



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

TESIS DE LICENCIATURA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

“EFECTO HIPOGLUCEMIANTE DEL PROPÓLEO DE
CHIHUAHUA EN UN MODELO DE DIABETES MELLITUS”

PRESENTA

MIGUEL ÁNGEL VILLANUEVA CAMPOS

DIRECTOR:

DR. MARCO AURELIO RODRÍGUEZ MONROY

AVENIDA DE LOS BARRIOS NÚMERO 1, COLONIA LOS REYES
IZTACALA TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO, C.P. 54090, 2015

LABORATORIO DE INMUNOBIOLOGÍA L-321

dr.marcorodriguez@gmail.com; miguebiol@gmail.com





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.

AGRADECIMIENTOS

**Facultad de Estudios Superiores Iztacala
Universidad Nacional Autónoma de México.**

Este trabajo fue financiado por el **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)** proyectos IN213713 y IN211614.

Al Comité Tutorial:

Dr. Maximiliano Ibarra Barajas.

Dr. Alonso Antonio Vilches Flores.

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy.

Dra. M. Margarita Canales Martínez.

M.C. Oscar de Jesús Nieto Yáñez

A la M. en C. Nelly Rivera Yáñez, por trabajar en colaboración.

Dedicatorias

Numerosas personas de manera directa o indirecta han participado en la realización de este, mi proyecto de tesis. Hoy, que he finalizado este trabajo quiero dejar constancia de todos ellos y expresarles mi más sincero agradecimiento.

A mi madre

Que has mostrado con tu existencia que cada día es diferente al anterior, con tu constancia me has mostrado que es una forma de vida, tu cariño maternal me ha alentado para seguir estudiando, y que todo sucede porque uno lo propone e induce para que suceda.

A mi padre

Por permitirme elegir mi camino, gracias por tu esfuerzo, paciencia y apoyo económico durante ese tiempo, que me ha servido para concluir esta etapa. Eres de los pocos hombres que admiro, porque con tu esfuerzo y constancia siempre has velado por el bienestar de la familia.

Gracias a ustedes por ser mis padres, esta tesis se las dedico porque es un logro en familia.

A mis hermanos

Adrián

Por mostrar la diversión, la calma, en cualquier momento, con todos los amigos y que siempre estuvimos en todos los momentos tanto buenos como malos, siempre creí que contabas con migo, ahora sé que siempre cuento contigo.

Rosalba

Por tu gran curiosidad por lo desconocido, por lo nuevo y divertido.

A mi Bulu

Que has estado a mi lado antes de que todo esto fuera posible, con tu amor, cariño y disparates me han llenado de alegrías, además de apoyarme en mi ausencia en diversas tareas

A mi tutor Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy

Con liderazgo y calidez de amistad han hecho posible que culmine esta etapa académica, ha sido todo un placer poder pertenecer a su equipo académico con un sentido familiar.

A mi M. en C. Nelly Rivera Yáñez

Por todo el trabajo y apoyo que has tenido a lo largo de este tiempo, me es muy gratificante haber podido estar en colaboración contigo.

A mi M. en C. Oscar

Por las múltiples enseñanzas, y sentido de equipo, me han hecho darme cuenta que todo conocimiento es aplicable, eres el chico discovery.

A Dr. Alonso Antonio Vilches Flores.

Por enseñarme la primera técnica para esta tesis que aún sigo realizando

A Dr. M. Margarita Canales Martínez

Por el grandísimo apoyo de abrir su laboratorio para realizar parte del proyecto ya culminado, además de su tiempo para la explicación de algo no comprendido

A ti Alonso

Por ser un ejemplo en la culminación de mi carrera, y de tu sinceridad ante todo

A mis tíos (as) los (as) latosos (as) que siempre preguntaban por mi titulación

A todos los del laboratorio

Judith por el apoyo en histología

A Vane, Rubén, Acoyani, Gustavo, Ana, Mario, Daniela, pili, y a los de farmacología.

A todos ustedes porque jamás hubo algún momento incomodo, y su amistad tan desinteresada brindada.

Índice

Resumen.....	1
Introducción	2
Diabetes mellitus.....	2
Clasificación.....	2
Alteraciones metabólicas	3
Complicaciones de la DM.....	4
Tratamiento de la DM	5
Medicamentos	6
Propóleo	10
Hipótesis.....	12
Objetivo general.....	13
Objetivos específicos.....	13
Materiales y métodos.	14
Características organolépticas del propóleo de Chihuahua	14
Extracto etanólico de propóleo.....	14
Animales.....	14
Grupos experimentales	15
Evaluación del EEPCh en ratones diabéticos.....	15
La Inducción de diabetes por STZ se realizó.....	15
Efecto del propóleo sobre el tamaño de los islotes del páncreas mediante la técnica de Histología.....	15
Obtención de suero.....	16
Determinar el efecto del propóleo en el contenido de insulina en suero mediante la técnica de ELISA sandwich.....	16
Capacidad antioxidante por la técnica de reducción de DPPH	16
Fenoles totales	16
Flavonoides totales	16
Caracterización química	16
Estadístico	17
Resultados	18
Características organolépticas	18

Rendimiento del propóleo	18
Efecto del EEPCh sobre los niveles de glucosa.....	18
Peso corporal durante la administración del EEPCh.....	19
Efecto del EEPCh sobre el área de los islotes del páncreas	20
Cuantificación de la secreción de insulina en sangre periférica por la técnica de ELISA sandwich	21
Capacidad antioxidante del EEPCh.....	22
Determinación de fenoles totales.....	23
Determinación de flavonoides totales	23
Caracterización de la composición química del propóleo mediante el Análisis de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).	24
Discusión	28
Conclusiones	31
APÉNDICES	32
(APÉNDICE 1).....	32
Técnica de Maceración.....	32
(APÉNDICE 2).....	32
Inducción de diabetes	32
(APÉNDICE 3).....	33
Obtención de muestras de páncreas para histología.....	33
(APÉNDICE 3.1).....	33
(APÉNDICE 4).....	34
TECNICA DE HISTOLOGIA	34
(APÉNDICE 4.1).....	37
(APÉNDICE 4.2).....	39
(APÉNDICE 5).....	43
Actividad antioxidante	43
(APÉNDICE 6).....	44
Contenido de Fenoles Totales (CFT).....	44
(APÉNDICE 7).....	46
Flavonoides totales	46
Bibliografía	48

Lista de abreviaturas

ADA: Asociación Americana de Diabetes

ADN: ácido desoxirribonucleico

AMPk: adenosina monofosfato cíclico

ATP: adenosina trifosfato

β: beta

CA: capacidad antioxidante

CFT: contenido de fenoles totales

CPH: Complejo Principal de Histocompatibilidad

DM: Diabetes Mellitus

DMT1: Diabetes Mellitus Tipo 1

DMT2: Diabetes Mellitus Tipo 2

DPP4: dipeptidil peptidasa 4

DPPH: 2,2,-difenil-1-picrilhidracil

EEPCh: extracto etanólico de propóleo de Chihuahua

ELISA: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

eQ: equivalentes de quercetina

GD: grupo diabético

GDT: grupo diabético tratado con propóleo

GIP: polipeptido insulínico dependiente de glucosa

GLP1: glucagón ligado a receptor 1

GLUT4: transportador de glucosa tipo 4

GS: grupo no diabético

HPLC: cromatografía de alta resolución

H y E: hematoxilina y eosina

IL2: interleucina tipo 2

OMS: Organización Mundial de la Salud

PPARY: proliferadores peroxisomales

Rpm: revoluciones por minuto

STZ: estreptozotocina

TNF α : factor de necrosis tumoral alfa

Resumen

El propóleo es un producto apícola colectado y procesado por las abejas, su composición es variable y se ha encontrado que su actividad biológica es diferente dependiendo de la zona geográfica y climática. Sin embargo se le han demostrado versátiles actividades farmacológicas: antibacteriano, antifúngico, antiviral, antiinflamatorio, hepatoprotector, antioxidante, antitumoral, inmunoestimulante, antiprotozoario, anestésico, regeneración tisular y como tratamiento para la diabetes. La Diabetes Mellitus (DM) es un conjunto de trastornos metabólicos de distinta etiología caracterizado por hiperglucemia y aunque los tratamientos para éste padecimiento son abundantes, estos son costosos y provocan efectos adversos, por lo que la medicina alternativa ofrece para muchos pacientes un recurso terapéutico muy importante. En la búsqueda de nuevas alternativas hipoglucemiantes, se ha demostrado que algunos propóleos pueden reducir los niveles de glucosa sanguínea. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto hipoglucemiante del extracto etanólico de propóleo de Chihuahua (EEPCh) en un modelo experimental de DM. Se determinó el efecto del EEPCh sobre los niveles de glucosa en sangre, pérdida de peso corporal, producción de insulina, tamaño de los islotes pancreáticos y se determinaron los antioxidantes en 2,2-Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH), fenoles totales y flavonoides. Los resultados fueron una disminución de la glucemia en el Grupo Diabético tratado con propóleo (GDT) (350mg/dL) respecto al Grupo Diabético (GD) (600mg/dL) y menor pérdida de peso corporal del GDT. La secreción de insulina presentó diferencias significativas entre el GD (ausencia completa de insulina) mientras que el grupo GDT fue en promedio 0.4ng/mL en suero, el tamaño de los islotes pancreáticos en el GDT presentó un efecto protector. La Capacidad Antioxidante del propóleo fue de $CA_{50}=69.53\mu\text{g/mL}$, la cantidad de fenoles totales fue de 314 mg/mL., la cantidad de flavonoides fue de 62.58 mg/mL. En conclusión el EEPCh si tiene un efecto hipoglucemiante, además podría estar teniendo un efecto protector en los islotes pancreáticos.

Palabras clave: propóleo, diabetes mellitus, glucemia, islotes pancreáticos

Introducción

Diabetes mellitus

La Diabetes mellitus (DM) es un conjunto de trastornos metabólicos de distinta etiología caracterizado por la hiperglucemia, debido a la causa, existen tres posibles alteraciones que contribuyen a esta característica, las cuales son, una elevada producción hepática de glucosa, secreción insuficiente de insulina y acción alterada de esta hormona (Vázquez, 2013).

La DM es considerada un problema de salud pública a nivel mundial, tanto en los países del 1^{er} mundo como en aquellos en vías de desarrollo. Se calcula que existen 382 millones de personas con este padecimiento, lo que equivale al 8.3% de la población mundial y para 2030 se calcula que esta cifra habrá aumentado hasta alcanzar los 592 millones, con un total de 5.1 millones de muertes. En México hay 8.1 millones de personas que padecen DM en edad productiva, con más de 70 mil muertes y 400,000 casos nuevos anuales (Nam, 2013).

Clasificación

De acuerdo al comité de expertos de la Asociación Americana de Diabetes (ADA) y la OMS la DM se clasifica en: DM tipo 1 (T1) (antes conocida como DM insulino-dependiente o de inicio en la infancia), DM tipo 2 (T2) (antes conocida como DM no insulino-dependiente o de inicio en la edad adulta), diabetes gestacional y otros tipos específicos de DM (López, 1998).

La DM T1 representa del 5 al 10% de la prevalencia a nivel mundial, es resultado de la deficiencia completa o casi total de insulina, debido a la destrucción autoinmune de las células beta (β) pancreáticas por anticuerpos, los cuales están presentes en el 85-90% de los individuos con hiperglucemia y se sabe que están asociados al Complejo Principal Histocompatibilidad (CPH), ligado a los genes DQA y DQB (Nam, 2013).

La DM T2 es un grupo heterogéneo de trastornos que se caracterizan por disminución de la eficacia de la insulina en estimular la captación de glucosa por el músculo esquelético y

en la restricción de la producción hepática de glucosa (resistencia a la insulina), debido en parte a una menor secreción de dicha hormona y una mayor liberación de glucosa en sangre (Beers y Berkow, 1999). No hay destrucción autoinmune de las células β pancreáticas pero si está asociada a predisposición genética y obesidad (Harrison, 2012). Es el tipo de diabetes más común, abarcando el 80 a 90% de todos los casos de DM (Guyton, 2001).

Alteraciones metabólicas

La hiperglucemia crónica se debe tanto a la incapacidad de los tejidos para captar glucosa periférica como a la sobre producción de esta por el hígado; en el primer caso, estos defectos metabólicos contribuyen a exacerbar los altos niveles de glucosa en estados postabsortivos, mientras que la sobre producción de glucosa por el hígado mantiene altas las concentraciones de glucosa en sangre durante periodos de ayuno (Vázquez, 2013).

Ya que los tejidos son incapaces de utilizar glucosa, el organismo reacciona como si estuviera en un estado de inanición, poniendo en marcha diversos mecanismos compensatorios. Además existe un aumento de la gluconeogénesis hepática, que puede deberse a factores como: resistencia a la insulina, deficiencia en la secreción de insulina, incremento de precursores gluconeogénicos y ácidos grasos libres, entre otros (Vázquez, 2013).

Los factores que predisponen al desarrollo de DM T2 pueden ser variados: genéticos, hormonales y ambientales. Factores de riesgo ya conocidos como la elevación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), disminución de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), hipertrigliceridemia, tabaquismo, hipertensión arterial, baja actividad física, estrés y la inflamación de bajo grado sostenida (Tilg y Moschen, 2006).

Debido a la heterogeneidad de esta enfermedad acompañada de diversos desórdenes metabólicos como dislipidemia e hipertensión, el control de este padecimiento requiere no sólo de la normalización de los niveles de glucosa, sino también de la modificación de ciertos factores de riesgo que llevan a desarrollar complicaciones en otros sistemas del organismo, como los hábitos alimenticios y la actividad física (Vázquez, 2013).

El sistema inmune celular tiene una respuesta retardada e ineficiente sobre agentes tóxicos, también hay una alteración de los sistemas antioxidantes y hay una baja producción de interleucinas, como la IL-2, que es clave en el proceso inflamatorio para una respuesta inmune efectiva (McMahon y Bistrrian, 1995). Estas deficiencias del sistema inmune por la DM, desencadena diversos mecanismos bioquímicos que llevan procesos como son el estrés oxidativo, la inflamación crónica y un proceso de cicatrización más lento, además son más sensibles a padecer heridas crónicas, como lesiones ulcerosas en los miembros inferiores lo cual es causa de amputaciones debido a infecciones (Ramanuja C. *et al.*, 2015).

