



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Caracterización del efecto hipoglucemiante del propóleo en un modelo experimental de diabetes.

T E S I S

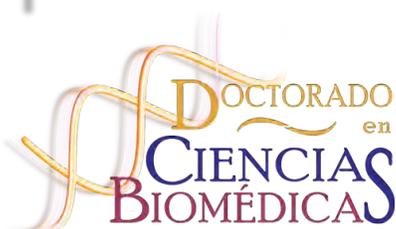
PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

M. en C. NELLY RIVERA YÁÑEZ

Director de Tesis:

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy



Tlalnepantla, Edo. De Méx., Mayo, 2018.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Al Doctorado en Ciencias Biomédicas.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A los apoyos recibidos por:

- CONACyT, con número de becario: 265778.

Al Comité Tutorial:

Dr. Manuel Jiménez Estrada.
Instituto de Química, CU, UNAM.

Dr. Maximiliano Ibarra Barajas.
FES-Iztacala, UNAM.

Al Ing. Martín Balcorta Beaza, por el propóleo.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. Diabetes Mellitus	5
1.2. Alteraciones metabólicas	6
1.3. Estrés oxidativo en la diabetes.....	7
1.4. Fármacos para tratar la Diabetes Mellitus	8
1.4.1. Insulina.....	8
1.4.2. Fármacos hipoglucemiantes.....	12
1.4.2.1. Sulfonilureas.....	12
1.4.2.2. Meglitinidas.....	13
1.4.2.3. Biguanidas.....	14
1.4.2.4. Tiazolidinedionas.....	15
1.4.2.5. Inhibidores de α -glucosidas.....	16
1.5. Propóleo	19
1.5.1. Definición	19
1.5.2. Historia.....	20
1.5.3. Elaboración.....	22
1.5.4. Colecta	22
1.5.5. Composición química	23
1.5.6. Propiedades biológicas.....	24
1.5.7. Capacidad antioxidante.....	24
1.5.8. Actividad hipoglucemiante.....	26
1.6. Compuestos naturales hipoglucemiantes.....	28
1.6.1. Compuestos fenólicos	29
1.6.1.1. Flavonoides	29
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
3. HIPÓTESIS.....	32
4. OBJETIVOS.....	33
4.1. Objetivo general	33
4.2. Objetivos específicos	33
5. MATERIAL Y MÉTODOS	34
5.1. Colecta de material.....	34
5.2. Obtención del extracto etanólico del propóleo	34
5.3. Inducción de Diabetes experimental mediante Estreptozotocina	34
5.4. Estudio de toxicidad aguda	35
5.5. Curva de tolerancia a la glucosa	36

5.6.	Determinación de las concentraciones de glucosa sérica en la administración de propóleo durante 15 días	37
5.7.	Detección de insulina en suero por medio de la técnica de ELISA	37
5.8.	Obtención del páncreas para la técnica de histología, inmunohistoquímica y detección enzimática.....	38
5.8.1.	Técnica de histología e inmunohistoquímica	38
5.8.2.	Parámetros del estrés oxidativo (enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx)	39
5.9.	Contenido de fenoles totales del propóleo.....	40
5.10.	Contenido de flavonoides totales del propóleo	40
5.11.	Capacidad antioxidante del propóleo.....	40
5.12.	Caracterización química del propóleo	41
5.12.1.	Análisis por Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-MS).....	41
5.12.2.	Análisis por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS).....	42
5.13.	Cromatografía en columna del propóleo.....	42
5.14.	Análisis estadístico.....	43
6.	RESULTADOS	44
6.1.	Estudio de toxicidad aguda	44
6.2.	Efecto de la administración única del propóleo (300 mg/Kg) sobre las concentraciones de glucosa sanguínea en la prueba de tolerancia a la glucosa	47
6.3.	Efecto de la administración del propóleo durante 15 días sobre las concentraciones de glucosa sérica.....	48
6.3.1.	Efecto de la administración del propóleo durante 15 días sobre el peso corporal.....	49
6.4.	Efecto de la administración del propóleo durante 15 días sobre las concentraciones de insulina en sangre	50
6.5.	Efecto de la administración del propóleo durante 15 días sobre los islotes de langerhans del páncreas.....	51
6.5.1.	Histología.....	51
6.5.2.	Inmunohistoquímica	52
6.6.	Efecto de la administración del propóleo durante 15 días sobre algunos parámetros del estrés oxidativo (SOD, CAT y GPx).....	53
6.7.	Contenido de fenoles totales en el propóleo	54
6.8.	Contenido de flavonoides totales en el propóleo	54
6.9.	Determinación de la capacidad antioxidante del propóleo	54
6.10.	Caracterización de la composición química del propóleo.....	55
6.10.1.	Análisis de Cromatografía Líquida acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS)	55
6.10.2.	Análisis de Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).....	56
6.11.	Cromatografía en columna del propóleo de Chihuahua.....	58
6.11.1.	Análisis de las fracciones del propóleo mediante HPLC	59
6.11.2.	Análisis de las fracciones del propóleo mediante GC-MS.....	60
6.11.3.	Capacidad antioxidante de las fracciones del propóleo	61
7.	DISCUSIÓN	63

