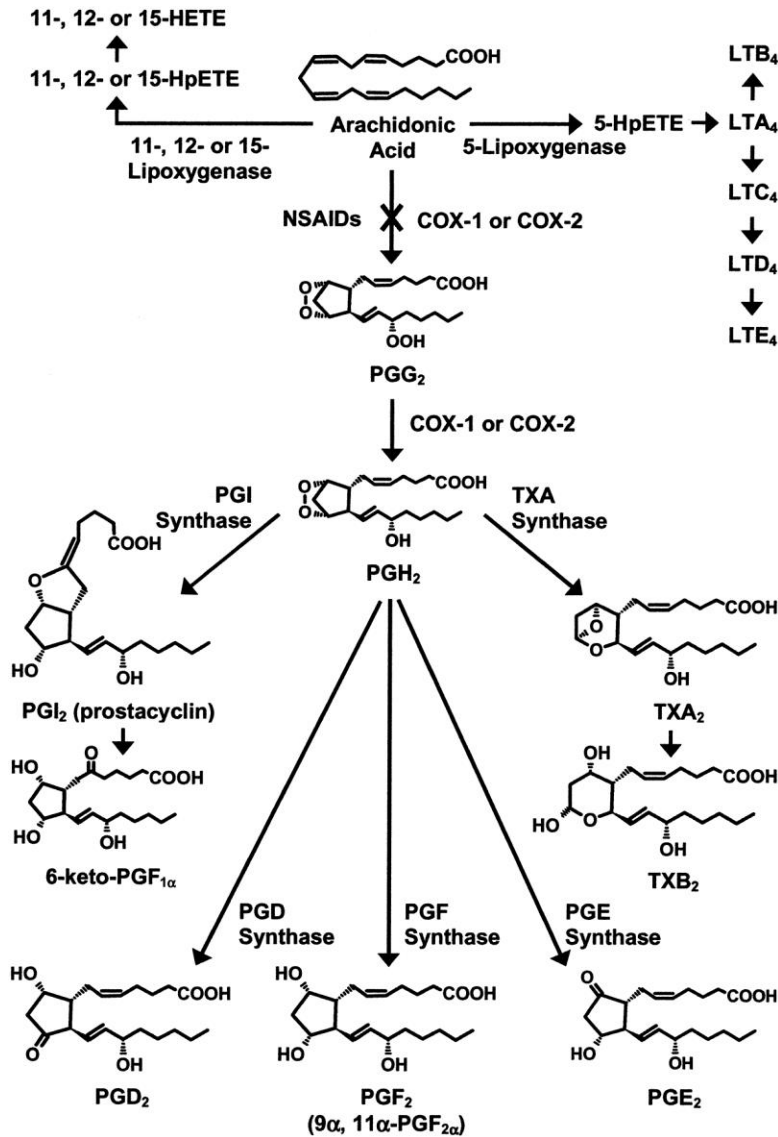
cubierta viscosa gelificada que se adhiere a la superficie epitelial y la protege contra la abrasión de los componentes más ásperos del quimo. Además, su concentración alta de bicarbonato y potasio protege el epitelio del contenido ácido del jugo gástrico. Por último, las prostaglandinas (PG) desempeñan un papel importante como protectoras de la mucosa gástrica. Estimulan la secreción de bicarbonato y aumentan el espesor de la capa de moco con vasodilatación asociada en la lámina propia. El revestimiento del estómago no cumple una función absorbente importante, no obstante, un poco de agua, sales y compuestos químicos liposolubles pueden absorberse a través de la mucosa gástrica; el alcohol y ciertos fármacos, por ejemplo, la aspirina y los AINEs, se introducen en la lámina propia mediante la lesión del epitelio superficial. Incluso dosis pequeñas de aspirina suprimen la producción de las prostaglandinas protectoras por la mucosa gástrica <sup>(8)</sup> (Figura 3).



**Figura 3.** Mecanismos por los cuales AINEs producen lesión en la mucosa (tomado de Harrison 18ª edición. Capítulo 293.p 2444) <sup>(11)</sup>.

## **Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México**

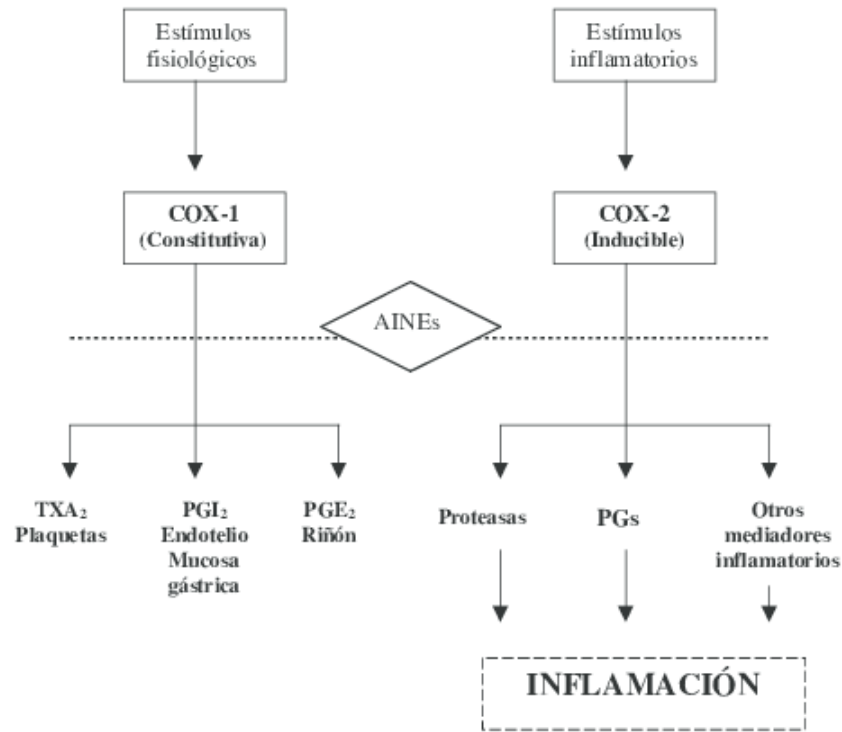
Las prostaglandinas contribuyen a conservar la integridad y la reparación de la mucosa gastroduodenal. Por tanto, si se interrumpe la síntesis de prostaglandinas, se alteran las defensas y la reconstrucción de la mucosa (figura 4), lo cual facilita la lesión de esta por medio de un mecanismo generalizado. Los estudios en animales han demostrado que la adherencia de los neutrófilos a la microcirculación gástrica contribuye de manera importante al principio de la lesión mucosa inducida por AINEs. La lesión de la mucosa es resultado del encuentro tópico con los AINEs. Muchos de estos últimos y el ácido acetilsalicílico son ácidos débiles que permanecen en una forma lipófila no ionizada en el ambiente gástrico. En estas circunstancias, los AINEs emigran a través de las membranas lipídicas de las células epiteliales, lesionando a la célula una vez que se atrapan dentro de la misma en forma ionizada. Asimismo, tales fármacos tópicos alteran la superficie mucosa, lo cual permite la retro difusión de H<sup>+</sup> y pepsina, con lo cual se daña aún más la célula epitelial. Además, las preparaciones amortiguadas o con capa entérica también tienen riesgo de producir úlceras pépticas <sup>(6)</sup>.



**Figura 4.** Cascada del ácido araquidónico metabolizado por COX-1 o COX-2 para la síntesis de prostaglandinas adaptado de The Coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2, Fitzgerald G. and Patrono. N Eng L Med. Vol 345, No 6, August 9 2001 <sup>(12)</sup>.

Los AINEs inhiben la actividad de la ciclooxygenasa 1 (COX-1) presente en diversos tejidos y que media las reacciones fisiológicas, y la ciclooxygenasa 2 (COX-2) presente en el tejido lesionado (figura 5). La inhibición de COX-2 media los efectos no deseados de la inflamación, pero la simultánea inhibición de COX-1 ocasiona efectos colaterales que son consecuencia de la disminución en la síntesis de prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos <sup>(13)</sup>.

## Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México



**Figura 5.** Acciones de COX-1 y COX-2 (adaptado de Vane JR. Nature 1994; 367: 215)  
(14).

El estímulo de la síntesis de la prostaglandina E2 (PGE2) está asociado a su vez a un incremento de la tasa de producción de dipalmitoilfosfatidilcolina (uno de los fosfolípidos más importantes del moco gástrico) aumenta consecuentemente el espesor de la capa del gel citoprotector. Esta mayor hidrofobicidad aumenta la capacidad de defensa de la barrera presente en la mucosa gástrica y duodenal, disminuyendo de esta manera la formación de úlceras gastroduodenales (15).

Otro proceso de regeneración podría estar relacionado con la liberación de péptido generador de calcitonina y óxido nítrico, que incrementan el flujo sanguíneo de la mucosa gástrica, favoreciendo la producción de moco y el efecto citoprotector (15).



Entre las medidas no farmacológicas para el control se recomienda el cese del tabaquismo y del consumo de alcohol, ya que ambos aumentan el estrés oxidativo de la mucosa, con lo que disminuye la velocidad de curación y aumentan la recurrencia, a lo que se añade que en el caso del humo del tabaco el agravamiento de la úlcera péptica es debido a la hiperemia en el margen de la lesión.

Por otra parte, se recomienda reducir el consumo de cafeína y controlar el estrés. Ya que esta estimula la secreción de ácido en el estómago, mientras que el abuso del alcohol y el aumento del estrés y la ansiedad puede aumentar el riesgo de favorecer la formación de úlceras y retardar su curación <sup>(16)</sup>.

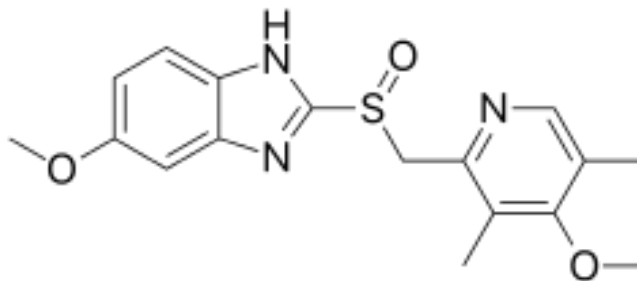
Dentro de los tratamientos farmacológicos se encuentran:

Los inhibidores de la bomba de protones (IBP) y los antagonistas de los receptores histaminérgicos tipo 2 representan el tratamiento de primera línea, los inhibidores de la bomba de protones son generalmente más efectivos que los antagonistas al receptor H<sub>2</sub>, ya que logran sus efectos en menor tiempo. También se emplean antiácidos, fundamentalmente después de las comidas y al acostarse <sup>(17)</sup>.

Inhibidores de la bomba de protones

Los inhibidores de la bomba de protones, son los medicamentos prescritos más frecuentemente (Omeprazol, genoprazol, pantoprazol, rabeprazol) usualmente se usa la dosis de 20 mg para el manejo de la enfermedad ácido-péptica, inhiben la secreción ácida mediante la inhibición irreversible de la H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasa, bomba de protones terminal de las células parietales, su principio activo se basa en el omeprazol (figura 6). Aunque la inhibición de la bomba de H<sup>+</sup> suprime la secreción ácida, el mecanismo gastroprotector de los IBP no se limita a ello, sino que involucra efectos antioxidantes, anti-inflamatorios y antiapoptóticos, con pronunciada efectividad sobre el daño inducido por los radicales •OH <sup>(18)</sup>.

## Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México



**Figura 6.** Omeprazol, principio activo en los inhibidores de protones.

En general, los IBP se consideran medicamentos bien tolerados, aunque suelen producir efectos adversos, dentro de los que se destacan el dolor de cabeza y diversos trastornos gastrointestinales (constipación, diarrea; flatulencia; dolor abdominal). Otras reacciones adversas vinculadas a su uso incluyen reacciones cutáneas diversas, ginecomastia; impotencia; aumento de peso, anemia hemolítica, vaginitis, entre otras <sup>(18)</sup>.

### Antagonistas al receptor histaminérgico H2 (AR-H2)

Los AR-H2 son inhibidores competitivos de los receptores H2 de las células parietales del estómago, bloqueando la acción de la histamina liberada por las células enterocromafines que estimulan la secreción ácida y reduciendo la de otras sustancias que promueven la secreción ácida, como la gastrina y la acetilcolina, lo que reduce la producción de ácido en esas células. Estos medicamentos han sido utilizados por más de 30 años en el tratamiento de la enfermedad ácido-péptica (gastritis, úlceras pépticas, reflujo, dispepsia no ulcerosa), siendo efectivos también en prevenir el daño gástrico por AINEs. A pesar de considerarse seguros pueden producir efectos adversos tales como: dolor de cabeza, cansancio, mareos y efectos gastrointestinales (diarrea, constipación, náuseas), entre los más frecuentes <sup>(18)</sup>.

### Agentes mucoprotectores

Las drogas mucoprotectoras incluyen los agonistas de prostaglandinas como el misoprostol y el sucralfato. La deficiencia de prostaglandinas de la mucosa desempeña un papel crucial en el daño gastroduodenal, especialmente en las úlceras por AINEs, aumentando la susceptibilidad a su formación. Ya que la inhibición de la síntesis de prostaglandinas es el principal mecanismo de los efectos anti-inflamatorios y de la toxicidad gastrointestinal de los

AINEs e involucra la reducción de mecanismos defensivos de la mucosa dependientes de prostaglandinas, como el flujo sanguíneo de la mucosa y la secreción de bicarbonato, es lógico que los agonistas de prostaglandinas prevengan el daño gastroduodenal por AINEs. Aunque la presencia de reacciones adversas como la diarrea y el dolor abdominal han limitado el uso de drogas mucoprotectoras <sup>(18)</sup>.

En vista de la incompleta erradicación lograda por el medicamento convencional aunada a los altos costos de estos medicamentos y los efectos secundarios provocados a los pacientes; se hace necesaria la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad <sup>(19)</sup>.

Por ello la Organización Mundial de la Salud (OMS) realiza esfuerzos por promover y desarrollar el uso racional de la medicina tradicional en todo el mundo, en muchos países se ha comprobado el aumento que hace la población del uso de esta medicina <sup>(20)</sup>.

El uso de terapias alternativas en países desarrollados es elevado. Informes indican que un 46% de los australianos, así como 49% de franceses y 70% de canadienses han utilizado alguna de esas terapias. En Alemania, uno de cada tres alemanes ha utilizado alguna terapia alternativa, siendo la acupuntura y la homeopatía las más empleadas. En países en ‘vías de desarrollo’, el uso de la medicina alternativa se considera aún mayor. La OMS parece celebrar que, en estos países, la mayoría de la población siga utilizando la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades sanitarias primarias. En uno de sus informes del año 2000 se indica que, en promedio, 80% de la población africana usó tal medicina; Etiopía es el país con mayor consumo (90%). En Sudamérica, se sabe que aproximadamente 70% de la población chilena y 40% de la población colombiana consumen medicina tradicional. En el caso peruano, un estudio ejecutado en un hospital de Lima de cuarto nivel encontró que cerca de 70% de pacientes utilizó alguna medicina tradicional. Una investigación realizada en los años 1980, en barrios marginales de Lima, encontró que 57% de los encuestados manifestaba una disposición favorable hacia la medicina tradicional <sup>(21)</sup>.

## **Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México**

La medicina tradicional representa una verdadera opción de salud para una gran parte de la población de México, en especial de las zonas rurales, que ha dado atención a personas que habitan en regiones donde el sistema de salud oficial no llega, o si llega es muy deficiente. Destaca la importancia de la medicina tradicional cuando se carece de una clínica o farmacias, cuando no cuentan con un doctor que atienda sus problemas de salud y, sobre todo, en casos de emergencias que surgen en las actividades cotidianas de su trabajo en el campo y sin los más elementales servicios públicos <sup>(22)</sup>.

Actualmente, más de la mitad de los medicamentos recetados en el mundo son sustancias naturales o bien preparados por modificación de ellos. Por otra parte, las plantas medicinales siguen siendo la base de los sistemas de salud de aproximadamente el 65% de la población mundial, como por ejemplo la medicina tradicional china y la ayurveda de la India <sup>(23)</sup>.

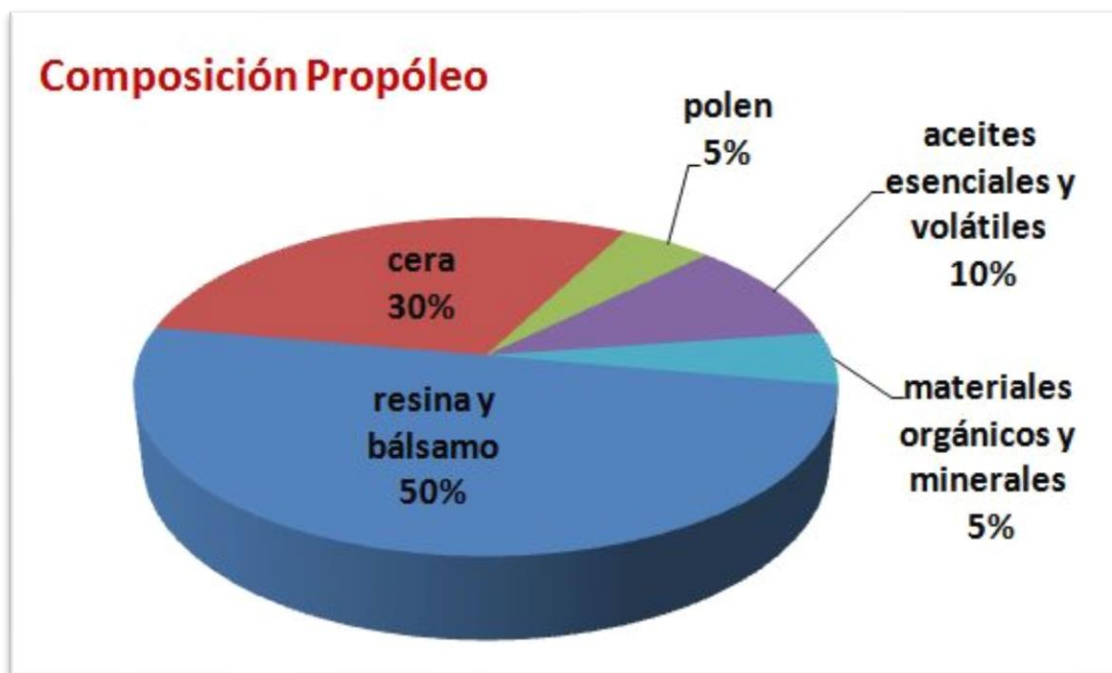
La importancia de los estudios etnofarmacológicos radica en la observación de que el primer fármaco eficaz contra la úlcera gástrica fue la carbenoxolona, descubierta como resultado de la investigación sobre una planta indígena *Glycyrrhiza glabra* <sup>(24)</sup>.