Complicaciones de la DM

La hiperglucemia crónica y la desregulación metabólica concomitante pueden asociarse con lesiones secundarias en múltiples órganos, destacándose:

- La retinopatía diabética debida al daño de los pequeños vasos de la retina, acumulado a lo largo del tiempo, es una importante causa de ceguera. Al cabo de 15 años con diabetes, aproximadamente un 2% de los pacientes están ciegos y cerca del 10% sufren un grave deterioro de la visión.
- La neuropatía diabética se debe al daño de los nervios y puede llegar a afectar a un 50% de los diabéticos. La neuropatía diabética puede causar muchos problemas diferentes, pero los síntomas más frecuentes son hormigueo, dolor, entumecimiento o debilidad en los pies y manos.
- Combinada con la disminución del flujo sanguíneo, la neuropatía incrementa el riesgo de úlceras en los pies y finalmente, de amputación del miembro inferior.
- La diabetes se encuentra entre las principales causas de insuficiencia renal. Un 10% a 20% de los pacientes con diabetes fallecen por esta causa.
- La diabetes aumenta el riesgo de cardiopatía y accidente vascular cerebral. El 50% de los pacientes con diabetes fallecen de enfermedades cardiovasculares.

- En general, la mortalidad de los diabéticos es al menos el doble que el de los no diabéticos (López, 1998).

Tratamiento de la DM

El tratamiento actual del enfermo diabético exige un abordaje múltiple, dirigido no sólo a ajustar en lo posible los niveles de glucemia, sino a prevenir y a tratar la mayoría de las alteraciones metabólicas antes señaladas, así como las complicaciones que tan frecuentemente surgen en el curso de la enfermedad. Este tratamiento se basa en la dieta ajustada a las necesidades vitales de cada persona, en la insulina y en los diversos fármacos orales que por sus mecanismos consiguen reducir los niveles de glucemia (Flórez *et al.*, 1997).

Con respecto al tratamiento farmacológico, existen diferentes tipos de medicamentos para tratar la diabetes: la insulina exógena, los hipoglucemiantes orales e incretinas. La insulina se emplea principalmente para el control glucémico de pacientes con DM-1. El tratamiento farmacológico para los pacientes con DM-2 se enfoca en controlar los niveles de glucosa plasmática en ayuno y postprandial, además de contrarrestar las 3 alteraciones metabólicas principales: disminución de la función de las células β pancreáticas, elevada producción de glucosa hepática y resistencia a la insulina (Cheng y Fantus, 2005).

La insulina inyectable, es el tratamiento más común indicado para el tratamiento de la DM T1, la DM T2 y la diabetes gestacional (Flórez *et al.*, 1997), ya que es la molécula deficiente en esta patología.

La insulina es un polipéptido de 51 aminoácidos (5,8 kD) sintetizado por las células β del páncreas. Consta de dos cadenas, la A, con 21 aminoácidos, y la B, con 30, unidas entre sí por dos puentes disulfuro; la cadena A tiene además otro puente disulfuro entre sus aminoácidos 6 y 11 (Figura 1) (Flórez *et al.*, 1997).

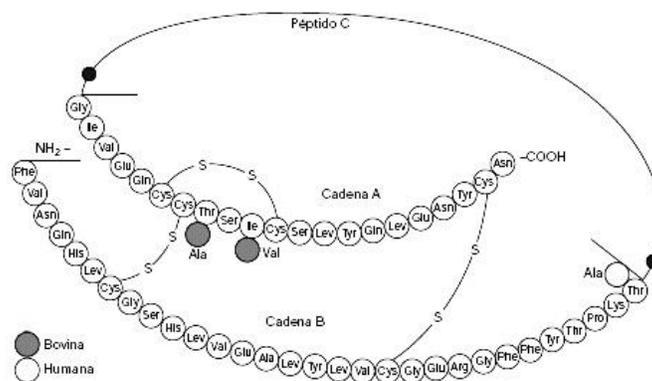


Figura 1. Proinsulina; el péptido C está representado por la línea continua a partir de los dos puntos negros (Flórez et al., 1997).

Hasta hace pocos años, la insulina utilizada clínicamente procedía de la extracción de páncreas bovinos y porcinos. En todos los países, ahora sólo se usa insulina humana obtenida por tecnología recombinante a partir de plásmidos ADN inyectados en *Escherichia coli* (Flórez et al., 1997). Las preparaciones de insulina pueden clasificarse según su duración, en insulina de acción corta, intermedia y prolongada (Goodman et al., 2006).

Aunque el efecto más evidente de la insulina es la reducción de la glucemia, su función es también promover el anabolismo energético (glucosa, aminoácidos y lípidos) y su utilización en las correspondientes células especializadas (Flórez et al., 1997; Goodman et al., 2006).

Medicamentos

Para el control de la DM-T2 existen diversos medicamentos, entre los que destacan:

1. Secretagogos de insulina.

Actúan promoviendo la liberación de insulina por las células β . Las sulfonilureas se unen a un receptor específico en los canales de potasio dependientes de ATP, provocando su cierre y la siguiente acumulación de potasio dentro de las células. Esto lleva a la despolarización de la membrana celular y a la apertura de los canales de calcio dependientes del voltaje, conforme el calcio entra a la célula se estimula la secreción de

insulina, como la . glibenclamida, ver figura 2 (González, 2002). Sin embargo presenta inconvenientes destacando agotamiento de las células β .

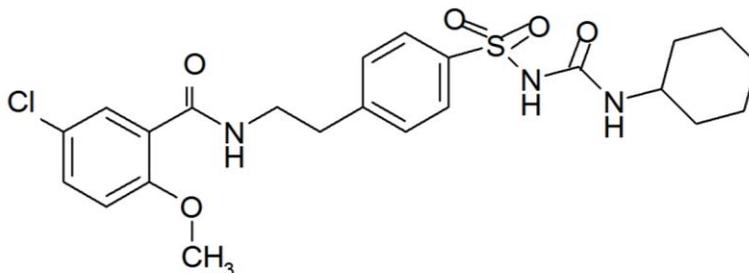


Figura 2. Glibenclamida (Daniele *et al.*, 2015)

2. Inhibidores de α -glucosidasa

Este tipo de fármacos inhiben la actividad de la enzima α -glucosidasa en el intestino delgado, retrasa la absorción de carbohidratos en el tubo digestivo y evita el aumento de la concentración plasmática postprandial de glucosa, como la acarbose ver figura 3 (González, 2002). No obstante tiene inconvenientes como trastornos intestinales y mala nutrición.

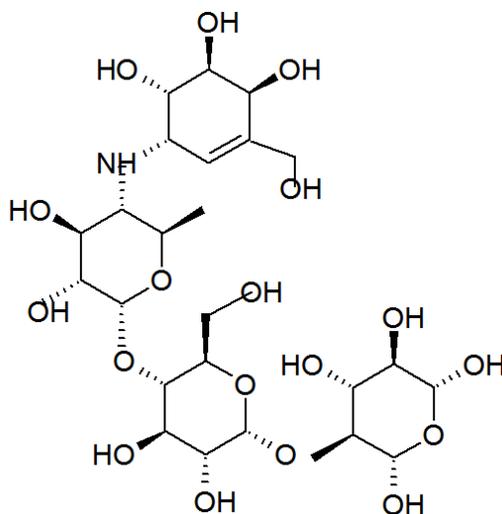


Figura 3. Acarbose (Chandran, *et al.*, 2008)

3. Metformina

Es un fármaco hipoglucemiante conformado por dos grupos metilo (CH_3) unidos por un nitrógeno (N) del núcleo biguanida. Actualmente se le prefiere como un fármaco de primera elección en el tratamiento de la DM-2 y el síndrome metabólico.

La metformina disminuye los niveles de glucosa en sangre y la gluconeogénesis hepática mediante una leve y transitoria inhibición de la respiración mitocondrial en el complejo de la cadena I resultando en la disminución de la energía hepática, activando a la AMPk, aumenta la captación de glucosa por el músculo, por lo que es considerado un sensibilizador de la insulina, induce la translocación del transportador de GLUT4 y aumenta la oxidación de ácidos grasos; a nivel intestinal inhibe la absorción de glucosa y aumenta la glucólisis anaerobia (González, 2002). Sin embargo puede ocasionar en algunos casos acidosis láctica, insuficiencia renal, hepática y cardíaca, ver figura 4.

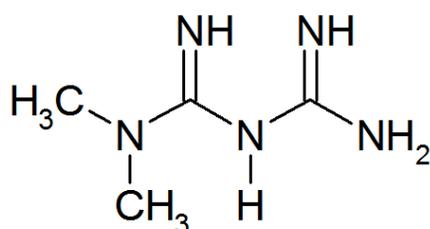


Figura 4. Metformina (Viollet, B. *et al.*, 2012)

También llamadas glitazonas, estos fármacos activan el receptor nuclear por proliferadores peroxisomales (PPAR γ), el cual participa en la regulación del metabolismo de carbohidratos y lípidos. PPAR γ se expresa en la mayoría de tejidos, pero hay una alta densidad de estos receptores en tejido adiposo, músculo, hígado y cerebro. Incrementan el consumo de glucosa por el músculo y disminuye la producción de este sustrato (González, 2002).

Indirectamente las tiazolidinedionas modifican la secreción de adipocitocinas, aumentan la adiponectina, reduce los niveles de TNF- α y resistina. A nivel hepático disminuye la producción de glucosa y promueve la actividad de la glucocinasa hepática (alrededor del 20%) provocando un aumento de la síntesis de glucógeno como el medicamento tiazolidinediona ver figura 5 (González, 2002). Sin embargo presenta inconvenientes como infarto.

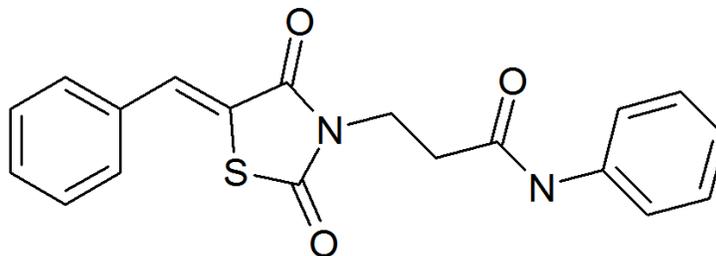


Figura 5. Tiazolidinediona (Radhe *et al.*, 2015)

4. Análogos de GLP-1 e inhibidores de DPP4

La ingesta de alimentos estimula secreción de diversas hormonas intestinales (incretinas) que regulan el metabolismo de carbohidratos y la producción de hormonas pancreáticas, entre ellas la insulina. Las principales incretinas que se han identificado son: GIP por sus siglas en inglés glucose-dependent insulinotropic polypeptide y GLP-1 glucagón-like receptor 1.

GLP-1 se sintetiza en las células L enteroendocrinas del íleo distal ante la presencia de alimentos en el estómago. Durante los periodos de ayuno los niveles de esta hormona se encuentran disminuidos, después de comer existe un incremento en la concentración de ésta, volviendo a disminuir rápidamente debido a su degradación por la enzima dipeptidil peptidasa 4 (DPP4). Los receptores para GLP-1 se encuentran distribuidos en varios tejidos, siendo las células β del páncreas, el sistema nervioso central y el tejido adiposo los de mayor importancia. En el páncreas GLP-1 promueve la producción de insulina y sobrevivencia de las células β . El efecto de las incretinas es dependiente de glucosa, necesiándose niveles por encima de los 55mg/dL para producir algún efecto. Las incretinas también inhiben la secreción de glucagón, disminuyendo así el consumo de alimentos. Actualmente existen dos grupos de fármacos relacionados con el sistema de incretinas que se emplean clínicamente: Los análogos como la exenatida y los inhibidores como la sitagliptina ver figura 6 (Vázquez, 2013). Sin embargo se han reportado inconvenientes como pancreatitis y la posibilidad de tumores.

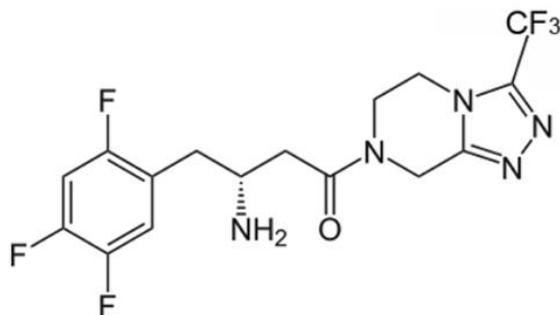


Figura 6. Sitagliptina (Kim y Egan, 2008)

Encontrar el tratamiento efectivo de la DM sigue siendo un reto para la medicina moderna. Si bien existe una amplia gama de fármacos hipoglucemiantes, muchos de estos agentes tienen efectos adversos severos como insuficiencia renal, fallo hepático, fallo cardíaco, por mencionar algunas y son ineficientes en el control glucémico a largo plazo (Saxena y Vikram, 2004).

En muchos países desarrollados, con sistemas de salud basados primordialmente en la medicina alopática, el empleo de la medicina alternativa ha aumentado en los últimos años. Paradójicamente en estos países, la esperanza y el estilo de vida propician el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas, y aunque la tecnología y los tratamientos para estos padecimientos son abundantes, son costosos y provocan efectos adversos, por lo que la medicina alternativa ofrece para muchos pacientes un recurso terapéutico muy importante (Vázquez, 2013).

En la búsqueda de nuevas alternativas hipoglucemiantes, se ha reportado que algunos propóleos reducen los niveles de glucosa sanguínea Jachak, 2002 y Zhu *et al.*, 2011, demostraron que el propóleo de Brasil y China tienen un efecto hipoglucemiante sobre la DM T1 inducida por STZ, además de evitar la pérdida de peso corporal. Esto corrobora que el propóleo estudiado puede disminuir los niveles de glucemia, efecto que se vio amplificado con el tiempo (Fuliang *et al.*, 2005).

