



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

Comparación de algunas propiedades biomédicas de dos propóleos de diferentes estados de la República Mexicana.

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA
PRESENTA:

Argueta Rodríguez Fátima Ileana

Bajo la dirección del **Dr. MARCO AURELIO RODRÍGUEZ MONROY**

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México

2016





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.

Tabla de contenido

RESUMEN	i
I INTRODUCCIÓN	1
1. Propóleo	1
2. Metabolitos secundarios	2
3. Flavonas	5
4. Amibas de vida libre	6
4.1 Respuesta inmune a agentes patógenos	7
5. Proceso inflamatorio	8
5.1 Tipos de inflamación	8
5.2 Funciones principales de la respuesta inflamatoria aguda	9
5.3 Manifestaciones crónicas	9
5.4 Composición del exudado inflamatorio agudo	10
6. Migración de neutrófilos	11
6.1 Característica de los neutrófilos	13
7. Fármacos para el tratamiento inflamatorio	14
7.1 Efectos adversos	14
7.2 Los analgésicos antipiréticos, antiinflamatorios no esteroideos	15
7.3 Efectos adversos	15
8. Medicina alternativa	16
9. Antecedentes	17
II Objetivos	18
1. Objetivo general	18
2. Objetivo particular	18
III Materiales y métodos	19
1. Efecto antiamibiano del extracto de diferentes propóleos sobre <i>A. castellani</i> y <i>N. fowleri</i>	19
2. Ensayo antiinflamatorio utilizando el modelo de edema plantar	20
3. Técnica histológica (tinción de hematoxilina-eosina	21
4. Técnica de inhibición de la migración de neutrófilos en la cavidad peritoneal	21
5. Caracterización química	22
IV Resultados	23
1. Efecto antiamibiano del extracto etanólico dos propóleos sobre <i>A. castellani</i> y <i>N. fowleri</i>	23
2. Ensayo antiinflamatorio utilizando el modelo de edema plantar	25
3. Técnica histológica (tinción de hematoxilina-eosina)	27

4. Técnica de inhibición de la migración de neutrófilos en la cavidad peritoneal	29
5. Caracterización química.....	31
V DISCUSIÓN	41
VI CONCLUSIONES	45
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46,47,48

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. Cesar Mateo Flores Ortiz.

Dra. M. Margarita Canales Martínez.

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy.

M.C. Oscar de Jesús Nieto Yáñez.

M.C. Luis Antonio Hernández González.

DEDICATORIAS

A mi Papá, quien me ha dado todo el apoyo, quien en ningún momento ha soltado mi mano aun cuando siento que ya no está cerca; en quien pienso, y no puedo dejar de sentir un enorme orgullo porque mejor papá no me pudo dar la vida. Todo lo aprendido en mi vida es gracias a tu paciencia y cariño, que en ningún momento me falta... simplemente mi todo... Te quiero mucho (siempre estarás en mi corazón).

A mi Ma, que has sido muy paciente en todo momento, a pesar de todo siento tu apoyo y te agradezco enormemente por seguir a mi lado, yo sé que no es fácil esta etapa que nos tocó vivir, pero sé que saldremos adelante... Te quiero mucho.

Súper estrella categoría R (mi spider hermano), gracias por tu apoyo, los tiempos que me has dado de alegrías cuando lo necesito; de alguna forma extraña nos entendemos y sabemos cuándo uno necesita del otro... aunque sea solo estar allí sin decir palabra alguna; no te lo digo pero sabes que: Te quiero mucho.

A mi Papi, mi Mami, mi abuelita y mi abuelito, siempre procurando que estemos bien, y siendo un gran apoyo desde que era pequeña hasta ahorita, siempre estando en sus oraciones; les agradezco mucho que estén conmigo en todo momento. Los quiero mucho.

A mi Lale y mi Manina, quienes me brindan su apoyo, que a pesar de todo siempre estar cerca cuando los necesito... los quiero mucho.

A mi Pelo y la tía Rosy, sus consejos nunca faltan y más cuando mi corazón se siente triste... Sé que contare siempre con ustedes y estoy agradecida de que me brinden su cariño, yo también los quiero mucho.

A Frida, aunque te parezca gracioso, para mí siempre serás mi hija ante todo... te quiero mucho mi niña, tus abrazos me llenan de alegría...

Adry, mi mejor amiga, eres de esos hermanos que uno puede escoger en el camino, fue muy raro la manera en que nos conocimos y como llegamos a tener esta amistad que espero nunca perder; te quiero mucho.

Alán, Brisa y Rafa, los momentos que pasamos juntos y su amistad nunca la olvidare... Alán eres un amigo que no cambiaría por nada; las risas nunca faltaron a tu lado, donde estés espero verte pronto...

A la Dra. Leticia Verdín, por todo su apoyo, paciencia, sus consejos y enseñanzas, aun la tengo presente en mis pensamientos.

A Víctor, cuando entraste a mi vida, fue una etapa difícil para mí y tu sola presencia y apoyo (junto al de mi Papá y mi Mamá) fueron suficientes para querer seguir este camino, me sorprendes cada vez, tus ocurrencias, la manera en que ves las cosas, además de tu amor, son un motor para mí. Te amo mucho

Y por último y no menos importante al Panzón, Helena, Nina, y Pimpón, además de al nuevo miembro de la familia mimishka, que en las tristezas y alegrías siempre están sin importar nada, su compañía es un fuerte para mí, los quiero mucho a los pulgosos de la casa.

RESUMEN

El propóleo es un producto natural de abejas, que procede de distintas fuentes vegetales, es una sustancia resinosa recolectada por las abejas (*Apis mellifera*). Este se compone principalmente de resinas, ceras de abejas, ácidos grasos, aceites esenciales, polen, minerales, vitaminas etc. El propóleo es uno de los medicamentos más frecuentemente utilizados; en la actualidad; ocupa un lugar destacado dentro de la Apiterapia. Se le han atribuido diversas propiedades biológicas, como su capacidad antimicrobiana, cicatrizante y antiinflamatoria. Sin embargo, investigaciones sobre propóleos en diferentes áreas geográficas han mostrado grandes diferencias en su composición química y por lo tanto en sus propiedades biológicas.

En este trabajo reportamos por primera vez, el efecto antiamebiano de dos extractos de propóleo Edo. de México y Guanajuato, sobre *Naegleria fowleri* y *Acanthamoeba castellanii*, donde el propóleo de Edo. de México presentó una CL_{50} de 0.015 mg/ml y Guanajuato una CL_{50} de 0.012 mg/ml, para el caso de *N. fowleri*; respecto a *A. castellanii*, las CL_{50} fueron de 0.62mg/ml y CL_{50} de 0.61 mg/ml respectivamente para cada propóleo. Así mismo, se determinó su efecto antiinflamatorio de ambos extractos, mediante el método de edema plantar por carragenina, obteniendo que la concentración de 500 mg/Kg y 750 mg/Kg en ambos extractos de propóleo presentan disminución de edema con un 50 % y 40 % de actividad antiinflamatoria para los dos casos; además, de que no presentan diferencias significativas entre ambas concentraciones. Por otra parte se midió la inhibición de migración de neutrófilos por citometría de flujo, en la cual se observó que el propóleo de Guanajuato presenta una disminución favorable de la migración de los neutrófilos con respecto al propóleo del Edo. México.

Para ambos extractos se realizaron un análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) encontrándose presencia de flavonoides (pinocembrina, pinostrobinina, naringenina entre otros).

I. INTRODUCCIÓN.

1. PROPÓLEO

El propóleo es un producto natural de abejas que procede de distintas fuentes vegetales, es una sustancia resinosa recolectada por las abejas (*Apis mellifera*) a partir de yemas, brotes y peciolos de las hojas de diferentes vegetales y que mezclan en la colmena con ceras y secreciones salivales (1). Posteriormente con sus mandíbulas trabajan la resina; esto es posible gracias a que dentro de su mandíbula desemboca un conducto que proviene de las glándulas mandibulares y que da salida a secreciones las cuales ablandan la resina. Esta es llevada a la colmena donde es utilizada para cerrar grietas o desinfectar (2).

El propóleo se ha utilizado desde la antigüedad en la medicina popular en diversas partes del mundo; los antiguos egipcios lo utilizaban para embalsamar a sus muertos mientras que los griegos fueron quien dieron origen a su nombre y es a partir de esta época que ha sido ampliamente utilizado. En la actualidad sigue siendo uno de los medicamentos más frecuentemente utilizados (2).

Así mismo el propóleo en bruto se compone principalmente de resinas (40 - 55%), ceras de abejas y ácidos grasos (20-35%), aceites esenciales (aproximadamente 10%), polen (aproximadamente 5%), minerales, vitaminas y algunos otros componentes como los polifenoles (flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres), terpenoides, esteroides y aminoácidos (3).

El propóleo ocupa un lugar destacado dentro de la Apiterapia; actualmente, se le han atribuido diversas propiedades biológicas, como su capacidad antimicrobiana, cicatrizante y antiinflamatoria. Esta última, comparable a la de anti-inflamatorios como el diclofenaco. Se señaló al ácido cafeico como responsable de inhibir la dihidrofolato reductasa, reduciendo la producción de interleucinas y prostaglandinas (4)

En los últimos estudios se han señalado las propiedades anti-inflamatorias de la miel y el propóleo, propiedades, debido básicamente a la presencia de flavonoides que inhiben el desarrollo de la inflamación provocada por una variedad de agentes (5).

Entre estos flavonoides, la galangina es de particular interés. Este compuesto es capaz de inhibir la ciclooxigenasa (COX) la actividad de la lipo-oxigenasa, lo que limita la acción de la poligalacturonasa y la reducción de la expresión de la isoforma inducible de la COX-2 (6). Otro compuesto el cual está presente en propóleos, es el ácido cafeico fenetil éster (CAPE), el

cual muestra actividad anti-inflamatoria a través de la inhibición la liberación de ácido araquidónico de la membrana celular, lo que conduce a la supresión de la actividad COX-1 y COX-2 e inhibe la activación de la expresión génica de la COX-2 (5).

2. METABOLITOS SECUNDARIOS

Dentro de los productos naturales se pueden reconocer los Metabolitos Primarios y los Metabolitos Secundarios. Estos no se pueden diferenciar con base a su estructura química, molécula precursora u orígenes biosintéticos. En ausencia de una distinción por su estructura o bioquímica, se tiene en cuenta su función, de modo que serán metabolitos primarios aquellos que participan en la nutrición y procesos metabólicos esenciales para la planta, mientras que los metabolitos secundarios serán los que permitan las interacciones ecológicas de la planta con su entorno (7).

Algunos metabolitos secundarios están presentes en determinadas especies y cumplen funciones ecológicas específicas como: atraer a los insectos polinizadores, también pueden actuar como pesticidas naturales en defensa contra algunos herbívoros o microorganismos patógenos, incluso algunos metabolitos secundarios pueden funcionar como agentes alelopáticos (sustancias que permiten la competición entre especies), o bien pueden presentarse en respuesta a algún daño en el tejido de la planta dado por un agente físico agresivo, etc. (7).

Existen una gran variedad de metabolitos secundarios, estos se agrupan según su origen biosintético común, y es así como encontramos a los tres grupos de metabolitos secundarios más importantes:

- Los **Terpenoides**
- Los **Fenilpropanoides**
- Los **Alcaloides**

A continuación se hablará de ellos brevemente.

Terpenoides:

Son compuestos formados por repeticiones de una molécula de cinco átomos de carbono llamada isopreno. Por lo que, los terpenoides se clasifican por el número de unidades de isopreno que los compongan. Como lo son los **Isoprenos** (terpenoide más simple, un producto volátil producido por los tejidos fotosintéticos), **Monoterpenos** (formado por dos moléculas de isopreno, suelen ser los componente de las esencias de las flores y de los aceites de las hierbas y especias); **Sequisterpenos** (formados por tres moléculas de isopreno, estos además de aparecer en aceites esenciales también actúan como fitoalexinas);

Diterpenos (formado por cuatro moléculas de isopreno, a este grupo pertenecen el fitol, y fitoalexinas), los **Triterpenos** (formados por seis moléculas de isopreno, en este grupo encontramos los brasinosteroides y fitoesteroles) y por último los **Tetraterpenos** (derivados de la unión de 8 unidades de isopreno que origina un esqueleto de 40 átomos de carbono, encontrando los carotenos) (7).

Alcaloides:

Se definen generalmente como sustancias de origen vegetal que poseen uno o más átomos de nitrógeno como parte de un sistema cíclico, que manifiesta significativa actividad farmacológica. Se ha reportado que algunos intervienen como reguladores de crecimiento, como repelentes o atrayentes de insectos (7)

Fenilpropanoides:

Uno de los grupos más numerosos y ampliamente distribuidos, estos compuestos se caracterizan por tener en su estructura un anillo aromático con uno o más grupos hidróxilos, algunos como los flavonoides, contienen quince átomos de carbono en su núcleo básico y están arreglados bajo un sistema C6-C3-C6; en el cual dos anillos aromáticos llamados A y B están unidos por una unidad de tres carbonos que pueden o no formar un tercer anillo y las cumarinas que en general son lactonas insaturadas y comprenden otra clase de compuestos C6-C3, prácticamente todas las cumarinas, poseen un sustituyente oxigenado en posición 7 (7).

La mayoría de estos compuestos constituyen la pared celular, algunos para proteger a la planta, otros establecen el color, olor y sabor. Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes. Estos con base a esta estructura se permiten una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C (8).

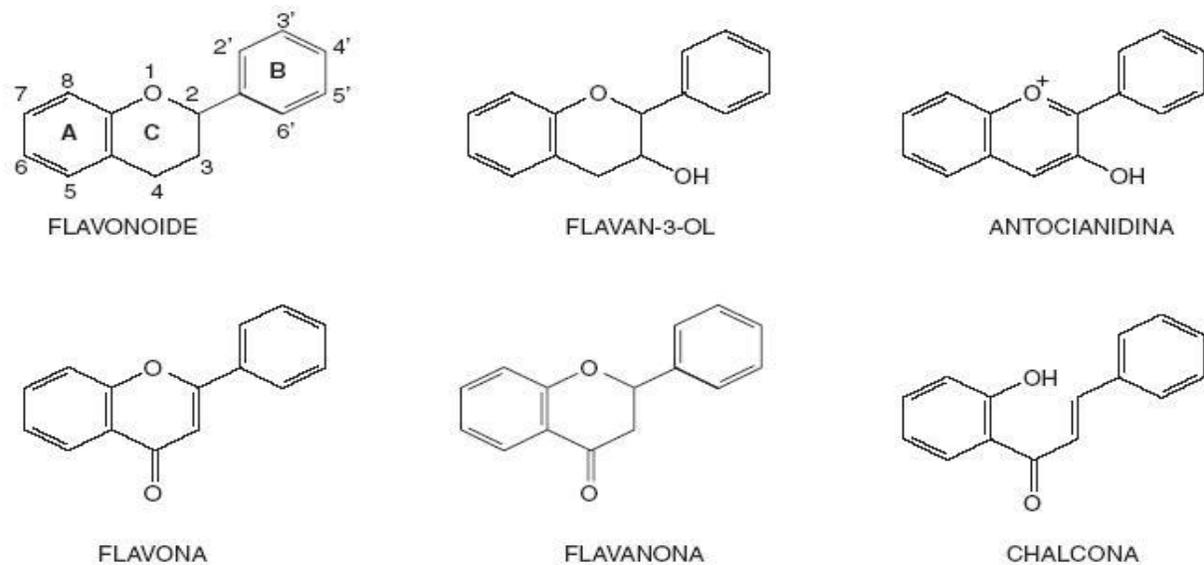


Fig. 1. Algunos ejemplos de fórmulas químicas de flavonoides.