Dentro de los diferentes productos naturales, se ha reportado que el propóleo tiene múltiples propiedades biomédicas lo que ha originado que sea utilizado para aminorar o erradicar diferentes padecimientos.

El propóleo es un material recolectado y usado por las abejas en la construcción y mantenimiento de sus colmenas a partir de exudados y brotes de plantas y mezclado con cera y enzimas (1,3-glucosidasa) producida por las glándulas salivares de la abeja. Es una sustancia resinosa, balsámica, gomosa, de consistencia viscosa y color verde pardo, castaño o incluso negro, sabor acre, frecuentemente amargo y de olor agradable y dulce. La palabra propóleo (del griego pro = en defensa o para, y polis = ciudad) refleja su importancia para las abejas, ya que lo utilizan para suavizar las paredes internas, así como para proteger la colonia de enfermedades y cubrir cadáveres de intrusos que murieron dentro de la colmena evitando su descomposición. Su color y composición dependen en gran medida de su origen botánico y del tipo de abeja que lo produzca <sup>(25) (26)</sup>.

La composición exacta del propóleo puro varía de acuerdo con la región, planta proveedora de resina y especie de abeja recolectora, reflejando la diversidad biológica que este producto presenta. A pesar de las posibles diferencias de composición, la mayoría de las muestras de propóleos comparten considerable similitud en su naturaleza química general: 50% de resina, 30% de cera, 10% de aceites esenciales, 5% de polen y 5% de otros compuestos orgánicos (figura 7) <sup>(27)</sup>.

El propóleo tiene más de 300 compuestos diferentes identificados, tales como: ácidos alifáticos, ésteres, ácidos aromáticos, ácidos grasos, carbohidratos, aldehídos, aminoácidos, cetonas, chalconas, dihidrochalconas, terpenoides, vitaminas y sustancias inorgánicas, destacándose la presencia de compuestos bioactivos tales como ácido cinámico, compuestos fenólicos y flavonoides <sup>(27) (28)</sup>.



**Figura 7.** Composición general del propóleo.

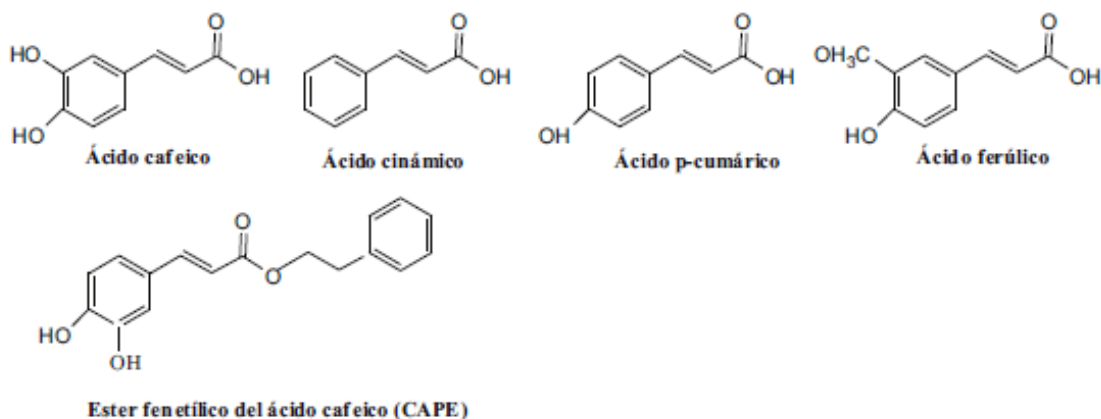
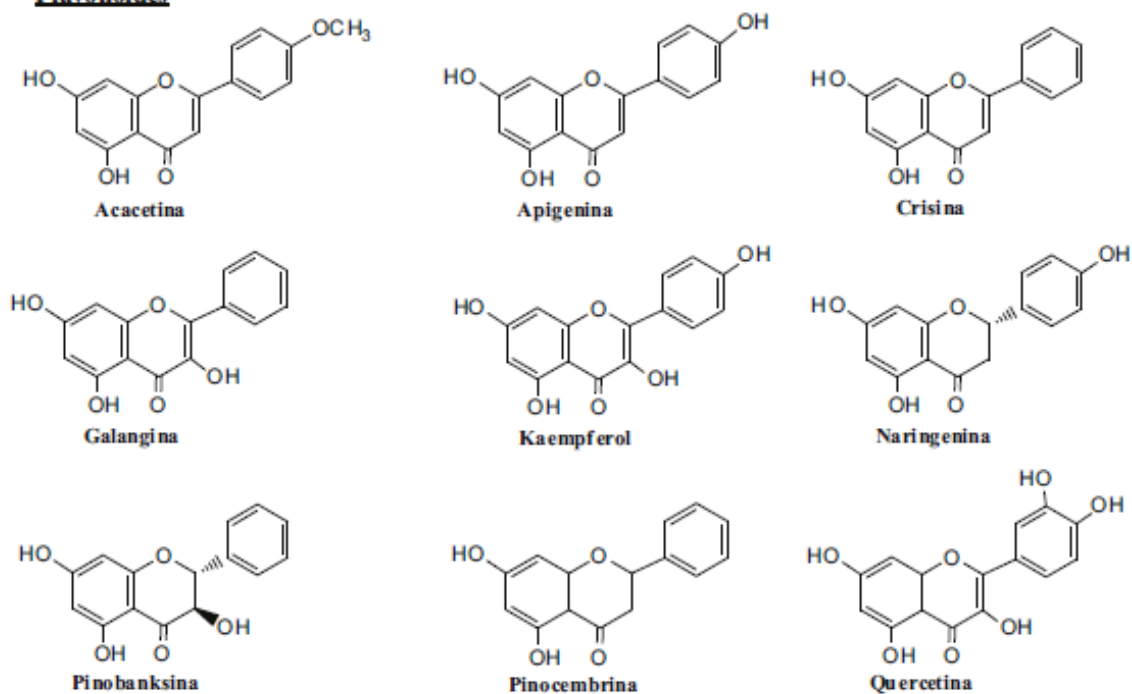
Desde la antigüedad se tiene reporte del uso de propóleo; los antiguos egipcios, griegos y romanos usaron propóleos para curar heridas, llagas y úlceras. En Egipto, uno de los

## **Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México**

ingredientes de la fórmula empleada para embalsamar cadáveres era el propóleo. También fue utilizado por Aristóteles, Dioscórides, Plinio, Galeno y los médicos árabes como un antiséptico y cicatrizante para los tratamientos de heridas. En el siglo XVII, el propóleo era una droga oficial en las farmacopeas de Londres. Más recientemente, el interés por las propiedades medicinales del propóleo ha aumentado, especialmente en Europa del Este <sup>(29)</sup>.

Entre sus diversas propiedades las más importantes que se han reportado son: anti-bacterianas, anti-virales, anti-tumorales, anti-inflamatorios, anti-cancerosos, inmunomoduladoras, anti-oxidantes y cicatrizantes <sup>(30)</sup>.

Las propiedades biológicas antes mencionadas en la mayoría de los estudios se atribuyen principalmente a los flavonoides: acetina, apigenina, crisina, galangina, kaempferol, naringenina, pinobanksina, pinocembrina y quercetina (Figura 8). Los flavonoides son compuestos que en su estructura química (básica) tienen un número variable de grupos hidroxilo fenólicos; además, poseen un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8 y los del anillo B desde el 2' al 6'. En función de sus características estructurales se pueden clasificar en: flavanos (poseen un grupo OH en posición 3 del anillo C), flavonoles (contienen un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo OH en posición 3 del anillo C), flavonas (tienen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3) y antocianidinas, las cuales tienen unido el grupo OH en posición 3 y un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C <sup>(31)</sup>.

**Ácidos fenólicos****Flavonoides**

**Figura 8.** Principales metabolitos secundarios responsables de las principales actividades biológicas del propóleo tomado de Vargas-Sánchez, 2014 mecanismos involucrados en la actividad antioxidante y antibacterianas de propóleos <sup>(31)</sup>.

Las propiedades antimicrobianas del propóleo parecen atribuibles principalmente a los flavonoides pinocebrina, galangina y pinobanksina. La pinocebrina también exhibe propiedades antifúngicas. Otros compuestos activos son éster de ácidos cumárico y cafeico. De los otros compuestos, los ácidos p-cumárico y diterpénico prenilados poseen actividades

## **Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México**

antibacterianas y citotóxicas. Los derivados del ácido cafeoilquínico muestran acciones inmunomoduladoras y hepatoprotectoras y lignanos de furofurano inhiben el crecimiento de algunas bacterias. El éster fenetílico del ácido cafeico (CAPE) es también citotóxico para las células tumorales <sup>(32)</sup>.

Las propiedades antioxidantes del propóleos son notables. Algunos compuestos antioxidantes identificados en el propóleo incluyen ácido ferúlico, quercetina y ácido cafeico <sup>(33)</sup>.

El propóleo también exhibe efectos anti-inflamatorios contra los modelos agudos y crónicos de inflamación (artritis inducida por formaldehído y adyuvante, edema de pata inducido por carragenina y PGE2, granuloma de paletas de algodón). El mecanismo exacto de las acciones anti-inflamatorias del propóleo aún no está claro. Entre los compuestos ensayados, sólo el CAPE y la galangina contribuyeron a la actividad anti-inflamatoria del propóleo; Sin embargo, la contribución del CAPE fue mayor <sup>(33)</sup>.

### **Antecedentes.**

Una de las propiedades funcionales del propóleo es su capacidad anti-ulcerosa. Varios estudios describen esta actividad en el propóleo y esta propiedad se ha atribuido a la presencia de compuestos fenólicos, particularmente los flavonoides. El mecanismo de acción de estos compuestos varía, los flavonoides aumentan el contenido de la mucosa de las prostaglandinas, lo que aumenta el efecto protector sobre la mucosa gástrica, evitando así la ulceración <sup>(34)</sup>.

En los últimos años los trabajos con propóleo han ido en aumento por sus propiedades biológicas y farmacológicas, entre los trabajos más representativos se encuentran:

En 2010 Gülçin y colaboradores determinaron las propiedades antioxidantes del extracto acuoso de propóleo de la provincia de Erzurum de Turquía y se correlacionaron los valores



con los niveles totales de compuestos polifenólicos, con el fin de estimar la capacidad para actuar como antioxidantes <sup>(30)</sup>.

Teixeira y colaboradores en 2010 determinaron los contenidos fenólicos totales, la actividad antioxidante y la composición química de muestras de propóleos de tres localidades de Brasil, quienes no observaron ninguna relación entre la actividad antioxidante de los tres propóleos con respecto al contenido fenólico total <sup>(35)</sup>.

Chi-Feng Liu y colaboradores en el 2002 administraron un extracto etanólico de propóleo previa a una inducción de gastritis mediante la administración de etanol absoluto, demostrando que el grupo tratado con extracto mostró una mejoría macroscópica en comparación con los grupos no tratados atribuyendo esta protección a la capacidad antioxidante del extracto etanólico de propóleo <sup>(36)</sup>.

En 2007 de Barros y colaboradores usaron un extracto crudo hidroalcohólico del propóleo verde brasileño a diferentes concentraciones frente a tres modelos de lesiones gástricas agudas por etanol, estrés e indometacina demostrando que el extracto a concentraciones de 250 y 500 mg/kg protegen al estómago frente a la gastritis <sup>(37)</sup>.

Así mismo de Barros y colaboradores en 2008 probaron los principales compuestos encontrados en el propóleo verde brasileño frente a tres modelos de gastritis los cuales fueron los modelos de AINEs, etanol y estrés <sup>(38)</sup>.

En 2007 Lemos y colaboradores usaron la principal fuente botánica del propóleo verde de Brasil como una alternativa contra la úlcera gástrica, demostrando que disminuye el volumen de jugo gástrico y acidez total <sup>(39)</sup>.

## **Justificación**

La medicina ha avanzado mucho en los últimos años, produciendo medicamentos para las enfermedades más cotidianas, sin embargo, actualmente el uso indiscriminado de anti-

## **Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México**

inflamatorios ha aumentado los casos de gastritis, úlceras gástricas u otro tipo de lesión gástrica, lo que ha generado que se busquen alternativas para el tratamiento de estas enfermedades.

En los últimos años la medicina se ha vuelto a enfocar en alternativas naturales, una de ellas es el propóleo el cual ha demostrado tener propiedades biológicas: anti-bacterianas, anti-tumorales, anti-inflamatorias, antioxidantes y cicatrizantes, importantes para el humano, en México se cuenta con una gran variedad de propóleos, muchos de ellos aún son carentes de información o de estudios que avalen sus propiedades.

En la actualidad no se tienen registros de propóleos de Mexicali que demuestren sus efectos gastroprotectores, por eso es importante realizar estudios acerca de las propiedades, sentar las bases para un estudio más completo y búsqueda de una alternativa viable para estas enfermedades.

### **Planteamiento del problema**

La gastritis es una enfermedad inflamatoria de la mucosa gástrica que depende de varios factores, el propóleo, ha demostrado poseer actividades biológicas de interés médico, además de que no existe información suficiente sobre las actividades de los propóleos mexicanos, en este trabajo se pretende saber si ¿el propóleo de Mexicali puede ser una buena alternativa para el tratamiento de la gastritis?

### **Hipótesis**

Si las úlceras gástricas conllevan procesos inflamatorios, de irritación y destrucción del tejido y si el propóleo ha demostrado tener propiedades biológicas como anti-oxidantes, anti-bacterianas y anti-inflamatorias, entonces se espera que el propóleo de Mexicali presente efecto gastroprotector.

## Objetivos

### Objetivo General

Evaluar el efecto gastroprotector del extracto etanólico de un propóleo de México.

### Objetivos particulares

- Evaluar la capacidad antioxidante del extracto y su contenido de fenoles y flavonoides.
- Determinar la composición química del extracto (HPLC, GC-MS).
- Determinar la capacidad antibacteriana del extracto etanólico del propóleo de Mexicali, Baja California.
- Evaluar la actividad anti-inflamatoria por el modelo de edema auricular y cuantificación de citocinas proinflamatorias.
- Evaluar el efecto macro y microscópico de diferentes concentraciones de propóleo en el modelo de úlcera gástrica

## Material y Método

### Colecta del material

El material fue colectado del apiario del Colorado S de RL de CV ubicado en Mexicali, en el estado de Baja California, México con las siguientes coordenadas 32°30'05.7"N 115°24'34.9"O, durante el mes de diciembre en el año 2017.

### Obtención del extracto etanólico

El extracto de propóleo de Mexicali se obtuvo por el método de maceración<sup>(40)</sup> (Apéndice 1). Se pesó el propóleo seco, después de haber sido limpiado de impurezas e insectos, el propóleo fue colocado en un matraz Erlenmeyer junto con 500 mL de etanol al 96% para

## **Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México**

obtener el extracto etanólico crudo, posteriormente fue filtrado para ser destilado en un rotavapor.

### **Capacidad antioxidante**

Se determinó la capacidad antioxidante mediante el método de reducción del radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH) y se realizó la lectura de la absorbancia a 540 nm (apéndice 4) método modificado de Murillo en 2006 <sup>(43)</sup>, para obtener la capacidad antioxidante media (CA<sub>50</sub>) del propóleo de Mexicali.

### **Concentración de fenoles totales (CFT)**

Se evaluó la concentración de fenoles totales (CFT) por espectrofotometría (Apéndice 2), con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción, por medio del reactivo de Folin-Ciocalteu. El estándar de referencia fue el ácido gálico, por su estabilidad y estructura fenólica. Las muestras se prepararon con una solución estándar (0.2 mg/mL). El ensayo se realizó por triplicado, se determinó la absorbancia a 760 nm <sup>(41)</sup>. Los resultados fueron expresados en mg equivalentes de ácido gálico por g de extracto (mg eqAG/g extracto).

### **Cuantificación de flavonoides**

Se realizó la cuantificación de flavonoides con base en la técnica descrita por Ramamoorthy 2007 <sup>(42)</sup> (Apéndice 3); para ello, se empleó una curva patrón de quercetina (0-100 mg/L) y AlCl<sub>3</sub> se determinó la absorbancia a 425 nm. Los resultados fueron expresados en µg equivalentes de quercetina por g de extracto (µg eqQ/g extracto).

### **Caracterización química**

Se realizó una caracterización química por medio de un análisis con una Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), con las siguientes condiciones: columna Discovery C-18, con las siguientes características: 250×4.6 mm con un tamaño de partícula 5 µm, se corrió de forma isocrática con una mezcla de MeOH-acetonitrilo-agua (25-25-50), acidulada al 1% con

ácido fórmico, con un flujo de 1 mL/min y con un detector de arreglo de diodos (DAD) a una longitud de onda de 260nm y realizando un barrido completo de 200-400 nm. Así como una Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS). Se empleó 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.

### Actividad Antibacteriana

La actividad antibacteriana se evaluó mediante el método de difusión en agar de Kirby-Baüer<sup>(44)</sup>. Los sensidiscos fueron impregnados con 4, 8 y 16 mg del extracto obtenido. Como control positivo se utilizaron sensidiscos impregnados con 25 µg de cloranfenicol; como controles negativos los sensidiscos fueron impregnados con 10 µL del solvente respectivo para evitar errores. Se utilizaron cajas de agar Müller Hinton, todos los bioensayos se realizaron por triplicado<sup>(44)</sup>.

La actividad antibacteriana fue evaluada mediante la utilización de los siguientes microorganismos:

- *Staphylococcus aureus* donada por el laboratorio de Análisis Clínicos, FES Iztacala.
- *Pseudomonas aeruginosa* CDBB-B-999, comprada en el cepario del CINVESTAV.
- *Enterobacter aerogenes* donadas por la FES Cuautitlán.
- *Escherichia coli* donada por el laboratorio de Análisis Clínicos, FES Iztacala caso clínico 1.

### Actividad Anti-inflamatoria

Se provocó un edema auricular por Activador Tisular Plasminógeno (TPA). Se indujo de acuerdo con el método modificado de De Young<sup>(45)</sup>. En éste, una solución de 13-acetato-12-O-tetradecanoilforbol (2,5 µg) disuelto en acetona (20 µL) se aplicó tópicamente sobre la superficie interna y externa de la oreja derecha de los ratones de la cepa CD-1 machos de 4 semanas (10 µL/lado) para provocar la inflamación. Las concentraciones de propóleo (100, 200 y 300 mg/kg) fueron disueltas en agua con alcohol en proporción 9:1 para la administración oral al igual que la indometacina (0.5 mg) media hora posterior a la administración del TPA. Trascorridas cuatro horas desde la administración del agente

## **Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México**

irritante, los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se tomaron secciones circulares (5 mm de diámetro) de ambas orejas del animal (tratada y no tratada), las cuales se procesaron para histología y determinar por diferencia de grosor en las orejas. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición frente al grupo control, utilizando la siguiente expresión:

### ***Porcentaje de Inhibición***

$$= \frac{\text{Edema (oreja izquierda)} - \text{Edema (oreja derecha)}}{\text{Edema (oreja izquierda)}} \times 100$$

### **Animales de laboratorio**

Se utilizaron 36 ratones *Mus musculus* de la cepa CD-1 machos de 4-6 semanas de edad, los cuales fueron proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Los animales estuvieron sometidos a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Estuvieron sometidos a condiciones de laboratorio con comida y agua *ad libitum*.