Propóleo

El propóleo es un producto natural resultado de la colecta y procesamiento realizado por las abejas. Este producto es colectado de la vegetación del lugar, resinas de los árboles ya

sea de los brotes, grietas en la corteza, esto es mezclado con la cera de abeja y sus secreciones glandulares hipo faríngeas, mandibulares. El propóleo también contiene cera, aceites esenciales y otros compuestos orgánicos en su mayoría polifenoles y flavonoides (Kędzia, 2009).

Las abejas usan el propóleo como material de construcción para cerrar los espacios entre cuadros, entre tapas y rendijas de las colmenas, reducir la piquera y embalsamar-aislar objetos u otros insectos. También lo utilizan como agente desinfectante de patógenos. La composición varía dependiendo de la vegetación del lugar, así como de la especie de abeja, que pueden tener nuevos componentes químicos e influenciar en las propiedades químicas (Bankova 2005), sin embargo independiente de su composición química se observa una amplia actividad biológica como: una elevada actividad antibacterial, antiviral, antioxidante, antifúngica, antiteratógeno, algunas variedades muestran un incremento en la actividad antiinflamatoria, propiedades regeneradoras, anestésicas, anticancerígenas, y antiparasitarias. Y ha sido utilizado en la práctica de la medicina tradicional, ya sea en infusiones o en extracto etanólico (Bankova, 2005).

Más de 300 compuestos químicos se han descrito en los propóleos de diversos orígenes, entre los que destacan: ácidos fenólicos, terpenos, ceras lipídicas, cera de abeja, bioelementos, y otras macromoléculas como vitaminas, proteínas, amino ácidos, y azúcares (Geckil *et al.*, 2005). Los compuestos fenólicos son el grupo más numeroso en el propóleo de acuerdo a cantidad y tipo, comprenden un 58% a un 78% respectivamente (Kędzia y Holderna, 2006), de los flavonoides con carácter multifenólico se han descubierto más de 38 flavonoides en el propóleo entre los que destacan las agliconas y sustancias glucosídicas presentes en las plantas (Dobrowolski *et al.*, 1991). Las abejas cuando fabrican propóleo secretan enzimas por medio de sus glándulas para hidrolizar el azúcar (Volpi, 2004). Se han reportado 17 aminoácidos libres en el propóleo además de contener terpenos aproximadamente en un 0.5%. Entre otros compuestos tiene cerca de 30 micro y macro elementos descubiertos de los cuales los principales son el grupo B de las vitaminas, C, D, E, β carotenos (Kędzia, 2006).

No obstante, debe señalarse que la mayoría de los estudios sobre propóleo no pretenden determinar la composición química completa, sino tan sólo algunos componentes de interés, en especial los flavonoides (Farré et al., 2004). Por otra parte, si los compuestos activos no se conocen o están aún bajo discusión, el extracto total se considera como el “principio activo” (Bankova, 2005).

El propóleo es un producto de extraordinario interés para la medicina e industria farmacéutica, al que mediante numerosos estudios se le han demostrado versátiles actividades farmacológicas, destacando la actividad hipoglucemiante a la cual se le ha adjudicado constituyentes específicos, como la pinocembrina (Huang D. *et al.*, 2015).

Aunque el propóleo es un producto natural, no se puede generalizar porque su composición varía en función de la vegetación del área en la que fue recolectado, de la especie de la abeja y del periodo de colecta (Russo *et al.*, 2004; Neira *et al.*, 2000). A pesar de esta variabilidad, se ha encontrado que la actividad biológica del propóleo, especialmente su actividad contra microorganismos, están siempre presentes en muestras de diversas zonas geográficas y climáticas.

Es importante recalcar que la eficiencia del propóleo puede ser fluctuante así como su composición química de una región a otra. Por lo que en este estudio se va a probar por primera vez el propóleo de Chihuahua en un modelo de DM experimental.

Hipótesis

Dada sus propiedades químicas el Extracto Etanólico de Propóleo de Chihuahua (EEPCh) podría presentar un efecto antidiabético.

Objetivo general

Evaluar el efecto hipoglucemiante del EEPCh en un modelo de DM experimental.

Objetivos específicos

1. Determinar el efecto del EEPCh sobre los niveles de glucosa y peso corporal en un modelo in vivo de DM.
2. Estudiar el efecto del EEPCh sobre el tamaño de los islotes del páncreas mediante la técnica de Histología.
3. Determinar el efecto del EEPCh en la secreción de insulina en suero mediante la técnica de ELISA sandwich.
4. Determinar la capacidad antioxidante del EEPCh por la técnica de DPPH.
5. Realizar la caracterización química de los metabolitos secundarios del EEPCh.

Materiales y métodos.

Características organolépticas del propóleo de Chihuahua

El propóleo se obtuvo del apiario ubicado en el Ejido de Concordia en el estado de Chihuahua. Las características organolépticas del propóleo se determinarán con base al cuadro 1 (Vargas *et al.*, 2013).

Característica	Consideraciones				
Color	amarillo	pardo	marrón	rojizo	variado
Aroma	resinoso	balsámico			
Sabor	variable	suave	balsámico	picante	
consistencia	maleable	rígido			

Cuadro 1. Características organolépticas para el propóleo.

Extracto etanólico de propóleo. (APÉNDICE 1)

El extracto etanólico se obtuvo por maceración con alcohol etílico al 96%. Se filtró y destiló en un rotavapor a una temperatura promedio de 53 °C. El extracto concentrado se colocó en una charola de vidrio para que se evaporara todo rastro de solvente.

Después se preparó un stock de propóleo. Primero se pesó 1.650 g de propóleo en 11 mL de etanol al 70%, se agitó el preparado hasta estar disuelto, se le agregó 11 mL de agua destilada, y se agitó para tener el extracto homogéneo, para aplicar una dosis de (300mg/kg).

Animales

Se utilizaron ratones machos de 7 semanas de edad de la especie *Mus musculus* de la cepa CD1. Los ratones se manejaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. A los animales se les permitió libre acceso de alimento y agua, con las condiciones óptimas de temperatura (22 ± 2)°C, humedad relativa (55 ± 5)% y período de luz (12 h luz/12h oscuridad) (El-Sayed *et al.*, 2009).

Grupos experimentales

El diseño experimental comprendió 3 grupos (n = 5 ratones por grupo), con una duración de 2 semanas a partir del día en que fueron considerados diabéticos los grupos.

Grupo 1: No diabéticos.(GS).

Grupo 2: Diabéticos sin tratamiento. (GD).

Grupo 3: Diabéticos con tratamiento (GDT), stock de propóleo (300mg/kg) vía oral mediante una cánula urogástrica, por día, en condiciones de ayuno.

Evaluación del EEPCh en ratones diabéticos

La Inducción de diabetes por STZ se realizó a ratones CD1 de 7 semanas de edad, se inyectó STZ (STZ) vía intraperitoneal dosis única de 130 mg/kg en 100 μ L de buffer de citratos (APÉNDICE 2).

Después de 7 días se realizó la medición de glucosa en condiciones de ayunas por punción capilar en cola con el glucómetro ACCU-CHEK Active Roche y las tiras reactivas se cuantificó las concentraciones de glucemia, los ratones con más de 300 mg/dL fueron considerados diabéticos. Se inició con el tratamiento del GDT administrando stock de propóleo una vez al día. Para evaluar el efecto del propóleo sobre el peso corporal se midió con una balanza granataria donde se pesó al ratón cada tercer día y se realizó un seguimiento hasta concluir el experimento.

Efecto del propóleo sobre el tamaño de los islotes del páncreas mediante la técnica de Histología.

Se obtuvieron las muestras de páncreas de los ratones de cada grupo por medio de inyección con fijador de Bouin (APÉNDICE 3). Después se realizó la técnica de histología (APÉNDICE 4). Se usó el micrótopo (APÉNDICE 4.1). Se realizó una tinción H y E (APÉNDICE 4.2), y se observó en el microscopio motic BA310E. Para la observación y captura de imágenes del islote pancreático se realizaron mediciones del tamaño de los islotes con el programa Motic Images Plus 2.0 ML, el cual está acoplado al microscopio Motic Cam BA310 con una cámara de 10 mega pixeles.

Obtención de suero

Suero: La sangre de los ratones se obtuvo por punción cardiaca al finalizar el tratamiento con EEPCh y se centrifugó a 2,000 rpm/10 min/4° C para obtener el suero, el cual se almacenó a -70°C.

Determinar el efecto del propóleo en el contenido de insulina en suero mediante la técnica de ELISA sandwich.

Una vez administrado el EEPCh se evaluó el efecto del propóleo en el contenido de insulina en suero utilizando la técnica de ELISA, de acuerdo al protocolo del proveedor (Rat / Mouse Insulin EMD Millipore. Charles M.) 96 Well Plate Assay Cat. # EZRMI-13K.

Capacidad antioxidante por la técnica de reducción de DPPH

La evaluación de la capacidad antioxidante para determinar la CA₅₀ del propóleo se llevó a cabo mediante el método de reducción del radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH) método modificado de (Murillo, 2006) (APÉNDICE 5), con concentraciones crecientes de propóleo (1-100 ppm).

Fenoles totales

Se realizó una curva patrón con quercetina y se interpoló la absorbancia de la muestra de propóleo para calcular los equivalentes de quercetina. La muestra se preparó a una solución estándar (1 mg/mL) (APÉNDICE 6).

Flavonoides totales

Este método consiste en formar un complejo de aluminio-flavonoide en medio básico que presenta una coloración amarilla que absorbe a 415 nm. Se realizó una curva patrón con quercetina y se interpoló la absorbancia de la muestra de propóleo para calcular los equivalentes de quercetina (APÉNDICE 7).

Caracterización química

Se realizó una caracterización química por medio de un análisis con una Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), así como una Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM). Utilizando 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.

Condiciones de corrida para Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas:

Con una temperatura del inyector de 250°C, a modo de inyección Split, con un ratio de 33.5:1, a flujo del Split de 29.9 mL/mn, el flujo de corrida de 35 cm/seg. El horno a temperatura inicial de 70°C, la rampa de calentamiento: 8°C por minuto hasta 270°C., segunda rampa: 10°C por minuto hasta 290°C, se mantiene 6 min. El tiempo de corrida total de 35 minutos, la línea de transferencia de 290°C.

Condiciones de corrida para la cromatografía líquida de alta resolución.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés), se realizó utilizando una columna Discovery C-18, de 250 x 4.6 mm, tamaño de partícula 5 µm. Corrida isocrática con mezcla de MeOH-acetonitrilo-agua (25-25-50), flujo de 1 mL/min. Detector de arreglo de diodos (DAD) a longitud de onda de 260 nm con barrido completo de 200-400 nm. Se inyectó una concentración de 3 µg/mL de EEPCh con metanol grado HPLC

Estadístico

Se utilizó ANOVA de una vía con una $p < 0.05$.

Resultados

Características organolépticas

De forma cualitativa se observó que el propóleo de Chihuahua presentó las siguientes características, Cuadro 1.

Característica	
Color	Marrón
Aroma	Resinoso
Sabor	Balsámico
consistencia	Rigido

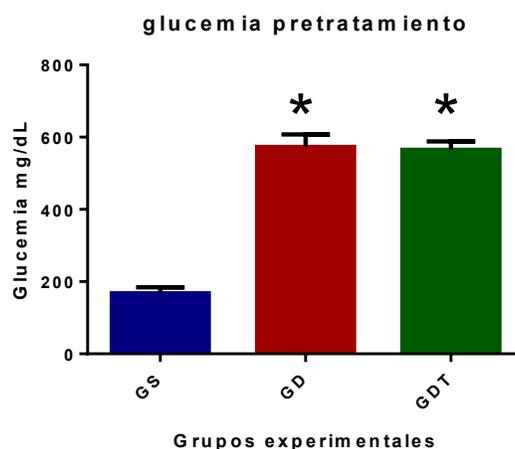
Cuadro 1 Características organolépticas del propóleo de Chihuahua obtenido del apiario del Ejido de Concordia.

Rendimiento del propóleo

Para el propóleo de Chihuahua se llevó a cabo la obtención del extracto etanólico por la técnica de maceración, el rendimiento fue del 67 %.

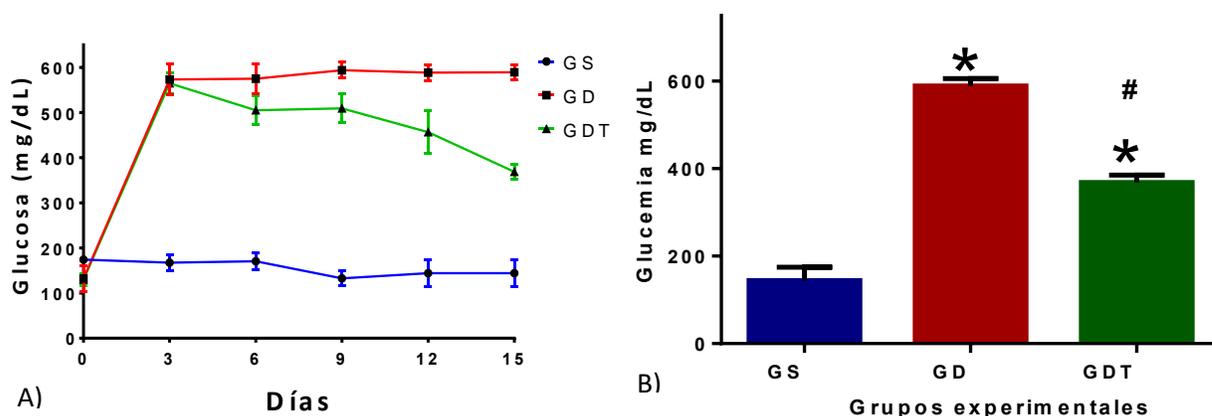
Efecto del EEPCh sobre los niveles de glucosa.

Antes de iniciar el tratamiento con EEPCh, todos los grupos se encontraban en un estado normoglucémico. Durante la semana pre-tratamiento los grupos de ratones con diabetes inducida con STZ pasaron a un estado hiperglucémico con diferencias significativas respecto al GS Gráfica 1.



Gráfica 1. Efecto de la inyección con STZ. Se muestran los niveles de glucosa de los grupos GD y GDT los cuales presentaron un estado hiperglucémico a una semana postinyección y previo al tratamiento con EEPCh. *= GDT, GD con diferencia significativa respecto al GS, $p < 0.05$.