A lo anteriormente mencionado encontramos dentro de este grupo, la siguiente clasificación:

1. **Flavanos:** como la catequina, con un grupo-OH en posición 3 del anillo C.
2. **Flavonol:** representados por la quercetina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo-OH en posición 3 del anillo C.
3. **Flavonas:** como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.
4. **Antocianidinas:** que tienen unido el grupo-OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C

Dentro de la diversa gama de grupos fenolicos el que mas resalta son las flavonas, por ser un grupo amplio y mayor constituyente biologico de los productos naturales.

3. FLAVONAS.

Son estructuras fenólicas que contienen un grupo carbonilo. Constituyen la familia más amplia de fenoles naturales. Su actividad frente a los organismos, probablemente se debe a que forman complejos con las proteínas solubles. Otros flavonoides tienen en general actividad antiviral, como la glicirricina. Los flavonoides se encuentran en frutas, verduras, semillas y flores, así como en cerveza, vino, té verde, té negro y soja, los cuales son consumidos en la dieta humana de forma habitual y también pueden utilizarse en forma de suplementos nutricionales, junto con ciertas vitaminas y minerales. Los flavonoides se encuentran también en extractos de plantas como arándano, ginkgo biloba, cardo, mariano o crataegus. Desempeñan un papel importante en la biología vegetal; así, responden a la luz y controlan los niveles de las auxinas reguladoras del crecimiento y diferenciación de las plantas. Otras funciones incluyen un papel antifúngico y bactericida, confieren coloración, lo que puede contribuir a los fenómenos de polinización (8).

Los flavonoides, también poseen una actividad antiinflamatoria como la luteonina la cual en estudios *in vivo* de inflamación, esta disminuyó en orejas de ratones producida por acetato de miristatoforbol y ozaxolona. Así mismo *Ginkgo biloba* mostró que algunos de sus flavonoides como quercetina presentan inhibición de la secreción de TNF- α . Otras sustancias de naturaleza flavonoide han mostrado tener importante actividad antiinflamatoria *in vitro* como el caso de geraniina y corilagina, dos flavonoides aislados del extracto acuoso de té verde. (8).

Se sabe que los flavonoides desde hace mucho tiempo ejercen diversos efectos biológicos como antioxidantes, agentes anticancerígenos y antimicrobianos, etc. Ellos son constituyentes comunes de la mayoría de las plantas medicinales y sus efectos terapéuticos ya se han descrito. Los flavonoides además representan una fuente inmensa para la búsqueda de nuevos candidatos de fármacos contra protozoos. El descubrimiento de nuevos fármacos contra protozoos es apremiante ya que algunos parásitos han incrementado su resistencia en forma gradual hacia las drogas convencionales, por lo que es necesario una mayor disponibilidad de agentes quimioterapéuticos que sean más efectivos, menos tóxicos y que brinden un menor costo a tratamientos de enfermedades endémicas (9)

Ejemplos de estos son las chalconas aisladas de *Dorstenia barteri* var. *subtriangularis* que fueron evaluadas *in vitro* contra una cepa de *Plasmodium falciparum*, mostraron potenciales

para el desarrollo antimalárico. Así mismo se reportan la acción atitripanosomal de las catequinas de *Camellia sinensis* contra dos diferentes estadios del desarrollo de *Trypanosoma cruzi*. (9)

Soto en el 2010, estudiaron los mecanismos involucrados en actividad antimibiana del flavonoide epicatequina. Ellos evaluaron los efectos ultraestructurales producidos por este flavonoide en los trofozoítos de *Entamoeba histolytica* (9,10)

4. AMIBAS DE VIDA LIBRE

La distinción entre los parásitos y protozoos de vida libre es generalmente dibujada con organismos que caen fácilmente en una u otra categoría. Algunas de las amibas de vida libre son inusuales, ya que se sitúan en la línea que separa los dos grupos de organismos y sin embargo son tan destructivas como cualquiera de los clásicos protozoos parásitos. A diferencia de sus homólogos de parásitos, estas no están bien adaptadas para el parasitismo; casi siempre matan a sus hospederos. Por otra parte, al ser de vida libre y ampliamente distribuidas en la naturaleza, no dependen de un huésped para su transmisión y difusión, ni la transmisión de huésped a huésped. Las amibas incluyen *Acanthamoeba spp.*, *Balamuthia*, *Naegleria fowleri*, *Sappinia diploidea*, entre otros representantes que, en virtud de su capacidad para sobrevivir dentro de un huésped mamífero, están preadaptados para un estilo de vida pseudo parasitaria y potencialmente patógena. Estos organismos han sido llamados amebas anfitriónicas en reconocimiento a su capacidad de vivir aliadas endozoicamente, sin embargo, son capaces de existir en vida-libre (11)

En el caso de *Naegleria* se han aislado más de 30 especies a partir de fuentes ambientales, solo *Naegleria fowleri* ha sido aislada de humanos. *N. fowleri* es agente causal de la Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MAP) la cual es una enfermedad mortal del Sistema Nervioso Central (12)

Sin embargo para *Acanthamoeba* el caso es diferente, es la amiba más común, presenta una distribución cosmopolita; siendo aislada de una variedad de hábitats incluyendo desde regiones tropicales hasta las regiones árticas. Dado a su amplia distribución en la naturaleza los seres humanos están en mayor contacto con esta, por lo que podemos encontrar presencia de anticuerpos contra *Acanthamoeba* en las poblaciones humanas y animales.

A pesar de las oportunidades para la infección, la acanthamoebiasis en las poblaciones es poco frecuente y a excepción de *Acanthamoeba keratitis* y *Acanthamoeba castellanii* esta última causante de Meningoencefalitis Granulomatosa Amebiana (MGA), en su mayoría esta limitada a huéspedes inmunocomprometidos; la acanthamoebiasis se desarrolla lentamente, con un engañoso curso clínico desde el momento de la infección (11)

Aunque, los números de infecciones causadas por estas amebas son bajos en comparación con otras parasitosis por protozoos (tripanosomiasis, toxoplasmosis, malaria, etc), su dificultad en el diagnóstico y el reto de encontrar tratamientos antimicrobianos óptimos, dada la morbilidad y mortalidad relativamente alta asociada con la encefalitis; han sido un motivo de preocupación para personal de laboratorio y parasitólogos clínicos.

4.1 RESPUESTA INMUNE A AGENTES PATOGENOS

El cuerpo está constantemente expuesto a microorganismos que se hayan en el ambiente, incluso si son expulsados por otros individuos. El contacto con estos microorganismos puede ocurrir por medio de superficies epiteliales externas e internas: la mucosa de vías respiratorias y gastrointestinales (13)

Las mordeduras, picaduras de insectos y las heridas, ofrecen un sin fin de oportunidades para que se desarrollen infecciones causadas por microorganismos. Sin embargo la mayoría de las veces las superficies epiteliales del cuerpo constituyen una barrera eficaz contra casi todos los microorganismos, pero cuando un microorganismo logra evadir o superar las defensas innatas del hospedero y establece un sitio de infección local, se replica para permitir su transmisión en el cuerpo (13)

La diseminación de un patógeno a menudo se contrarresta inicialmente por una respuesta inflamatoria que recluta más células y moléculas efectoras del sistema inmunitario innato, desde vasos sanguíneos locales, mientras que induce la coagulación adicional en el flujo descendente de manera que el agente patógeno no pueda diseminarse (13).

5. PROCESO INFLAMATORIO

La inflamación es la reacción de los tejidos vivos a todas formas de lesión. Se trata de una respuesta normal y como tal, se espera que suceda cuando hay daño en tejidos; la inflamación es una respuesta fisiopatológica fundamental con la que el organismo se defiende frente a factores endógenos (necrosis tisular o rotura ósea) o factores exógenos como lesiones por agentes físicos (quemaduras), químicos (corrosivos), biológicos (microorganismos) e inmunológicos (reacciones de hipersensibilidad) (14;15).

5.1 TIPOS DE INFLAMACIÓN

La respuesta inflamatoria puede clasificarse en fases aguda o crónica, en cada una de las cuales intervienen mecanismos muy complejos.

Cuando un tejido es lesionado y hay muerte celular es posible más de una respuesta. La zona lesionada puede ser sustituida por un tejido organizado de estructura y función idénticas a las originales. A esto se le denomina restitución, pero sólo puede darse si desaparece el agente lesivo, los detritus celulares se eliminan de la zona y las células especializadas destruidas pueden volver a crecer o regenerarse (16).

La inflamación aguda comprende la reacción inmediata y temprana de un agente lesivo. Esta respuesta es relativamente inespecífica y sus funciones principales son el de eliminar los tejidos muertos, proteger frente a una lesión local y facilitar el acceso del sistema inmunitario a la zona afectada (15; 16).

Si las células lesionadas no pueden regenerarse o la lesión local es tan intensa que ha destruido la arquitectura tisular, la restitución completa del tejido no siempre será posible. En tal caso la respuesta tisular consiste en reparar la zona afectada sustituyéndola por un tejido de cicatrización; proceso llamado reparación fibrosa. Pero si un agente lesivo persiste (sobre todo si se trata de una infección) y la destrucción tisular continua, los intentos de reparación fibrosa y las respuestas inmunitarias se producen al mismo tiempo. A esto se le denomina inflamación crónica (16)

5.2 FUNCIONES PRINCIPALES DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA AGUDA

La respuesta inflamatoria aguda posee tres funciones principales que son:

1. La zona afectada es ocupada por un material transitorio denominado exudado inflamatorio agudo. El cual aporta proteínas, líquido y células de los vasos sanguíneos a la zona afectada, para poner en marcha la defensa local.
2. Si existe un agente infeccioso en la zona lesionada, los componentes del exudado pueden destruirlo y eliminarlo.
3. El tejido lesionado puede ser lesionado y parcialmente licuado, y los detritus eliminados de la zona lesionada.

La respuesta inflamatoria aguda es controlada por la producción y difusión de mensajeros químicos derivados tanto de los tejidos lesionados como del exudado inflamatorio agudo (16).

5.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La inflamación aguda se manifiesta clínicamente por signos y síntomas característicos, que se presentan en mayor o menor grado:

- Enrojecimiento
- Tumefacción
- Calor
- Dolor

El enrojecimiento y el calor de la inflamación aguda son consecuencia de la vasodilatación y el aumento del flujo sanguíneo en la parte inflamada y el edema se debe a la acumulación de exudado, especialmente a un componente líquido. El dolor puede deberse a varios factores, entre ellos la presión sobre las terminaciones nerviosas o bien al efecto de ciertos factores químicos liberados para mediar la respuesta inflamatoria (14).

5.4 COMPOSICIÓN DEL EXUDADO INFLAMATORIO AGUDO

El exudado inflamatorio agudo esta formado por:

1. Líquido con sales y una elevada concentración proteica incluidas las inmunoglobulinas.
2. Fibrina, una proteína filamentosa insoluble de alto peso molecular.
3. Muchos neutrófilos polimorfonucleares derivados de leucocitos sanguíneos.
4. Algunos macrófagos, células fagocitarias que derivan de los monocitos sanguíneos.
5. Algunos linfocitos (16)

Todos estos componentes salen de la sangre a consecuencia de los cambios que se producen en los vasos sanguíneos de los tejidos supervivientes de la zona lesionada. En resumen las fases son:

1. Pequeños vasos sanguíneos adyacentes a la zona del tejido lesionado se dilatan inicialmente, con aumento de flujo sanguíneo, por lo que éste se hace más lento
2. Las células endoteliales se hinchan y se retraen parcialmente, con lo que ya no forma un revestimiento interno completamente intacto
3. Los vasos pierden líquido, permitiendo la salida de agua, sales y algunas proteínas de pequeño tamaño del plasma a la zona lesionada.
4. Los neutrófilos polimorfonucleares circulantes inicialmente se adhieren a las células endoteliales hinchadas y luego migran activamente a través de la membrana basal vascular, pasando a la zona tisular lesionada.
5. Mas tarde un pequeño grupo de macrófagos emigran de forma similar, al igual que lo hacen algunos linfocitos (16)

Los principales cambios vasculares en la inflamación son el resultado del flujo y la dilatación de los vasos, así como el aumento de la permeabilidad de sus paredes, que permiten la difusión de las proteínas grandes y líquido.

6. MIGRACIÓN DE LOS NEUTROFILOS

Desde el punto de vista cronológico, los mediadores de la inflamación van a producir básicamente dos efectos. En una primera fase inicial, alteraciones vasculares que facilitan el trasvase de moléculas desde la sangre al foco inflamatorio, así como la producción de edema. En una segunda fase, más tardía, las propias alteraciones vasculares, así como la liberación en el foco de factores quimiotácticos, determinan la llegada de células inmunes procedentes de la sangre y de los tejidos circundantes (14).

Fase inicial: Llegada de moléculas

1. Inmunoglobulinas. Los anticuerpos se unen y bloquean el germen y sus toxinas. La IgM e IgG activan el complemento por la vía clásica. La IgG, a su vez, se une a los receptores por la porción Fc (FcR) que presentan los fagocitos en su membrana, potenciando la fagocitosis.
2. Factores del complemento. Además de la activación de la vía clásica indicada anteriormente, el complemento se puede activar por la vía alternativa, por productos liberados directamente por el germen. Cuando el complemento, siguiendo una u otra vía, alcanza la vía común produce la lisis del germen o la célula extraña inductora de la inflamación. Los factores C3a y C5a, actuando sobre receptores de membrana, activan al mastocito y basófilo induciendo la liberación de mediadores y amplificando, de esta forma, el fenómeno inflamatorio. El C5a es un potente factor quimiotáctico, mientras que el C3b, uniéndose a receptores de membrana de los fagocitos, potencia la fagocitosis (14)

Fase tardía: Llegada de células

1. Basófilo. Contribuye, junto con el mastocito, a la liberación de mediadores.
2. Neutrófilo. Es de las primeras células en llegar al foco inflamatorio. Elimina al germen mediante fagocitosis o liberando factores tóxicos que contiene en sus gránulos citoplasmáticos y produciéndole, así, una muerte extracelular.