### **Inducción de gastritis mediante indometacina**

Los ratones CD-1 fueron sometidos a una única administración de indometacina mediante cánula en dosis ulcerogénica de 20 mg/kg, después de ocurridas seis horas, los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical para realizar la extracción de estómagos los cuales fueron abiertos y fijados al instante con formol para la posterior realización de las técnicas histológicas <sup>(46)</sup> (Apéndice 5).

### **Administración del extracto de propóleo**

Se formaron 6 grupos de 6 ratones con ayuno de 12 horas previas a la inducción de gastritis con acceso libre de agua, a los cuales se le administró propóleo a una concentración de 100 mg/kg, 200 mg/kg y 300 mg/kg, dos horas previas a la administración de indometacina 20 mg/kg mediante cánula. Respecto a los grupos controles, al grupo control positivo se le administró 20 mg/kg de Omeprazol, previo a la administración de indometacina, al grupo

control negativo se le administró únicamente indometacina, los grupos controles se mantuvieron en condiciones igualitarias a los demás grupos de experimentación por último el grupo testigo fue administrado con Tween 80 al 1%.

### **Evaluación del área de lesión**

Una vez retirados los estómagos de los ratones, se usó el programa de ImageJ para realizar mediciones de las áreas de lesión correspondiente a cada estómago, la medición se realizó por triplicado, se obtuvo un promedio con su desviación estándar, todo lo anterior fue graficado para obtener las diferencias entre los grupos.

### **Evaluación del índice de daño histológico**

Realizada la técnica histológica de tinción de hematoxilina y eosina se aplicó el índice modificado de Shan y Khan <sup>(47)</sup>, en el que se evaluaron 4 aspectos de la técnica, a los que se les asignó un puntaje que va de 0 a 4, los aspectos a evaluar fueron los siguientes:

Pérdida de epitelio (0-4), Hemorragia (0-4), Erosión de la mucosa (0-4) e Infiltrado inflamatorio (0-4).

Se realizó la técnica de Schiff la cual se basó en la tinción de ácido peryódico de Schiff (PAS) para comprobar la presencia de mucopolisacáridos y el espesor del moco gástrico básico (Apéndice 5).

### **Evaluación de citocinas pro-inflamatorias**

La evaluación de citocinas pro-inflamatorias fueron realizadas mediante placa de ELISA con las indicaciones del proveedor en el kit PeptoTech.

# Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México

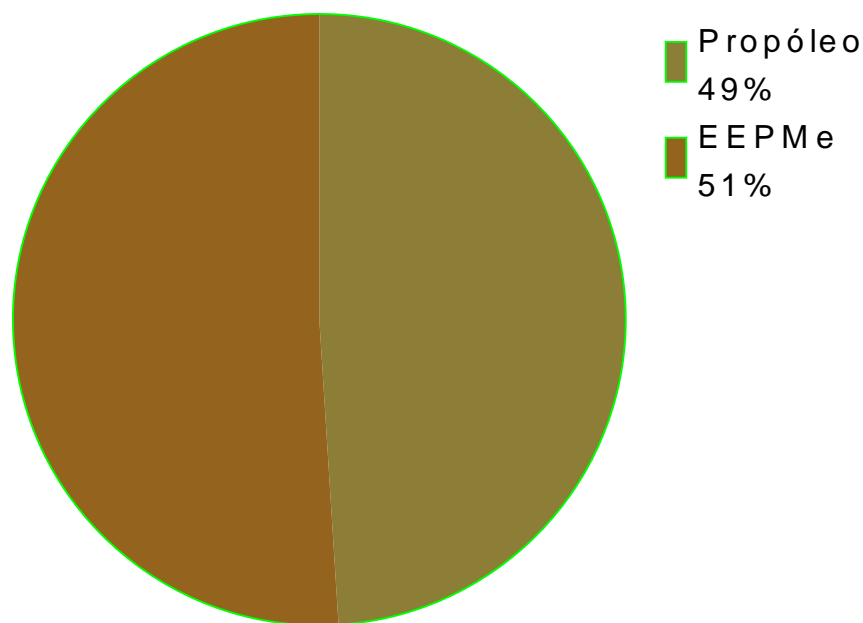
## Resultados

### Colecta del propóleo

El propóleo fue colectado del apiario del Colorado S de RL de CV ubicado en la localidad de Cierro Prieto en Mexicali, Baja California, colectada durante el año 2018, las coordenadas del apiario son las siguientes: 32°30'05.7"N 115°24'34.9"O. El clima es seco la mayor parte del año con temperaturas máximas de 42.3°C y una precipitación promedio de 5.9 mm.

### Rendimiento del extracto

Se obtuvo el extracto etanólico del propóleo colectado en Mexicali (EEPMe), a partir de 52.76g iniciales de propóleo obteniendo 27g de extracto, correspondiente al 51% (figura 9).



**Total: 100%**

**Figura 9.** Rendimiento del extracto etanólico del propóleo de Mexicali.



### Pruebas organolépticas

En cuanto a las pruebas organolépticas realizadas del propóleo de Mexicali se obtuvieron los siguientes resultados (cuadro 1), estas características son propias de cada propóleo y dependen totalmente de las condiciones de la flora en la zona de colecta, además de ser pruebas de tipo subjetivas las cuales pueden variar entre cada persona.

**Cuadro 1.** Pruebas organolépticas del Propóleo en greña.

<b>Característica</b>	<b>Resultado</b>
<b>Color</b>	Pardo
<b>Aroma</b>	Resinoso
<b>Sabor</b>	Imperceptible
<b>Consistencia</b>	Rígido

### Capacidad antioxidante

Parte importante de la defensa en las plantas está mediada por los fenoles y flavonoides, en conjuntos pueden otorgar una capacidad antioxidante la cual es capaz de cesar el crecimiento de agentes ajenos y extraños, así como de proteger la planta generando radicales libres que le son de ayuda, por ello se realizó la medición de la capacidad antioxidante.

Cabe resaltar que la capacidad antioxidante está relacionada con la concentración de los compuestos fenólicos, dentro de ellos el grupo de los flavonoides, muchos de estos flavonoides poseen una gran capacidad antioxidante como lo es el caso de la quercetina y otros flavonoides.

Se encontró que la Capacidad Antioxidante media ( $CA_{50}$ ) del EEPMe fue de  $89.92 \mu\text{g/mL}$  tal como se expresa en el cuadro 2.

## Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México

Los resultados obtenidos de capacidad antioxidante fueron comparados con los descritos por Al-Fatimi <sup>(48)</sup> quien indica que CA<sub>50</sub> menores a 96.6 µg/mL se pueden considerar con una buena capacidad antioxidante, el EEPMe mostró una CA<sub>50</sub> por debajo de este valor por lo que se puede considerar que el EEPMe contiene una buena capacidad antioxidante.

### Determinación de fenoles y flavonoides totales

Para poder explicar la buena capacidad antioxidante obtenida se determinó la concentración de fenoles totales y flavonoides en el extracto etanólico de propóleo de Mexicali, presentando la cantidad de 286 mgeqAG/g lo que representa el 28.6% del EEPMe para fenoles totales y de 60.28 mgeqQ/g para flavonoides, lo que representa el 21% respecto a la cantidad de fenoles y el 6% respecto al total del extracto (cuadro 2).

**Cuadro 2.** Resultados de capacidad antioxidante, fenoles y flavonoides del EEPMe.

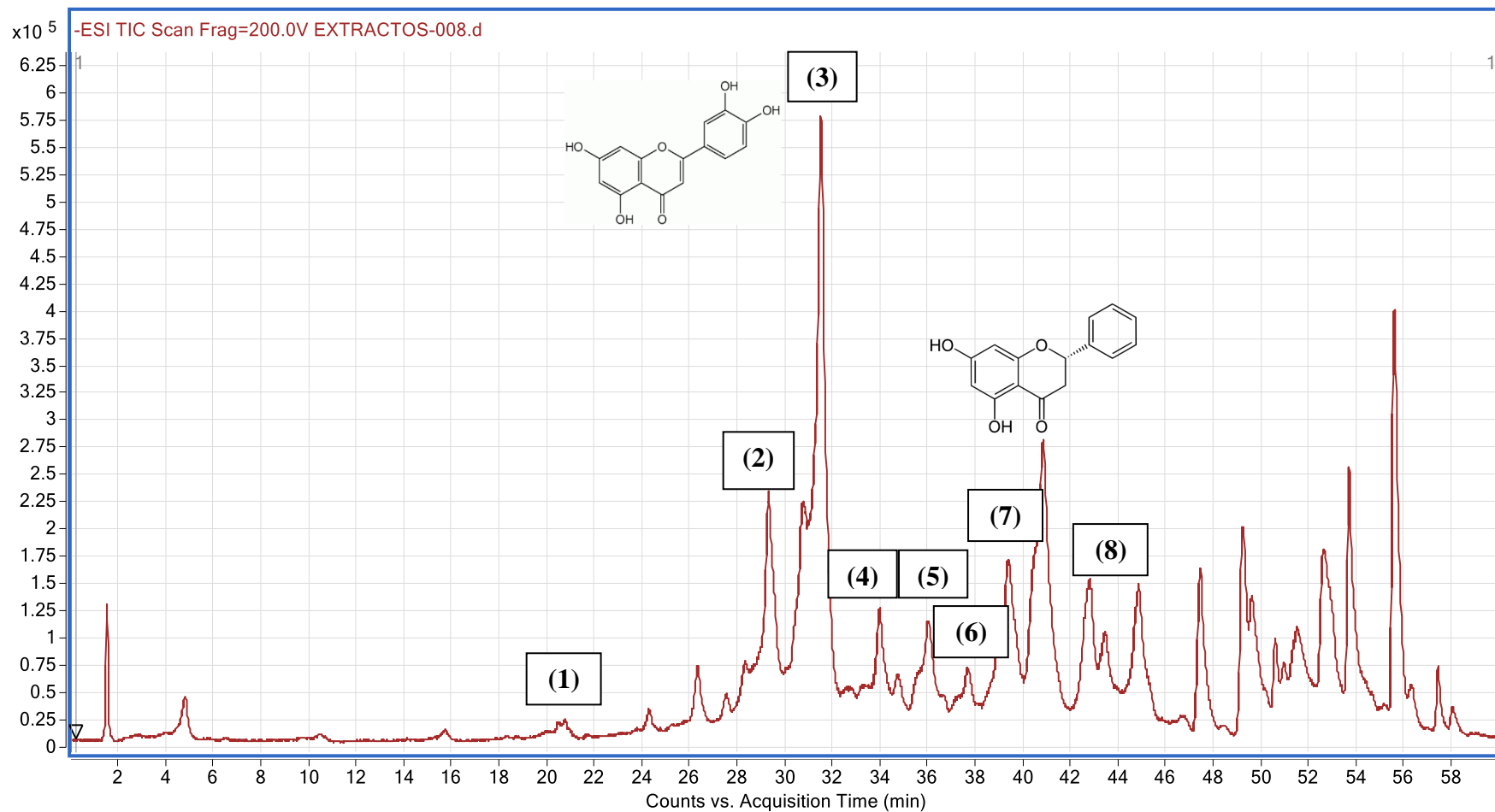
	EEPMe	Porcentaje	Quercetina
Capacidad antioxidante	89.92 µg/mL	-	6.54 µg/mL
Fenoles	286 mgeqAG/g	28.6%	-
Flavonoides	60.28 mgeqQ/g	6%	.

### Caracterización Química

#### Compuestos identificados por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

El EEPMe fue sometido a un análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución, el espectro obtenido de la partición metanólica se muestra en la figura 10, donde se observan los diferentes compuestos del extracto etanólico de propóleo de Mexicali.

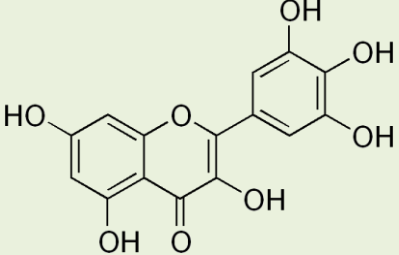
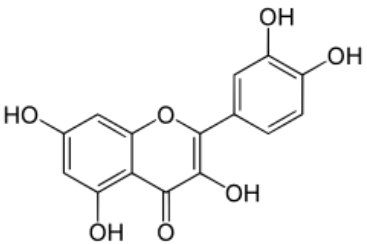
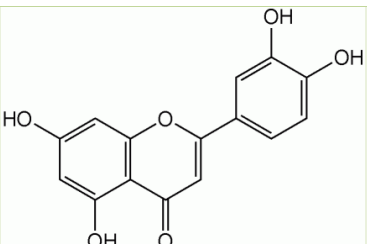
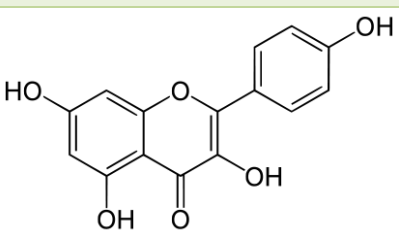
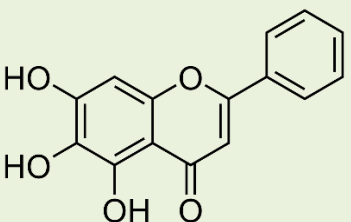
Dentro del cuadro 3 se muestra el tiempo de retención, las absorciones máximas bajo la luz ultra violeta ( $\lambda$  máx) y la estructura de los compuestos.

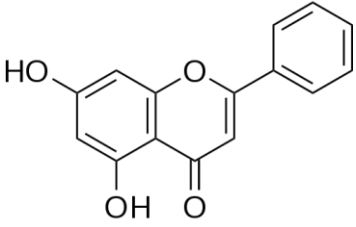
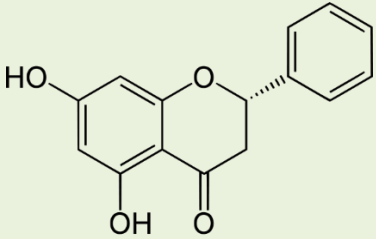
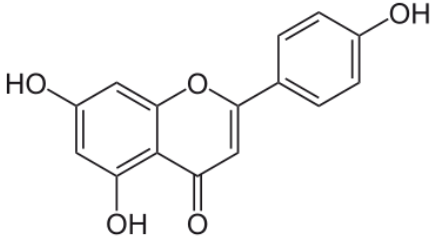


**Figura 10.** Cromatograma de HPLC correspondiente al EEPMe.

**Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México**

**Cuadro 3.** Compuestos identificados en el cromatograma de HPLC.

No. De compuesto	Tiempo de retención (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Compuesto	Estructura
1	21.65	255, 376	Miricetina	
2	29.26	202, 256, 356	Quercetina	
3	30.72	204, 254, 266, 356	Luteolina	
4	33.90	220, 266, 366	Kaempferol	
5	34.65	216, 277, 324	Baicaleína	

6	38.04	210, 266, 312	Crisina	
7	39.3	290	Pinocembrina	
8	43.41	212, 269, 334	Apigenina	

Al momento de ser inyectada la muestra se compararon con 15 estándares de flavonoides que se encuentran en la biblioteca, como se mencionó anteriormente, se encontraron 8 diferentes flavonoides en la muestra, los cuales fueron comparados para averiguar sus actividades biomédicas tal y como se muestra en el cuadro 4.

**Cuadro 4.** Actividades biomédicas presentes en los compuestos identificados mediante HPLC.

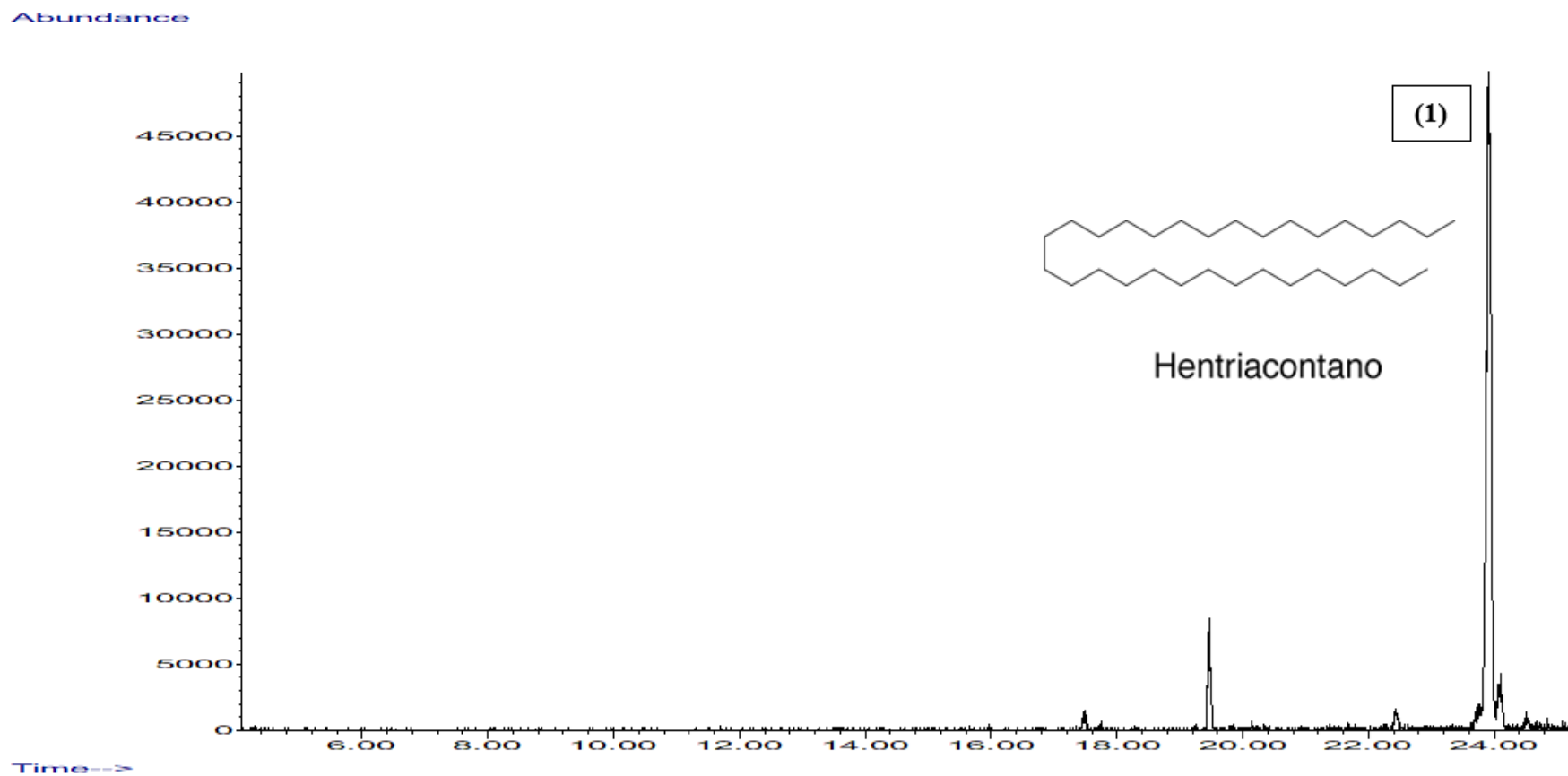
Compuesto	Anti-inflamatoria	Antioxidante	Gastroprotector
Miricetina	(49)	(50) (51) (52) (53) (54)	(55)
Quercetina	(56) (57) (58)	(59) (60) (61) (62) (63)	(64) (65) (66) (67)
Luteolina	(68) (69) (70)	(71) (72)	(73)

## Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México

<b>Kaempferol</b>	<b>(74) (75)</b>	<b>(76) (77) (78)</b>	<b>(79)</b>
<b>Baicaleína</b>	<b>(80) (81) (82)</b>	<b>(83) (84) (85) (86)</b> <b>(87)</b>	<b>-</b>
<b>Crisina</b>	<b>(88)</b>	<b>(89) (90)</b>	<b>(91)</b>
<b>Pinocembrina</b>	<b>(92) (93) (94)</b>	<b>(95) (96)</b>	<b>-</b>
<b>Apigenina</b>	<b>(97)</b>	<b>(98) (99) (100)</b>	<b>(101)</b>

### Compuestos identificados por GC-MS

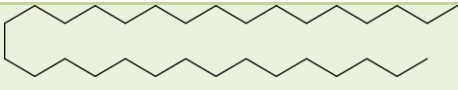
Se realizó una Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas en donde se encontraron los siguientes compuestos correspondiente a las partición metanólica, únicamente se encontró un compuesto (cuadro 5) en la partición metanólica el cual corresponde a hentriacontano (figura 11).