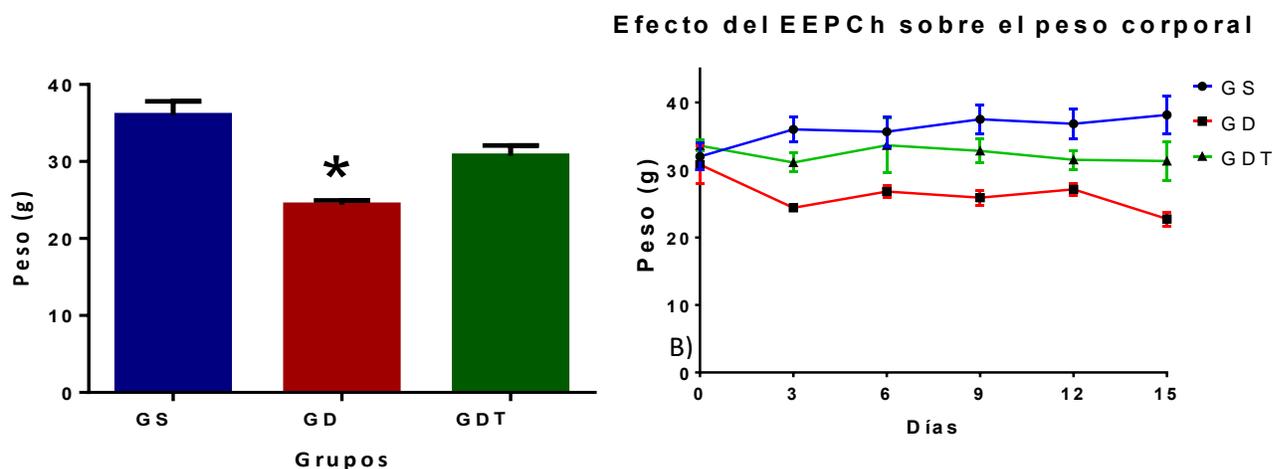
Como se observa en la gráfica 2, el efecto del propóleo sobre los niveles de glucemia, el GD presentó hiperglucemia desde la inducción manteniendo los niveles de 600 mg/dL y durante el resto del estudio. El GDT presentó una tendencia a disminuir sus niveles de glucemia durante el estudio y concluido el experimento a cifras menores a 400 mg/dL.



Gráfica 2, A) Se muestran los niveles de glucemia durante los 15 días de tratamiento, y B) concluido el experimento. *= los GDT y GD muestran diferencia significativa con respecto al GS ya que tienen hiperglucemia, #= el GDT muestra diferencia significativa respecto al GD al disminuir los niveles de glucemia.

Peso corporal durante la administración del EEPCh.

Después de inducido el modelo y concluido el experimento el GDT tendió ligeramente a mantener los valores de peso corporal inicial, se observa que no hay diferencia significativa entre el GDT y el GS (* $p < 0.05$), como se muestra en la gráfica 3.



Gráfica 3. Efecto del propóleo sobre el peso corporal en el GDT se mantuvo después de 15 días de tratamiento A), y durante el experimento B). $n=5$ * $p<0.05$ vs GS y GDT.

Efecto del EEPCh sobre el área de los islotes del páncreas

Se tomaron fotos de cortes histológicos de los tres grupos GS, GD, GDT a 10X fig. 7, donde en el GS y GDT muestran islotes de Langerhans con cordones celulares característico de la conservación de la arquitectura histológica de un islote íntegro, mientras que en el GD se observa daño un decremento del área de la superficie de los cortes en la micro estructura del islote.

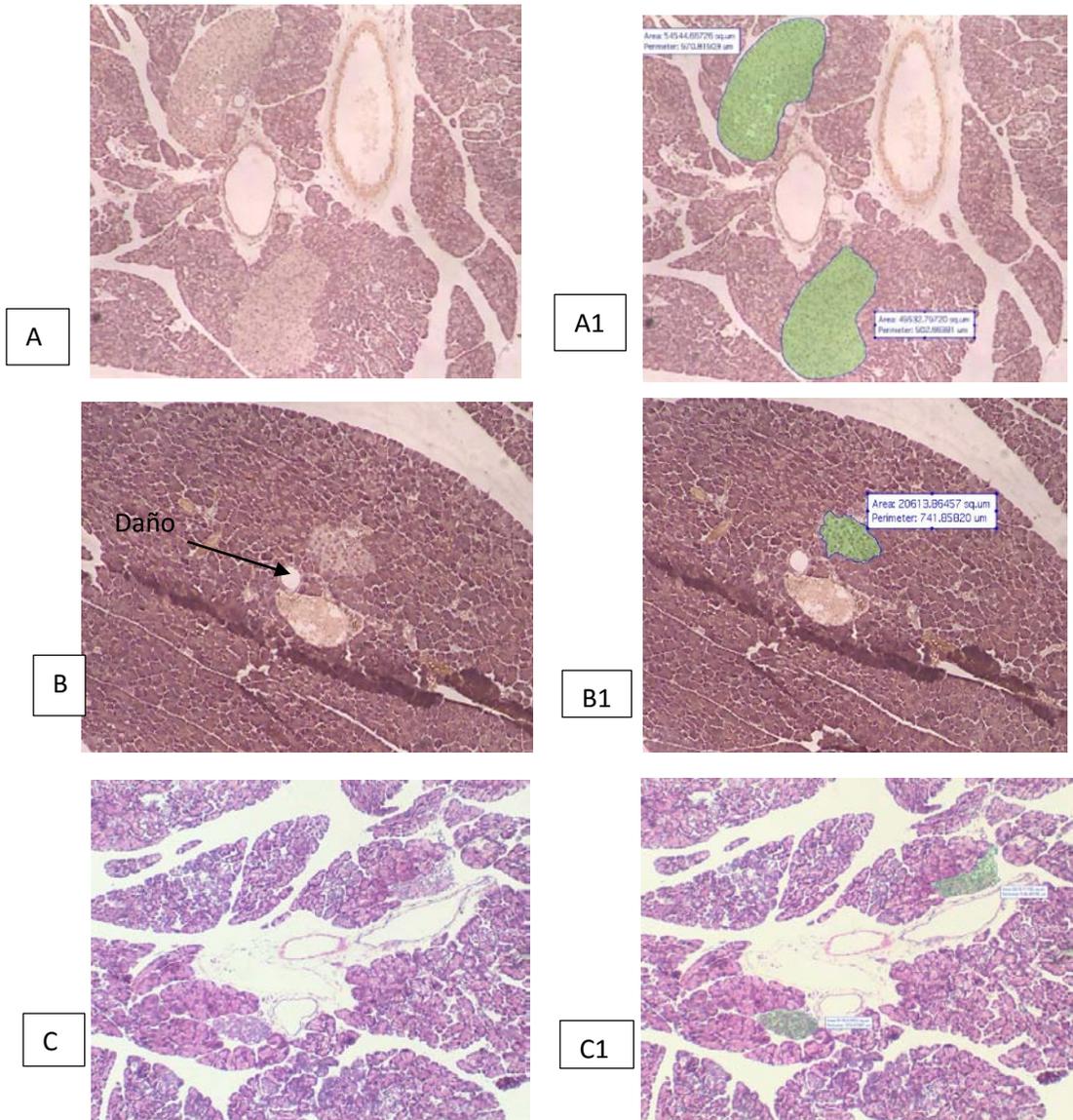
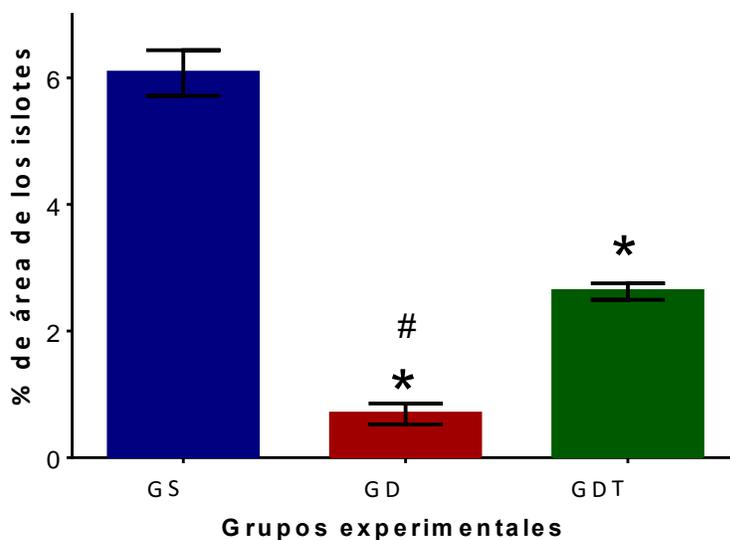


Fig.7. Tincion H y E a 10X. A) corte del GS, A1) corte del GS medido el área en μm^2 y transformado a porcentaje de área respecto a la muestra en el campo; B) corte del GD, B1) corte del GD medido; C) corte del GDT, C1) corte del GDT medido. Lo que sugiere que el propóleo tienen efecto protector.

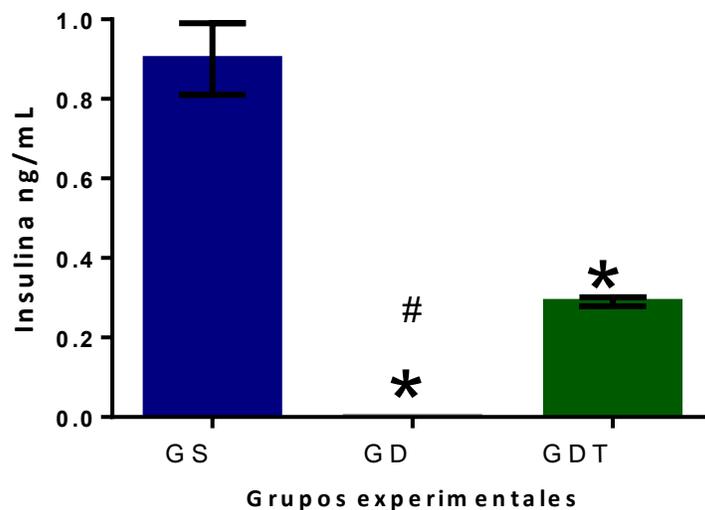
Al medir y comparar el porcentaje de área de los islotes de Langerhans por área total en un campo a 10X, en los grupos experimentales se observó que el GDT tiene un porcentaje de área mayor que el GD ya que se ve protegido por el tratamiento, gráfica 4.



Gráfica 4 El propóleo tiene efecto protector sobre el área de los islotes del páncreas. * $p < 0.05$ vs GS, #* $p < 0.05$ vs GDT.

Cuantificación de la secreción de insulina en sangre periférica por la técnica de ELISA sandwich

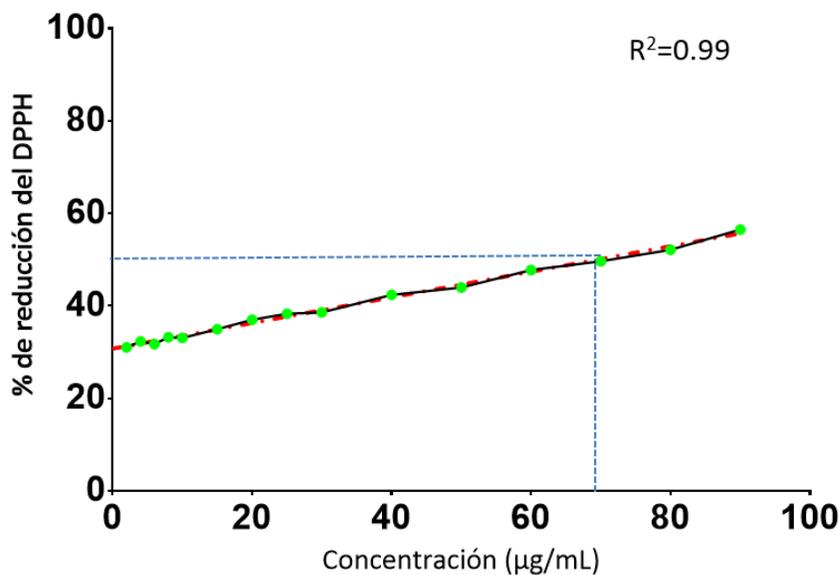
El propóleo presentó un aumento sobre la concentración de insulina en el GDT, mientras que el GD no registró niveles de insulina, gráfica 5.



Gráfica 5. Niveles de insulina en sangre periférica * $p < 0.05$ vs GS, *# $P < 0.05$ VS GDT.

Capacidad antioxidante del EEPCh

El EEPCh presentó una actividad antioxidante media de $69.5 \mu\text{g/mL}$ gráfica 6. Considerando el criterio de Al-Fatimi *et al* (2007), donde se refieren que a una CA_{50} menor de $96.6 \mu\text{g/mL}$ para extracto se considera con buena capacidad antioxidante.



Gráfica 6. EEPCh presentó una CA_{50} de $69.5 \mu\text{g/mL}$ con una $n=3$

El EEPCh fue comparado con un control, quercetina con una alta capacidad antioxidante.

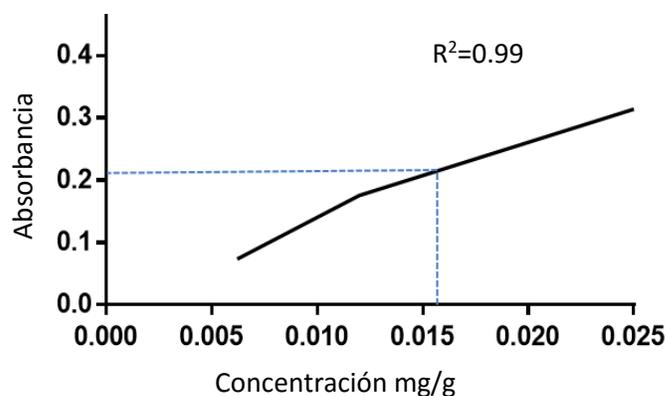
Cuadro 2

	$CA_{50} \mu g/mL$
Propóleo	69.5
Quercetina	4.0

Cuadro 2. Comparación del EEPCh con quercetina que es una alta actividad antioxidante.