8. CONCLUSIONES	68
9. ARTÍCULO PUBLICADO	69
10. APÉNDICES	79
10.1. APÉNDICE 1	79
Zona de Colecta.....	79
10.2. APÉNDICE 2	80
Técnica Histológica	80
10.3. APÉNDICE 3	84
Técnica de inmunohistoquímica.....	84
10.4. APÉNDICE 4	88
Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD)	88
10.5. APÉNDICE 5	89
Determinación de la actividad de catalasa (CAT)	89
10.6. APÉNDICE 6	90
Determinación de la actividad de glutatión peroxidasa (GPx)	90
10.7. APÉNDICE 7	91
Contenido de Fenoles Totales.....	91
10.8. APÉNDICE 8	93
Contenido de Flavonoides Totales.....	93
10.9. APÉNDICE 9	95
Capacidad antioxidante	95
10.10. APÉNDICE 10	97
Capacidad antioxidante de las fracciones del propóleo.....	97
10.11. APÉNDICE 11	98
10.12. APÉNDICE 12	102
11. REFERENCIAS	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la insulina	9
Figura 2. Subunidades del canal K_{ATP} en la célula β	13
Figura 3. Estructura básica de los flavonoides	29
Figura 4. Curva de tolerancia a la glucosa del propóleo.....	47
Figura 5. (A) Efecto del propóleo sobre las concentraciones de glucosa en sangre a partir del día 1 de su administración y hasta el día 15. (B) Efecto del propóleo sobre las concentraciones de glucosa en sangre en el día 15	48
Figura 6. (A) Efecto del propóleo sobre el peso corporal a partir del día 1 y hasta el día 15. (B) Efecto del propóleo sobre el peso corporal en el día 15.....	49
Figura 7. Detección de los niveles de insulina en sangre al final del tratamiento.....	50
Figura 8. Microfotografías (10X) de páncreas de los diferentes grupos experimentales, tinción de Hematoxilina y Eosina.	51
Figura 9. Microfotografías (40X) de páncreas de los diferentes grupos experimentales, inmunohistoquímica	52
Figura 10. Efecto del propóleo sobre la actividad de las enzimas SOD, CAT y GPx	53
Figura 11. Capacidad antioxidante del propóleo de Chihuahua.....	55
Figura 12. Cromatograma del análisis por HPLC-MS del propóleo de Chihuahua.....	56
Figura 13. Cromatograma del análisis por GC-MS del propóleo de Chihuahua	57
Figura 14. Ubicación del apiario donde se realizó la colecta del propóleo de Chihuahua .	79