**Figura 11.** Cromatografía de gases de la partición metanólica del EEPMe.

## Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México

**Cuadro 5.** Compuestos identificados en la partición metanólica.

No.	Nombre del compuesto	Tiempo de retención (min)	Porcentaje de abundancia	Estructura
1	Hentriacontano	25.27	89.23	

Del compuesto encontrado se realizó la búsqueda bibliográfica para determinar las actividades biomédicas que este compuesto presenta, encontrando los resultados que se detallan en el cuadro 6.

**Cuadro 6.** Actividades biomédicas encontradas en el compuesto encontrado mediante GC-MS.

Compuesto	Anti-inflamatoria	Antioxidante	Gastroprotector
Hentriacontano	(102) (103)	-	-

### Actividad Antibacteriana

Si bien es cierto que en este trabajo no se probó el efecto del EEPMe sobre *H. pylori*, se decidió evaluar la actividad antibacteriana del propóleo sobre 4 bacterias de importancia médica con la intención de relacionar los datos obtenidos con una suposición de infección por *H. pylori* y el efecto que el EEPMe tendría sobre esta, como se mencionó anteriormente *H. pylori* está relacionado con un porcentaje importante en la generación de úlceras pépticas al dañar el revestimiento mucoso en el estómago y duodeno, permitiendo la entrada de ácido estomacal provocando heridas y causando la ulceración.



De las cuatro cepas de bacterias utilizadas tres fueron Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*) y sólo una fue Gram positiva (*Staphylococcus aureus*).

Se probaron dos concentraciones diferentes 16 mg/s y 8 mg/s con las cuales fueron impregnados los sensidiscos y colocados en los medios de crecimiento.

De las bacterias probadas contra el EEPMe a pesar de que en *E. aerogenes* únicamente se mostraron halos de impregnación no se mostraron halos reales de inhibición, sin embargo, en *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus* se obtuvieron halos de inhibición, los halos de inhibición fueron de 7 mm, 7 mm y 10 mm respectivamente para las bacterias, *S. aureus* mostró una mayor sensibilidad, lo que nos indica que el EEPMe posee una actividad antibacteriana tal como se observa en el cuadro 7 y figura 12.

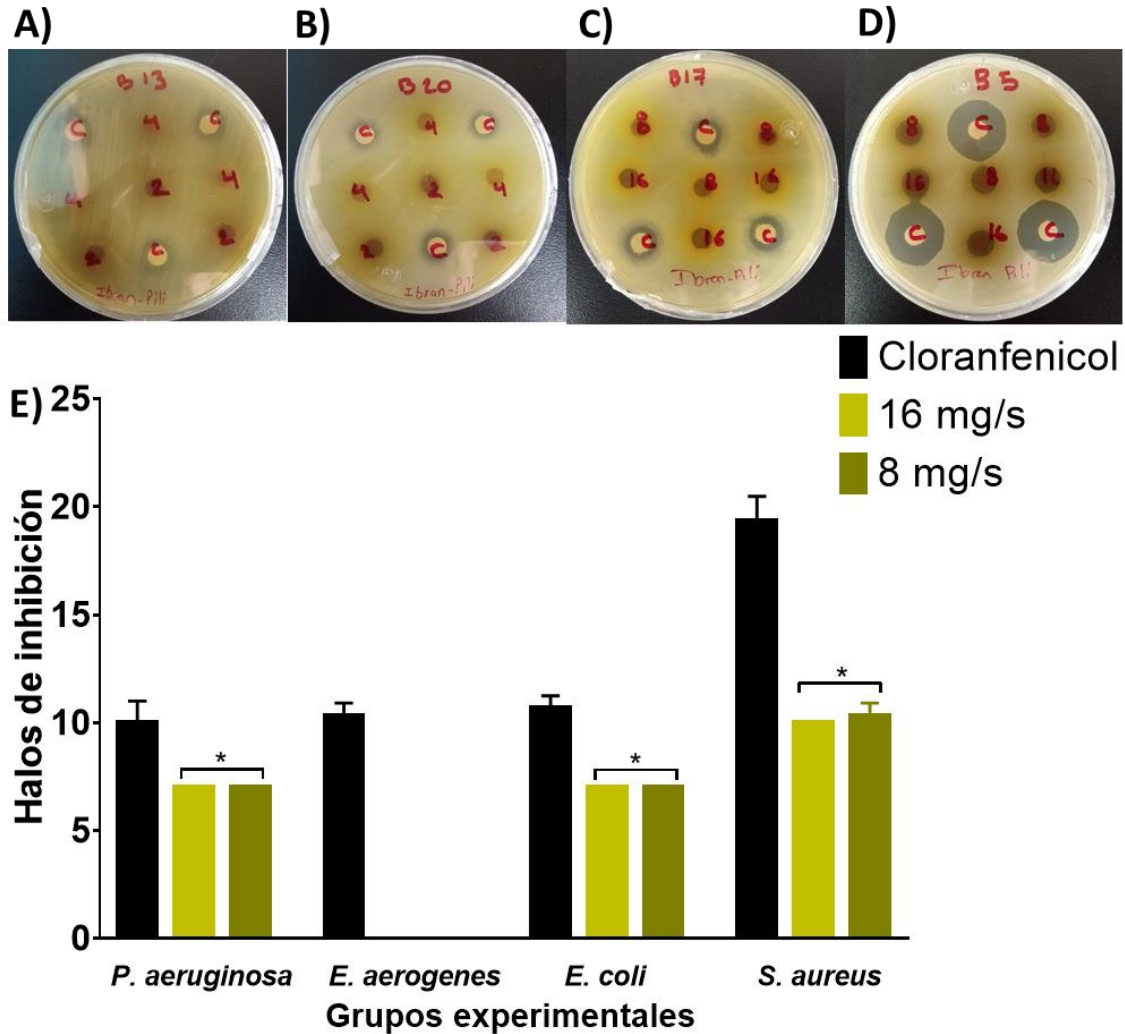
**Cuadro 7.** Actividad antibacteriana del extracto de propóleo de Mexicali.

Bacterias	16mg/s	8mg/s	Cloranfenicol
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	7.00 ± 0.0	7.00 ± 0.0	10.00 ± 1.0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	na	na	10.33 ± 0.57
<i>Escherichia coli</i>	7.00 ± 0.0	7.00 ± 0.0	10.66 ± 0.57
<i>Staphylococcus aureus</i>	10.00 ± 0.0	10.33 ± 0.57	19.33 ± 1.15

Diámetros expresados en milímetros. na: no activo.

El cloranfenicol es un antibiótico de amplio espectro altamente efectivo contra la mayoría de las bacterias Gram positivas y Gram negativas, por eso fue usado como control.

## Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México

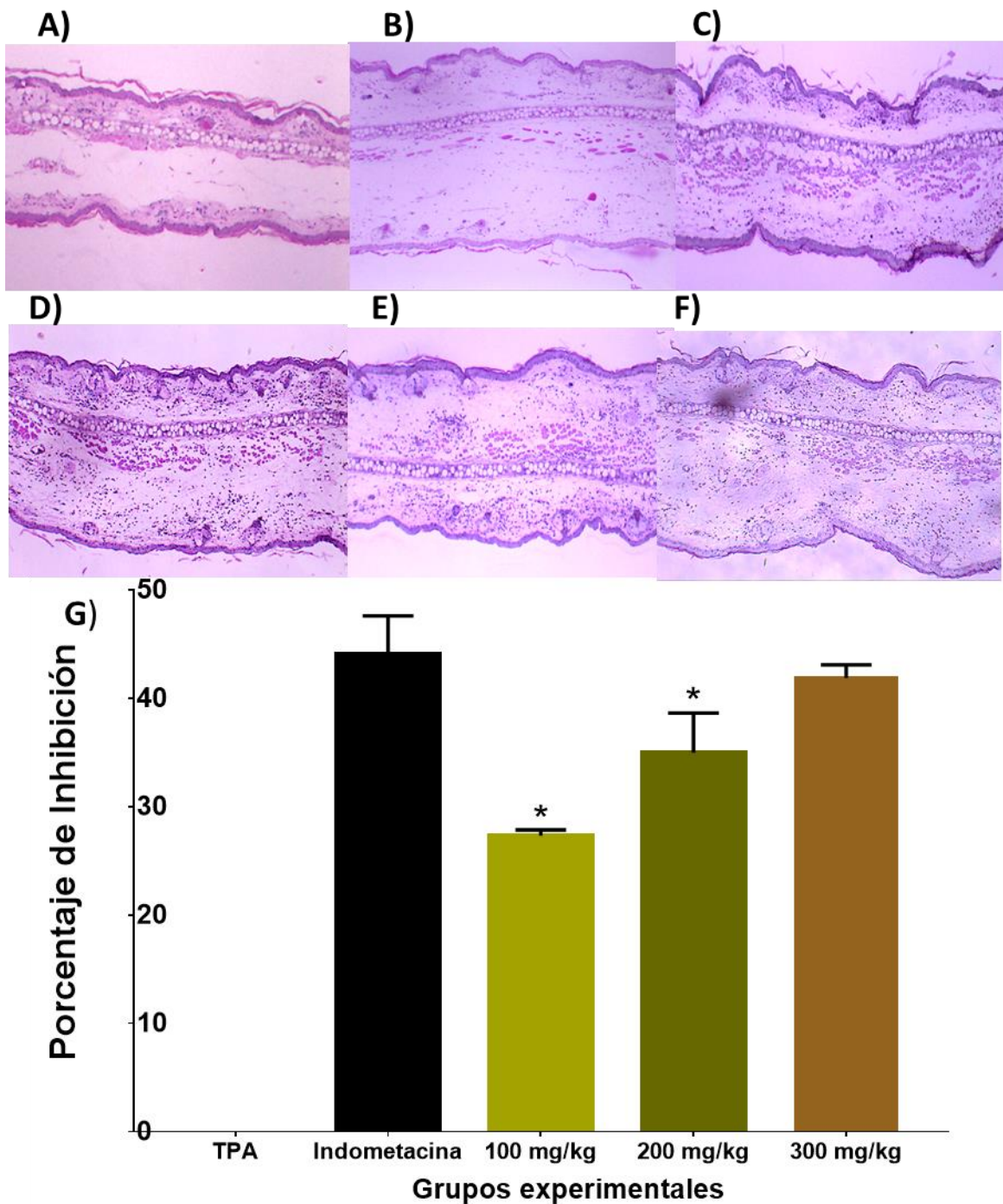


**Figura 12.** Halos de inhibición del EEPMe contra cuatro bacterias. A) *P. aeruginosa*, B) *E. aerogenes*, C) *E. coli*, D) *S. aureus*. E) Actividad antibacteriana del EEPMe sobre cuatro bacterias de importancia médica, resultados expresados en mm. \*Diferencias significativas con respecto al grupo Cloranfenicol.  $P < 0.05$ .

### Actividad Anti-inflamatoria

En un modelo como gastritis donde la enfermedad está mediada por inflamación gástrica, es importante conocer la capacidad que tiene el EEPMe de inhibir la inflamación, para ello se probó un modelo de inflamación auricular mediante el uso de TPA.

Los resultados obtenidos fueron analizados, medidos y graficados como se muestra en la figura 13.



**Figura 13.** Efecto anti-inflamatorio del EPPMe. Cortes histológicos de las orejas de ratón, se observan respectivamente los grupos: A) Control B) TPA C) Indometacina D) 100 mg/kg E) 200 mg/kg F) 300 mg/kg. G) Porcentaje de inhibición de inflamación en un modelo de edema auricular (TPA). \*Diferencias significativas con respecto al grupo Indometacina.  $P < 0.05$ .

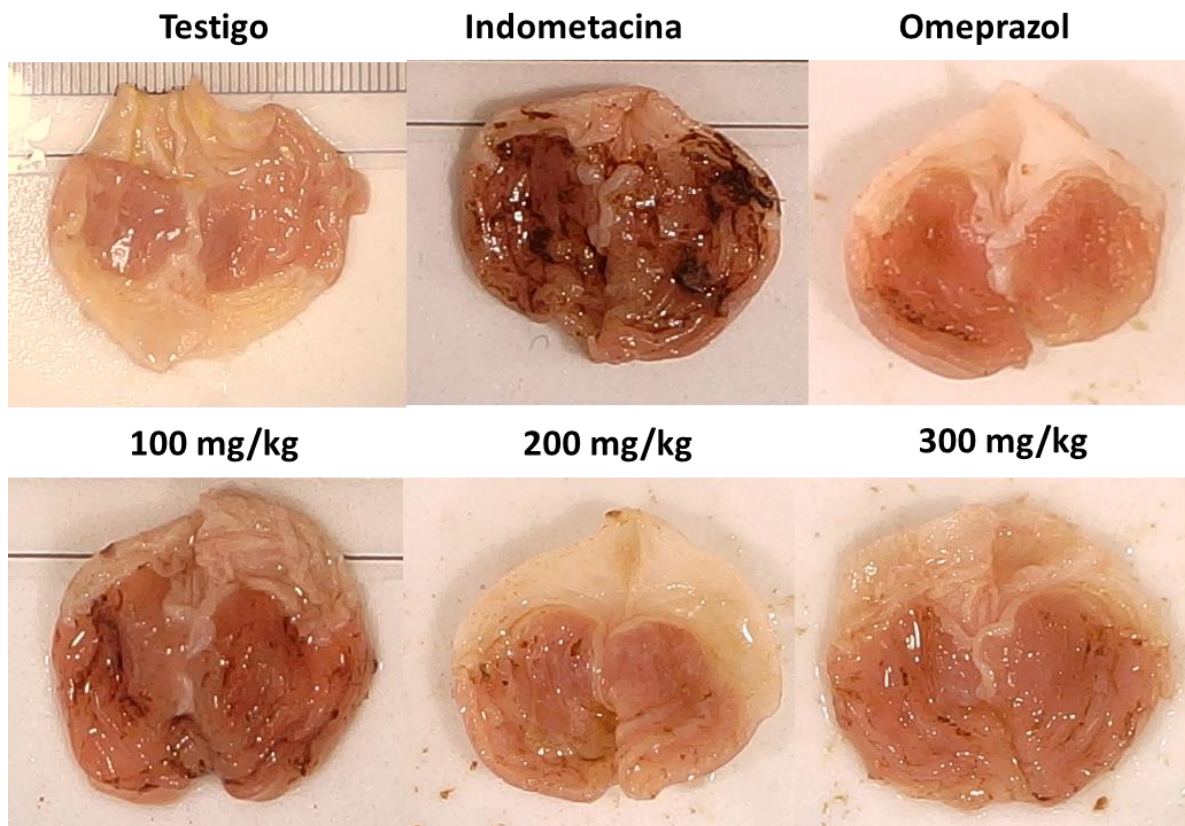
## **Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México**

De las tres concentraciones probadas, la concentración de 300 mg/kg no mostró diferencias significativas con respecto al grupo Indometacina (fármaco anti-inflamatorio), mostrando 41.8% de inhibición mientras que el grupo anti-inflamatorio obtuvo un 44% ambos demostrando tener una buena capacidad para inhibir la inflamación en un lapso de 4 horas, aunque los grupos de 200 mg/kg y 100 mg/kg mostraron diferencias con respecto a la Indometacina, ambos grupos lograron obtener un porcentaje mayor al 25% un valor que nos sugiere que contienen una capacidad para inhibir la inflamación.

### **Modelo de gastritis por Indometacina**

Una vez administrada la indometacina a los grupos más la dosis correspondiente de propóleo se evaluó el daño macroscópico a través de fotografías. El grupo testigo no presentó ningún daño. Por el contrario, el daño macroscópico ocasionado por la indometacina es evidente en aquellos que no recibieron un tratamiento. En comparación con los que fueron canulados con omeprazol se redujo considerablemente el daño provocado por el AINEs como se puede observar en la figura 14.