Determinación de fenoles totales

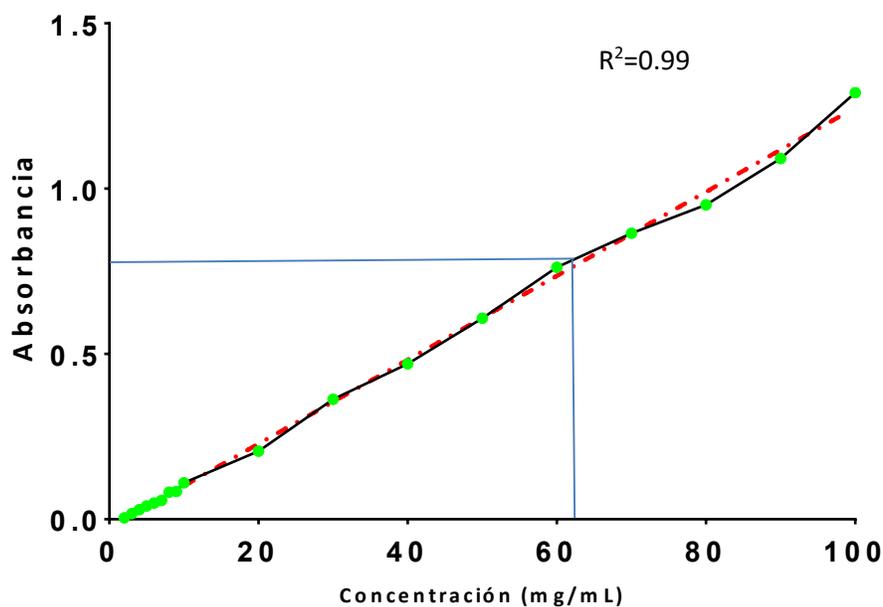
El EEPCh presentó fenoles, este grupo tiene actividad antioxidante además de cambiar la actividad de enzimas inhibiendo oxidasas, por lo que se cuantificó como se muestra en el gráfica 7.



Gráfica 7. El propóleo de Chihuahua tiene una concentración de 314 mg de equivalentes de ácido gálico /mL.

Determinación de flavonoides totales

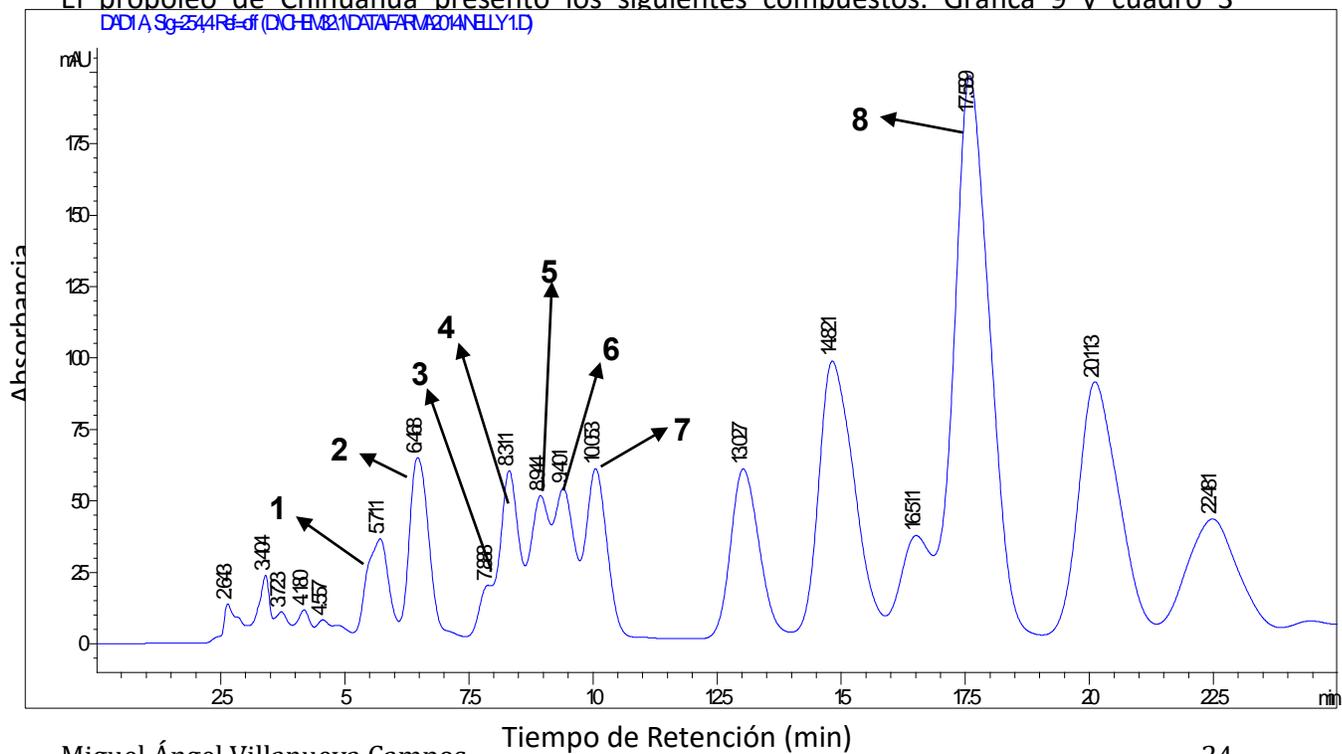
El EEPCh presentó flavonoides que es un grupo perteneciente a los fenoles, con una estructura que le permite tener un poder antioxidante, para atrapar especies reactivas de oxígeno y radical nitrógeno. Como se muestra en la gráfica 8, contiene 62.58 mg de equivalentes de quercetina /g de extracto, lo que equivale al 6.7% del EEPCh.



Gráfica 8 El propóleo de Chihuahua contiene 62.58 mg de equivalentes de quercetina /mL de extracto. Lo que equivale al 6.7% del EPCh.

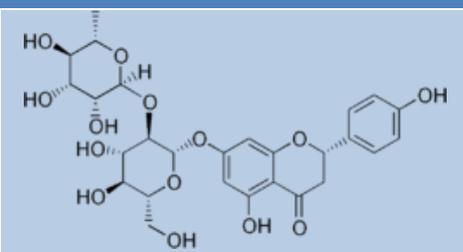
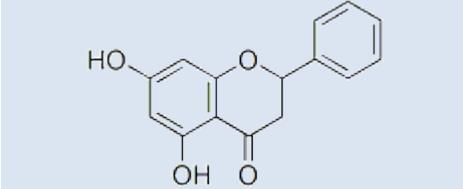
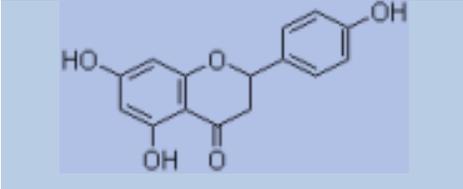
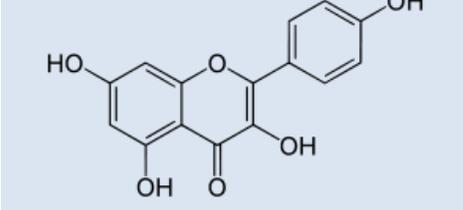
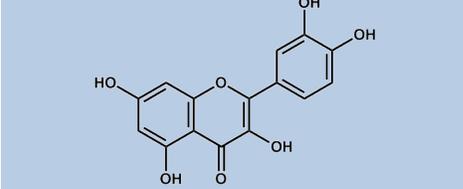
Caracterización de la composición química del propóleo mediante el Análisis de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

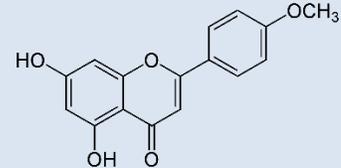
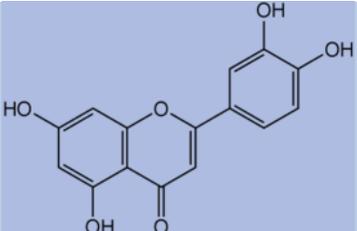
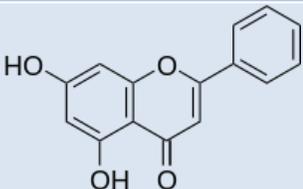
El propóleo de Chihuahua presentó los siguientes compuestos. Gráfica 9 y cuadro 3



Gráfica 9. HPLC del propóleo de Chihuahua, se observó el tiempo de retención en minutos vs absorbancia y cada pico fue comparado con la base de datos para determinar el compuesto, cada número corresponde a un compuesto diferente (cuadro 3).

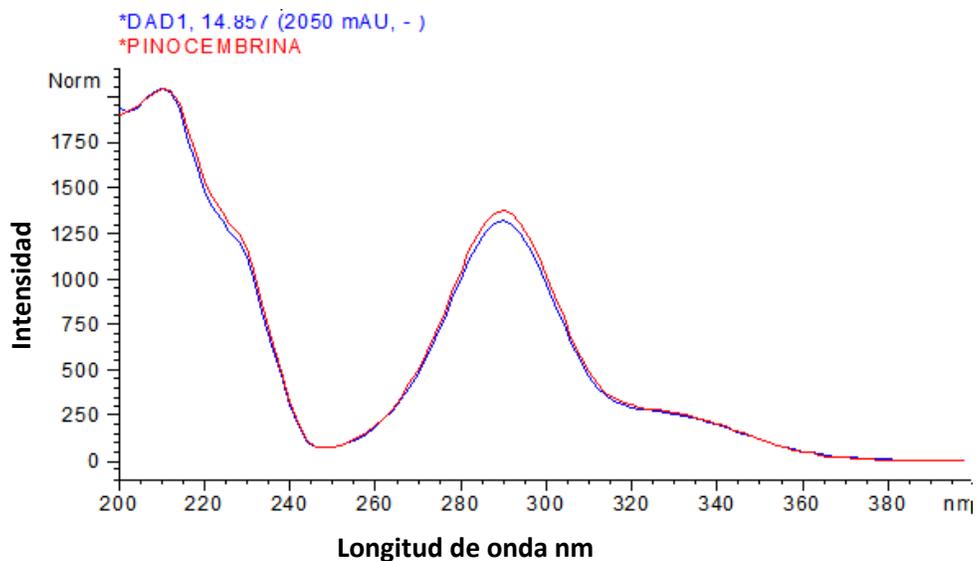
Cuadro 3. Tiempo de retención y $\lambda_{\text{máx}}$ del propóleo de Chihuahua.

No. Compuesto	Tiempo de Retención (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Compuesto	Estructura química
1	5.71	286	Naringina	
2	6.48	228, 290	Pinocebrina	
3	7.88	228, 286	Naringenina	
4	8.31	266, 356	Kaempferol	
5	8.94	256, 370	Quercetina	

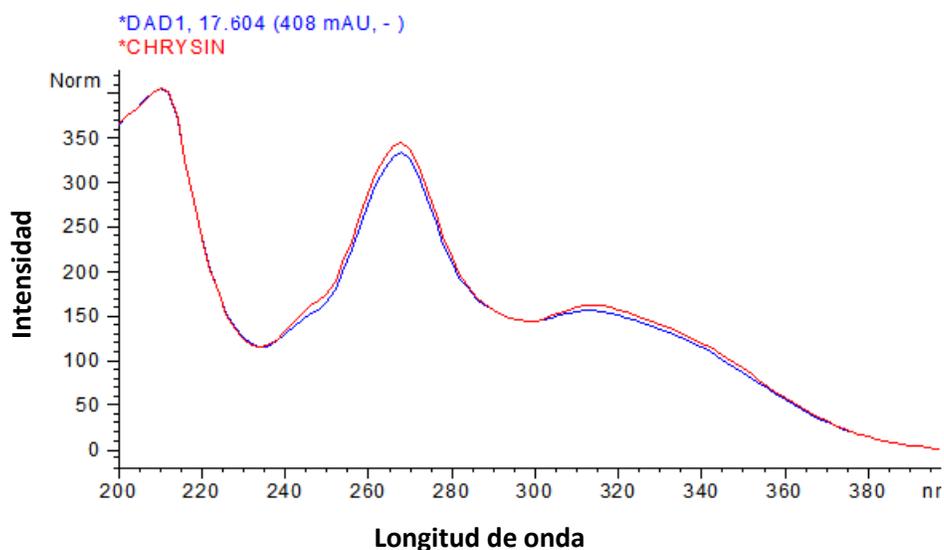
6	9.40	266, 350	Acacetina	
7	10.05	254, 268, 356	Luteolina	
8	17.58	212, 266, 312	Crisina	

Además, la muestra de propóleo fue comparada con los 15 estándares de flavonoides (Vainillina, Quercetina, Catequina, Luteolina, Pinocembrina, Chrysin, Baicaleina, Myricetina, Naringenina, Naringina, Ácido Gálico, Catecol, Apigenina, Acacetina, Kaempferol) con los que se cuenta en el laboratorio, y con ello fue que se pudieron identificar en el propóleo los compuestos como la Pinocembrina, Quercetina, Naringina, Naringenina, Camferol, Acacetina, Luteolina, Crisina, algunos fenoles flavonoles y flavanonas.

La comparación de los estándares de flavonoides con la muestra de propóleo se muestra en las gráficas 10 y 11.



Gráfica 10. Comparación del estándar de Pinocebrina con la muestra de propóleo para su identificación.



Gráfica 11. Comparación del estándar de Crisina con la muestra de propóleo para su identificación.

El cuadro 4 muestra las características químicas del EEPCH .

Familias de metabolitos	
Fenoles	314 mg e AG/g
Flavonoide	62.58 mg eQ/g
Capacidad antioxidante	69.5 ppm $\mu\text{g/mL}$

Cuadro 4 presencia de familias de los metabolitos secundarios con su propiedad química

Discusión

El propóleo es un producto natural con una elevada actividad medicinal. El cual ha sido analizado mostrando diferencias en su composición, sin embargo a pesar de la diversidad de componentes e independiente de la zona geográfica recolectada, muestra una alta actividad biológica, antibacteriana (Armutcu *et al.*, 2015), antifúngica (Martins *et al.*, 2002) antiamebiana (Dobrowolski *et al.*, 1991), antioxidante (Palomino *et al.*, 2009), antiinflamatoria (Shi *et al.*, 2012), entre otros, cabe recalcar que en este trabajo por primera vez se demuestra el efecto hipoglucemiante de una muestra de propóleo de Chihuahua en un modelo de DM con STZ.