3. Monocito/Macrófago. Procedente de la sangre el monocito, y de los tejidos cercanos, el macrófago, llega al foco más tardíamente. El monocito, en los tejidos, se diferencia en macrófago. Esta célula presenta idénticas funciones a las señaladas para el neutrófilo. Actúa además, como célula presentadora del antígeno a las células específicas T y B, iniciando, de esta forma, la respuesta específica. El macrófago sintetiza un péptido inespecífico, la interleucina 1 (IL-1), que es una auténtica hormona del Sistema Inmune, ya que pasando a la sangre produce efectos sobre distintas partes del organismo. Determina la aparición de fiebre, probablemente induciendo la síntesis de Prostaglandinas E, (PGE) en las células endoteliales que revisten los vasos sanguíneos del hipotálamo; a su vez la PGE actúan sobre el centro termorregulador. Sobre la médula ósea favorece la producción y liberación de neutrófilos. En el hígado incrementa la síntesis de proteínas de la fase aguda. A nivel local, la IL-1 activa la proliferación y diferenciación de las células T y B contribuyendo, así a la respuesta específica. También activa la proliferación de fibroblastos y producción de colágeno, fenómenos incluidos en la fase de reparación de la inflamación
4. Linfocitos T y B. Potenciados por el macrófago inician la respuesta específica. Las células B procedentes de los tejidos linfoides asociados a tejidos o mucosas sintetizan IgE, que unidas al mastocito o basófilo pueden potenciar la inflamación. Por otra parte, las células T comienzan a producir linfoquinas que prolongan la inflamación en una respuesta inmune más elaborada.
5. Eosinófilo. Aunque es una célula citotóxica en las infecciones parasitarias, parece además tener en la inflamación una función reguladora Factores del complemento. Además de la activación de la vía clásica indicada anteriormente, el complemento se puede activar por la vía alternativa, por productos liberados directamente por el germen.

6.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS NEUTRÓFILOS

Los neutrófilos son un tipo de glóbulo blanco, de tipo de granulocito, que se producen a partir de la maduración de células precursoras en la médula ósea, cuya principal función es fagocitar y destruir a bacterias y participar en el inicio del proceso inflamatorio. Los neutrófilos se caracterizan por tener un núcleo lobulado y gran cantidad de gránulos y lisosomas en su citoplasma con diferentes contenidos que les permiten realizar sus funciones específicas (17)

Existen tres tipos de glóbulos blancos: linfocitos, monocitos y granulocitos. Los granulocitos reciben ese nombre por el aspecto granular que tienen al microscopio debido a la gran cantidad de gránulos y lisosomas que contienen. Los neutrófilos reciben ese nombre por no tener preferencia por colorantes ácidos ni básicos. Como características propias, además de la gran cantidad de gránulos, presentan un núcleo multilobulado (con 2 a 5 lóbulos) por lo que también se llaman leucocitos polimorfonucleares. Hay un 10% de neutrófilos que tienen un núcleo alargado y de grosor uniforme que son los neutrófilos bastonados.

Los granulocitos provienen de la línea hematopoyética mieloide y tienen una diferenciación común con los macrófagos. Su principal función es fagocitar y destruir bacterias. Son los glóbulos blancos más abundantes en la sangre y su vida media es muy corta (de horas a días). Los neutrófilos son atraídos por quimiotaxis por productos procedentes de células muertas, polisacáridos bacterianos y productos de degradación del complemento. Al estimular su movilización salen de los vasos sanguíneos por diapedesis. Los neutrófilos tienen en su membrana receptores que reconocen anticuerpos, factores del complemento unidos a bacterias y polisacáridos bacterianos. Esto estimula la fagocitosis de las bacterias y su posterior destrucción. Los gránulos de los neutrófilos contienen gran cantidad de enzimas y sustancias para realizar su función: enzimas lisosomales, catepsina G, colagenasa inespecífica, colagenasa G, fosfolipasa A2, fosfatasa alcalina, fagocitina (18)

7. FÁRMACOS PARA EL TRATAMIENTO INFLAMATORIO

Los antiinflamatorios esteroideos o glucocorticoides Son los más potentes antiinflamatorios, actúan sobre la inflamación por diversos caminos, por ejemplo, reducen el número y la activación de eosinófilos, desencadenando la apoptosis de los mismos y disminuyendo algunos de sus factores quimiotácticos que incluyen las IL-3 y 5, el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos, exotoxina y la citoquina RANTES (citoquina expresada y secretada en células T normales), entre otras. También reducen la proliferación de linfocitos T, e inducen la apoptosis de los mismos, al disminuir la acción de la IL-2. Disminuyen también la cantidad de monocitos (células presentadoras de antígeno), células dendríticas, mastocitos, y otras células inflamatorias, y por lo tanto inducen una disminución en la producción de citoquinas y mediadores proinflamatorios. Estos efectos son producidos por diversos mecanismos, que incluyen entre otros la síntesis de proteínas con efecto antiinflamatorio y la inhibición de la síntesis de numerosos factores proinflamatorios y de crecimiento. En este grupo de fármacos se encuentran la dexametasona, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, cortisona, hidrocortisona, mometasona, entre otros (19).

7.1 Efectos Adversos

Hiperglucemia, glucosuria, redistribución de grasa (cara de luna llena, cuello de búfalo), debilidad muscular (miopatía esteroidea) secundaria al efecto anti-anabólico. Riesgo de fracturas y dificultad para su consolidación. Osteoporosis. Edemas de hipertensión y agravamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva. Incremento de susceptibilidad a las infecciones y agravamiento de las mismas. Trastornos psíquicos. Euforia, depresión. La sensación de bienestar que producen puede incrementar el apetito y el pulso. Trastornos oculares: Cataratas e incremento de la presión intraocular, sobretodo en niños. Alteraciones digestivas: Dispepsia, riesgo de úlcera gástrica, sobre todo en pacientes predispuestos (20).

7.2 Los analgésicos, antipiréticos, antiinflamatorios no esteroides (AINEs)

Los AINEs son un grupo de agentes de estructura química diferente que tienen como efecto primario inhibir la síntesis de prostaglandinas a través de la inhibición de la enzima COX. Estas drogas comparten acciones farmacológicas y efectos indeseables semejantes. Los AINEs son sustancias capaces de suprimir los signos y síntomas de la inflamación, algunos también ejercen acciones antipiréticas y analgésicas pero son sus propiedades antiinflamatorias las que los hacen útiles en el tratamiento de trastornos en los cuales el dolor está relacionado con la intensidad del proceso inflamatorio (19).

Estos fármacos se agrupan en varias clases químicas:

1. Salicilatos: AAS, diflunidal, salicilato sódico
2. Paraaminofenoles: Paracetamol
3. Pirazolonas: Metamizol, propifenazona, fenilbutazona
4. Ácidos propiónicos: Ibuprofeno, naproxeno, fenoprofeno, ketoprofeno
5. Ácidos acéticos: Indometacina, sulindaco, diclofenaco, ketorolaco, aceclofenaco
6. Ácidos antranílicos: Ac. Mefenámico, ac. meclofenámico
7. Oxicams: Piroxicam, tenoxicam, meloxicam
8. Inhibidores selectivos COX-2: Rofecoxib, celecoxib
9. Otros: Nabumetona, Nimesulida

7.2.1 Efectos Adversos

Aun cuando los AINEs generalmente son bien tolerados, se asocian a una amplia gama de efectos adversos potenciales. Su toxicidad mayor se presenta en el tracto gastrointestinal, renal y cardiovascular. Estos inhiben la síntesis de prostaglandinas que están asociadas a la mucosa gástrica, plaquetas, riñones y pulmones (20)

8. MEDICINA ALTERNATIVA

Por lo anteriormente mencionado, la incorporación y utilización de la medicina tradicional, en el tratamiento de diversas enfermedades ha aumentado en los últimos años. Además de ser una alternativa muy común en nuestro país.

La medicina tradicional o alternativa es todo el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales, que ha sido adoptada por otras poblaciones (distintas de su cultura de origen) que suele denominarse medicina alternativa o complementaria. En la cual generalmente se utilizan hierbas o materiales herbarios, preparaciones y productos herbarios, acabados; cuyos ingredientes activos son partes de plantas u otras materias vegetales (18).

Uno de los tratamientos alternativos de gran interés es el propóleo, el cual presenta más de 300 compuestos químicos; que han sido descritos en propóleos de diversos orígenes (21). Incluso se ha encontrado presencia de flavonoides en muestras comerciales (22). Investigaciones sobre propóleos en diferentes aéreas geográficas han mostrado diferencias en su composición química y sus propiedades biológicas (23).

Motivo por el cual es de suponerse que propóleos de diferentes regiones, tendrán diferentes propiedades biomédicas. Por lo que en este trabajo se pretende evaluar las diferencias entre algunas propiedades medicinales de dos propóleos de diferentes estados de la República Mexicana.

9. ANTECEDENTES

Como se ha mencionado anteriormente, el propóleo presenta diferentes propiedades biológicas como lo son la antimicrobiana, antiinflamatoria, anti-fúngica, entre muchas otras. Existen pocas publicaciones sobre el propóleo y sus propiedades, la mayoría de estas evalúan los efectos de los extractos como de sus compuestos aislados e identificados en propóleos de diferentes países.

La actividad antiparasitaria se ha descrito contra *Leishmania*, *Trypanosoma* y *Plasmodium*, cabe destacar que para este último se evaluó el efecto de un propóleo cubano contra *Plasmodium* presentando una inhibición antimalárica de un 50% (con una CL₅₀ de 0.2 mg/ml); obteniendo una correlación positiva entre la actividad biológica y la composición química del propóleo, la cual reportan presencia de flavonoides (24).

Rivera 2013, evaluó la actividad antimicrobiana de cinco propóleos de distintas áreas de la República Mexicana, obteniendo una inhibición del crecimiento tanto de bacterias como de hongos. (25)

Así mismo, se evaluó la actividad antimicrobiana de un propóleo de Turquía sobre *Acanthamoeba keratitis*, presentando una actividad amebicida con una concentración de 7.81 mg/ml (26).

Respecto a la actividad antiinflamatoria, se ha comparado al propóleo con el efecto del diclofenaco, estudiándolo en un modelo de edema plantar inducido por carragenina, obteniendo que entre el propóleo y el diclofenaco no existen diferencias significativas (27).

Naito, et al (2007) estudio el efecto antiinflamatorio de un ungüento de propóleo sobre el modelo de edema plantar inducido por carragenina, obteniendo un resultado de inhibición moderada del edema, además midió la presencia de leucocitos, por medio del método de placa agarosa, obteniendo un efecto inhibitorio de presencia de leucocitos (28).

II. OBJETIVOS.

1. Objetivo General.

Caracterizar algunas propiedades medicinales de dos propóleos de los estados de Guanajuato y Estado de México.

2. Objetivos particulares:

- ❖ Determinar el efecto antiinflamatorio del extracto etanólico del propóleo del Estado de Guanajuato y Estado de México.
- ❖ Evaluar la actividad anti-inflamatoria del extracto etanólico del propóleo obtenido del Estado de Guanajuato y Estado de México en el modelo de inducción de edema por carragenina.
- ❖ Determinar la presencia de granulocitos por medio de técnicas histológicas.
- ❖ Evaluar la inhibición de la migración de neutrófilos a la cavidad peritoneal.
- ❖ Realizar la caracterización química de los metabolitos secundarios mediante el análisis de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS) comparando con estándares.

III. MATERIALES Y MÉTODOS.

Los extractos; de propóleo Guanajuato y Estado de México, fueron proporcionados por la Dra. Margarita Canales Martínez del Laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos (UBIPRO), FES Iztacala.

1. Efecto antiamebiano del extracto etanólico de diferentes propóleos sobre *Acanthamoeba castellanii* y *Naegleria fowleri*.

Para probar el efecto del extracto sobre los trofozoitos de *N. fowleri* y *A. castellanii* se realizó una curva patrón de la siguiente manera:

En una placa de 96 pozos para cultivo celular, se agregó a cada pozo 50 µl de medio. Excepto en el primer pozo, en este se ajustó la suspensión de amibas a 2×10^6 en 200 µl y se agregó al primer pozo. A continuación se mezclaron las amibas del primer pozo con la micropipeta entre 5 y 10 veces se tomaron 100 µl y se pasaron al segundo pozo, así sucesivamente se realizaron diluciones hasta llegar al pozo 12. Se incubó la placa a 37°C por 30 min. Posteriormente se eliminó el medio, se lavó la placa con solución salina (dos veces). Se fijaron las células con 100 µl de metanol por 30 segundos. Se retiró el resto de metanol. Después se agregaron 100 µl de solución de Cristal Violeta por pozos (0.1% en agua destilada). Se incubó de 10 a 15 min a temperatura ambiente en oscuridad. Transcurrido el tiempo se eliminó el colorante, sacudiendo la placa. Se volvió a lavar con solución salina. Posteriormente solubilizó las células agregando 100 µl de SDS al 1% (1 gramo de SDS en 100 ml de etanol al 50%), se pasó a leer en lector de ELISA a una longitud de onda de 570 a 690 nm. Una vez obtenida la curva patrón, se realizaron las interacciones con el extracto etanólico de los diferentes propóleos para determinar la Concentración Letal Media (CL_{50}), siguiendo la técnica de viabilidad celular por Cristal Violeta. Los valores de absorbancia se graficaron contra el número de amibas

2. Ensayo antiinflamatorio utilizando el modelo de Edema Plantar.

Se obtuvieron ratas macho de la cepa Wistar (180-200gr) las cuales tuvieron una alimentación estándar, a una temperatura de 20-25 °C y se formaron 6 grupos de 3 ratas por grupo:

Grupo 1) Carragenina 100µl (Control -)

Grupo 2) Dexametasona 10mg/Kg de peso. (Control +)

Grupo 3) Extracto de propóleo a 250mg/Kg de peso.

Grupo 4) Extracto de propóleo a 500mg/Kg de peso.

Grupo 5) Extracto de propóleo a 750mg/Kg de peso

} Experimentales

A los seis grupos (n=3) de ratas Wistar machos (180-200 gr) en ayuno de 8h, con acceso libre de agua, se les administró oralmente, mediante cánula: 250, 500 y 750 mg/kg de extracto etanólico del propóleo obtenido del Estado de Guanajuato y del Estado de México. El grupo control positivo recibió dexametasona (10 mg/kg, vía oral) disuelta en solución salina estéril, el grupo control negativo recibió solución salina estéril (10ml/kg, vía oral). Una hora después se les inyectó 100 µl de carragenina al 1 % en el cojinete plantar de la pata derecha trasera. El volúmen de la pata se midió antes y después de la inyección de carragenina o solución salina por el desplazamiento del método mercurio (29). El grosor de la pata se midió a los tiempos 0, 1, 2, 3 y 4 horas después de la inyección de la carragenina. Después se sacrificaron a las ratas en cámara de CO₂. Se utilizó la siguiente ecuación para el cálculo del porcentaje de inhibición de la inflamación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{[(Ct - Co)_{control} - (Ct - Co)_{tratado}]}{(Ct - Co)_{control}} \times 100$$

Dónde:

Ct. es el valor del desplazamiento de volumen al tiempo X

Co. es el valor del desplazamiento de volumen al tiempo cero

3. Técnica Histológica; tinción de Hematoxilina-Eosina.

Se obtuvieron muestras de los organismos control y experimentales (la pata derecha de cada organismo). Las muestras fueron fijadas 24hr en fijador de sales de zinc (FSZ) (30).