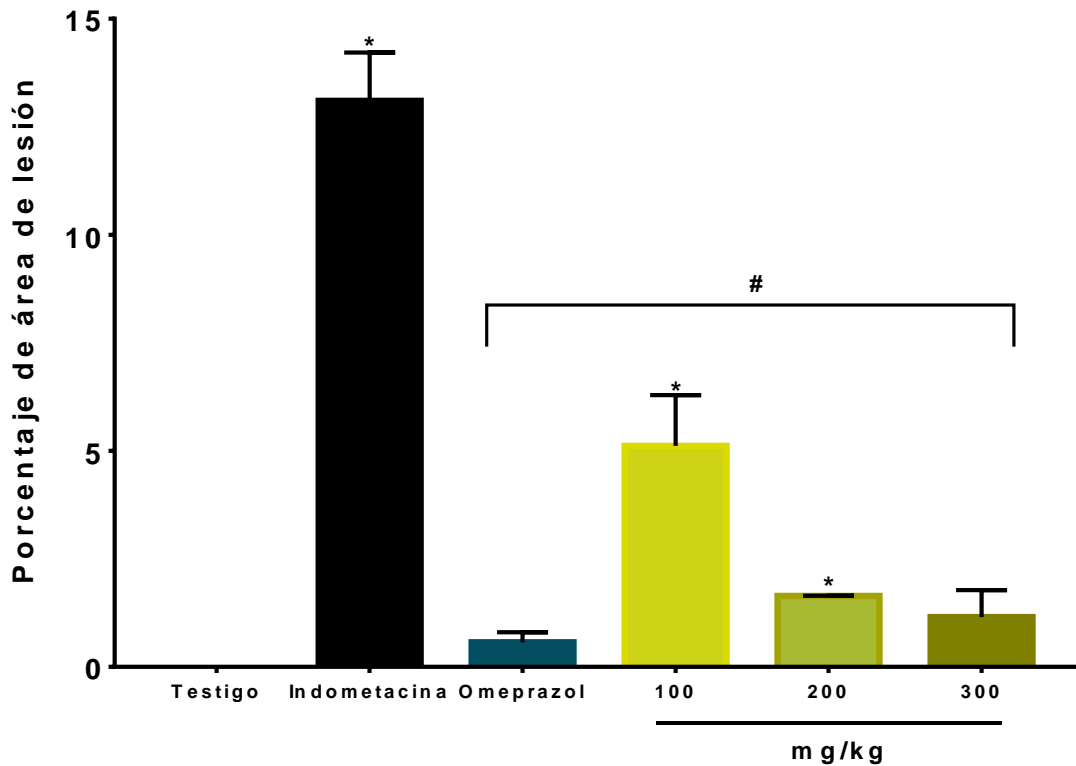
La mitad de los grupos recibió propóleo a diferentes concentraciones, en la figura 14, se observa la comparación entre los tres grupos correspondientes a las concentraciones de 100mg/kg, 200mg/kg y 300mg/kg. La reducción del daño en los tres grupos es evidente, hay una reducción en el sangrado, así como en la ulceración provocada por la Indometacina, los resultados obtenidos en los grupos de 200 mg/kg y 300 mg/kg muestran una protección muy similar a la mostrada por el medicamento usado (Omeprazol), con esto se puede decir que a nivel macroscópico el EPPMe protege de una forma tan eficiente como lo hacen los fármacos.



**Figura 14.** Fotografías de los estómagos correspondientes a los grupos experimentales.  
\*Imágenes representativas de los experimentos.

Posteriormente con ayuda del programa ImageJ se obtuvo el área correspondiente a cada una de las lesiones de los estómagos, el promedio correspondiente a los grupos se graficó como se muestra en la figura 15, los resultados están expresados en porcentaje de área de lesión.

## Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México



**Figura 15.** Área de lesión en cada grupo experimental, expresado en porcentaje. \*Diferencias significativas con respecto al grupo Omeprazol. # Diferencias significativas con respecto al grupo Indometacina.  $P < 0.05$ .

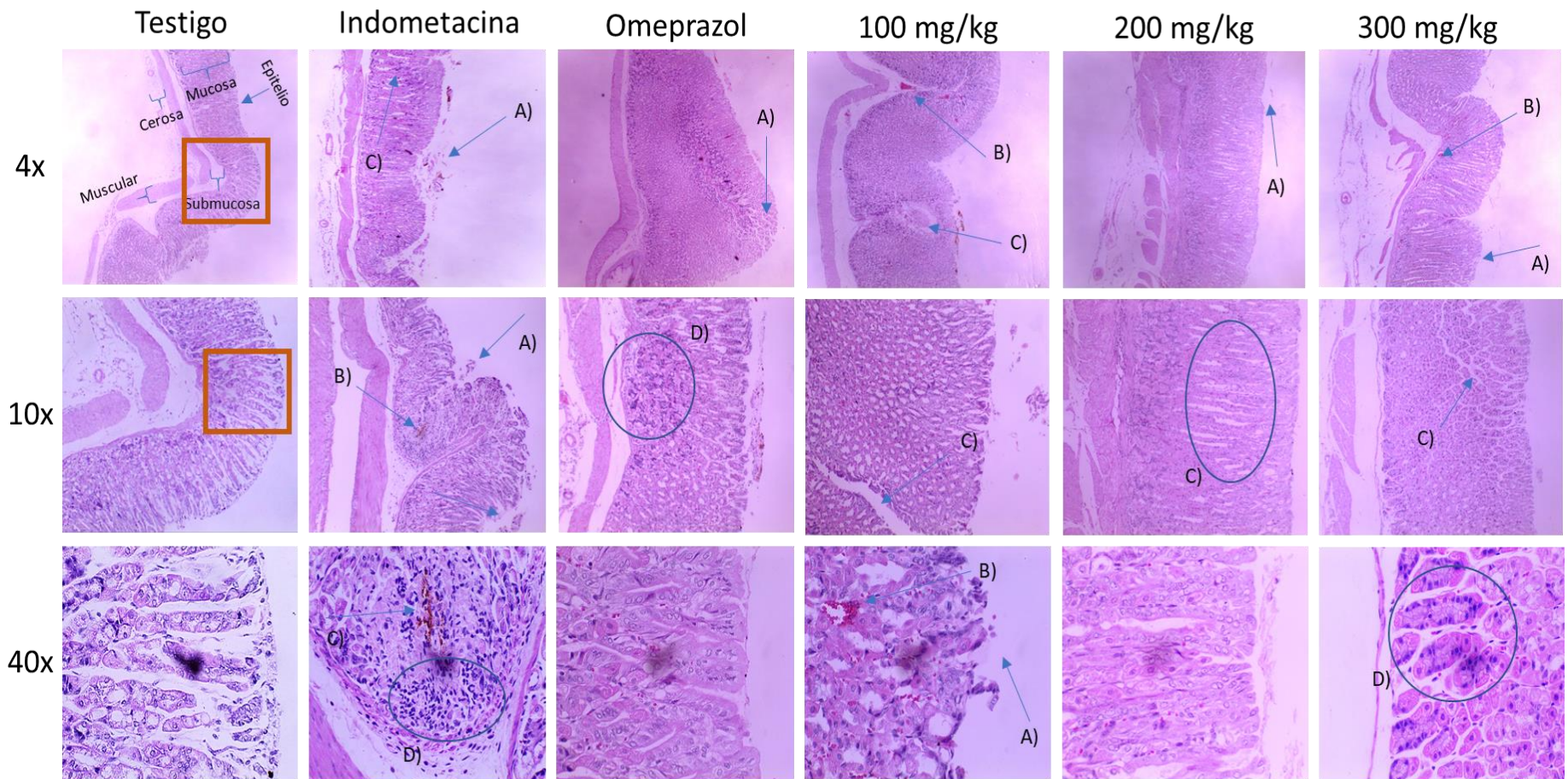
Los resultados mostraron que no hay una diferencia significativa entre el grupo de 300 mg/kg y el grupo Omeprazol, siendo ambos muy buenos al mostrar un porcentaje por debajo del 5%. El grupo de 200 mg/kg fue el segundo mejor ya que se mantuvo en 2% de daño, sin embargo, este si muestra diferencias significativas con respecto a Omeprazol y la concentración de 300 mg/kg, por último, el grupo de 100 mg/kg a pesar de ser un buen tratamiento con respecto a la Indometacina no es suficiente para mostrar similitud al grupo Omeprazol.

### Histología

Para confirmar el daño en los estómagos se realizó la tinción de hematoxilina y eosina (H-E) (apéndice 5), una vez realizada la tinción se realizaron microfotografías las cuales se muestran en la figura 16, en la tinción se evidencia el daño provocado por las úlceras en cada

uno de los estómagos. Se muestra que en el grupo Testigo hay una arquitectura íntegra del tejido y sin daño, en el grupo Indometacina hay pérdida del epitelio, infiltrado inflamatorio y sangrado, mientras que el grupo Omeprazol, se reduce el daño, a pesar de presentar sangrado y una ligera pérdida del epitelio. Para los grupos tratados con EEPMe hay una conservación de la arquitectura sin embargo la concentración de 100 mg/kg hay sangrado y más pérdida del epitelio, por otra parte, en la concentración de 200 mg/kg el infiltrado inflamatorio es muy ligero al igual que la erosión y pérdida de epitelio, es decir logró mantener en mejor forma la forma natural del estómago, por último la concentración de 300 mg/kg ayudó a conservar la estructura y evitar la erosión, así como el sangrado sin embargo se muestra infiltrado inflamatorio.

## Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México



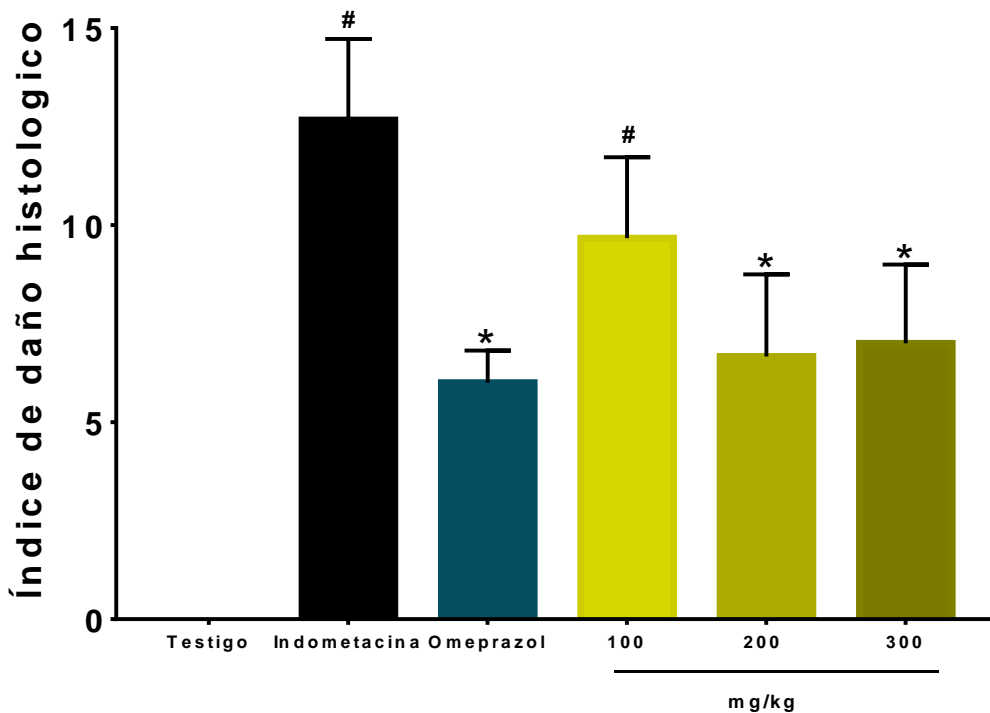
**Figura 16.** Microfotografías de estómago: A) Desprendimiento del epitelio, B) Hemorragia, C) Erosión de la mucosa, D) Infiltrado inflamatorio. Tinción H-E.



A través de la apreciación histológica en la tinción de hematoxilina y eosina se identificaron las estructuras del estómago y con base al índice modificado de Shan y Khan en 1997 <sup>(47)</sup> se asignaron valores que van de 0-4 para valorar el daño correspondiente a cada señal:

Desprendimiento del epitelio (0-4), Hemorragia (0-4), Erosión de la mucosa (0-4) e Infiltrado inflamatorio (0-4).

Una vez obtenidos los puntajes de todos los estómagos se graficó el promedio como se muestra en la figura 17, donde se observa que no hay diferencias significativas entre las concentraciones de 200 mg/kg, 300 mg/kg y el grupo Omeprazol, caso contrario es la concentración de 100 mg/kg la cual muestra diferencias con el resto de las concentraciones y Omeprazol, sin embargo, con Indometacina no muestra diferencias significativas.



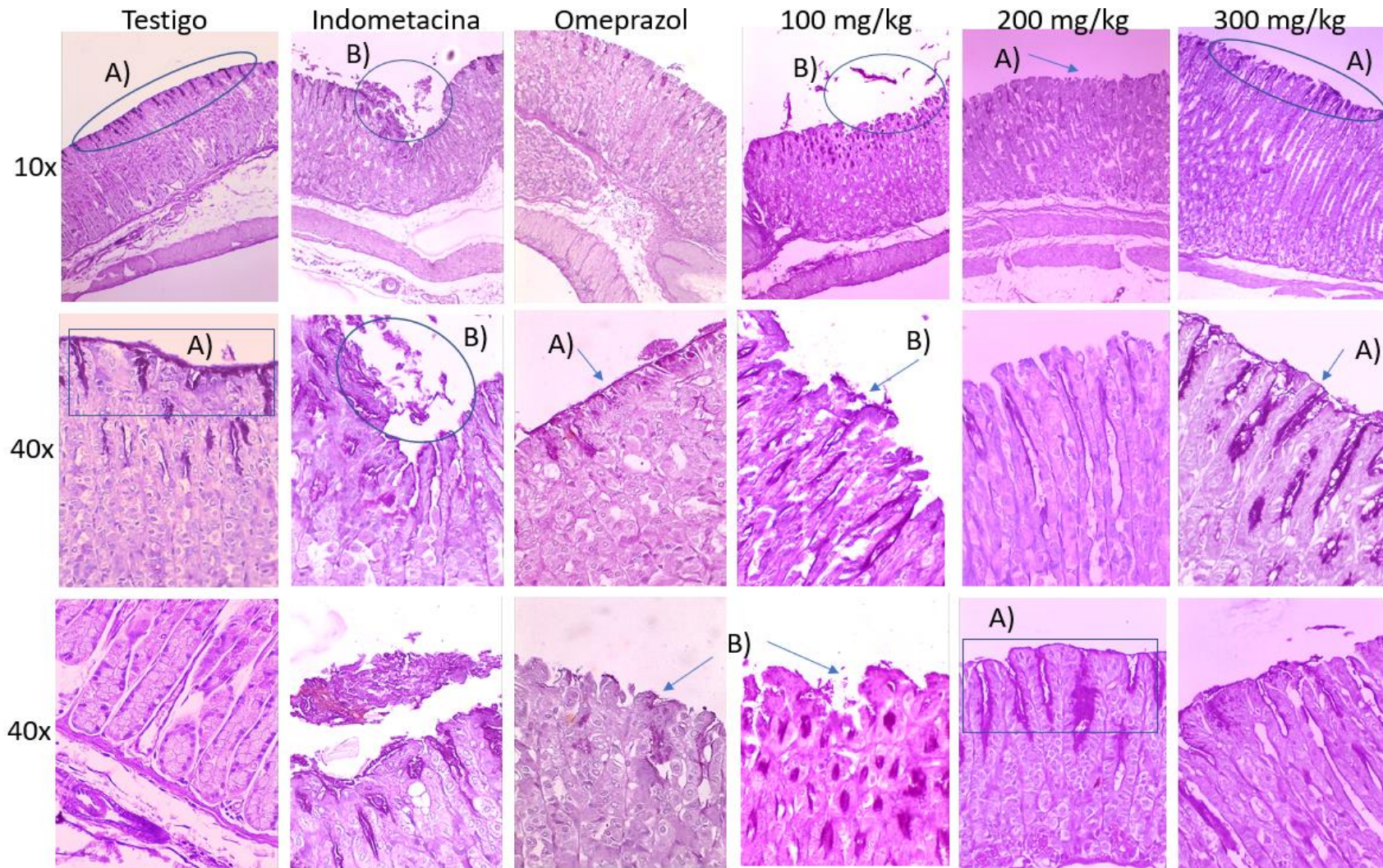
**Figura 17.** Índice de daño histológico de cada grupo experimental modificado de Shan y Khan (1997). \* Diferencias significativas con respecto al grupo Indometacina. # Diferencias significativas con respecto al grupo Omeprazol.  $P < 0.05$ .

## **Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México**

### **Tinción de PAS**

Para confirmar el daño histológico se realizó la técnica de Schiff la cual se basa en la utilización de ácido peryódico de Schiff (PAS), esta técnica es usada para diferenciar el moco básico del neutro, con esto se buscó teñir el moco gástrico para poder realizar comparaciones entre los grupos de trabajo.

Al finalizar la tinción se realizaron microfotografías de los diferentes estómagos de los grupos (figura 18), en ellas se puede observar que el grupo Testigo (A) no hay daño, se muestra una arquitectura íntegra por parte de este grupo, mientras que el grupo de Indometacina ha perdido la integridad de las crestas, así como reducir su cantidad de moco visible, el grupo tratado con Omeprazol mostró una mayor cantidad de moco básico, así como una mejor estructura de la mucosa. De entre los tres grupos de concentraciones de propóleo, el grupo tratado con 100 mg/kg mostró una reducción en la producción de moco en comparación con el grupo Omeprazol y Testigo. Sin embargo, en los grupos de 200 mg/kg y 300 mg/kg se pudo observar una cantidad similar a la mostrada por el grupo Testigo, además de que se mantuvieron las crestas y la arquitectura similar al grupo Testigo.