Respecto a los resultados obtenidos en esta investigación se ha demostrado que el propóleo de Chihuahua tiene efecto hipoglucemiante en un modelo de DM. Lo que concuerda con otros resultados como el propóleo chino, que ha sido estudiado por Fuliang *et al.*, (2005), quien reporta que el extracto de este propóleo tiene un efecto hipoglucemiante, en un modelo de DM con STZ. Al igual que el estudio de Matsui *et al.*, (2004), quien demostró el efecto hipoglucemiante del propóleo Brasileño.

Con la administración diaria de EEPCh se demostró que se mantiene el peso corporal evitando la pérdida, lo que coincide con Zhu *et al.*, (2011), quien además comparó los propóleos de origen chino y de Brasil, demostrando que ambos evitan la pérdida de peso por la DM inducida con STZ. Esto se podría explicar con lo mencionado por Lichman *et al.*, (2005). La descompensación metabólica conlleva a lipólisis y a proteólisis.

Siguiendo con los resultados de este trabajo, se observó una disminución en los niveles glucémicos por lo que se decidió evaluar el efecto del propóleo de Chihuahua en la producción de insulina ya que es probable que tenga un efecto protector en las células β . Los resultados indican que el propóleo de Chihuahua tiene un efecto en la producción de insulina esto se puede explicar en parte al contenido de flavonoides ya que se ha reportado que estos compuestos como la epicatequina estimula la síntesis de insulina e incrementa los niveles de AMPc en las células β (Jachak, 2002). Además las propiedades

de los flavonoides son numerosas como reducir la apoptosis, estimular la proliferación de las células β y promover la secreción de insulina.

Como se observó un aumento en el contenido de insulina sérica y considerando que esta hormona sólo se produce en las células β , ubicadas en los islotes pancreáticos, se decidió evaluar el efecto del EEPCh en el área de los islotes, los resultados indican una posible protección, algunos autores concuerdan con resultados como De D. *et al.*, (2012) que refiere una recuperación en el área de los islotes en el grupo DM inducido con STZ tratado con una fracción hexánica del extracto de *Salmalia malabarica* y en un análisis fitoquímico reveló la presencia de flavonoides. Sin embargo no existe actualmente información que explique el efecto del propóleo sobre el área de los islotes pancreáticos. Por primera vez se reportan estos resultados del EEPCh.

Ya que los flavonoides tienen actividad como inhibidores de la degradación oxidativa, actúan debido a su capacidad para reaccionar con radicales libres, mismos que tienen un efecto sobre la inhibición de la aparición de especies reactivas de oxígeno (ROS), quelando iones metálicos implicados en el proceso de la creación de radicales libres, antiradical de las especies reactivas de oxígeno e inhibiendo la cascada de reacciones principalmente de la peroxidación de lípidos y hacen sinergismo entre antioxidantes, se determinó la actividad antioxidante del EEPCh. Los resultados indican que el EEPCh tiene una buena capacidad antioxidante lo que se correlaciona con la cantidad de fenoles y flavonoides, esto coincide con los propóleos analizados de diferentes partes del mundo, como el propóleo de Chino (Zhang *et al.*, 2015), el propóleo de Egipto (Tohamy *et al.*, 2014), propóleo polaco (Kokoszko *et al.*, 2014), entre otros, esta actividad antioxidante del EEP es resultado de la presencia de compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos tienen una estructura básica de un anillo de benceno unido a un grupo carboxilo e hidroxilo. La capacidad antioxidante depende del número de grupos hidroxilo en su estructura molecular y del efecto estérico (Leja *et al.*, 2007). El propóleo de Chihuahua presentó una alta concentración de fenoles totales.

Dentro de los fenoles hay un grupo numeroso de polifenoles que son los flavonoides caracterizados por su poder antioxidante, esta propiedad está estrechamente relacionada con su estructura (Gulcin, 2012). Entre los compuestos con mayor actividad antioxidante se encuentra la quercetina (Silva *et al.*, 2000). Este compuesto fue identificado en el propóleo de Chihuahua.

El propóleo de Chihuahua fue analizado por HPLC, los resultados indicaron que presentó acacetina, crisina, kaemferol, luteolina, naringenina, naringina, pinocembrina, quercetina. La acacetina tiene un efecto hipoglucemiante según Juárez R. *et al.*, (2015) además de poseer actividad antioxidante, junto con la crisina. El kaemferol inhibe la α -glucosidasa (Peng *et al.*, 2016). Se ha observado in vitro que la luteilina inhibe a las enzimas α -glucosidasa, α -amilasa y reduce el nivel de glucosa plasmática (Danish A., 2014). La naringenina y naringina tienen un efecto antihiperoglucemiante y antioxidante en un modelo de DM con STZ en ratas (Annadurai *et al.*, 2012). La pinocembrina ha mostrado ser un hipoglucemiante en un modelo de DM con STZ en ratas (Huang *et al.*, 2015). En cuanto a la quercetina además de ser un excelente antioxidante usado como referencia para dicha actividad, incrementa la secreción de insulina, reduce la glucosa en plasma y tiene un efecto protector en los islotes en un modelo de DM inducido con STZ (Nayak *et al.*, 2014). Estos compuestos pueden estar actuando de forma sinérgica ya que la mayoría presentan actividad antioxidante.

Por todo lo anterior presentado, el propóleo de Chihuahua es un buen candidato para posteriores estudios como antidiabético, tomando en cuenta su efecto hipoglucemiante en un modelo de DM inducida con STZ.

Conclusiones

- El propóleo de Chihuahua tiene un efecto hipoglucemiante en un modelo de DM experimental.
- La pérdida de peso corporal por la DM fue mantenida por el propóleo.
- El propóleo favoreció el contenido de insulina presente en ratones diabéticos.
- La administración de propóleo aumentó en el porcentaje del área de los islotes pancreáticos.
- La buena Capacidad Antioxidante demostrada es debida a la presencia de fenoles y flavonoides principalmente.
- Estos compuestos como la acacetina, crisina, kaemferol, luteolina, naringenina, naringina, pinocembrina, quercetina encontrados en el propóleo de Chihuahua tienen un efecto favorable para la reducción de los niveles de glucemia.

APÉNDICES

(APÉNDICE 1)

Técnica de Maceración

(Domínguez, 1973)

El propóleo en greña, se colocaron 300 g en un matraz Erlenmeyer, posteriormente se le agregó 1L de solvente, para que el propóleo estuviera cubierto y el líquido por encima del recipiente fue tapado con un aluminio para evitar la evaporación del solvente.

El propóleo se dejó reposar con un máximo de 2 semanas, teniendo en cuenta que la extracción de los compuestos se vio reflejado en la coloración del líquido, entre más oscuro mayor el rendimiento.

Por último se realizó una destilación a presión reducida en un rotavapor. Posteriormente se colocó en un recipiente para que se evaporara el solvente y se obtuvo extracto libre del solvente.

(APÉNDICE 2)

Inducción de diabetes

Se estandarizó la dosis mediante ensayos previos de STZ a 130mg/kg esto en 100 μ L de buffer de citratos para la inducción de la DM en ratones CD1, a las 7 semanas de edad. El cálculo para buffer de citratos donde el peso molecular del citrato de sodio= 294.09 g en 1L esto es 1 M, para llevarlo a 0.05 M se calculó 0.147 gramos de citrato de sodio para 10 mL de agua destilada y para bajar el pH se usó ácido cítrico 0.1 M. La STZ debió mantener en frío hasta el momento de la inyección, que fue administrada vía intraperitoneal. Esto en condiciones de ayuno, que es considerado de 4-6 horas sin alimento.

(APÉNDICE 3)

Obtención de muestras de páncreas para histología

Se sacrificó al ratón por dislocación cervical o por cámara de CO₂, e inmediatamente se limpió la parte abdominal con alcohol al 70% para retirar la piel y no contaminar las vísceras con pelos, una vez retirada la piel, los intestinos fueron sacados y puestos en la parte baja respecto al ratón, se sacó el hígado, envuelto en papel y se subió en dirección a la cabeza del ratón. Para identificar el conducto biliar que va de la bolsa biliar al duodeno pero bifurca antes al páncreas, posteriormente con una pinza de bulldog se prensó justamente en la ampolla de Váter para dejar sólo una vía de acceso para inyectar fijador Bouin (APENDICE 3.1), una vez irrigado todo el páncreas se cortó el tejido que mantiene al páncreas fijo evitando cortar al mismo, se guardó en un tubo cónico de 30 mL, durante 24 h en frío, después se lavó con agua corriente hasta retirar o quitar el ácido pícrico y se inició con el tren de deshidratación Figura 8 y 9.



Figura 8 y 9, el páncreas se le inyectó fijador de Bouin y todo lo observado de amarillo es el páncreas, en la figura de la derecha el páncreas fue lavado con agua.

(APÉNDICE 3.1)

El fijador de Bouin se preparó con 75 mL de solución acuosa y ácido pícrico, mezclando 25 mL de formol y añadiendo 5mL de ácido acético glacial.

La solución acuosa con ácido pícrico se preparó con 0.5g ácido pícrico en 100 mL de agua destilada.

(APÉNDICE 4)

TECNICA DE HISTOLOGIA

Tren de deshidratación

Deshidratación. Significa extraer o remover el agua de los tejidos fijados. La deshidratación debe ser completa porque, de lo contrario, el solvente no actúa de forma adecuada y el bloque de inclusión no alcanza la dureza requerida. Para tal fin se utilizaron líquidos deshidratadores en los cuales se sumergieron los tejidos.

Los deshidratadores más usados son el alcohol etílico, el alcohol isopropílico, el dioxano y el cloroformo.

En el caso de la inclusión en parafina, las muestras se deshidrataron en baños sucesivos en soluciones de concentración crecientes de alcohol etílico. El procedimiento de rutina fue el siguiente:

- 1) alcohol etílico al 70 % ----- 2 horas
- 2) alcohol etílico al 80 % ----- 2 horas
- 3) alcohol etílico al 90 % -----2 horas
- 4) alcohol etílico al 100 % (absoluto) -----2 horas

Nota: En cada caso es necesario agitar de vez en cuando los frascos que contienen las muestras.

La deshidratación incompleta de los tejidos se comprueba cuando éstos al sumergirse en el líquido diafanizador muestran un aspecto turbio blanquecino.

Diafanización. Las muestras deshidratadas se encuentran totalmente embebidas en alcohol etílico absoluto; pero la parafina tampoco es soluble en alcohol por lo que es necesario reemplazarlo por sustancias que sean capaces, simultáneamente, de mezclarse

con el alcohol y disolver la parafina. Estas se denominan líquidos diafanizadores o intermediarios. Ejemplos: butanol, xilol, tolueno, benceno, y el cloroformo.

El líquido diafanizador de uso más frecuente es el butanol. La actividad aclaradora o diafanizadora del butanol se emplea también en el procedimiento de coloración. La diafanización de los tejidos deshidratados se debe a que estas sustancias poseen un alto índice de refracción y al interactuar con los tejidos los vuelven transparentes.

El procedimiento de diafanización se realizó de la siguiente manera:

6) butanol-----2 hrs

7) butanol-----2 hrs

Nota: las muestras deben agitarse continuamente para permitir la renovación de los líquidos.

Inclusión y formación del bloque de parafina.

Las parafinas son hidrocarburos saturados provenientes de la destilación del petróleo. Generalmente son sustancias sólidas a temperatura ambiente. Existen diferentes tipos de parafina que se caracterizan por sus puntos de fusión. Estos oscilan entre 40° C y 60°C. La parafina hierve a 300°C, y emite vapores que son muy inflamables. Las parafinas se clasifican en:

- Blandas. tienen un punto de fusión de 45°C - 52°C. Son recomendables para incluir tejidos en los se detectarán antígenos mediante inmunohistoquímica.
- Semiduras. Sus puntos de fusión son de 54°C -58°C. Es la parafina que se emplea con mayor frecuencia en los laboratorios donde se realiza técnica histológica. De acuerdo a la temperatura del medio, se recomienda su uso pues se pueden obtener secciones de 5 a 7 µm.
- Duras. Tienen un punto de fusión de 60°C - 65°C. Son parafinas que deben usarse en climas de temperaturas altas.

La entrada de la parafina al interior de los tejidos se efectúa cuando ésta se encuentre en estado líquido. En el comercio las parafinas se expenden en forma de bloques discoidales, escamas, tabletas rectangulares o en forma de grumos pequeños. Las parafinas, se disuelven usando estufas que las mantienen en ese estado. Las estufas permanecen a una temperatura constante, generalmente de 2° C a 4° C por encima del punto de fusión de la parafina a emplear. La parafina diluida se colocó en tres recipientes dentro de la estufa. El primero, con una capacidad de 1000 a 1500 mL, recibió a las muestras embebidas en xilol; la parafina reemplazó el xilol de las muestras y se infiltró al interior de las mismas. Los otros dos recipientes fueron más pequeños (500 mL. de capacidad) y, de manera consecutiva recibieron a los tejidos. El último de ellos sirvió para contener a las muestras antes del proceso de formación de los “bloques” de parafina. En el interior de la estufa debe existir otro recipiente conteniendo parafina líquida pura, que se empleó para la formación de los “bloques”. Para las muestras de páncreas los tiempos en que permanecieron las muestras dentro de los recipientes de parafina se realizaron en estos tiempos:

8) Primer baño de parafina-----24 horas

9) Segundo baño de parafina-----24 horas

Nota: agitar las muestras con cierta frecuencia

La inclusión o formación del bloque de parafina se efectuó empleando moldes de diversos materiales, diferentes áreas y profundidades. Pueden ser de papel, metal o plástico. El bloque de parafina debe contener la muestra correctamente orientada para facilitar la obtención de las secciones o “cortes”. El molde que se usó fue de metal y se llenó con parafina caliente pura; con una pinza calentada en un mechero se tomó una pieza de tejido del tercer recipiente y se orientó a una de sus superficies (aquella que se colocó en contacto con el filo de la navaja) se sumergió al interior del molde, en el que la parafina empezó a solidificarse, se le aplicó una leve presión. Después los moldes se enfriaron de inmediato introduciéndolos en el refrigerador para que la parafina se solidifique de manera homogénea.