Se descalcificaron con EDTA al 7% con cambios cada dos días durante una semana, después fueron procesadas por la técnica histológica de rutina, con líquido intermedio de alcohol butílico, se incluyeron de Paraplast (Merck) y se cortaron (solo el área inflamada) a 5 micras. Se utilizó la tinción de Hematoxilina-Eosina (H-E) (31)

4. Técnica de la inhibición de la migración de neutrófilos a la cavidad peritoneal.

Ratones macho de la cepa Balb/c de 8 semanas de edad y se formaron 4 grupos de 5 ratones por grupo.

Grupo 1: Control testigo (solución salina)

Grupo 2: Extracto de propóleo a 500mg/Kg de peso (experimentales Edo. de Guanajuato y el Edo. de México)

Grupo 3: Carragenina 100µl (Control -)

Grupo 4: Dexametasona 10mg/Kg de peso. (Control +)

Se utilizaron ratones machos BALB/c de 8 semanas de edad y se formaron 4 grupos (n=5), los cuales quedaron conformados de la siguiente manera:

Los ratones fueron pesados y puestos en ayuno 6 horas antes de iniciar el experimento. Al grupo 1 sólo se le administró solución salina estéril, al grupo 2 se les administró por vía oral, 500 mg/kg del extracto etanólico de propóleo del Edo. de Guanajuato y otro el Edo. de México, al grupo 3 se le administró dexametasona (0.5 mg/kg). Una hora después de la administración del extracto etanólico, se les inyectó dentro de la cavidad peritoneal a los 4 grupos, 3 ml de carragenina (100 µg/ml, preparada con solución salina estéril). Cuatro horas después, la cavidad peritoneal se lavó con 5 ml de PBS frío, complementado con suero fetal bovino al 5%. El líquido recuperado se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min, se retiró el sobrenadante y el paquete celular se contó en una Cámara de Neubauer para hacer alicuotas de 1×10^6 células, para realizar la tinción para el análisis por citometría de flujo. Una vez obtenidas las alicuotas de las células, se tiñeron con 20 µl de anticuerpos anti-ratón acoplados a fluorocromos CD11c (FITC) y GR-1(PE-Cy5). Las células se incubaron con los anticuerpos por 30 min a 4 °C y en oscuridad. Después de la incubación, se lavaron las

células para quitar el exceso de anticuerpos agregando 900 µl de PBA y centrifugando a 1500 rpm por 5 min. Se retiró el sobrenadante y se fijaron las células con 600 µl de paraformaldehído al 1%. Se conservaron en oscuridad y a 4°C para analizarse por citometría de flujo.

5. 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. 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:

- Temperatura del inyector: 250°C.
- Modo de inyección: Split.
- Radio: 33.5:1
- Flujo del Split: 29.9 ml/min.
- Flujo de corrida: 35 cm/s.

Horno:

- Temperatura inicial: 70°C
- Rampa de calentamiento: 8°C por minuto hasta 270°C., segunda rampa: 10°C por minuto hasta 290°C, se mantiene 6 min.
- Tiempo de corrida total: 35 minutos.
- Línea de transferencia: 290°C.

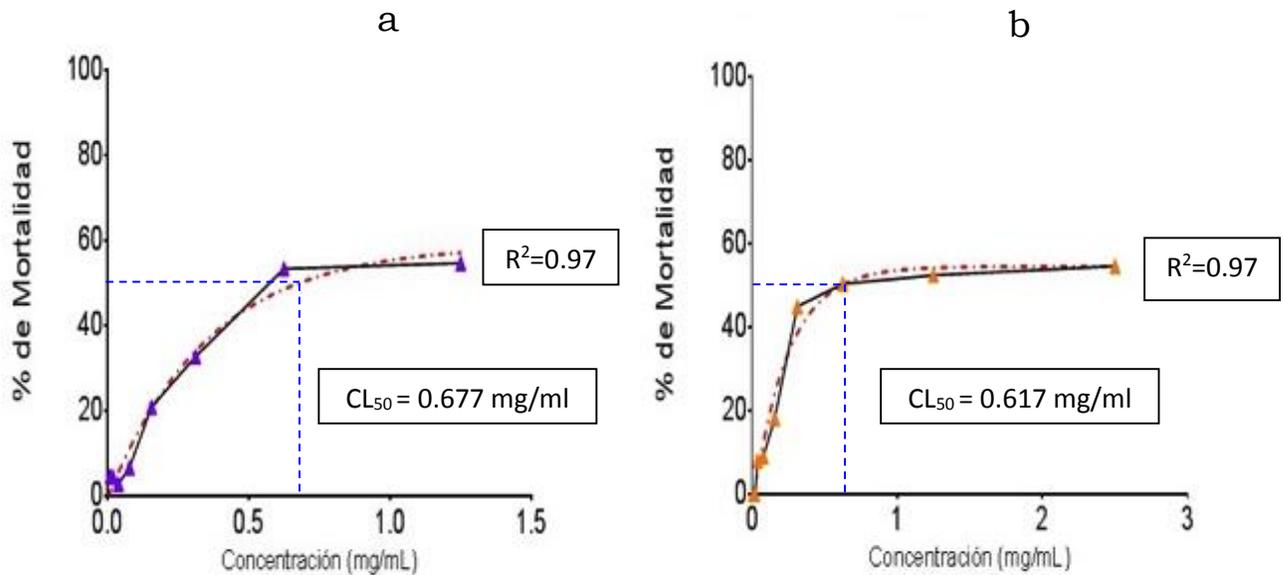
Se hizo la caracterización química de los propóleos Guanajuato y Edo. de México para compararlos con los estándares de la biblioteca del equipo, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés), utilizando una columna Discovery C-18, de 250 x 4.6 mm, tamaño de partícula 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.

IV. RESULTADOS

1. Efecto antiamicibiano del extracto etanólico de diferentes propóleos sobre *Acanthamoeba castellanii* y *Naegleria fowleri*.

Como se puede observar en la figura 2 y 3 los propóleos del estado de Guanajuato y Edo. de México muestran un efecto dosis dependiente sobre las amibas de vida libre *Acanthamoeba castellanii* y *Naegleria fowleri*.

La CL_{50} de los extractos etanólicos de los propóleos Edo. de México y Guanajuato sobre *A. castellanii* fue de 0.677 mg/ml y 0.617 mg/ml



respectivamente.

Figura 2. Efecto de los extractos etanólicos de los propóleos Edo. de México (a) y Guanajuato (b), sobre *A. castellanii* mediante la Técnica de Viabilidad Celular por Cristal Violeta.

Por lo que respecta a la actividad de estos propóleos contra *Naegleria fowleri* la CL₅₀ que se obtuvo para el extracto del propóleo del Edo. de México fue de 0.015 mg/ml y de 0.012 mg/ml para el extracto de propóleo de Guanajuato.

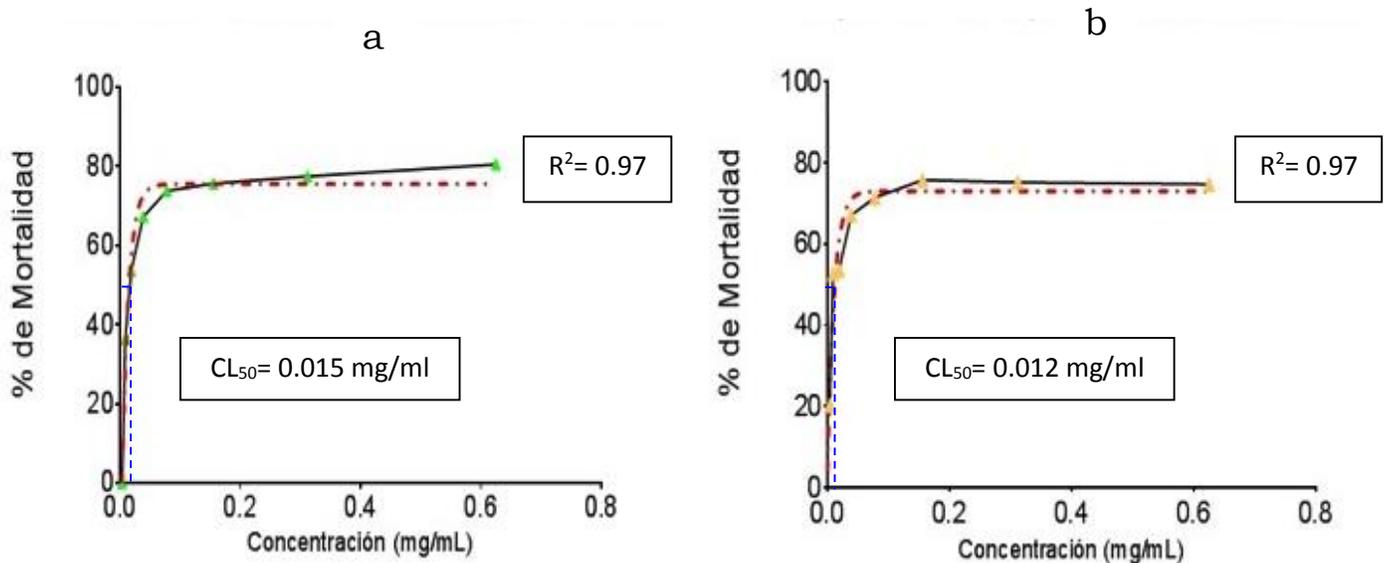


Figura 3. Efecto de los extractos etanólicos de los propóleos Edo. de México(a) y Guanajuato b), sobre *N. fowleri* mediante la Técnica de Viabilidad Celular por Cristal Violeta.

Como se puede observar los propóleos del Edo. de México y Guanajuato presentaron una CL₅₀ de 0.677 mg/ml y 0.617 mg/ml para *A. castellani*, y para *N. fowleri* una CL₅₀ de 0.015mg/ml y 0.012mg/ml respectivamente. Sin embargo, es importante señalar que las concentraciones usadas de los propóleos a y b sólo obtuvieron un porcentaje de mortalidad de 60% para *A. castellani*, y 80% para *N. fowleri*. Lo que sugiere que los trofozoitos de *A. castellani* son más resistentes que los de *N. fowleri*, al interactuar con los propóleos.

2. Ensayo anti-inflamatorio utilizando el modelo de Edema Plantar.

El edema producido en la pata trasera de las ratas, se midió durante 4 horas después de la inyección de carragenina. Como puede observarse en la figura 4 y 5 el grupo control negativo (carragenina) muestra un mayor incremento en el porcentaje de inflamación correspondiente al tiempo máximo, el cual fue considerado como el 100% de inflamación. El grupo control positivo (dexametasona) en el mismo lapso de tiempo mostró un porcentaje de 20% de inflamación, lo cual nos muestra que nuestro grupo control positivo (dexametasona 10 mg/kg) previene la formación de edema.

En cuanto a los propóleos Edo. de México y Guanajuato, para ambos las tres concentraciones (250 mg/kg, 500 mg/kg y 750 mg/kg) mostraron una actividad anti-inflamatoria y para ambos la mejor concentración fue de 500 mg/kg; ya que como se puede observar en la figura 4, no existen diferencias significativas entre las concentraciones de 500 mg/kg y 750 mg/kg con respecto a la disminución del edema plantar.

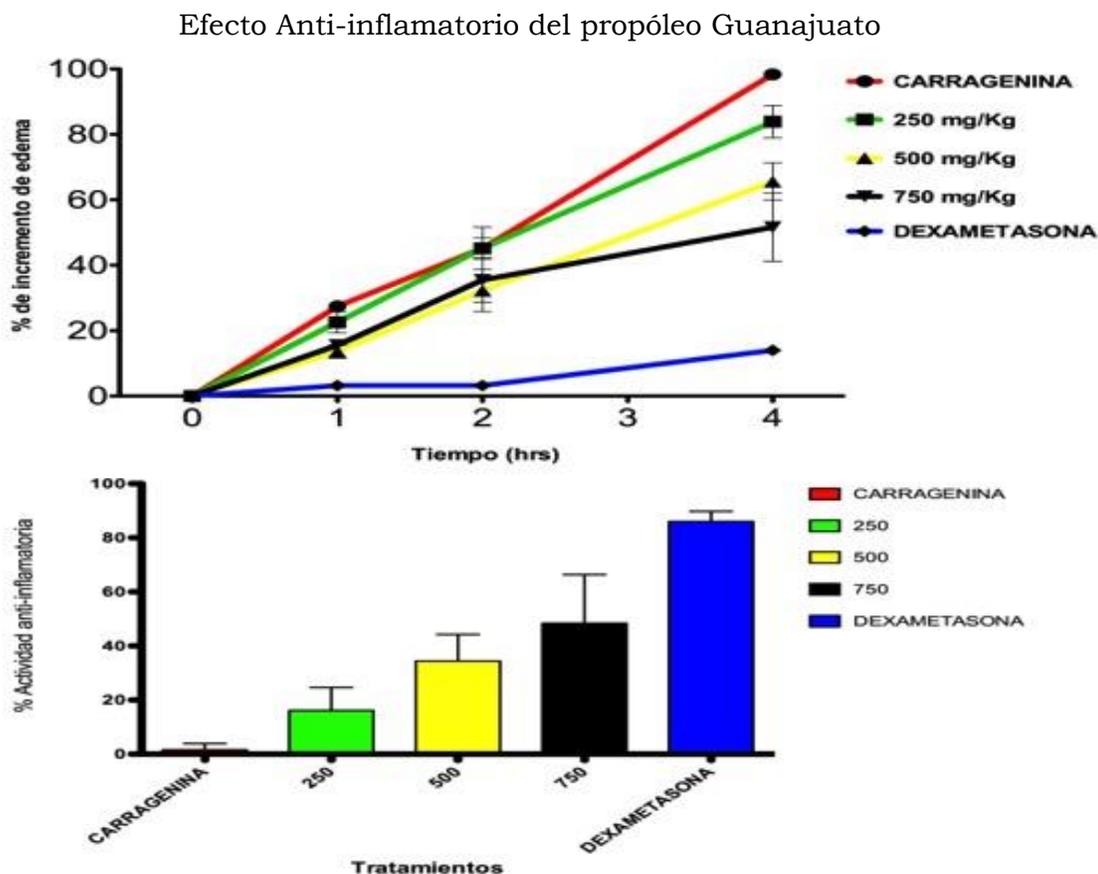


Figura 4. Efecto del extracto de propóleo Guanajuato sobre el edema inducido por 0.1ml de carragenina en una extremidad de ratas Wistar.