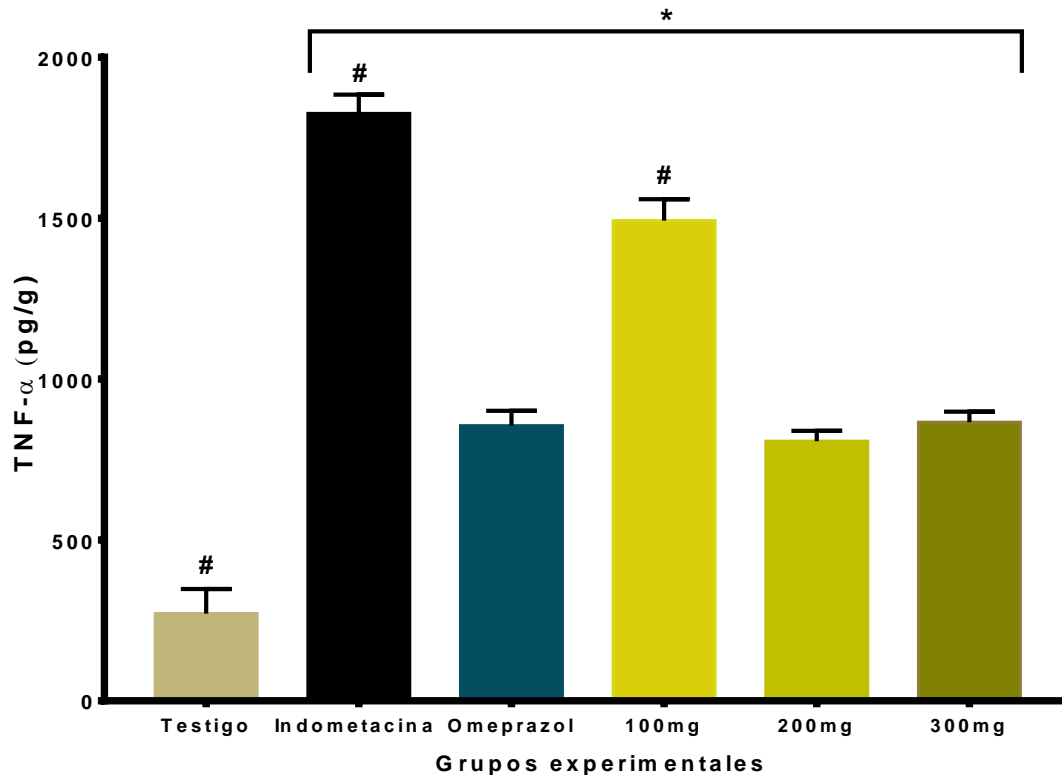
**Figura 18.** Técnica de Schiff empleada en cortes histológicos de estómago. A) Moco básico presente en los cortes. B) Pérdida de epitelio en los cortes.

## **Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México**

### **Citocinas pro-inflamatorias**

Por último, para corroborar los resultados que se describían en las técnicas de histología se realizó la medición de citocinas pro-inflamatorias por medio de la técnica de ELISA en los cuales se evaluaron 6 grupos, el grupo Control, Indometacina, Omeprazol, 100 mg/kg, 200 mg/kg y 300 mg/kg. Con respecto a TNF- $\alpha$ , en la figura 19 se puede observar que el grupo Control mostró una producción de 271 pg/g los cuales son niveles basales o normales, mientras que el grupo Indometacina mostró la mayor producción alcanzando los 1825 pg/g.

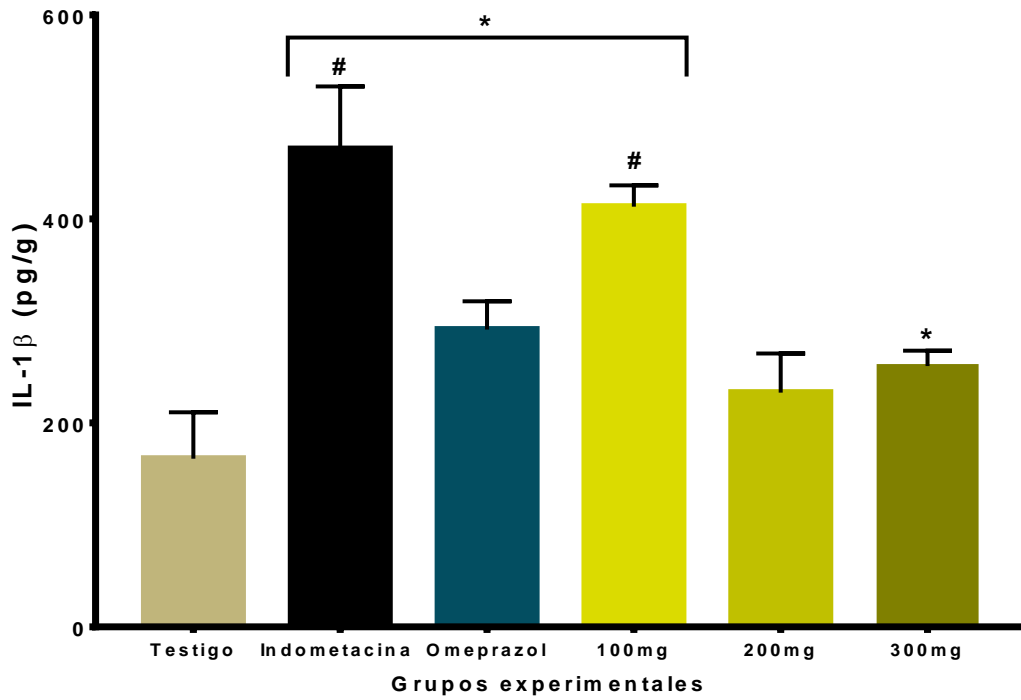
El grupo Omeprazol tuvo una producción de 855 pg/g mientras que en los grupos experimentales sólo el grupo de 100 mg/kg tuvo diferencias significativas con respecto al grupo Omeprazol al obtener una producción de 1445 pg/g mientras que los grupos de 200 mg/kg y 300 mg/kg no mostraron diferencias significativas con respecto al fármaco convencional obteniendo 829 pg/g y 842 pg/g respectivamente, estos resultados confirman la capacidad anti-inflamatoria que posee en EEPMe en sus concentraciones de 200 mg/kg y 300 mg/kg, la cual protege de una forma muy similar a la que lo hace el fármaco Omeprazol.



**Figura 19.** Detección de TNF- $\alpha$  en suero y homogenizado mediante la técnica de ELISA. \*Diferencias significativas con respecto al grupo Control. # Diferencias significativas con respecto al grupo Omeprazol.  $P < 0.05$ .

Otra citocina proinflamatoria y de interés es IL-1 $\beta$  la cual fue evaluada mediante el kit PeproTech al igual que en TNF- $\alpha$ . El fármaco convencional Omeprazol mostró niveles de IL-1 $\beta$  fueron de 291 pg/g, dicho dato es mejor en comparación con el grupo de 100 mg/kg la cual fue de 426 pg/g, sin embargo los grupos de 300 mg/kg y 200 mg/kg mostraron una menor producción con respecto al Omeprazol con valores de 266 pg/g y 202 pg/g, únicamente el grupo de 200 mg/kg mostró diferencias significativas con respecto al grupo Omeprazol y no mostró diferencias con el grupo Control, mostrando que los niveles de citocinas proinflamatorias en la concentración de 200 mg/kg se mantuvieron basales (figura 20).

## Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México



**Figura 20.** Valores correspondientes a la medición de la citocina IL-1 $\beta$  en suero y homogenizado mediante la técnica de ELISA. \*Diferencias significativas con respecto al grupo Control. Diferencias significativas con respecto al grupo Omeprazol.  $P < 0.05$ .

## Discusión

Respecto al EEPME, se obtuvo un 51% de rendimiento, este porcentaje está por encima de la media con el resultado obtenido por Carrillo y colaboradores en 2011, quienes obtuvieron un promedio de 4 extractos etanólicos de diferentes zonas de la Huasteca Potosina cuya media fue 41.83% de rendimiento<sup>(104)</sup>, lo que nos indica que el EEPMe contiene una mayor cantidad de compuestos con polaridad alta, los cuales pueden contener propiedades biomédicas que pudieran actuar en conjunto para mitigar los daños de la gastritis.

Como se describió anteriormente, se realizó la medición de la concentración de fenoles totales en el EEPMe, mostrando una concentración de 286 mg, equivalente al 28.6% del EEPMe, es un porcentaje considerado alto, en comparación con lo descrito por Bedascarrasbure y colaboradores en el 2004 quienes analizaron 84 muestras de propóleo provenientes de 5 regiones diferentes de Argentina encontrando un promedio de las 84 muestras de 18.64% de las cuales la región con el promedio más alto fue la de Estepa pampeana con 21.31% siendo aun así inferior, Delgado y colaboradores en el 2015 analizaron propóleos del Bosque la Primavera en Zapopan, Jalisco, en el mes de Septiembre, quienes obtuvieron una cantidad inferior al de Mexicali la cual fue de 260 mg, la cantidad obtenida en el propóleo de Jalisco, se debe a la estación del año colectada, la importancia de los fenoles radica en que se les atribuyen las propiedades biomédicas del propóleo, como la actividad anti-inflamatoria la cual es de interés para este proyecto<sup>(105)(15)</sup>.

Las diferencias encontradas en los porcentajes respecto a la cantidad de fenoles como menciona Palomino y colaboradores pueden ser atribuidas a la vegetación que se encuentra en la zona de colecta a partir de las cuales las abejas elaboran el propóleo, la estación del año, así como el estado de estrés de las plantas al momento de la colecta, ya que al estresarse sintetizan una mayor cantidad de metabolitos secundarios como una respuesta al ambiente o a los agentes extraños<sup>(106)</sup>.

Dentro del grupo de los fenoles, se encuentran los flavonoides los cuales son de gran importancia junto con los ácidos fenólicos y sus ésteres, son considerados los principales componentes bioactivos de los propóleos<sup>(105)</sup>.

## **Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México**

La concentración de flavonoides correspondiente al EEPMe fue de 60.28 mgeq/AG/g equivalente al 6% del extracto y correspondiente al 21.1% dentro de los fenoles totales lo cual es una cantidad considerable en comparación con lo obtenido por Palomino y colabores en 2009 quienes analizaron la muestra de 5 propóleos obtenidos en el departamento de Antioquia, Colombia, los rangos obtenidos de flavonoides van desde 4.75mg hasta 42.37mg, con un promedio de 19.89mg, mientras que Chaillou y colabores analizando 21 muestras de diferentes propóleos de tres zonas de Argentina obtuvieron valores equivalentes en porcentaje de mg/g desde 0.23% hasta 2.17%, cabe mencionar que estos últimos propóleos fueron recolectados durante los meses de Septiembre y Octubre, sin embargo ninguno de ellos obtuvo un porcentaje cercano al mostrado por el EEPMe, Yoong y Aura en el 2004 caracterizó tres propóleos de la Escuela Agrícola Panamericana obteniendo porcentajes de 1.73, 5.11 y 5.13, porcentajes similares al obtenido de Mexicali, los propóleos en esa ocasión fueron colectados en el mes de Diciembre, la diferencia de flavonoides como describe Chaillou es una consecuencia de las diferentes especies botánicas que las abejas de una y otra región utilizan como fuente de resinas <sup>(106) (107) (108) (68)</sup>.

La capacidad antioxidante de un extracto es dependiente de los compuestos fenólicos que éste presente como lo son los ácidos fenólicos, flavonoides, entre otros, al realizar la capacidad antioxidante del EEPMe se obtuvo una capacidad con un valor de CA<sub>50</sub> de 89.92 µg/mL, 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 <sup>(31)</sup>. La cual está relacionada con la cantidad de fenoles totales, así como los flavonoides, en 2008 Manrique y Santana destacan que la propiedad antioxidante de los propóleos varía según la concentración de dichos metabolitos y la naturaleza del producto <sup>(109)</sup>. En comparación con los valores obtenidos por Palomino y colaboradores quienes analizaron la capacidad antioxidante por el mismo método de reducción (DPPH) quienes obtuvieron rangos de 33.9 µg/mL hasta 517.4 µg/mL con un promedio de 218.4 µg/mL, demostrando que el valor obtenido en el EEPMe es un valor bueno de capacidad antioxidante. Es importante señalar que los compuestos fenólicos, por la presencia en su estructura de un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos son capaces de formar quelatos con el hierro, jugando un papel importante la posición en que los mismos se encuentran <sup>(106) (110)</sup>.



Como menciona Zapata y colaboradores en el 2015 la capacidad antioxidante coincide con el contenido de fenoles totales, mostrando una posible correlación entre estos metabolitos y la actividad antioxidante. En numerosos estudios han concluido que el contenido fenólico puede contribuir significativamente a su capacidad antioxidante <sup>(111)</sup>. Schinella y colaboradores en 2010 demostraron la relación que existe entre el contenido de compuestos fenólicos con la capacidad reductora de radicales DPPH <sup>(112)</sup> los compuestos encontrados en el EEPMe podrían estar actuando en un modo de sinérgica para reducir los radicales.

La Norma Oficial Mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017 establece que para que un propóleo sea considerado con una buena capacidad antioxidante esta debe ser menor a 100 microgramos/mililitro, dicho criterio es cumplido por el EEPMe, considerando bajo la NORMA Oficial Mexicana como buena capacidad antioxidante. Como último criterio se tomó el de Al-Fatimi el cual indica que CA<sub>50</sub> menores a 96.6µg/mL se pueden considerar buenos por lo que nuevamente el EEPMe se considera con buena capacidad antioxidante <sup>(48)</sup>.

El EEPMe después de ser sometido a un análisis por HPLC Y CG-MS los resultados arrojados nos indicaron que el propóleo contiene flavonoides, dentro de los compuestos identificados los más abundantes fueron luteolina, quercetina y pinocembrina. Delgado y colaboradores en el 2015 quienes caracterizaron propóleos de Zapopan, Jalisco, recalcan la importancia y abundancia de los fenoles y dentro de ellos los flavonoides, Salomao y colaboradores en 2008 colectaron y sometieron a un análisis de HPLC-MS 11 muestras de diferentes zonas de Brasil, entre los flavonoides encontrados están; kaempferol, kaempferide, crisina y pinobaksina, quienes atribuyen la variación de los compuestos entre los propóleos a las diferentes zonas geográficas. Bankova y colaboradores en 1998 estudiaron las variaciones estacionales en un propóleo de Brasil, encontrando que hay una variación entre los compuestos identificados mediante GC-MS, entre los compuestos de flavonoides encontrados estuvo kaempferid como el de mayor abundancia, demostraron que no infiere únicamente la zona geográfica como lo indica Salomao et al., sino también la estación del año <sup>(113) (114) (115)</sup>.

Como se observó en los resultados a pesar de que el propóleo no mostró actividad antibacteriana en una de las cuatro bacterias, tanto en las dos Gram negativa como en la Gram positiva se observa

## Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México

que tanto la concentración de 8 mg/kg, así como la concentración de 16 mg/kg mostraron el mismo efecto, obteniendo halos de inhibición similares.

Ambas concentraciones mostraron el mismo efecto en las tres Gram Negativa, en *E. aerogenes* no mostraron halos de inhibición, sin embargo, su efecto fue visible en *P. aeruginosa* y *E. coli*, en ambas bacterias mostraron halos de inhibición de 7 mm. Como menciona Tovalino y Contreras en 2010 la actividad de un propóleo depende del origen de la muestra, aunque resalta la función de los flavonoides contra microorganismos los cuales son capaces de inhibir la formación de glucano y glucosiltransferasa demostrando el efecto antimicrobiano. Esto también coincide con Carrillo y colaboradores en 2011 quienes atribuyen el efecto antimicrobiano a los fenoles, dentro de ellos a los flavonoides al poseer propiedades contra las paredes de bacterias <sup>(116)</sup> <sup>(104)</sup>.

Mientras que en *Staphylococcus aureus* hubo un aumento de los halos, los cuales fueron de 10 mm para las dos concentraciones, estos resultados coinciden con los obtenidos por Benítez y colaboradores en 2011 quienes tuvieron mayores efectos en bacterias Gram positivas mientras que el efecto fue menor en Gram Negativas, esto puede deberse a la diferencia que existe entre las paredes de las bacterias, las Gram Negativas poseen una pared celular más completa <sup>(117)</sup>.

Al probar la capacidad del EEPMe para poder inhibir la inflamación en un modelo auricular inducido por TPA, los resultados mostraron que la concentración de 300 mg/kg no mostró diferencias significativas con respecto al grupo Indometacina el cual es un anti-inflamatorio no esteroideo, los resultados muestran a nivel de histología que el propóleo logró desinflamar las orejas de los ratones, así mismo fue confirmado mediante la medición de las orejas en cortes histológicos. Núñez y colaboradores en el 2018 probaron la actividad anti-inflamatoria de un propóleo chileno, mediante el modelo de Edema auricular por TPA, encontrando que el Extracto de propóleo chileno disminuye el proceso inflamatorio de forma significativa, lo cual es atribuido a la alta concentración de polifenoles presentes. Estos resultados coinciden con los encontrados en el EEPMe, al ser la concentración de 300 mg/kg la más efectiva, puede inferirse que esta es la que contiene más concentración de fenoles y de ahí su capacidad para intervenir en el proceso inflamatorio <sup>(118)</sup>. Ledón y colaboradores en 1996 probaron la capacidad de el extracto rojo de propóleo colectado en Cuba, para ello probaron un ensayo de granuloma inducido por algodón en

ratas, los resultados indicaron que la concentración de 50 mg/kg tuvo un mayor efecto inflamatorio que la concentración de 25 mg/kg, los autores atribuyen el efecto a compuestos diferentes a los flavonoides tales como naftoquinonas, sesquiterpenos y fenoles <sup>(119)</sup>. Estos resultados confirman la capacidad anti-inflamatoria de los propóleos que tienen una mejor eficacia a una mayor concentración.

Como se describió anteriormente, las concentraciones de 200 mg/kg y 300 mg/kg del EEPMe lograron mantener los daños a nivel macroscópico por debajo del 5% en comparación con el total del estómago, a pesar de que Arai y colaboradores <sup>(120)</sup> han demostrado que usando concentraciones entre un rango de 1-30 mg/kg de indometacina incrementa la secreción ácida, así como la ulceración, el EEPMe logró disminuir considerablemente el daño en los estómagos. Sin embargo, la concentración de 100 mg/kg no mostró diferencias significativas con respecto al grupo de indometacina. Estadísticamente hablando, la concentración de 300 mg/kg no mostró diferencias significativas con respecto al grupo Omeprazol, el cual es un fármaco de primera línea, considerado un potente inhibidor selectivo de la bomba de protones de las células parietales del estómago, por lo que reduce la secreción del ácido gástrico, por inhibición de la enzima H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa, uniéndose a la bomba de protones localizada en la membrana de las células parietales gástricas inhibiendo la acción de la bomba de Na/K como menciona Arroyo y colaboradores <sup>(121)</sup>. Estos resultados demuestran que el EEPMe está protegiendo de forma efectiva contra la ulceración provocada por la Indometacina, los metabolitos identificados pudieran estar trabajando en conjunto para reducir la secreción de ácido gástrico.

Dajani y Agrawal en 1995 <sup>(122)</sup> comprobaron que los daños inducidos por indometacina van desde la supresión de la generación de prostaglandinas, sobreproducción de leucotrienos, actuando como un irritante tópico que reduce el flujo sanguíneo local. Otro tipo de daño al administrar la indometacina además de reducir la producción de prostaglandinas es el daño oxidativo el cual es un factor común en la patogénesis de la úlcera <sup>(123)</sup>.

Tal como describen Arroyo y colaboradores en el 2009, uno de los posibles mecanismos de acción gastroprotector involucra la producción de moco gástrico y/o posible antagonismo de leucotrienos

## Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México

<sup>(121)</sup>. La variada composición de los propóleos como describe Giral y colaboradores pudiera hacer que su alto contenido de compuestos explique el efecto gastroprotector <sup>(124)</sup>.