Todos los procedimientos mencionados, desde la deshidratación hasta la infiltración en los dos o tres recipientes de parafina líquida, se pueden efectuar de manera automática.

(APÉNDICE 4.1)

Microtoma (obtención de los cortes) y su uso.

En esta etapa, los tejidos y la parafina integran un solo bloque que, posee la dureza y la consistencia suficientes para obtener secciones delgadas y transparentes. Las secciones delgadas o “cortes” se obtuvieron utilizando instrumentos mecánicos diseñados para que en forma más o menos automática, seccionen el bloque de parafina en cortes delgados y de grosor uniforme. Los instrumentos se denominan “**microtomos**”. El sistema de funcionamiento de los microtomos consta de cuatro mecanismos principales:

- *sujeción del bloque de parafina.*
- *sujeción de la navaja.*
- *El que permite que el filo de la navaja seccione al bloque en cortes delgados y de grosor uniforme.*
- *El de avance del bloque en un número determinado de micrómetros después que se ha obtenido un corte.*

Los microtomos se clasifican de acuerdo a la manera como se desplaza el bloque que contiene el tejido incluido; así, existen:

Microtomo de rotación tipo Minot.

Mediante una manivela circular denominada **volante**, el mecanismo que sujeta al bloque de parafina se desplaza frente al filo de la navaja, de arriba hacia abajo y viceversa en un movimiento vertical.

Microtomo de deslizamiento. El movimiento que se realiza para obtener los cortes es horizontal, es decir de atrás hacia adelante y viceversa. Generalmente el mecanismo que sujeta al bloque de parafina es el que se desplaza y la navaja permanece estática.

Los microtomos **tipo Minot** son los de uso más frecuente en cualquier laboratorio donde se realiza técnica histológica y fue el utilizado para el proceso de las muestras, donde el

tejido está incluido en parafina de inclusión. Los microtomos de **deslizamiento**, en cambio, se emplean cuando los tejidos están incluidos en celoidina o cuando la inclusión en parafina contiene porciones voluminosas de tejidos y órganos. Los microtomos tipo Minot permiten obtener secciones delgadas, del orden de 4 a 7 μm de espesor. Producen **cortes seriados**, es decir, cuando se obtiene un corte, éste queda adherido por su borde anterior al borde posterior del que lo precedió; formándose de esta manera una cinta de cortes que va descendiendo por la superficie anterior de la navaja. Los cortes seriados se emplean cuando se desea realizar reconstrucciones tridimensionales del órgano procesado, cuando se requieren comparar secciones vecinas, del tejido u órgano, coloreadas por diversas técnicas de tinción o cuando se hace el estudio microscópico topográfico en embriones y fetos. Existen dos condiciones indispensables que garantizan la obtención de secciones delgadas, uniformes y seriadas:

- Que la deshidratación, impregnación e inclusión hayan sido realizadas correctamente.
- El empleo de una navaja o cuchilla muy bien afilada y asentada y que el filo de la misma ofrezca la inclinación adecuada hacia la superficie del bloque.

En la actualidad se expenden en el mercado cuchillas descartables. Se venden en gran cantidad, generalmente por cientos, son relativamente baratas. Se emplean para obtener algunos cortes y luego se descartan. Ofrecen dos ventajas: no se requiere afilarlas y siempre el usuario tendrá un instrumento bien afilado, para la obtención de los cortes se siguieron los siguientes pasos

- Sujetar firmemente el bloque con el sistema de abrazaderas y la muestra orientada correctamente.
- Alinear el sistema de sujeción de la navaja y el filo de la misma, con la superficie de corte del bloque.
- Desgastar la superficie del bloque de parafina hasta alcanzar el tejido y tener la certeza de abarcar toda el área que se deseó seccionar.

- Marcar en el dial del microtomo, el número de micrómetros de grosor al que deben alcanzar los cortes.
- Accionar la manivela que desplaza la abrazadera con el bloque de parafina para obtener los cortes (aislados o seriados). Obtenidos los cortes se recogerán cuidadosamente con unas pinzas o pinceles finos.

Los cortes obtenidos, aislados o en forma de cintas, generalmente se presentan arrugados y muestran una área menor que la que poseen en la inclusión, por lo que es necesario extenderlos y luego adherirlos a las láminas portaobjetos (esto facilita su manipulación posterior). Los cortes se extendieron al depositarlos sobre la superficie del líquido extendedor en este caso se usó ruyter.

Las secciones se extienden aisladas o formando cintas, estas se recogen y adhieren al portaobjetos de la misma forma; en el caso que se requiera recoger los cortes aislados, extendidos previamente como una cinta, deben separarse utilizando las mismas pinzas finas o agujas de disección. Para garantizar una mejor adhesión de los cortes a los portaobjetos, se recomienda colocarlo en plancha a 53⁰C, durante 5 segundos, ya que pasado ese tiempo se forman burbujas de aire que impiden el proceso de las muestras.

El ruyter se preparó con la adición de solución A en la solución B (en ese orden), gota a gota muy lentamente, pues de no hacerlo se forma un precipitado. La solución A se preparó con 20 gotas de albumina glicerizada en 80 mL de agua destilada, la solución B con 20 gotas de benzoato de metilo en 20 mL de acetona, la albumina glicerizada en proporciones 1:1 de 1 mL, se vació una clara de huevo de gallina a una probeta y se agregó el mismo volumen de glicerina, se guardó a 4 ⁰C, para 6 meses.

(APÉNDICE 4.2).

Coloración o tinción.

Los cortes de los tejidos adheridos a los portaobjetos están listos para ser coloreados. El procedimiento de coloración o tinción consiste en que una estructura celular o tisular adquiere específicamente un color bajo la acción de una sustancia colorante. Se considera que una estructura se ha coloreado o teñido cuando al ser lavada con el líquido que

disuelve al colorante, no se decolora. El proporcionar color a las estructuras que constituyen un tejido o un órgano se hace con la finalidad de distinguirlas entre sí y facilitar su observación. Si se examina al microscopio una sección de tejido sin colorear, ya adherida al portaobjetos, se podrá constatar que no es fácil discernir sus componentes, pues lo delgado de los cortes y la diafanización producida en los tejidos igualan sus índices de refracción. La coloración proporciona diferencias evidentes entre las estructuras y al observar los cortes será fácil reconocerlas. Se denomina sustancia colorante a aquella que puede transferir su color a otro cuerpo.

Teoría de la coloración. Existen dos teorías que explican el procedimiento de la coloración la teoría física considera que la coloración es un proceso físico de adsorción, así las partículas de las sustancias colorantes disueltas penetran en los espacios intra e intercelulares en los que se mantienen adheridas en razón de la cohesión molecular. Por ejemplo, la coloración de las grasas o lípidos es una tinción por adsorción; los Sudanes III o IV tiñen las grasas por la facilidad que tienen para disolverse en ellas.

La teoría química donde el colorante se une a la sustancia coloreable combinándose con ella íntimamente debido a la presencia de agrupaciones moleculares ácidas o básicas en los componentes celulares o tisulares que se unen respectivamente a los cromógenos básicos y ácidos de los colorantes, formando sales insolubles. Una prueba de ello es el hecho de la casi imposibilidad de separar completamente el colorante de los componentes en donde ejerció su acción de tinción aun empleando sus líquidos solventes. De acuerdo a esta teoría los colorantes se unen (ligan) a los tejidos por enlaces iónicos, covalentes o de hidrógeno. El enlace iónico o electrostático ocurre cuando el colorante y la sustancia que se va a teñir, desarrollan diferentes cargas eléctricas y entonces se atraen una a la otra, por ejemplo, el citoplasma se colorea porque las proteínas citoplasmáticas poseen carga eléctrica (+) y las partículas del colorante tienen carga eléctrica (-).

Clasificación de los colorantes. Existen varios criterios para clasificar a los colorantes:

Por su origen. Pueden ser naturales y artificiales (sintéticos). Colorantes naturales, se extraen de animales como el carmín, que se extrae de la cochinilla, artrópodo parásito de

los tallos del nopal (tuna). El carmín (de color rojo intenso) es uno de los colorantes naturales más empleado en la industria alimentaria y cosmética. En técnica histológica se utiliza el carmín de Best para demostrar glucógeno, el carmín de Mayer para demostrar mucina; las células fagocíticas se evidencian con el carmín de litio (colorante vital). Vegetales como la hematoxilina, obtenida de la corteza de un árbol, el “palo de campeche” (*Haematoxylum campechanum*), la safranina que se extrae de una liliacea (pistilos de la flor de azafrán) o la orceína que se obtiene de un líquen.

Colorantes artificiales o sintéticos. Son productos derivados de la destilación de la hulla o carbón y se clasifican en ácidos: son sales cuya parte básica es incolora y el componente ácido posee color. Así, en el colorante eosina o eosinato de sodio, la propiedad colorante se debe al ácido eosínico y no a la base, el sodio. Los colorantes ácidos tienen carga eléctrica negativa, por lo tanto la designación correcta es la de colorantes aniónicos. También se les conoce como colorantes citoplasmáticos, pues tiñen al grupo químico, cargado eléctricamente, localizado en un extremo de la cadena de aminoácidos que integran las proteínas citoplasmáticas. Las sustancias que atraen eléctricamente a los colorantes ácidos se denominan “acidófilas” y químicamente están constituidas por componentes básicos o alcalinos. Ejemplos: la eosina, el amarillo de metanilo, la fucsina ácida, el ácido pícrico, el verde rápido, el naranja G, la safranina, el azul de anilina, etc. b) Básicos. Son sales que poseen la base coloreada e incolora la porción ácida; por ejemplo, el azul de metileno o clorhidrato de azul de metileno, debe su propiedad colorante a la base azul de metileno y no al ácido clorhídrico que es incoloro. Poseen una carga eléctrica positiva, por lo tanto son colorantes catiónicos. Se les denomina también colorantes nucleares, pues tienen afinidad por los ácidos nucleicos (ADN y ARN). Las sustancias teñidas por los colorantes básicos se denominan “basófilas” y están constituidas por componentes ácidos. Ejemplos: la hematoxilina, el rojo nuclear, el azul de metileno, la tionina, el azul de toluidina, la fucsina básica.

Coloración de hematoxilina-eosina (H&E) La coloración de hematoxilina-eosina se considera como la técnica de tinción de uso más frecuente en el estudio de células y tejidos, a través del microscopio, consiste en la tinción de los núcleos mediante una

hematoxilina ya que es catiónica tiñendo de azul, azul morado, violeta, pardo oscuro o negro el núcleo para ello debe estar previamente oxidada y transformada en hemateína a la que se le añade una sustancia mordiente para formar una laca (para tal fin se usan sales metálicas de aluminio, plomo o hierro), dependiendo de los agentes oxidantes y mordientes que se utilizaron. El citoplasma y material extracelular utilizando la eosina que es aniónica que les confiere diversos grados de color rosado al citoplasma.

El procedimiento de coloración de H & E es el siguiente:

1. Se desparafinó los cortes con un previo de 1 hora en estufa a 53 °C, después sumergió en xilol (1) durante 15 minutos después a xilol (2) 10 lavados
2. Se hidrató los cortes en baños decrecientes de alcohol, etanol absoluto (100°) 10 lavados, cada lavado es sumergir la canasta con las muestras un tiempo breve de 2 segundos y sacarlas a la superficie, después etanol al 90° 10 lavados, etanol al 80° 10 lavados, etanol al 70° 10 lavados, agua corriente 10 lavados.
3. Se coloreó con la solución de hematoxilina, en este paso es conveniente respetar el tiempo de coloración que recomienda cada tipo de solución de hematoxilina. Dependiendo de la fórmula de preparación el tiempo puede variar de 3 a 20 minutos. La hematoxilina de uso más frecuente es la hematoxilina alumínica de Harris 3 a 5 minutos, que fue la usada para las muestras de páncreas, se realizó con un tiempo de 5 minutos para las muestras de páncreas. Se Lavó con agua corriente 10 lavadas.
5. Se diferenció, para eliminar el exceso de colorante, se empleó el alcohol ácido al 1%, hasta que los núcleos y los componentes basófilos de las células fueron los únicos que permanecieron teñidos, lavar 10 veces con agua corriente, para virar al color azul, empleando soluciones de sustancias alcalinas como agua amoniacal 2 lavados, lavar con etanol al 96°C 10 lavados
6. Se coloreó con una solución alcohólica de eosina 3 a 5 minutos.

7. Se deshidrató en baños crecientes de alcohol etílico alcohol 70° 10 lavados, etanol 80° 10 lavados, etanol al 90° etanol absoluto (100°) 10 lavados, etanol absoluto (100°) 10 lavados.

8. Se diafanizó o aclaró empleando xilol 1 durante 10 lavados xilol 2 10 lavados. En estas condiciones los tejidos están preparados para realizar en ellos el montaje

Montaje.

Concluido el proceso de la tinción de los cortes, éstos se colocaron en condiciones de protección para poderlos utilizar infinidad de veces sin que se deterioren. Para alcanzar tales propósitos se recurrió al último procedimiento que es el montaje. Este procedimiento consiste en colocar encima del corte coloreado y diafanizado una gota de una sustancia adherente, se usó resina sintética de la marca HYCEL, diluida generalmente en xilol al 60° cuyos índices de refracción son similares a los del vidrio y encima de ellos, una laminilla cubreobjetos, cuidando que no queden burbujas de aire entre la resina. A continuación se dejó que el xilol se evapore, y la resina adquiera solidez suficiente para ser observadas.

(APÉNDICE 5)

Actividad antioxidante

(Murillo, 2006).

La actividad antioxidante se evaluó 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 (1-100 ppm), por medio de espectrometría UV-VIS. En una placa de ELISA se adicionaron 50 µL de la solución problema a diferentes concentraciones (1-100ppm) por triplicado, posteriormente a cada pozo con las concentraciones señaladas, se adicionaron 150 µL de una solución metanólica de DPPH cuya concentración final fue de 100 µg/mL; inmediatamente se protege de la luz y se mantendrá en agitación constante durante 30

min a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo se determinó la absorbancia a 540nm en un lector de ELISA SLT Spetra; el blanco fue aplicando 200µL de metanol en los pozos y como control positivo se usa quercetina a las mismas condiciones que el compuesto problema.