Efecto Anti-inflamatorio del propóleo Edo.
de México

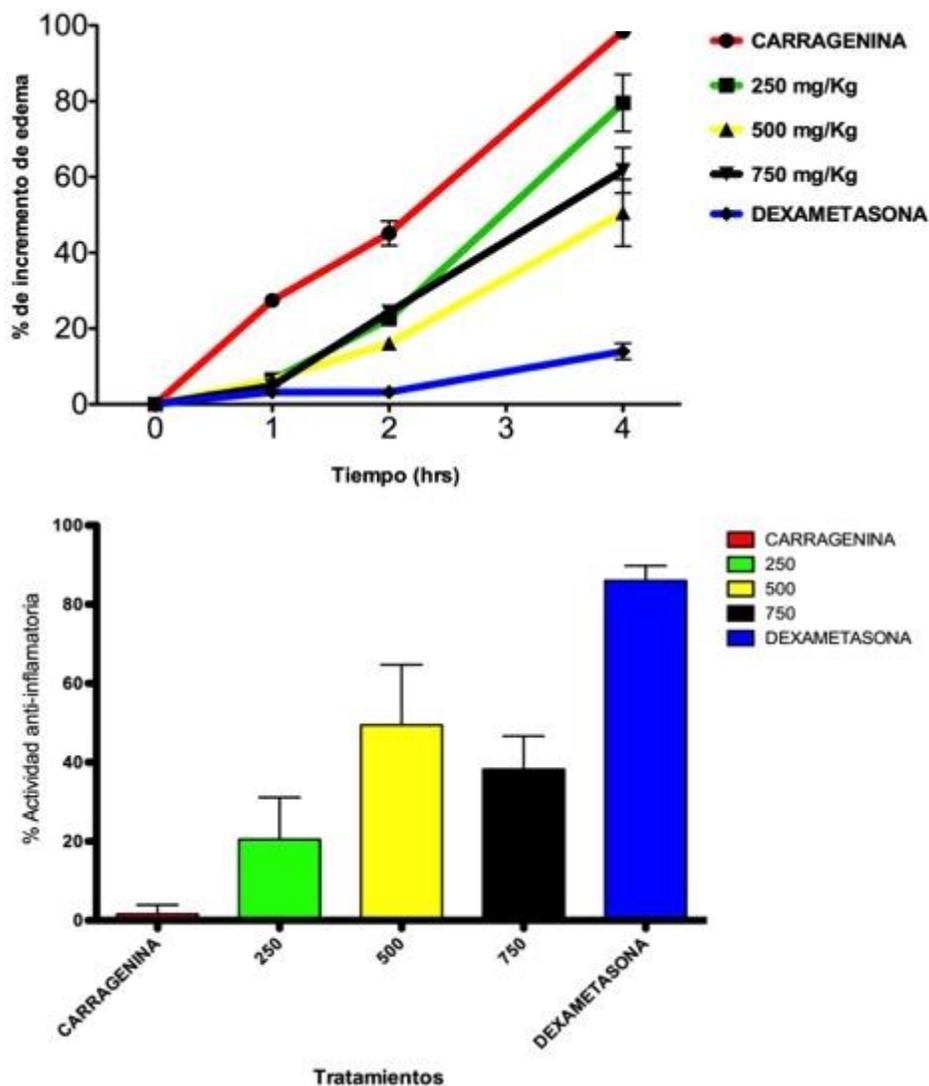


Figura 5. Efecto de los extractos de propóleo Guanajuato y Edo. de México administrados vía oral sobre el edema inducido por 0.1ml de carragenina en una extremidad de ratas Wistar.

3. Técnica Histológica; tinción de Hematoxilina-Eosina.

Posterior al ensayo anti-inflamatorio, se realizó un análisis histológico por medio de la técnica de tinción de Hematoxilina-Eosina, realizando cortes histológicos de las patas derechas de los organismos usados en dicho ensayo, donde se observó en los tejidos la presencia de células inflamatorias.

En la fig. 6 se puede apreciar los cortes histológicos de las muestras obtenidas de los organismos control (control, dexametasona, carragenina) y experimentales (Edo. México y Edo. Guanajuato); en ellas se puede observar en color rosa el tejido muscular; mientras que en color morado el infiltrado inflamatorio (en este caso granulocitos).

Como era de esperarse en la muestra control (C) se nota el tejido sin daño alguno, mientras que en el de carragenina (CR) se puede observar que se encuentra daño en el tejido muscular, y la presencia de infiltrado inflamatorio.

En comparación con la muestra C y CR la muestra de dexametasona (Dx), se observa que el tejido no presenta daño alguno, no obstante sí muestra poco infiltrado inflamatorio, esto es debido a que, este medicamento es un corticosteroide comúnmente usado como anti-inflamatorio.

Para el caso de las muestras de propóleo Edo. de México y Edo. de Guanajuato comparándolas con la muestra C, para la dosis de 500 mg/kg, se puede observar un daño moderado en el tejido muscular tanto para el caso de propóleo Edo. de México como el propóleo del Edo. Guanajuato, sin embargo para el Edo. México la presencia de infiltrado inflamatorio es poca, a comparación con el corte de Edo. de Guanajuato, el cual presenta un acúmulo de infiltrado inflamatorio; sin embargo ambos cortes histológicos comparados con CR presentan menor cantidad de dicho infiltrado, por lo que se puede confirmar un efecto anti-inflamatorio, corroborando el presentado en los gráficos estadísticos del ensayo de edema plantar.

Para el caso de la dosis de 750 mg/kg, se puede observar una menor presencia de infiltrado inflamatorio para Edo. de México como para Edo. de Guanajuato, comparada a la muestra de CR; no obstante, se muestra un mayor daño a nivel tejido, en comparación con la dosis de 500mg/kg.

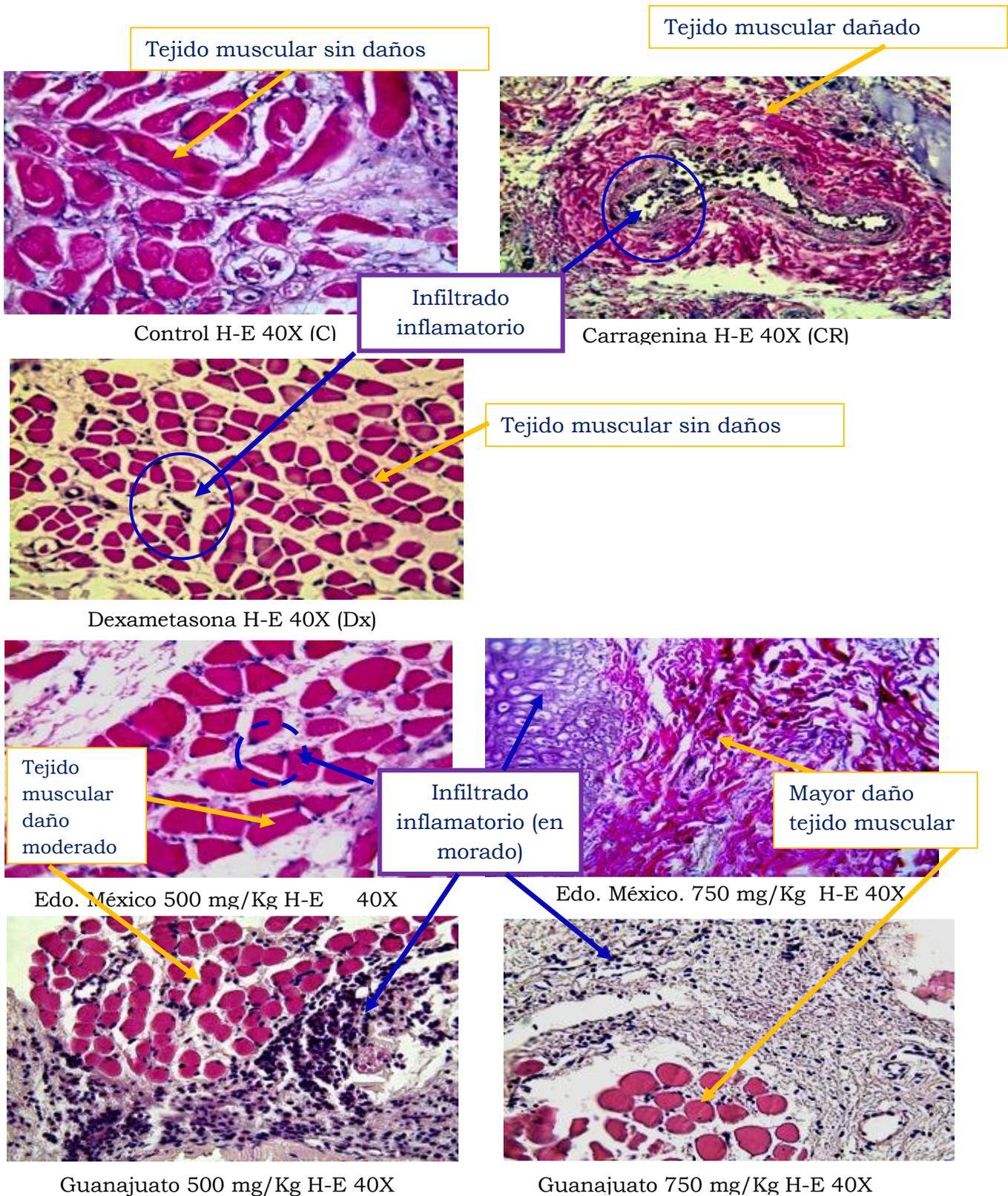


Figura 6. Tinción H-E de los tejidos de los grupos: Control, Carragenina, Dexametasona y Tratamiento en concentración de 500 mg/Kg y 750 mg/kg (extractos de los propóleos de Guanajuato y Edo. de México).

4. Técnica de la inhibición de la migración de neutrófilos a la cavidad peritoneal.

Por medio de citometría de flujo se determinó el efecto de los propóleos, en la figura 7, se puede observar que el grupo de carragenina muestra un incremento considerable de neutrófilos que migraron a la cavidad peritoneal con respecto al grupo control (solución salina), donde se registró 7 neutrófilos contra 1120 de carragenina.

Por otra parte el grupo de dexametasona mostró una reducción de neutrófilos que migraron a esta cavidad de 1120 a 28. Con respecto a los propóleos, el que presentó una mayor disminución de migración fue el del Edo. de Guanajuato de 1120 a 91 por 183 del Edo. de México. Estos resultados muestran que el tratamiento con los propóleos presenta una reducción de la migración de neutrófilos que es estadísticamente significativa con respecto al grupo con carragenina, (ANOVA $P < 0.05$) (obsérvese Fig. 8)

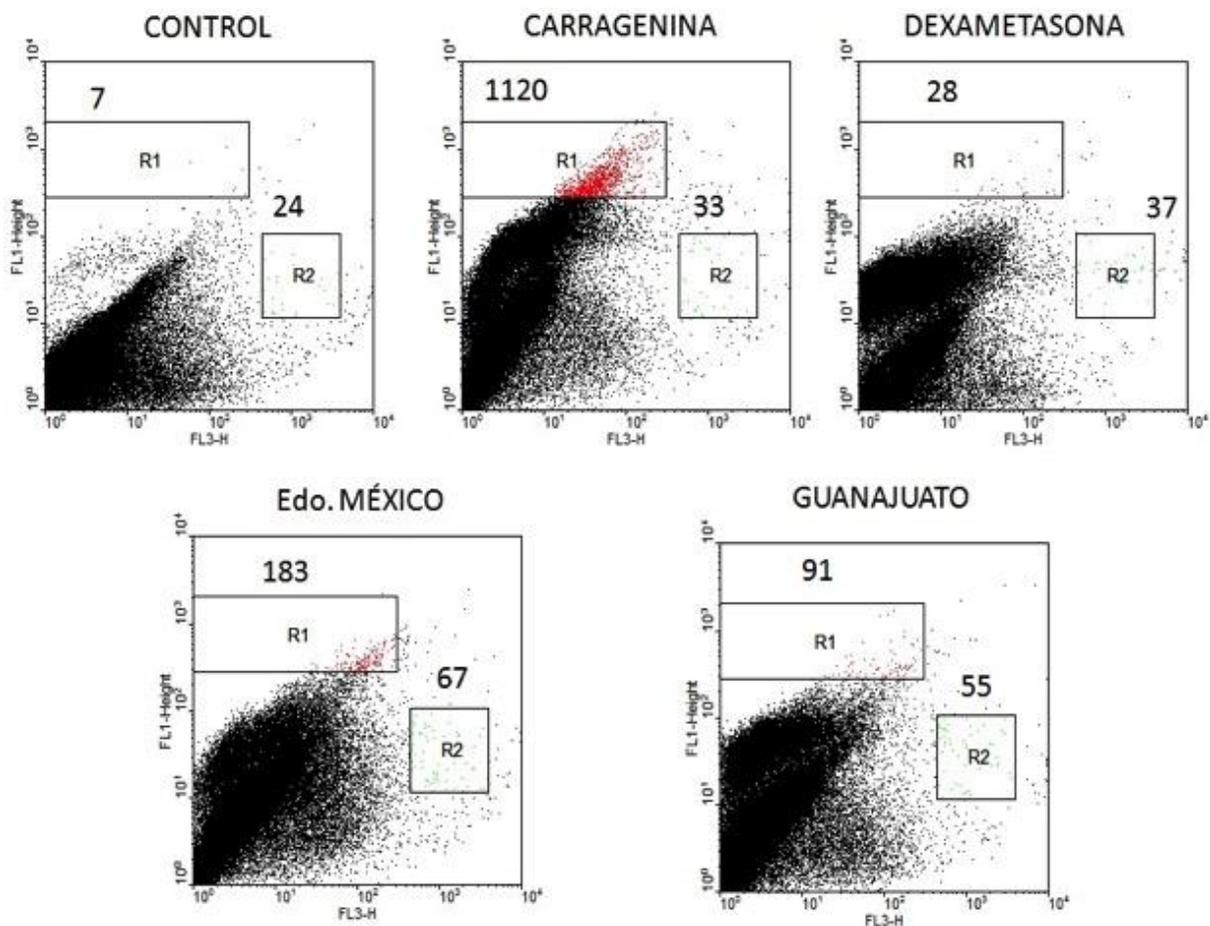


Figura 7 Citometria de Flujo, donde se muestra el número de neutrófilos que emigraron en la cavidad peritoneal.