Como se mencionó anteriormente el EEPMe presenta un alto contenido de fenoles lo que le confiere su capacidad antioxidante. Gonzales y Di Stasi afirman que los agentes antioxidantes al atrapar los radicales libres previenen la formación de la lesión ulcerogénica causada por radicales libres. Dentro de los compuestos fenólicos los flavonoides han sido reportados con las propiedades antioxidantes además de fortalecer el sistema de defensa de la mucosa gástrica a través de la estimulación de la secreción de moco gástrico <sup>(125)</sup>. Los radicales libres pueden provocar una alteración a nivel mitocondrial lo que pudiera provocar una producción de especies reactivas de oxígeno, los compuestos presentes en el EEPMe podrían estar evitando la producción de las especies reactivas de oxígeno o bien cediendo electrones para neutralizarlos.

Guaraldo y colaboradores en el 2001 demostraron que los flavonoides tienen un efecto antisecretor y propiedades citoprotectoras, además se cree que aumentan la resistencia capilar y mejoran la microcirculación <sup>(126)</sup>.

Otros autores apoyan que los metabolitos secundarios mayoritarios pudieran explicar el efecto gastroprotector que presenta el EEPMe, muchos fenoles poseen propiedades antioxidantes y pueden inhibir la peroxidación lipídica *in vitro* e *in vivo*. Los componentes fenólicos, al inhibir la producción de los radicales libres y la peroxidación lipídica, pudieran favorecer el efecto antiinflamatorio y gastroprotector. Además de crear un ambiente interno con pH alcalino, pudiendo atrapar a los radicales libres además de inducir la formación de prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>) que son responsables de la secreción de la inhibición y protección contra las secreciones de ácido clorhídrico a través de la producción y la acción del moco protector. No sólo hay un aumento de prostaglandinas, sino que también de somatostatina y reducción de gastrina, los cuales son algunas de las defensas de la mucosa gástrica <sup>(127)</sup> <sup>(128)</sup> <sup>(129)</sup>. Los compuestos identificados en el EEPMe han sido reportados con actividades biomédicas como la antioxidante y gastroprotectora, un mecanismo de estos compuestos pudiera ser que además de reducir la secreción de ácido gástrico, pudieran estar protegiendo al estimular la producción de PG.

Las lesiones a nivel macroscópico nos indican que el propóleo logró reducir de manera significativa el daño, logró mantener el sangrado a niveles mínimos, así como proteger el estómago de la ulceración, para confirmar dicha protección por parte del propóleo se realizaron dos tinciones, la primera una tinción de Hematoxilina y Eosina en la cual se analizó el daño microscópico encontrando que las concentraciones de 200 mg/kg y 300 mg/kg no mostraron diferencias significativas en el índice de daño histológico realizado en comparación con el fármaco Omeprazol y la segunda tinción la cual fue la técnica de PAS, la cual nos muestra la cantidad de moco básico presente en el estómago. La capacidad del propóleo para poder reducir el daño en la arquitectura del estómago puede ser atribuido a la cantidad de polifenoles presentes, se ha reportado que durante el proceso de inflamación hay una adherencia de los neutrófilos y monocitos, lo que provoca una pérdida del epitelio y un aumento de la captación de  $O_2$  y  $H_2O_2$  <sup>(129)</sup>. La presencia de metabolitos secundarios con propiedades antioxidantes tales como algunos flavonoides presentes en el EEPMe actúan como captadores de radicales libres, reduciendo el daño y manteniendo la arquitectura del estómago, otro método por el cual suele dañarse el estómago es por el aumento de las secreciones acidas en el estómago, como reporta Arroyo y colaboradores el Omeprazol es un potente inhibidor selectivo de la bomba de protones de las células parietales del estómago, por lo que reduce la secreción del ácido gástrico, por inhibición de la enzima  $H^+/K^+$  ATPasa incrementando el pH gástrico y manteniendo la integridad del moco básico <sup>(121)</sup>, con los resultados obtenidos en la técnica de PAS, se encontró que los niveles de moco básico son ligeramente superior en los grupos tratados con propóleo lo que nos podría indicar que de alguna manera el extracto está regulando el pH gástrico y manteniendo la arquitectura del moco y las capas del estómago.

El propóleo demostró tener un efecto gastroprotector a nivel macroscópico en el área de lesión, también mostró conservar la arquitectura del estómago a nivel histológico, así como mantener una mayor cantidad de moco básico el cual es esencial para evitar el daño en las capas del estómago, por último, se realizó la medición de citocinas proinflamatorias tales como  $TNF-\alpha$  e  $IL-1\beta$ , las cuales son liberadas por macrófagos activados.

La producción tanto de  $TNF-\alpha$  como de  $IL-1\beta$  no mostraron diferencias significativas con respecto al grupo Omeprazol, demostrando que a nivel inmunológico el extracto de propóleo está mostrando tener una gran capacidad para mantener la inflamación en niveles casi basales, la

## **Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México**

concentración de 200 mg/kg no mostró diferencias con el grupo control en cuanto a la producción de IL-1 $\beta$ .

Araujo y colaboradores mencionan que un extracto de propóleo puede provocar una reducción en las citocinas pro-inflamatorias. Además, se ha sugerido que la inhibición de la activación y diferenciación de los macrófagos es uno de los posibles mecanismos subyacentes a los efectos antiinflamatorios e inmunológicos y esto es atribuido a la acción de los flavonoides <sup>(130)</sup>. Como menciona De Almeida y Menezes, el propóleo al ser una mezcla compleja, se debe considerar las interacciones sinérgicas entre los compuestos presentes y así mismo considerarse como un factor importante en las actividades anti-inflamatorias <sup>(131)</sup>.

### **Conclusiones**

- El propóleo de Mexicali tiene un efecto gastroprotector.
- El EEPMe posee una buena capacidad antioxidante.
- El EEPMe tiene actividad anti-inflamatoria.
- Disminuye los niveles de citocinas pro-inflamatorias.
- Los compuestos más abundantes en el propóleo de Mexicali son; Luteolina, Quercetina y Pinocembrina a los cuales se les puede atribuir las actividades biomédicas reportadas.

## Referencias

1. Valdivia Roldán M. Gastritis y gastropatías. *Revista de Gastroenterología del Perú*. 2011;31(1):38-48.
2. Mustafa M, Menon J, Muiandy R, Freddie R, Sein M, Fariz A. Risk factors, Diagnosis & management of Peptic ulcer disease. *IOSR Journal of Dental and Medical Science Sabah, Malaysia*. 2015;14:40-6.
3. Silva MIG, de Sousa FCF. Gastric ulcer etiology. *Peptic Ulcer Disease: InTech*; 2011. p. 3-7.
4. Rodriguez H, Loera E, Almaraz C, Jiménez N, Solano A, Jacobo J. Úlcera péptica con hemorragia. Análisis de egresos hospitalarios. *Rev Gastroent México*. 1999;63:6-11.
5. Batlouni M. Antiinflamatorios no esteroides: efectos cardiovasculares, cerebrovasculares y renales. *Arq Bras Cardiol*. 2010;94(4):538-46.
6. Longo DL. Úlcera péptica y trastornos relacionados. *Harrison: principios de medicina interna 2. 18° edición ed: McGraw Hill Mexico*; 2012. p. 2437-42.
7. NIDDK. Gastritis 2014 [updated Julio 2015. Available from: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/digestive-diseases/gastritis>.
8. Ross MH, Pawlina W. *Histología Texto y Atlas color, con Biología Celular y Molecular* Séptima edición ed: Ed. Médica Panamericana; 2012.
9. Sepúlveda Saavedra J. *Texto atlas de histología: biología celular y tisular: McGraw Hill Mexico*; 2013.
10. Ramos-Martínez E. Alteraciones histológicas de la enfermedad péptica. *Gaceta Médica de México* Vol 128, no 1, p 19-26. 1992.
11. Longo DL. *Harrison: manual de medicina (18a: McGraw Hill Mexico*; 2013.
12. FitzGerald GA, Patrono C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *New England Journal of Medicine*. 2001;345(6):433-42.
13. Regalado Veloz AI, Sánchez Perera LM, Mancebo Dorvigny B. Tratamientos convencionales y medicina alternativa de la úlcera péptica. *Revista Cubana de Farmacia*. 2012;46(1):127-37.
14. Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A, Bishop-Bailey D, Croxtall J, et al. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994;91(6):2046-50.

## Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México

15. Delgado Montero R, Flores Cortez D, Villalobos Pacheco E. Efecto del *Capsicum annum* L (pucunucho, ají mono) en úlcera gástrica experimental inducida en ratas. *Revista de Gastroenterología del Perú*. 2015;35(2):141-6.
16. Malfertheiner P, Chan FK, McColl KE. Peptic ulcer disease. *The Lancet*. 2009;374(9699):1449-61.
17. Biswas K, Bandyopadhyay U, Chattopadhyay I, Varadaraj A, Ali E, Banerjee RK. A novel antioxidant and antiapoptotic role of omeprazole to block gastric ulcer through scavenging of hydroxyl radical. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(13):10993-1001.
18. Fernández Travieso JC. Incidencia actual de la gastritis: una breve revisión. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2014;45(1):10-7.
19. Palacios-Espinosa F, Escobedo-Hinojosa W, Romero I. Panorama actual del estudio de las plantas con actividad anti-*Helicobacter pylori*. *TIP Revista especializada en ciencias químico-biológicas*. 2011;14(1):51-61.
20. Oramas Díaz J, Rodríguez Luis I. La información científica y la medicina tradicional y natural. *Resumed*. 1999;12(1):39-46.
21. Peña A, Paco O, editors. *Medicina alternativa: intento de análisis*. Anales de la Facultad de Medicina; 2007: UNMSM. Facultad de Medicina.
22. Durán García R, Méndez González M. Medicina tradicional y las plantas medicinales en el contexto actual. *Herbario CICY*. 2015:165-8.
23. Callies O. La farmacia naturaleza fuente de fármacos en el siglo XXI. *Ciencia Amazónica (Iquitos)*. 2011;1(2):149-53.
24. Borrelli F, Izzo AA. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytotherapy Research*. 2000;14(8):581-91.
25. Londoño-Orozco A, Pinieres-Carrillo JG, García-Tovar CG, Carrillo L, Quintero-Mora ML, García-Vásquez SE, et al. Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja *Apis mellifera* proveniente del estado de México. *Revista Tecnología en Marcha*. 2008;21(1):49-55.
26. Sforcin JM, Bankova V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *Journal of ethnopharmacology*. 2011;133(2):253-60.
27. Silva JC, Rodrigues S, Feás X, Estevinho LM. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. *Food and Chemical Toxicology*. 2012;50(5):1790-5.



28. Alves Ferreira Bastos E, Guzmán D, Figueroa J, Tello J, De Oliveira Scoaris D. Caracterización antimicrobiana y fisicoquímica de propóleos de *Apis mellifera* L.(Hymenoptera: Apidae) de la región andina colombiana. *Acta Biológica Colombiana*. 2011;16(1):175-84.
29. Salatino A, Fernandes-Silva CC, Righi AA, Salatino MLF. Propolis research and the chemistry of plant products. *Natural product reports*. 2011;28(5):925-36.
30. Gülçin I, Bursal E, Şehitoğlu MH, Bilsel M, Gören AC. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food and Chemical Toxicology*. 2010;48(8):2227-38.
31. Vargas-Sánchez R, Torrescano-Urrutia G, Mendoza-Wilson A, Vallejo-Galland B, Acedo-Félix E, SánchezEscalante J. Mecanismos involucrados en la actividad antioxidante y antibacteriana del propóleos. *Biocencia*. 2014;16(1):32-7.
32. Castaldo S, Capasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*. 2002;73:S1-S6.
33. Peña RC. Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. *Ciencia e investigación agraria*. 2008;35(1):17-26.
34. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Álvarez J. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of food science*. 2008;73(9).
35. Teixeira EW, Negri G, Salatino A, Stringheta PC. Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian propolis samples. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2010;7(3):307-15.
36. Liu C-F, Lin C-C, Lin M-H, Lin Y-S, Lin S-C. Cytoprotection by Propolis Ethanol Extract of Acute Absolute Ethanol-Induced Gastric Mucosal Lesions. *The American Journal of Chinese Medicine*. 2002;30(02n03):245-54.
37. de Barros MP, Sousa JPB, Bastos JK, de Andrade SF. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007;110(3):567-71.
38. Barros MPd, Lemos M, Maistro EL, Leite MF, Sousa JPB, Bastos JK, et al. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008;120(3):372-7.
39. Marivane L, Primon BM, Barreto SJP, Silva FAAd, Kenupp BJ, Faloni AS. *Baccharis dracunculifolia*, the main botanical source of Brazilian green propolis, displays antiulcer activity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2007;59(4):603-8.
40. Domínguez XA. Métodos de investigación fitoquímica. 1973.

## Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México

41. Singleton V, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*. 1965;16(3):144-58.
42. Ramamoorthy PK, Bono A. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. *Journal of Engineering Science and Technology*. 2007;2(1):70-80.
43. Murillo Franco E. Actividad antioxidante in vitro de las bebidas de frutas. *Bebidas-Alfa Editores Técnicos*, Junio/Julio. 2006:20-7.
44. Bershe D, Vlietnick A. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants, In *methods in plant biochemistry*. Academic press: London, VI. 1991:47-69.
45. De Young L, Kheifets J, Ballaron S, Young J. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Inflammation Research*. 1989;26(3):335-41.
46. Prophet E, Mills B, Arrington J, Sobin L. *Manual de métodos histotecnológicos del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América*. Traducción de la 5ª Edición inglesa Washington. 1995.
47. Shah A, Khan Z, Baig M, Qureshi S, Al-Bekairi A. Gastroprotective effects of pretreatment with *Zizyphus sativa* fruits against toxic damage in rats. *Fitoterapia*. 1997;68(3):226-34.
48. Al-Fatimi M, Wurster M, Schröder G, Lindequist U. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. *Journal of ethnopharmacology*. 2007;111(3):657-66.
49. Wang S-J, Tong Y, Lu S, Yang R, Liao X, Xu Y-F, et al. Anti-inflammatory activity of myricetin isolated from *Myrica rubra* Sieb. et Zucc. leaves. *Planta medica*. 2010;76(14):1492-6.
50. Gordon MH, Roedig-Penman A. Antioxidant activity of quercetin and myricetin in liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids*. 1998;97(1):79-85.
51. Roedig-Penman A, Gordon MH. Antioxidant properties of myricetin and quercetin in oil and emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1998;75(2):169-80.
52. Pekkarinen SS, Heinonen IM, Hopia AI. Flavonoids quercetin, myricetin, kaemferol and (+)-catechin as antioxidants in methyl linoleate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1999;79(4):499-506.
53. Moser BR. Efficacy of myricetin as an antioxidant in methyl esters of soybean oil. *European journal of lipid science and technology*. 2008;110(12):1167-74.

54. Marinova E, Toneva A, Yanishlieva N. Synergistic antioxidant effect of  $\alpha$ -tocopherol and myricetin on the autoxidation of triacylglycerols of sunflower oil. *Food chemistry*. 2008;106(2):628-33.
55. Cespedes CL. Anti-inflammatory, Antioedema and Gastroprotective Activities of *Aristolelia chilensis* Extracts, Part 2. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2010;9(6).
56. Comalada M, Camuesco D, Sierra S, Ballester I, Xaus J, Gálvez J, et al. In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF- $\kappa$ B pathway. *European journal of immunology*. 2005;35(2):584-92.
57. Kim HK, Namgoong SY, Kim HP. Antiinflammatory activity of flavonoids: Mouse ear edema inhibition. *Archives of Pharmacal Research*. 1993;16(1):18.
58. Hämäläinen M, Nieminen R, Vuorela P, Heinonen M, Moilanen E. Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF- $\kappa$ B activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF- $\kappa$ B activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators of inflammation*. 2007;2007.
59. Hirano R, Sasamoto W, Matsumoto A, Itakura H, Igarashi O, Kondo K. Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *Journal of nutritional science and vitaminology*. 2001;47(5):357-62.
60. von Gadow A, Joubert E, Hansmann CF. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*),  $\alpha$ -tocopherol, BHT, and BHA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1997;45(3):632-8.
61. Braca A, Sortino C, Politi M, Morelli I, Mendez J. Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. *Journal of ethnopharmacology*. 2002;79(3):379-81.
62. Pinelo M, Manzocco L, Nunez MJ, Nicoli MC. Solvent effect on quercetin antioxidant capacity. *Food Chemistry*. 2004;88(2):201-7.
63. Jovanovic SV, Steenken S, Hara Y, Simic MG. Reduction potentials of flavonoid and model phenoxyl radicals. Which ring in flavonoids is responsible for antioxidant activity? *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*. 1996(11):2497-504.
64. de la Lastra A, Martin MJ, Motilva V. Antiulcer and gastroprotective effects of quercetin: a gross and histologic study. *Pharmacology*. 1994;48(1):56-62.
65. Martin M, La-Casa C, Alarcon-de-La-Lastra C, Cabeza J, Villegas I, Motilva V. Antioxidant mechanisms involved in gastroprotective effects of quercetin. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 1998;53(1-2):82-8.

## Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México

66. Kahraman A, Erkasap N, Köken T, Serteser M, Aktepe F, Erkasap S. The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. *Toxicology*. 2003;183(1-3):133-42.
67. Martin M, Motilva V, ÓN de la Lastra CA. Quercetin and naringenin; effects on ulcer formation and gastric secretion in rats. *Phytotherapy Research*. 1993;7(2):150-3.
68. Kimata M, Inagaki N, Nagai H. Effects of luteolin and other flavonoids on IgE-mediated allergic reactions. *Planta medica*. 2000;66(01):25-9.
69. Kimata M, Shichijo M, Miura T, Serizawa I, Inagaki N, Nagai H. Effects of luteolin, quercetin and baicalein on immunoglobulin E-mediated mediator release from human cultured mast cells. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2000;30(4):501-8.
70. Lee SJ, Son KH, Chang HW, Do JC, Jung KY, Kang SS, et al. Antiinflammatory activity of naturally occurring flavone and flavonol glycosides. *Archives of Pharmacal Research*. 1993;16(1):25.
71. Ashokkumar P, Sudhandiran G. Protective role of luteolin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against azoxymethane-induced experimental colon carcinogenesis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2008;62(9):590-7.
72. Leopoldini M, Pitarch IP, Russo N, Toscano M. Structure, conformation, and electronic properties of apigenin, luteolin, and taxifolin antioxidants. A first principle theoretical study. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2004;108(1):92-6.
73. Min YS, Bai KL, Yim SH, Lee YJ, Song HJ, Kim JH, et al. The effect of luteolin-7-O- $\beta$ -D-glucuronopyranoside on gastritis and esophagitis in rats. *Archives of pharmacal research*. 2006;29(6):484.
74. Harasstani OA, Moin S, Tham CL, Liew CY, Ismail N, Rajajendram R, et al. Flavonoid combinations cause synergistic inhibition of proinflammatory mediator secretion from lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 cells. *Inflammation research*. 2010;59(9):711-21.
75. Kowalski J, Samojedny A, Paul M, Pietsz G, Wilczok T. Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the expression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha genes in J774. 2 macrophages. *Pharmacological reports: PR*. 2005;57(3):390-4.
76. Teffo LS, Aderogba M, Eloff JN. Antibacterial and antioxidant activities of four kaempferol methyl ethers isolated from *Dodonaea viscosa* Jacq. var. *angustifolia* leaf extracts. *South African Journal of Botany*. 2010;76(1):25-9.
77. Marković JMD, Amić D, Lučić B, Marković ZS. Oxidation of kaempferol and its iron (III) complex by DPPH radicals: spectroscopic and theoretical study. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*. 2014;145(4):557-63.