Interpretación de Resultados

Los resultados fueron reportados obteniendo el porcentaje de reducción y se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reducción} = (C-E/C) * 100$$

En donde:

C= Absorbancia del control positivo (DPPH con metanol)

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

(APÉNDICE 6)

Contenido de Fenoles Totales (CFT)

(Método modificado de Singleton *et al.*, 1999)

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

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

Se utiliza una solución estándar de ácido gálico de 0.2 mg/mL. A partir de esta solución se toman las alícuotas correspondientes para obtener las concentraciones seriadas de ácido

gálico (0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.2 mg/mL), a cada una se le agrega el volumen correspondiente de agua destilada para obtener las concentraciones mencionadas a un volumen final de 1 mL. Cuadro 5.

Para el análisis de fenoles totales del extracto, se prepara una solución estándar (0.2 mg/mL), se toma una alícuota de 250 μ L de esta y se agregan 750 μ 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 6mL de agua destilada a continuación se adicionan 500 μ L de reactivo Folin-Ciocalteu. Después de cinco minutos se añaden 1.5 mL de una solución de Na_2CO_3 (200 g/L) y agua hasta completar un volumen de 10mL.

Después de dos horas de reacción a temperatura ambiente se determina la absorbancia a 760nm. Cada concentración se determina por triplicado.

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

Tubo B (blanco)	[Ácido gálico] mg/mL	μL patrón	μL agua destilada	mL Agua destilada
1	0.00625	31.25 (31)	968.75 (968.5)	7
2	0.0125	62.5	937.5	7
3	0.025	125	875	7
4	0.05	250	750	7
5	0.1	500	500	7
6	0.2	1000	0	7
P (problema)	-	250	750	7

Cuadro 5. Curva patron para cuantificar fenoles totales

(APÉNDICE 7)**Flavonoides totales**

(Método de Down)

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 μ L, se emplearon 2 mg de quercetina en 2 mL de MeOH.

[] ppm	μ L STOCK	μ L MeOH	(AlCl ₃) al 2% mL
1	3	2997	3
2	6	2994	3
3	9	2991	3
4	12	2988	3
5	15	2985	3
6	18	2982	3
7	21	2979	3
8	24	2976	3
9	27	2973	3
10	30	2970	3
20	60	2940	3
30	90	2910	3
40	120	2880	3
50	150	2850	3
60	180	2820	3
70	210	2790	3
80	240	2760	3

90	270	2730	3
100	300	2700	3
problema	3 mL	0	3

Cuadro 4. Curva patrón para la cuantificación de flavonoides

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 preparan 3 mL de cloruro de aluminio (AlCl_3) al 2% en metanol, se mezcla con 3 mL del extracto en solución a probar (0.2mg/mL).

La prueba se hace por triplicado.

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 (eQ/g).

Bibliografía

- Annadurai, T., Muralidharan, A.R., Joseph, T., Hsu, M.J., Thomas, P.A., and Geraldine, P. (2012). Antihyperglycemic and antioxidant effects of a flavanone, naringenin, in streptozotocin-nicotinamide-induced experimental diabetic rats. *Journal of physiology and biochemistry* 68, 307-318.
- Armutcu, F., Akyol, S., Ustunsoy, S., and Turan, F.F. (2015). Therapeutic potential of caffeic acid phenethyl ester and its anti-inflammatory and immunomodulatory effects (Review). *Experimental and therapeutic medicine* 9, 1582-1588.
- Bankova, V. (2005a). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of ethnopharmacology* 100, 114-117.
- Bankova, V. (2005b). Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2, 29-32.
- Beers, M., Berkow, R. (1999). *El Manual Merck de Diagnóstico y Tratamiento*. 10a Edición. Harcourt, Madrid.
- Chandran, R.; Suba, G.; Venkat, V.; Hameetha, B.; Chinnasamy, K.; Narayanan, R. (2008). Probing the role of aromatic residues at the secondary saccharide binding sites of human salivary α -amylase in substrate hydrolysis and bacterial binding. *J Mol Biol.* 384 1232–1248.
- Cheng, A.Y., and Fantus, I.G. (2005). Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* 172, 213-226.
- Daniele, S., Luca, R., Gian, P., Pamela, M., Marcello, B., Roberto, M., Francesca, C., Gian, P., Ettore, B., Giuseppe, D. (2015). Sulfonylureas and their use in clinical practice. *Arch Med Sci* 4. 840–848.
- Danish, A., Vikas, K., Manju, S., Amita, V. (2014). Target guided isolation, in-vitro antidiabetic, antioxidant activity and molecular docking studies of some flavonoids from *Albizzia Lebbeck Benth. Bark*. *Complementary and Alternative Medicine*. 13. 140:155.
- De, D., Ali, K.M., Chatterjee, K., Bera, T.K., and Ghosh, D. (2012). Antihyperglycemic and antihyperlipidemic effects of n-hexane fraction from the hydro-methanolic extract of sepals of *Salmalia malabarica* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of complementary & integrative medicine* 9, Article 12.
- Dobrowolski, J.W., Vohora, S.B., Sharma, K., Shah, S.A., Naqvi, S.A., and Dandiya, P.C. (1991). Antibacterial, antifungal, antiamoebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *Journal of ethnopharmacology* 35, 77-82.
- Domínguez, X. A. (1973). *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Limusa. México. 1. 3-17.
- El-Sayed el, S.M., Abo-Salem, O.M., Aly, H.A., and Mansour, A.M. (2009). Potential antidiabetic and hypolipidemic effects of propolis extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences* 22, 168-174.

- Farré, R., Frassetto, I., Sánchez, S. (2004). El própolis y la salud. *Ars Pharmaceutica*, 45 (1): 21-43.
- Flórez, J., Armijo, J., Mediavilla, A. (1997). *Farmacología humana*. Masson, Barcelona. 3. 927-1300
- Fuliang, H.; Hepburn, H.; Xuan H. (2005). Effects of propolis on blood glucose, blood lipids and free radical in rats with Diabetes mellitus. *Pharmacol. Res.* 51, 1255–1261.
- Geckil, H., Ates, B., Durmaz, G., Erdogan, S., Yilmaz, I. (2005). Antioxidant, Free Radical Scavenging and Metal chelating characteristics of propolis. *Am. J. Biochem. Biotech.* 1, 27–31.
- Gonzalez, G. (2002). Tratamiento farmacológico para la diabetes mellitus. *Hospital General.* 5. 33-41.
- Goodman, L., Bruton, L., Lazo, J., Parker, K. (2006). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Mc Graw-Hill, México. 11. 560-620.
- Gulcin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of toxicology* 86, 345-391.
- Guyton, A., Hall, J. (2001). *Tratado de fisiología médica*. Mc Graw-Hill Interamericana, México. 10. 890-940.
- Harrison (2012). *Principios de Medicina Interna*. 18. Mc Graww Hill. 2. 21-22.
- Huang, D., Jiang, Y., Chen, W., Yao, F., Huang, G., and Sun, L. (2015). Evaluation of hypoglycemic effects of polyphenols and extracts from *Penthorum chinense*. *Journal of ethnopharmacology* 163, 256-263.
- Jachak, S. (2002). Herbal drugs an antidiabetic: An overview. *Pharmacognosy* 3. 9–13
- Jaganathan, S.K., and Mandal, M. (2009). Antiproliferative effects of honey and of its polyphenols: a review. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2009, 830616.
- Juárez-Reyes, K., Brindis, F., Medina-Campos, O.N., Pedraza-Chaverri, J., Bye, R., Linares, E., and Mata, R. (2015). Hypoglycemic, antihyperglycemic, and antioxidant effects of the edible plant *Anoda cristata*. *Journal of ethnopharmacology* 161, 36-45.
- Kędzia, B., Hołderna, K. (2006). The bee products in the nutrition and supplementation. *Post. Fitoter.* 213–221.
- Kędzia, B. (2009). Chemical composition of polish propolis. Part I. The initial period of investigations. *Post. Fitoter.* 1, 39–44.
- Kim, W., and Egan, J.M. (2008). The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. *Pharmacological reviews* 60, 470-512.
- Kokoszko, B., Jan, S., Andrzej, L., Karbownik, L. (2014). Protective antioxidative effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in the thyroid and the liver are similar to those caused by melatonin. *Thyroid Research.* 10. 7-15.
- Leja M., Mareczek G., Wyzgolik G., Klepacz B., Czekońska K. (2007). Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chem.* 237–240,
- Lichtman. A. (2005). *Inmunología celular y molecular*. Elsevier España. 5. 120-132.

- López, G. (1998). Nueva clasificación y criterios diagnósticos de la diabetes mellitus. *Rev. Méd. Chile.* 126-127.
- López, A. (2004). Propóleo: Composición y beneficios. *Imagen Veterinaria*, 4. 41-44.
- Martins R., Pereira E., Lima J., Senna M., Mesquita R., Santos V. (2002). Effect of commercial ethanol propolis extra with the in vitro growth of *Candida albicans* collected from HIV-seropositive and HIV-seronegative Brazilian patients with oral candidiasis. *J Oral Sci.* 44(1). 41-48.
- Matsui, T., Ebuchi, S., Fujise, T., Abesundara, K.J., Doi, S., Yamada, H., and Matsumoto, K. (2004). Strong antihyperglycemic effects of water-soluble fraction of Brazilian propolis and its bioactive constituent, 3,4,5-tri-O-caffeoylquinic acid. *Biological & pharmaceutical bulletin* 27, 1797-1803.
- McMahan, M.M., and Bistrain, B.R. (1995). Host defenses and susceptibility to infection in patients with diabetes mellitus. *Infectious disease clinics of North America* 9, 1-9.
- Murillo, F. (2006). Actividad antioxidante in Vitro de las bebidas de frutas. *Tecnológica Alfa editores técnicos.* 1-27.
- Nam H., (2013). *IDF DIABETES ATLAS.* 6. 1-160.
- Nayak, Y., Hillemane, V., Daroji, V.K., Jayashree, B.S., and Unnikrishnan, M.K. (2014). Antidiabetic activity of benzopyrone analogues in nicotinamide-streptozotocin induced type 2 diabetes in rats. *TheScientificWorldJournal* 2014, 854267.
- Neira, M., Moriamez, D., Heinsohn, P. (2000). VI Encuentro de Ciencia y Tecnología Apícola. Valdivia, Chile.
- Okine, L.K., Nyarko, A.K., Osei-Kwabena, N., Oppong, I.V., Barnes, F., and Ofosuhene, M. (2005). The antidiabetic activity of the herbal preparation ADD-199 in mice: a comparative study with two oral hypoglycaemic drugs. *Journal of ethnopharmacology* 97, 31-38.
- Palomino, G., García, P., Gil G., Rojano, B., Durango, R. (2009). Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). *facultad de química farmacéutica.* 16. 388-395.
- Peng, X., Zhang, G., Liao, Y., and Gong, D. (2016). Inhibitory kinetics and mechanism of kaempferol on alpha-glucosidase. *Food chemistry* 190, 207-215.
- Radhe, S., Swastika, G., Kiattawee, C., Supaporn, S. (2015). Synthesis, HIV-1 RT inhibitory, antibacterial, antifungal and binding mode studies of some novel N-substituted 5-benzylidene-2,4-thiazolidinediones. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 24. 23-36.
- Ramanujam, C.L., Han, D., and Zgonis, T. (2015). Lower Extremity Amputation and Mortality Rates in the Reconstructed Diabetic Charcot Foot and Ankle With External Fixation: Data Analysis of 116 Patients. *Foot & ankle specialist.*

- Russo, A., Cardile, V., Sanchez, F., Troncoso, N., Vanella, A., and Garbarino, J.A. (2004). Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life sciences* 76, 545-558.
- Saxena, A., Vikram, N., (2004). Role of selected Indian plant in management of Type 2 Diabetes: a review, *J Altern Complement Med.* 10(2). 369-378.
- Shi, H., Yang, H., Zhang, X., and Yu, L.L. (2012). Identification and quantification of phytochemical composition and anti-inflammatory and radical scavenging properties of methanolic extracts of Chinese propolis. *Journal of agricultural and food chemistry* 60, 12403-12410.
- Silva, F., Borges F., Guimaraes C., Lima J., Matos C., Reis S. (2000). Phenolic acids and derivatives studies on the relationship among structure, radical scavenging activity and physicochemical parameters. *J. Agric. Food Chem.* 48 (6) 2122–2126.
- Singleton, V., Orthofer, R., Lamuela, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299. 152-178.
- Tilg, H., Moschen, A. (2006). Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature reviews.* 6. 772-783.
- Tohamy, A.A., Abdella, E.M., Ahmed, R.R., and Ahmed, Y.K. (2014). Assessment of anti-mutagenic, anti-histopathologic and antioxidant capacities of Egyptian bee pollen and propolis extracts. *Cytotechnology* 66, 283-297.
- Vargas-Sanchez R., Torrescano U., Sanchez E. (2013). El propóleos: conservador potencial para la industria alimentaria. *Interciencia* 38, 10, 705-711.
- Vázquez, C. (2013). Evaluación del efecto hipoglucemiante de un sesquiterpeno (Eudesmano) aislado de *Verbesina persicifolia* DC. TESIS. México, D.F. 1-77.
- Viollet, B., Guigas, B., Sanz Garcia, N., Leclerc, J., Foretz, M., and Andreelli, F. (2012). Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clinical science* 122, 253-270.
- Volpi, N. (2004). Separation of flavonoids and phenolic acids from propolis by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 25, 1872-1878.
- Zhang, J., Cao, X., Ping, S., Wang, K., Shi, J., Zhang, C., Zheng, H., and Hu, F. (2015). Comparisons of ethanol extracts of chinese propolis (poplar type) and poplar gums based on the antioxidant activities and molecular mechanism. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2015, 307594.
- Zhu, W., Chen, M., Shou, Q., Li, Y., and Hu, F. (2011). Biological activities of chinese propolis and brazilian propolis on streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus in rats. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2011, 468529.