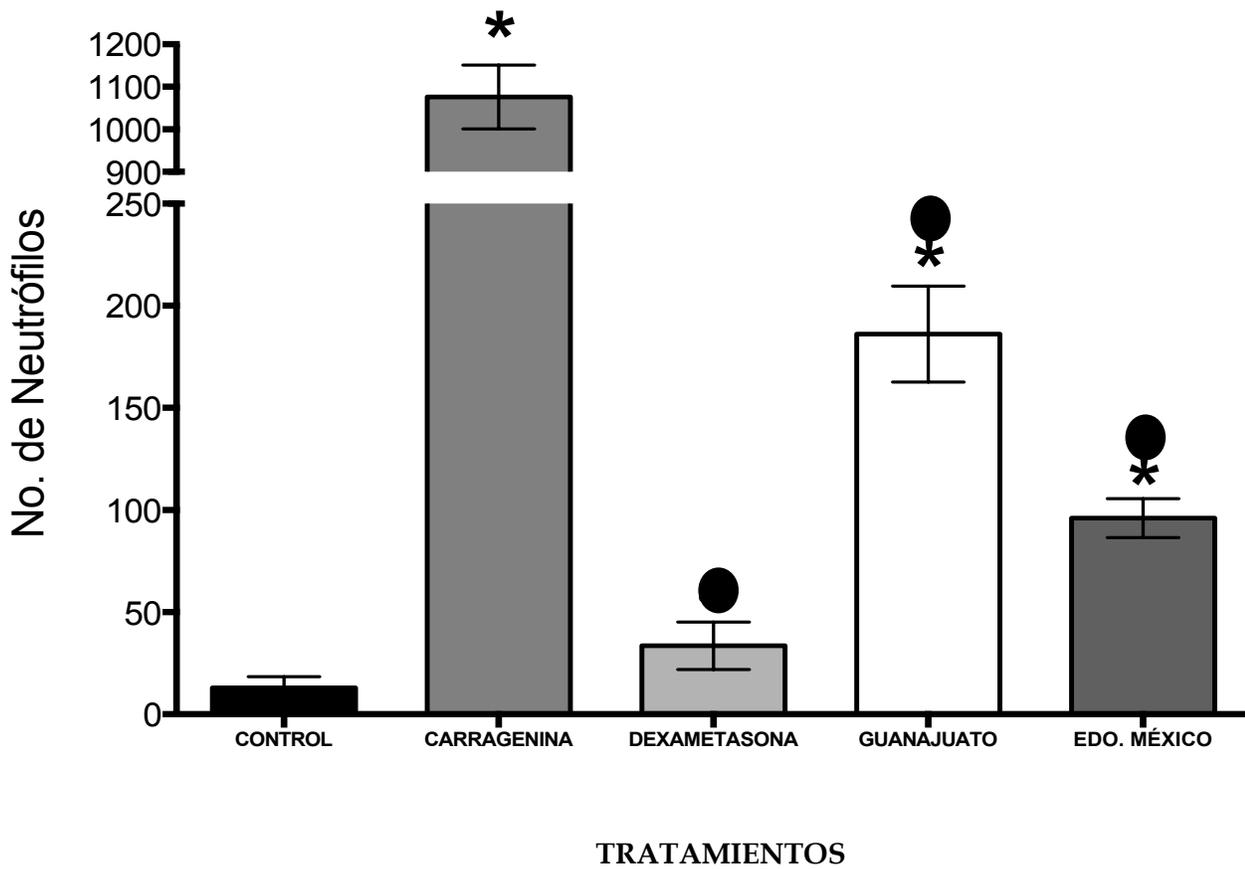


Figura 8. Reducción de la migración de neutrófilos (donde • es igual a la diferencia significativa con el grupo de dexametasona y * es igual a la diferencia significativa con el grupo control).

5. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

5.1 CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

En la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas, de los propóleos del Edo. de México y Guanajuato (figura 9 y 10), se puede observar diferencias entre los componentes de cada propóleo.

Para el propóleo del estado de Guanajuato de acuerdo al tiempo de retención y por sus patrones de fragmentación se obtuvieron e identificaron cinco compuestos que forman parte del extracto etanólico siendo el mayor presencia la Pinocembrina con un 42.53%, seguido del Metil éster del ácido oleico con 10.80%, así como Metil éster del ácido paltmítico obteniendo 9.12%, Naringenina con 7.91% y Ácido palmítico con un 4.81%, los cuales se muestran en el cuadro 2.

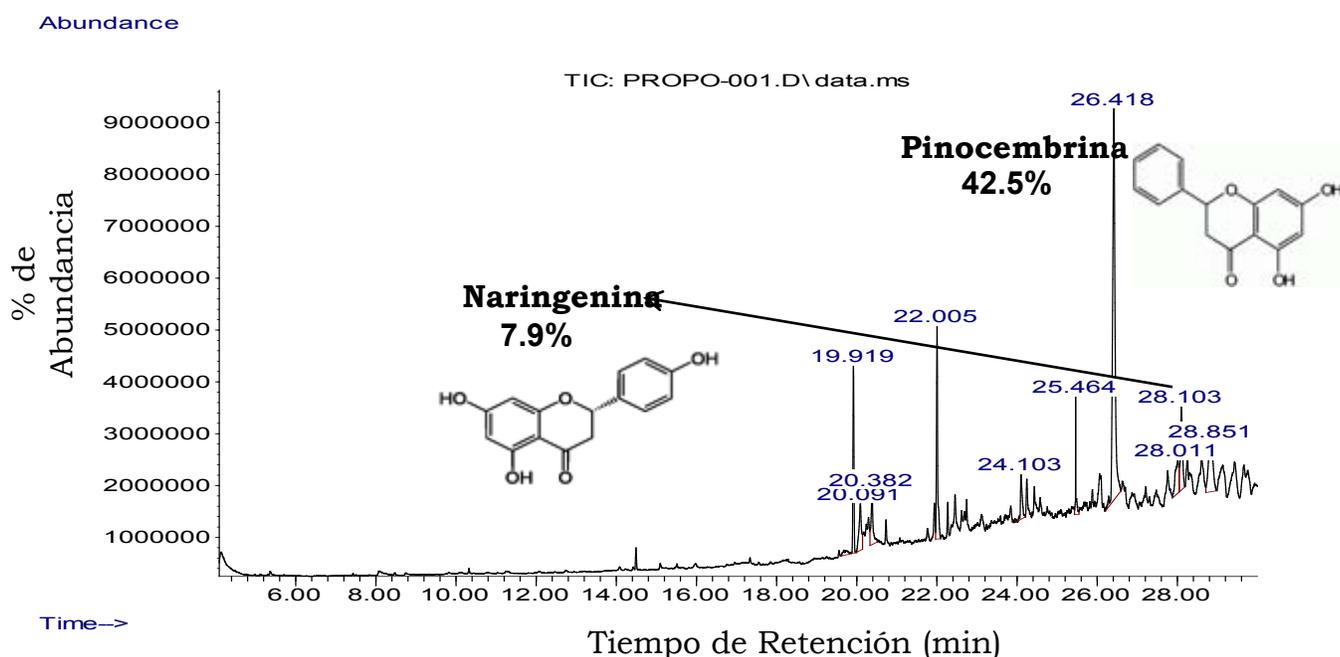
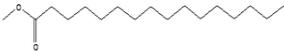
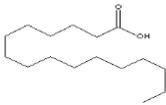
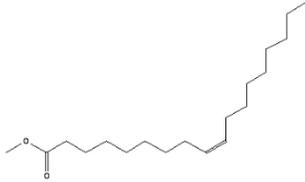
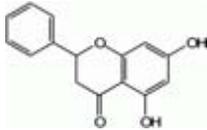
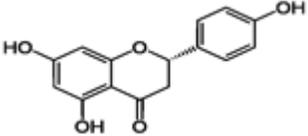


Figura 9. Cromatografía de gases del propóleo de Guanajuato.

Cuadro 1. Compuestos presentes en el propóleo de Guanajuato.

Nombre en Español	Tiempo de Retención(min)	Porcentaje de Abundancia	Estructura Química	PROPIEDADES MEDICINALES
Metil éster del ácido palmítico	19.919	9.12		Vasodilatador
Ácido palmítico	20.093	4.81		Antiparasitario, Antifúngico y Pro-inflamatorio
Metil éster del ácido oleico	22.002	10.80		-
Pinocembrina	26.417	42.53		Anti-Inflamatoria, Antifúngico, Antimicrobiana
Naringenina	28.104	7.91		Antimicrobiana y Anti-inflamatoria

El propóleo del Estado de México de acuerdo a sus patrones de fragmentación y al tiempo de retención, se identificaron 14 compuestos que forman parte del extracto etanólico, teniendo entre sus compuestos Pinocembrina (3.15%), Pinostrobrina (1.05%), Cardamonina (5.22%), entre otros, los cuales se muestran en el en el cuadro 3.

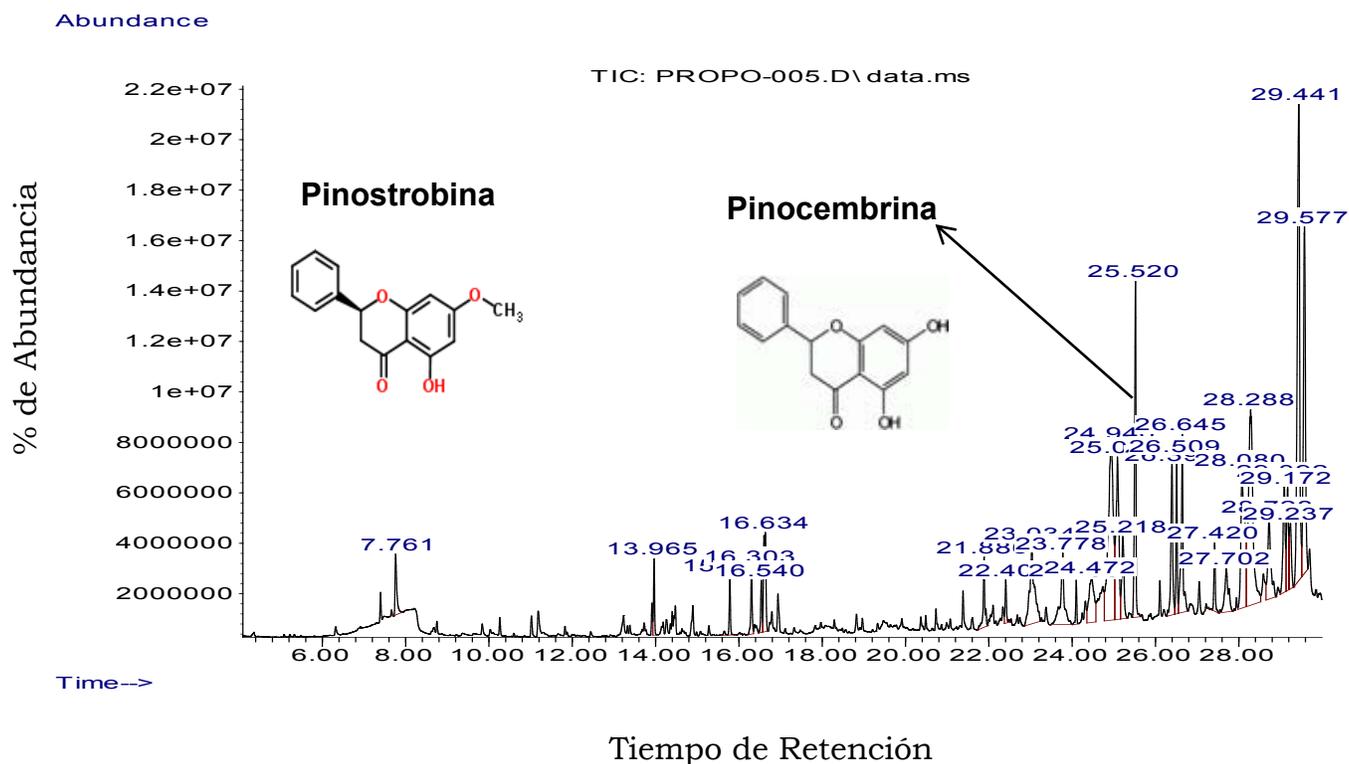
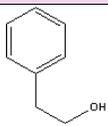
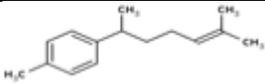
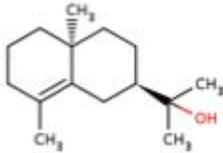
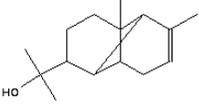
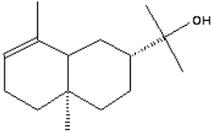
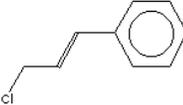
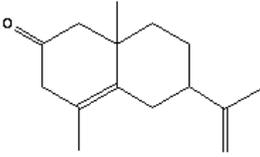
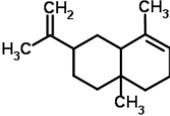
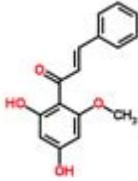
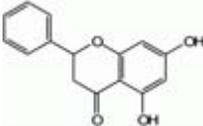
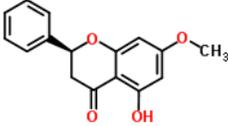


Figura 10. Cromatografía de gases del propóleo del Estado de México.

Cuadro 2. Compuestos presentes en el propóleo del Estado de México.

Nombre en Español	Tiempo de Retención(min)	Porcentaje de Abundancia	Estructura Química	Propiedades Medicinales
Feniletil alcohol	7.760	1.17		Antiséptico, Antibacteriano Y Antimicrobiano
α -curcumeno	13.965	0.91		Antibacteriana Y Anti-fúngica
γ -eudesmol	16.303	1.02		Antibacteriana Y Antitrypanosomal
α -copaenol	16.539	0.71		Antibacteriana
α -eudesmol	16.633	2.50		-
Cloruro de cinamilo	22.409	0.66		-
Octacosano	23.034	4.02		-
Eicosano	24.100	0.53		-

3,5,6,7,8,8 a- hexahidro-4, 8a- dimetil-6-(1- metiletetil)-2 (1H) naftalenona	24.473	10.63		-
4-11- selinadieno	25.090	5.34		-
Cardamonin a	25.518	5.22		Anti-fúngico
Pinocembrin a	26.396	3.15		Antiinflamatoria Anti-fúngico Y Antimicrobiano
Pinostrobin a	27.419	1.05		Antiinflamatoria

5.2 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Se sometieron al análisis por medio de HPLC los extractos etanólicos de los propóleos del Edo. de México y Guanajuato. Los cromatogramas se muestran a continuación en las figuras 11 y 12. Así mismo, de cada uno de los propóleos, se muestran, sus máximas absorciones bajo luz ultra violeta ($\lambda_{m\acute{a}x}$) y tiempo de retención, los compuestos que contienen las muestras (cuadros 3 y 4). Donde se puede confirmar la presencia de pinocembrina en ambos extractos.