78. Park JS, Rho HS, Kim DH, Chang IS. Enzymatic preparation of kaempferol from green tea seed and its antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2006;54(8):2951-6.
79. Beber AP, de Souza P, Boeing T, Somensi LB, Mariano LNB, Cury BJ, et al. Constituents of leaves from *Bauhinia curvula* Benth. exert gastroprotective activity in rodents: role of quercitrin and kaempferol. *Inflammopharmacology*. 2018;26(2):539-50.
80. Lin C-C, Shieh D-E. The anti-inflammatory activity of *Scutellaria rivularis* extracts and its active components, baicalin, baicalein and wogonin. *The American journal of Chinese medicine*. 1996;24(01):31-6.
81. Shen Y-C, Chiou W-F, Chou Y-C, Chen C-F. Mechanisms in mediating the anti-inflammatory effects of baicalin and baicalein in human leukocytes. *European journal of pharmacology*. 2003;465(1-2):171-81.
82. Hideaki H, Takayuki S, Hiroshi O, Kenichi A, Yoshio T, Yuji S, et al. Effects of baicalein and  $\alpha$ -tocopherol on lipid peroxidation, free radical scavenging activity and 12-O-tetradecanoylphorbol acetate-induced ear edema. *European journal of pharmacology*. 1992;221(2-3):193-8.
83. Kang KA, Zhang R, Piao MJ, Chae S, Kim HS, Park JH, et al. Baicalein inhibits oxidative stress-induced cellular damage via antioxidant effects. *Toxicology and industrial health*. 2012;28(5):412-21.
84. Shao Z-H, Vanden Hoek TL, Qin Y, Becker LB, Schumacker PT, Li C-Q, et al. Baicalein attenuates oxidant stress in cardiomyocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2002;282(3):H999-H1006.
85. Gao Z, Huang K, Yang X, Xu H. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 1999;1472(3):643-50.
86. Lapchak P, Maher P, Schubert D, Zivin J. Baicalein, an antioxidant 12/15-lipoxygenase inhibitor improves clinical rating scores following multiple infarct embolic strokes. *Neuroscience*. 2007;150(3):585-91.
87. van Leyen K, Kim HY, Lee S-R, Jin G, Arai K, Lo EH. Baicalein and 12/15-lipoxygenase in the ischemic brain. *Stroke*. 2006;37(12):3014-8.
88. Rehman MU, Tahir M, Khan AQ, Khan R, Lateef A, Qamar W, et al. Chrysin suppresses renal carcinogenesis via amelioration of hyperproliferation, oxidative stress and inflammation: plausible role of NF- $\kappa$ B. *Toxicology letters*. 2013;216(2-3):146-58.

## Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México

89. Sathiavelu J, Senapathy GJ, Devaraj R, Namasivayam N. Hepatoprotective effect of chrysin on prooxidant-antioxidant status during ethanol-induced toxicity in female albino rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2009;61(6):809-17.
90. Sultana S, Verma K, Khan R. Nephroprotective efficacy of chrysin against cisplatin-induced toxicity via attenuation of oxidative stress. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2012;64(6):872-81.
91. George MY, Esmat A, Tadros MG, El-Demerdash E. In vivo cellular and molecular gastroprotective mechanisms of chrysin; Emphasis on oxidative stress, inflammation and angiogenesis. *European journal of pharmacology*. 2018;818:486-98.
92. Soromou LW, Chu X, Jiang L, Wei M, Huo M, Chen N, et al. In vitro and in vivo protection provided by pinocembrin against lipopolysaccharide-induced inflammatory responses. *International immunopharmacology*. 2012;14(1):66-74.
93. Sala A, Recio MC, Schinella GR, Mániz S, Giner RM, Cerdá-Nicolás M, et al. Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. *European Journal of Pharmacology*. 2003;461(1):53-61.
94. Ma Y, Li L, Kong L, Zhu Z, Zhang W, Song J, et al. Pinocembrin Protects Blood-Brain Barrier Function and Expands the Therapeutic Time Window for Tissue-Type Plasminogen Activator Treatment in a Rat Thromboembolic Stroke Model. *BioMed research international*. 2018;2018.
95. Saad MA, Salam RMA, Kenawy SA, Attia AS. Pinocembrin attenuates hippocampal inflammation, oxidative perturbations and apoptosis in a rat model of global cerebral ischemia reperfusion. *Pharmacological Reports*. 2015;67(1):115-22.
96. Barriga-González G, Chamorro E, Salinas M, Modak B, Olea-Azar C. Evaluation of the antioxidant activity of the flavonoids isolated from *heliotropium sinuatum* resin using orac fl, dpph and esr methodologies. *Journal of the Chilean Chemical Society*. 2016;61(3):3125-9.
97. Lee J-H, Zhou HY, Cho SY, Kim YS, Lee YS, Jeong CS. Anti-inflammatory mechanisms of apigenin: inhibition of cyclooxygenase-2 expression, adhesion of monocytes to human umbilical vein endothelial cells, and expression of cellular adhesion molecules. *Archives of pharmacal research*. 2007;30(10):1318-27.
98. Van Acker SA, Tromp MN, Griffioen DH, Van Bennekom WP, Van Der Vijgh WJ, Bast A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*. 1996;20(3):331-42.
99. Nielsen S, Young JF, Daneshvar B, Lauridsen S, Knuthsen P, Sandström B, et al. Effect of parsley (*Petroselinum crispum*) intake on urinary apigenin excretion, blood antioxidant enzymes and biomarkers for oxidative stress in human subjects. *British Journal of Nutrition*. 1999;81(6):447-55.

100. Al Shaal L, Shegokar R, Müller RH. Production and characterization of antioxidant apigenin nanocrystals as a novel UV skin protective formulation. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011;420(1):133-40.
101. Min Y, Yim S, Bai K, Choi H, Jeong J, Song H, et al. The effects of apigenin-7-O- $\beta$ -d-glucuronopyranoside on reflux oesophagitis and gastritis in rats. *Autonomic and Autacoid Pharmacology*. 2005;25(3):85-91.
102. Khajuria V, Gupta S, Sharma N, Kumar A, Lone NA, Khullar M, et al. Anti-inflammatory potential of hentriacontane in LPS stimulated RAW 264.7 cells and mice model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;92:175-86.
103. Kim SJ, Chung WS, Kim SS, Ko SG, Um JY. Antiinflammatory Effect of Oldenlandia diffusa and its Constituent, Hentriacontane, through Suppression of Caspase-1 Activation in Mouse Peritoneal Macrophages. *Phytotherapy Research*. 2011;25(10):1537-46.
104. Carrillo ML, Castillo LN, Mauricio R. Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de la Huasteca Potosina (México). *Información tecnológica*. 2011;22(5):21-8.
105. Bedascarrasbure E, Maldonado L, Álvarez A, Rodriguez E. Contenido de fenoles y flavonoides del propoleos argentino. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. 2004;23:369-72.
106. Palomino LR, García CM, Gil JH, Rojano BA, Durango DL. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). *Vitae*. 2009;16(3).
107. Chaillou LL, Herrera HA, Maidana JF. Estudio del propóleos de Santiago del Estero, Argentina. *Food Science and Technology (Campinas)*. 2004;24(1):11-5.
108. Yoong K, Aura M. Caracterización físico-química del propóleo de la Escuela Agrícola Panamericana y su efecto antioxidante en aceite de soya. 2004.
109. Manrique AJ, Santana WC. Flavonoides, actividades antibacteriana y antioxidante de propóleos de abejas sin aguijón, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* y *Nannotrigona* sp. de Brasil y Venezuela. *Zootecnia Trop*. 2008;26(2):157-66.
110. Bermúdez-Camps I, Reyes-Hernández I, León-Fernández OS. Evaluación de la actividad antioxidante del propóleos de la región de Manzanillo. Provincia Granma. Cuba. *Bioquímica*. 2000;25(3).
111. Zapata Bustamante S, Tamayo Tenorio A, Rojano BA. Efecto del tostado sobre los metabolitos secundarios y la actividad antioxidante de clones de cacao colombiano. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*. 2015;68(1).

## Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México

112. Schinella G, Mosca S, Cienfuegos-Jovellanos E, Pasamar MÁ, Muguersa B, Ramón D, et al. Antioxidant properties of polyphenol-rich cocoa products industrially processed. *Food Research International*. 2010;43(6):1614-23.
113. Delgado Aceves MdL, Andrade Ortega JÁ, Ramírez Barragán CA. Caracterización fisicoquímica de propóleos colectados en el Bosque La Primavera Zapopan, Jalisco. *Revista mexicana de ciencias forestales*. 2015;6(28):74-87.
114. Salomao K, Pereira PRS, Campos LC, Borba CM, Cabello PH, Marcucci MC, et al. Brazilian propolis: correlation between chemical composition and antimicrobial activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2008;5(3):317-24.
115. Bankova V, Boudourova-Krasteva G, Popov S, Sforcin JM, Funari SRC. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. *Apidologie*. 1998;29(4):361-7.
116. Tovalino FRM, Contreras SS. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa-Perú sobre cultivos de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). *Revista Estomatológica Herediana*. 2010;20(1):19-24.
117. Benítez N, Ortega NS, Fajardo FC. Actividad antibacteriana y composición cualitativa de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del Departamento del Cauca. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*. 2011;9(1):8-16.
118. Núñez D, Balboa N, Alvear M, Ceron A, Abarzua K, Vasconcellos A. Evaluación de la Actividad Anti-inflamatoria de Propóleos Chileno sobre Cortes Histológicos de Orejas de Ratón. *International Journal of Morphology*. 2018;36(1):189-93.
119. Ledón N, Casacó A, González R, Merino N, González A, Tolón Z. Efectos antipsoriásico, antiinflamatorio y analgésico del propoleo rojo colectado en Cuba. *Revista Cubana de Farmacia*. 1996;30:0-.
120. Arai I, Hirose H, Usuki C, Muramatsu M, Aihara H. Effects of indomethacin and cold-stress on gastric acid secretion and ulceration. The effects of anti-acid secretory agents in rats. *Research communications in chemical pathology and pharmacology*. 1987;57(3):313-27.
121. Arroyo J, Almora Y, Quino M, Martínez J, Condorhuamán M, Flores M, et al., editors. Efecto citoprotector y antiselector del aceite de *Copaifera officinalis* en lesiones gástricas inducidas en ratas. *Anales de la Facultad de Medicina*; 2009: UNMSM. Facultad de Medicina.
122. Dajani E, Agrawal N. Prevention and treatment of ulcers induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: an update. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*. 1995;46(1):3-16.
123. Arroyo J, Bonilla P, Moreno-Exebio L, Ronceros G, Tomás G, Huamán J, et al. Efecto gastroprotector y antiselector de un fitofármaco de hojas de matico (*Piper aduncum*). *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2013;30:608-15.



124. Giral T, Achong M, Fernandez S, Rodriguez A, EEA EEA. Acciones del propóleos en la secreción acido-gastrica. 2000;2.
125. Gonzalez FG, Di Stasi LC. Anti-ulcerogenic and analgesic activities of the leaves of *Wilbrandia ebracteata* in mice. *Phytomedicine*. 2002;9(2):125-34.
126. Guaraldo L, Sertiè JAA, Bacchi EM. Antiulcer action of the hydroalcoholic extract and fractions of *Davilla rugosa* Poiret in the rat. *Journal of Ethnopharmacology*. 2001;76(2):191-5.
127. Cárdenas MB, Ranzola RM, Jiménez EM, Álvarez CS. Efecto gastroprotector del fruto de la musa ABB sobre las úlceras experimentales inducidas por indometacina. *Medicentro Electrónica*. 2008;12(1).
128. Llontop LFG, Quevedo JL. Efecto gastroprotector del extracto total de *Solanum tuberosum* L. var. "papa blanca" y *Croton lechleri* L. "sangre de grado" EN *Rattus rattus* var. *albinus* con daño gástrico por acción del etanol. *sciéndo*. 2014;15(2).
129. Huamán O, Sandoval M, Arnao I, Béjar E. Efecto antiulceroso del extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de *Bixa orellana* (achiote), en ratas. *Anales de la Facultad de Medicina*. 2009;70:97-102.
130. Araujo MA, Libério SA, Guerra RN, Ribeiro MNS, Nascimento FR. Mechanisms of action underlying the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of propolis: a brief review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2012;22(1):208-19.
131. De Almeida E, Menezes H. Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review. *Journal of Venomous Animals and Toxins*. 2002;8(2):191-212.

# **Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México**

## **Apéndices**

### **Apéndice 1**

#### **Técnica de maceración**

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 y la penetración de la luz.

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**

#### **Determinación de la concentración de fenoles totales (CFT)**

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 agregará 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  $\mu$ L y se agrega 750  $\mu$ L 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  $\mu$ L de reactivo Folin-Ciocalteu. Después de cinco minutos se añade 1.5 mL de una solución  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (200 g/L) y agua hasta completar un volumen de 10 mL. Después de dos horas de reacción a temperatura ambiente se determina la absorbancia a 760 nm. 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	[Ácido gálico] mg/mL	$\mu$ L patrón	$\mu$ L agua destilada	mL Agua destilada
(Blanco)		-	-	1	7
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

## Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México

P (problema)	-	250	750	7
--------------	---	-----	-----	---

### Apéndice 3

#### Cuantificación de flavonoides totales

La concentración de flavonoides se mide por espectrofotometría utilizando cloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ). 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 a una longitud de onda de 425 nm 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  $\text{AlCl}_3$  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 en 3 anillos y 5 grupos hidroxilo. Se utiliza una solución estándar de quercetina (1mg /1 mL), a partir de esta solución se toman las alícuotas correspondientes para las diferentes concentraciones (1-100 ppm, 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  $\text{AlCl}_3$  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  $\text{AlCl}_3$  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 mL de metanol sin  $\text{AlCl}_3$ . El control negativo se prepara con 1mL de metanol más 1 mL de la solución de  $\text{AlCl}_3$  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  $\mu$ L, se emplearán 2 mg de quercetina en 2 mL de MeOH.

[ ] ppm	$\mu$ L STOCK	$\mu$ L MeOH	(AlCl <sub>3</sub> ) al 2% mL
1	1	999	1
2	2	998	1
3	3	997	1
4	4	996	1
5	5	995	1
6	6	994	1
7	7	993	1
8	8	992	1
9	9	991	1
10	10	990	1
20	20	980	1
30	30	970	1
40	40	960	1
50	50	950	1
60	60	940	1
70	70	930	1
80	80	920	1

## Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México

<b>90</b>	90	910	1
<b>100</b>	100	900	1
<b>problema</b>	1	0	1

### 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 ( $\text{AlCl}_3$ ) 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 ( $\text{AlCl}_3$ ).

### 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 4

### Capacidad antioxidante (DPPH)

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 5 mg de muestra en 5 ml de MeOH

Las concentraciones del extracto o fracción a probar son las siguientes 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 (5 mg de muestra en 5 mL) tomar 10  $\mu\text{L}$  y disolverlos en 90  $\mu\text{L}$**

de MeOH

[ ] ppm	$\mu\text{L}$ stock	$\mu$ MeOH
1	10	990
2	20	980
3	30	970
4	40	960
5	50	950
<b>Del stock (5 mg de muestra en 5 mL)</b>		
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
150	15	985
200	20	980
250	25	975
300	30	970
350	35	965
400	40	960
450	45	955
500	50	950

## Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México

Aplicación de extractos: En la placa de ELISA se adicionarán 50 µL de la solución problema a diferentes concentraciones (1-500 ppm) por triplicado, el solvente utilizado será metanol grado HPLC. Posteriormente a cada pozo con las concentraciones señaladas, se adicionará 150 µL de una solución metanólica de DPPH; inmediatamente se protegerá de la luz y se mantendrá en agitación constante durante 30 min a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo se determinará la absorbancia a 540 nm en un lector de ELISA.

Blanco: pozos con 200 µL de metanol

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

Interpretación de resultados: se reportará obteniendo el porcentaje de reducción y se calculará 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).

### Apéndice 5

#### Técnica histológica

##### 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

**Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto etanólico de un propóleo de México**

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

**Tinción de Azul de Alcian**

<i>No.</i>	<i>Alcohol</i>	<i>Tiempo</i>
1	Xilol I	10 minutos
2	Alcohol- Xilol	3 minutos
3	Alcohol etílico 100%	3 minutos
4	Alcohol etílico 90 %	2 minutos
5	Alcohol etílico 80%	2 minutos
6	Alcohol etílico 70 %	2 minutos
7	Agua corriente	3 lavados
8	Azul de Alcian	90 minutos
9	Agua corriente	5 lavados
10	Hematoxilina	8 lavados
11	Agua corriente	5 lavados
12	Ácido clorhídrico al 0.25%	5 segundos
13	Agua corriente	5 lavado

14	Agua amoniaca 0.25%	3 segundos
15	Agua corriente	5 lavados
16	Alcohol etílico 70%	1 minuto
17	Eosina	15 lavados
18	Alcohol etílico 96%	1 minuto
19	Alcohol etílico 100%	1 minuto
20	Xilol III	Montar

### Tinción de P.A.S. o Reacción del Ácido Peryódico de Schiff

Técnica.

<i>No.</i>	<i>Alcohol</i>	<i>Tiempo</i>
1	Ácido pervódico	10 minutos
2	Agua destilada	3 cambios
3	Secar bien el tejido	
4	Reactivo de Schiff	2 a 15 minutos
5	Agua corriente en chorro (Hasta color rosa pálido)	15 minutos
6	Hematoxilina de Harris	1 a 5 minutos
7	Lavar, decolorar y virar	
8	Deshidratar, aclarar y montar en resina	

Resultados.

Glucógeno, mucina y algunas membranas basales.

De rojo a púrpura.

Hongos.

De rojo a púrpura.

Núcleos.

Azul.