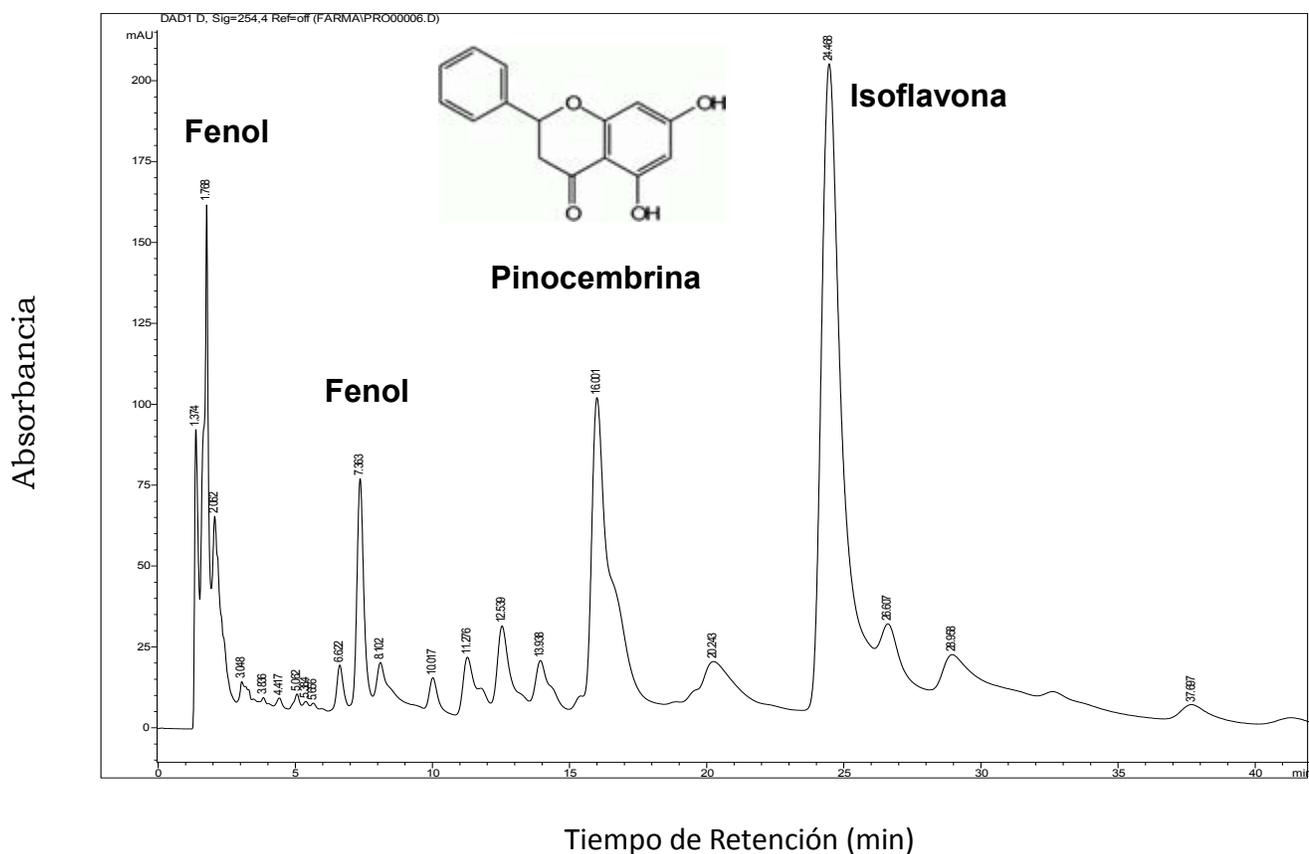


Figura 11. Cromatograma del propóleo de Guanajuato.

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

No. Compuesto	Tiempo de Retención (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Compuesto
1	1.42	292	Fenol
2	1.81	290	Fenol
3	2.12	284	Fenol
4	3.07	272	Fenol
5	3.84	284 Sh; 326	Flavanona
6	4.40	292, 330	Isoflavona
7	5.03	254	N.I.
8	5.41	284 Sh: 330	Flavanona
9	5.68	266, 290	N.I.
10	6.61	288 Sh: 320	Flavanona
11	7.34	292 Sh: 340	Flavanona
12	8.11	292 Sh: 350	Flavanona
13	10.07	286 Sh: 326	Flavanona

14	11.29	268, 298, 368	Flavonol
15	12.59	266, 356	Flavonol
16	13.92	256, 268, 356	Flavonol
17	16.02	290	Pinocembrina
18	20.32	292 Sh: 340	Flavanona
19	24.52	266, 312	Isoflavona
20	26.62	266, 292	N.I.
21	32.61	266, 356	Flavonol
22	37.72	254, 356	Flavonol
23	41.36	294 Sh: 330	Flavanona

N.I.= No Identificado

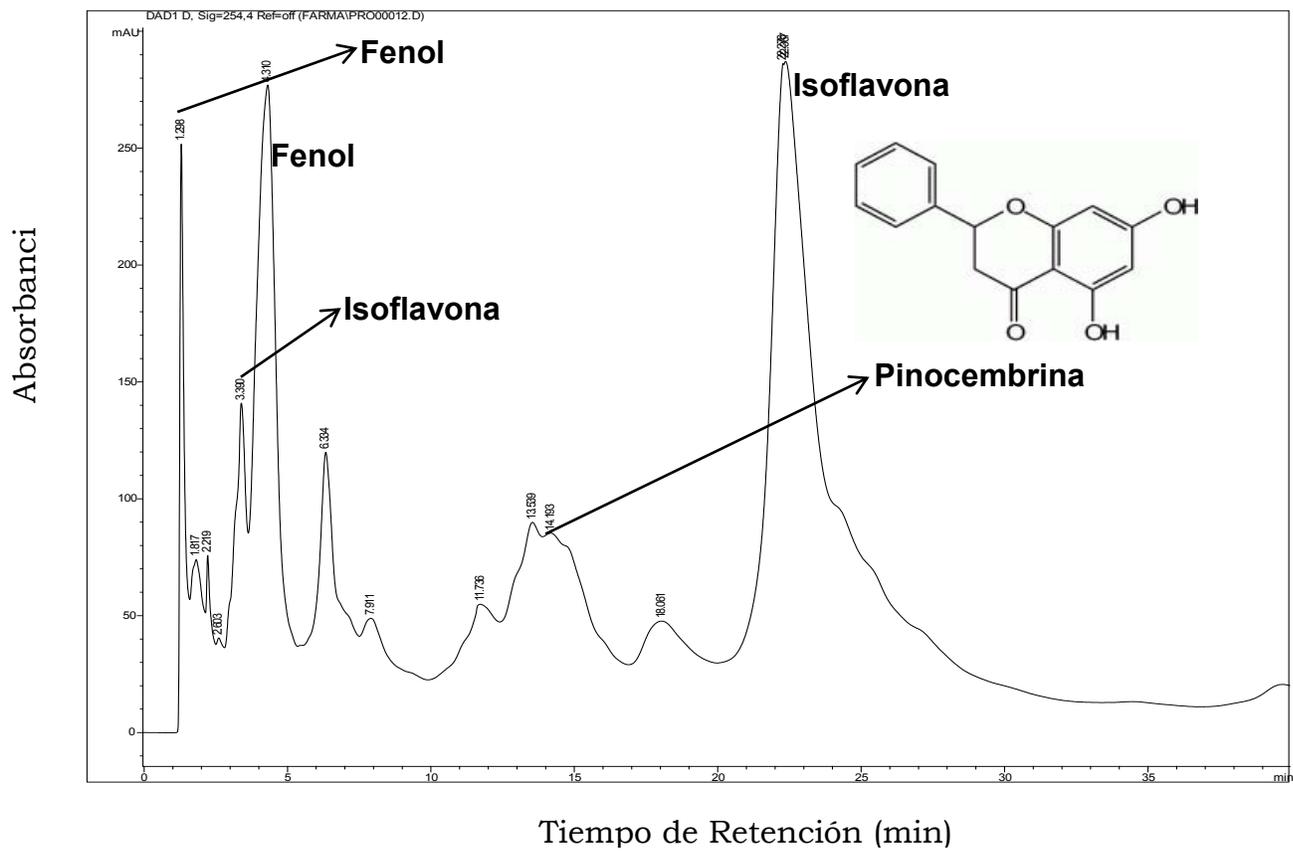


Figura. 12. Cromatograma del propóleo del Estado de México.

Cuadro 4. Tiempo de retención y $\lambda_{\text{máx}}$ del propóleo del Estado de México.

No. Compuesto	Tiempo de Retención (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Compuesto
1	1.29	284	Fenol
2	1.85	290	Fenol
3	2.25	280	Fenol
4	2.59	272	Fenol
5	3.42	286, 318	Isoflavona
6	4.32	278	Flavanona
7	6.29	304	Ácido fenólico
8	7.95	290	Fenol
9	11.69	268, 292, 336	Flavona
10	13.55	298, 326	N.I.
11	14.19	294, 326	N.I.
12	14.75	290	Pinocembrina
13	18.05	270, 290, 336	N.I.
14	22.27	266, 312	Isoflavona
15	39.75	290 Sh: 330	Flavanona

N.I.= No Identificado.

V.DISCUSIÓN

En este trabajo se presentan por primera vez resultados de dos propóleos originarios de México, sobre amibas de vida libre y actividad antiinflamatoria, así como su caracterización química. Lo antes mencionado es de suma importancia ya que en México hay una limitada producción del propóleo, esto se debe a que la mayoría de los apicultores se enfocan más a la producción de miel, dado a que desconocen el procedimiento de extracción o incluso su valor, además de la falta de demanda de este producto por parte de empresas contribuyendo al lento desarrollo y producción del propóleo.

El propóleo se ha utilizado en la medicina popular durante mucho tiempo, por sus efectos antimicrobianos, antiinflamatorios, anti-fúngicos, entre otros. Esto debido a que los componentes químicos de los propóleos son cuantitativamente y cualitativamente variables, dependiendo de la región geográfica, vegetación y tiempo de colecta (32; 4)

Las amibas de vida libre presentan una fuerte resistencia a diferentes fármacos, pero son muy susceptibles a Anfotericina B, un fármaco establecido clínicamente por su eficacia contra *Naegleria fowleri*, responsable de la Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MAP) y fármacos azólicos (clotrimazol, miconazol ketoconazol, fluconazol, itraconazo) en caso de *Acanthamoeba castellani* responsable de la meningoencefalitis granulomatosa amebiana (MGA); sin embargo es un antibiótico muy tóxico usado hoy en día, ya que causa seria toxicidad renal, efectos hepáticos y daño en otros órganos. Por lo que este trabajo ofrece evidencia científica del posible uso del propóleo contra las amibas de vida libre.

Como se muestra en los resultados los propoleos tuvieron actividad contra *Naegleria fowleri* y *Acanthamoeba castellani*, en donde de manera interesante, *A. castellani* mostró una mayor resistencia que *Naegleria* (figura 2 y 3). Aunque solo se usaron trofozoitos, se ha observado que tanto estos como los quistes presentan características semejantes en sus nucleos, por lo que se puede suponer que la resistencia de *Acanthamoeba* se debe a que puede permanecer viable en los cultivos por meses e incluso años; lo cual podría explicar su amplia distribución y su alta incidencia en el ambiente (33)

Los propoleos tuvieron un efecto antiamebiano contra *A. castellani* presentando una CL_{50} de 0.67 mg/ml para Edo. de México y 0.61 mg/ml para el Edo. de Guanajuato (figura 2). Estos resultados son comparables con el estudio realizado por Vural, et al (2007) con propóleo de Trabzon Turquía contra *Acanthamoeba keratitis*; en donde se presenta una mayor actividad

antiamibiana, en concentraciones de propóleo menores a 7.81 mg/ml, con respecto al control (lubricante en gotas); ya que concentraciones mayores a esta dañaban el epitelio corneal (25)

Asimismo, los extractos de propóleo presentaron una actividad antiamibiana contra *N. fowleri* (figura 3), con una CL₅₀ de 0.015 mg/ml del Edo. de México y una CL₅₀ de 0.012 mg/ml del Edo. de Guanajuato, estos resultados del efecto antiamibiano coinciden con Belofsky, et al (2006) en donde demuestra la actividad *in vitro* de dos isoflavonas aisladas de extractos metanólicos de *Daelea urea* (*Fabaceae*), los cuales causaron una inhibición en el crecimiento de *N. fowleri* (34). Comparable con nuestro análisis de caracterización química, ya que en ambos propóleos encontramos isoflavonas, las cuales suponemos, presentan actividad antiamibiana.

No obstante, se ha demostrado que el propóleo presenta un efecto *in vitro* contra protozoos como: *Leishmania*, *Trypanosoma* y *Plasmodium*, cabe destacar que en el caso de *Plasmodium*, este tuvo una CL₅₀ de 0.2 mg/ml; el efecto del propóleo se ha asociado principalmente al contenido de acetil triterpeno, benzofenonas y flavonoides (24).

Un compuesto encontrado en el extracto de propóleo del Edo. México es el Feniletil alcohol, el cual se ha reportado con anterioridad que presenta una actividad antiamebiana; además de mencionar que este flavonoide se encuentra presente en aceites esenciales de *Murraya paniculata*. El cual muestra una actividad antiamebiana (35).

De igual manera encontramos compuestos como α -Curcumeno, γ -Eudesmol, α -Copaeno-11ol y Cardamonina, presentes en el mismo extracto de propóleo del Edo. México, los cuales están relacionados a actividad antimicrobiana, antifúngica y antitripanosomal encontrados en diferentes extractos de plantas (36,37, 38, 39, 40)

Naringenina, es otro compuesto identificado dentro del extracto de propóleo del Edo. de Guanajuato, Patel, et al (2014) menciona que la Naringenina es un flavonoide de interés farmacológico debido a que este presenta actividad antimicrobiana y antiinflamatoria (41). Junto al Ácido Palmítico, que igualmente presenta actividad antiparasitaria (42). Ambos extractos de propóleo presentan pinocembrina, un flavonoide aislado de infinidad de plantas, con un uso principal en las industrias farmacéuticas, se han realizado varios estudios *in vitro* e *in vivo* para determinar las propiedades biológicas atribuidas a la pinocembrina. Dentro de estas actividades encontramos la actividad antimicrobiana, en la cual la pinocembrina es probada contra *Staphylococcus aureus* y *Neisseria gonorrhoeae*; inhibiendo

el crecimiento del 100% del panel de *Neisseria gonorrhoeae*, al mismo tiempo se le atribuye la actividad antibacteriana, dado a que la pinocebrina muestra una acción de lisis a la membrana bacteriana de *Escherichia coli* y antifúngica en la cual inhibe el crecimiento micelial de *P. italicum* (43).

Por lo anteriormente mencionado, y con base a los resultados obtenidos podemos demostrar que ambos extractos de propóleos de Edo. México y Guanajuato, tienen actividad antiamebiana contra *Naegleria fowleri* y *Acanthamoeba castellanii*.

Ante todo proceso infeccioso se sabe que se genera inflamación, la cual es una respuesta fisiológica integral del hospedero a una lesión tisular o infección, que es vital para nuestro organismo; cuando se enfrenta a los microbios invasores o las enfermedades (13)

Anteriormente se mencionó que el propóleo ha mostrado diversos efectos dentro de los cuales se encuentra el anti-inflamatorio; por lo que se decidió realizar el ensayo anti-inflamatorio utilizando el modelo de edema plantar, para evaluar este mismo; en los propóleos de Edo. de México y Guanajuato. Obteniendo que para ambos propóleos las concentraciones de 500 mg/kg y 750 mg/kg no existe diferencia significativa presentando un comportamiento cercano al del efecto de Dexametasona. Esto es comparable con lo reportado por Naito (2007) ; que estudió el efecto anti-inflamatorio de un ungüento de extracto de propóleo al 3% y 7%, utilizando el modelo de edema plantar en ratas, obteniendo como resultado la inhibición moderada del edema, esto en un 5% y 7% significativamente. Cabe destacar que la vía de administración de nuestros propóleos fue oral, ya que esta produce un efecto local como sistémico (28).

Del mismo modo Tan-No, (2006) comparó el efecto anti-inflamatorio del propóleo con la del diclofenaco (un fármaco no esteroideo anti-inflamatorio) y L-NG-nitro arginina metil éster un inhibidor del óxido nítrico, usando el método de edema plantar inducido por carragenina en pata de ratón. Encontrando un efecto significativo entre el diclofenaco y el propóleo, demostrando que el propóleo presenta un efecto antiinflamatorio, pues inhibe la producción de óxido nítrico (NO) (27).

Respecto a los resultados obtenidos por la técnica de inhibición de migración de neutrófilos, ambos extractos de propóleo a una concentración de 500 mg/kg redujo considerablemente la migración de los neutrófilos, lo cual indica, que además de reducir la formación del exudado inflamatorio, también inhibe el aumento de neutrófilos desde el torrente circulatorio

hacia los sitios de lesión, Naito (2007) midió el efecto de la pomada de extracto de propóleo al 5% sobre la quimiotaxis de los leucocitos polimorfonucleares, utilizando el método de placa de agarosa. Obteniendo como resultado la inhibición de la presencia de leucocitos (28).

En el 2014 da Silva, experimentó la actividad antiinflamatoria, con extracto de *Macrosiphonia longiflora*, por medio de la técnica de edema plantar inducido por carragenina en ratones; además de inducir en ratas la inflamación de pulmones (pleuresía) por carragenina y peritonitis en ratones inducida por lipopolisacárido (LPS). Encontrando en primer lugar presencia de polifenoles y flavonoides, predominando los flavonoides naringenina, quercetina; seguido de la inhibición del edema plantar y por último reportando, la reducción significativa del volumen de los exudados y en la migración de leucocitos en la pleuritis inducida por carragenina y peritonitis inducida por LPS, así como en el conteo de neutrófilos en la peritonitis inducida por LPS (44),

La naringenina, es un compuesto encontrado en el extracto de propóleo del Estado de Guanajuato, farmacológicamente este flavonoide es de un interés particular ya que, ha presentado actividad anti-inflamatoria. La naringenina ha sido utilizada en tratamientos contra osteoporosis y cáncer (41).

Igualmente encontramos en el extracto de propóleo del Edo. de México la pinostrobina, la cual ha sido reportada por (45) como analgésico, anti-inflamatorio y anti-hemolítico. La pinocembrina mencionada anteriormente; además presenta actividad anticancerígena, neuroprotectora y por último antiinflamatoria, inhibiendo significativamente la peroxidación lipídica enzimática y no enzimática, ya que modula la respuesta inflamatoria (43)

Lo anterior coincide con los resultados obtenidos de la actividad anti-inflamatoria de los extractos de propóleo del Edo. de México y Guanajuato, debido a que en ellos encontramos la presencia de pinocembrina, naringinina y pinostrobina.

VI. CONCLUSIONES

- 1.- Las propiedades biomédicas de los extractos varía de acuerdo a la zona de extracción del propóleo.
- 2.- Los propóleos Guanajuato y Edo. de México presentaron propiedades anti-amebianas y anti-inflamatorias.
- 3.- El propóleo de Guanajuato inhibió con mayor eficiencia la migración de Neutrófilos con respecto al del Edo. de México.
- 4.- Ambos propóleos muestran Pinocembrina dentro de su composición química, teniendo mayor concentración el propóleo de Guanajuato.

Referencias bibliográficas

1. Quintero Mora Ma., L. O. A., Hernández Hernández F, Manzano Gayosso P, López Martínez R, Soto Zárate C, Carrillo Miranda L, Penieres Carrillo G, García Tovar C, Cruz Sánchez T. (2008) Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento in vitro de *Candida albicans*. Revista Iberoamericana de Micología **25**, 22-26
2. Saucedo, A. T. (2011) Propiedades del Propoleo: Una Alternativa En Odontopediatria. Facultad de Odontología. Tesina para Obtener el Título de Cirujano Dentista, Universidad Nacional Autónoma de México. México
3. Banskota, A. H., Tezuka, Y., Adnyana, I. K., Midorikawa, K., Matsushige, K., Message, D., Huertas, A. A., and Kadota, S. (2000) Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. J Ethnopharmacol **72**, 239-246
4. Fierro, W. (2000) Evidencia científica del propóleo desde el punto de vista médico. In Congreso Internacional de Propóleos Vol. 1 p. 11, Buenos Aires, Argentina
5. Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J., and Perez-Alvarez, J. A. (2008) Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. J Food Sci **73**, R117-124
6. Raso, G. M., Meli, R., Di Carlo, G., Pacilio, M., and Di Carlo, R. (2001) Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. Life Sci **68**, 921-931
7. Valle, P. C. (2012) Metabolitos secundarios de las plantas. Tesina de curso de Naturopatía, Escuela Superior de Técnicas y Estudios Avanzados; España, España
8. Martínez Flórez S, G. G. J., Culebras J, Tuñón Ma (2002) Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutrición Hospitalaria **22 (6)**, 271- 278
9. Ramírez M. Ma., M. A. J., Arreola G. R, Ordaz P. C (2010) Flavonoides con actividad antiprotozoaria. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas **41**
10. Soto, J., Gomez, C., Calzada, F., and Ramirez, M. E. (2010) Ultrastructural changes on *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS caused by the flavan-3-ol-epicatechin. Planta Med **76**, 611-612
11. Schuster, F. L., and Visvesvara, G. S. (2004) Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. Int J Parasitol **34**, 1001-1027
12. Marciano-Cabral, F., and Cabral, G. A. (2007) The immune response to *Naegleria fowleri* amebae and pathogenesis of infection. FEMS Immunol Med Microbiol **51**, 243-259
13. Murphy, K. M. (2009) Inmunobiología de Janeway, McGraw-Hill Interamericana de España S.L.
14. Bordés González, R. M. B., M.; García Olivares, E., Guisado Barrilao, R. (2009) El Proceso Inflamatorio. Vol. 4, Universidad de Castilla la Mancha. España
15. Carranza, R. R., Vidrio, H., and Sepúlveda, A. E. C. (2007) Guía de farmacología y terapéutica, McGraw Hill
16. Martínez Juárez, M. E. (2002) Actividad Anti-Inflamatoria de *Porophyllum tagetoides*. Tesis Para Obtener El Título De Biólogo p. 47, Universidad Nacional Autonoma de Mexico. Facultad de Estudios Superiores Iztacala., México
17. FIBAO, M. m. (Revisado el 3/10/12 (2008) El portal Medicina molecular: Neutrofilo Vol. 2012
18. OMS (Revisada 26/10/2012 (Diciembre 2008) Medicina Tradiciona. pp. Nota Descriptiva, N°134

19. Gómez Estrada, H. G. R., K; Domingo Medina, J (2011) Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas **10**, (3), 182-217
20. Leyva Islas R, M. R. O. N. R. G., Balcazar Vázquez R (2007) Efectos secundarios de los antiinflamatorios no esteroideos a nivel gastrointestinal, renal y cardiovascular en pacientes con artritis reumatoide II. Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas **12** (1), 41-45
21. Castaldo, S., and Capasso, F. (2002) Propolis, an old remedy used in modern medicine. Fitoterapia **73 Suppl 1**, S1-6
22. Astudillo S., L. R. A., F.R. Morrison, M. Gutierrez, J. Bastida J., C. Codina, and G. Schmeda- Hirschmann (2000) Biologically Active compounds from Chilean propolis. Boletín de la Sociedad Chilena de Química **45(4)**, 577-581
23. Barberan F , G. V. C., Oliver P V, Ferreres F (1990) Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. Phytochemistry **34**, 191-196
24. Monzote, L., Cuesta-Rubio, O., Campo Fernandez, M., Marquez Hernandez, I., Fraga, J., Perez, K., Kerstens, M., Maes, L., and Cos, P. (2012) In vitro antimicrobial assessment of Cuban propolis extracts. Mem Inst Oswaldo Cruz **107**, 978-984
25. Rivera, Y. N. (2013) Comparación de las propiedades biológicas del propóleo de diferentes estados de la república. Escuela Superior de Medicina; Sección de Estudios de Posgrado e Investigación. Maestro en Ciencias de la Salud p. 156, Instituto Politécnico Nacional, México
26. Vural, A., Polat, Z. A., Topalkara, A., Toker, M. I., Erdogan, H., Arici, M. K., and Cetin, A. (2007) The effect of propolis in experimental *Acanthamoeba keratitis*. Clin Experiment Ophthalmol **35**, 749-754
27. Tan-No, K., Nakajima, T., Shoji, T., Nakagawasai, O., Nijima, F., Ishikawa, M., Endo, Y., Sato, T., Satoh, S., and Tadano, T. (2006) Anti-inflammatory effect of propolis through inhibition of nitric oxide production on carrageenin-induced mouse paw edema. Biol Pharm Bull **29**, 96-99
28. Naito, Y., Yasumuro, M., Kondou, K., and Ohara, N. (2007) Antiinflammatory effect of topically applied propolis extract in carrageenan-induced rat hind paw edema. Phytother Res **21**, 452-456
29. Vazquez, B., Avila, G., Segura, D., and Escalante, B. (1996) Antiinflammatory activity of extracts from Aloe vera gel. J Ethnopharmacol **55**, 69-75
30. Gonzalez, L., Anderson, I., Deane, D., Summers, C., and Buxton, D. (2001) Detection of immune system cells in paraffin wax-embedded ovine tissues. J Comp Pathol **125**, 41-47
31. Luna, L. G., and Pathology, A. F. I. o. (1968) Manual of Histologic Staining Methods ; of the Armed Forces Institute of Pathology. Edited by Lee G. Luna, Blakiston Division, McGraw-Hill
32. Sartori, G., Pesarico, A. P., Pinton, S., Dobrachinski, F., Roman, S. S., Pauletto, F., Rodrigues, L. C., Jr., and Prigol, M. (2012) Protective effect of brown Brazilian propolis against acute vaginal lesions caused by herpes simplex virus type 2 in mice: involvement of antioxidant and anti-inflammatory mechanisms. Cell Biochem Funct **30**, 1-10
33. Rosas Irma, C. A., Ezcurra Exequiel (2004) Microbiología Ambiental Vol. 1, Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT), México.
34. Belofsky, G., Carreno, R., Goswick, S. M., and John, D. T. (2006) Activity of isoflavans of *Dalea aurea* (*Fabaceae*) against the opportunistic ameba *Naegleria fowleri*. Planta Med **72**, 383-386

35. Casado Martín Celia Magaly, G. G. Y. I., Rodríguez Amado Elvis (2011) Acercamiento al género *Murraya* (*Rutaceae*) y a la especie *Murraya paniculata* (L.) Jack. species. Revista Cubana de Plantas Medicinales **16** (4), 408-418
36. Merghache, D., Boucherit-Otmani, Z., Merghache, S., Chikhi, I., Selles, C., and Boucherit, K. (2014) Chemical composition, antibacterial, antifungal and antioxidant activities of Algerian *Eryngium tricuspidatum* L. essential oil. Nat Prod Res **28**, 795-807
37. Muhd Haffiz, J., Norhayati, I., Getha, K., Nor Azah, M. A., Mohd Ilham, A., Lili Sahira, H., Roshan Jahn, M. S., and Muhd Syamil, A. (2013) Chemical composition and in vitro antitrypanosomal activity of fractions of essential oil from *Cymbopogon nardus* L. Trop Biomed **30**, 9-14
38. Alzate Tamayo L, A. G. D., Jaramillo Garcés Y (2008) Propiedades farmacológicas del Algarrobo (*Hymenaea courbaril* Linnaeus) de interés para la industria de alimentos. Revista Lasallista de Investigación **5** (2), 100-111
39. de Souza Prestes L, D. S. L. F., Hörnke Alves G, Ziemann dos Santos M A, Alves Rodrigues Ma R, Araújo Meireles M C (2011) Evaluación de la actividad bactericida de aceites esenciales de hojas de guayabo, pitango y arazá. Revista Cubana de Plantas Medicinales **16** (4), 324-330
40. Ramírez Escobedo M, B. B. L., Pérez Berumen C, Sáenz Galindo A, Silva Belmares S (2012) Síntesis y actividad biológica de chalconas. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas **43** (4), 2240-2230
41. Patel, K., Singh, G. K., and Patel, D. K. (2014) A review on pharmacological and analytical aspects of naringenin. Chin J Integr Med
42. Hoet, S., Stevigny, C., Herent, M. F., and Quetin-Leclercq, J. (2006) Antitrypanosomal compounds from the leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. Planta Med **72**, 480-482
43. Rasul, A., Millimouno, F. M., Ali Eltayb, W., Ali, M., Li, J., and Li, X. (2013) Pinocembrin: a novel natural compound with versatile pharmacological and biological activities. Biomed Res Int **2013**, 379850
44. da Silva, A. O., Damaceno Alves, A., Almeida, D. A., Balogun, S. O., de Oliveira, R. G., Aires Aguiar, A., Soares, I. M., Marson-Ascencio, P. G., Ascencio, S. D., and de Oliveira Martins, D. T. (2014) Evaluation of anti-inflammatory and mechanism of action of extract of *Macrosiphonia longiflora* (Desf.) Mull. Arg. J Ethnopharmacol **154**, 319-329
45. Gomez-Betancur, I., Benjumea, D., Patino, A., Jimenez, N., and Osorio, E. (2014) Inhibition of the toxic effects of *Bothrops asper* venom by pinostrobin, a flavanone isolated from *Renealmia alpinia* (Rottb.) MAAS. J Ethnopharmacol **155**, 1609-1615