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Compuestos naturales reportados con actividad hipoglucémica.....	28
Cuadro 2. Actividades biológicas reportadas para algunos flavonoides.....	30
Cuadro 3. Dosis administradas para el ensayo de toxicidad aguda	35
Cuadro 4. Peso corporal de los ratones y peso de los órganos después de la administración de la única dosis oral de propóleo.....	45
Cuadro 5. Evaluación hematológica y análisis bioquímico de los ratones después de la administración de la única dosis oral de propóleo.....	¡Error! Marcador no definido.
Cuadro 6. Compuestos identificados por HPLC-MS del propóleo de Chihuahua	56
Cuadro 7. Compuestos identificados por GC-MS del propóleo de Chihuahua.....	58
Cuadro 8. Fracciones obtenidas de la cromatografía en columna del propóleo.....	58
Cuadro 9. Compuestos identificados mediante el análisis de HPLC en cada una de las fracciones obtenidas en la Cromatografía en columna del Propóleo de Chihuahua.....	59
Cuadro 10. Compuestos identificados mediante el análisis de GC-MS en cada una de las fracciones obtenidas en la Cromatografía en columna del Propóleo de Chihuahua.....	60
Cuadro 11. Capacidad antioxidante de cada una de las fracciones obtenidas en la Cromatografía en columna del Propóleo de Chihuahua	62

RESUMEN

El propóleo es un producto apícola resinoso y complejo, recogido y procesado por las abejas a partir de resinas, polen, ceras, sustancias florales, entre otros. Se sabe que su composición química varía dependiendo de la zona de floración. Además, el propóleo tiene diferentes propiedades biológicas como antimicrobiano, antioxidante, antiinflamatorio e inclusive se ha demostrado en estudios que el propóleo tiene actividad hipoglucémica. La Diabetes Mellitus es un problema de salud mundial y en nuestro país, es la principal causa de mortalidad en la población con edad productiva. La diabetes es una enfermedad metabólica caracterizada por hiperglucemia como consecuencia de defectos en la secreción y/o acción de la insulina. Además, la diabetes está asociada con la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) que causan daño oxidativo a diferentes órganos. El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto hipoglucemiante y antioxidante del propóleo de Chihuahua en un modelo experimental de diabetes. Se obtuvo el extracto etanólico del propóleo mediante la técnica de maceración. En resultados obtenidos del efecto del propóleo en la curva de tolerancia a la glucosa, el grupo de ratones diabéticos tratados con propóleo (D/P) mostró una reducción notable de los niveles de glucosa (330 mg/dL) con respecto al grupo de ratones diabéticos (D) 570 mg/dL. Además, la administración de propóleo a ratones diabéticos durante 15 días mostró una disminución de los niveles de glucosa donde se registraron valores de 350 mg/dL. Al final del tratamiento, se determinaron los niveles de insulina, observando que el grupo D/P registraron 0.3 ng/mL, por otra parte, en el grupo D no se detectó insulina. Por medio de la técnica histológica se encontró que la administración de propóleo muestra una diferencia en el tamaño de los islotes pancreáticos de cada uno de los grupos experimentales. Además se detectó insulina en los islotes del páncreas de los ratones del grupo D/P mediante inmunohistoquímica. También se observó que la actividad de las enzimas SOD, CAT Y GPx se ve disminuida en los ratones diabéticos, mientras que hay un aumento significativo en los ratones diabéticos tratados con propóleo. El contenido de fenoles totales del propóleo de Chihuahua fue de 314 mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto. En cuanto al contenido de flavonoides totales del propóleo se obtuvo 6.28 mg de equivalentes de

quercetina por gramo de extracto. Además, la capacidad antioxidante media (CA_{50}) del propóleo fue de 15.75 $\mu\text{g/mL}$. Mediante el análisis de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS) se identificaron en el propóleo: pinocebrina, quercetina, naringina, naringenina, kaempferol, acacetina, luteolina, crisina, algunos fenoles, flavonoles y flavanonas. Y por último, se realizó una cromatografía en columna del propóleo para obtener las fracciones del extracto (800) y posteriormente evaluar su capacidad antioxidante, observando que 58 fracciones presentaron capacidad antioxidante de manera diferente. En esta investigación se encontró que el propóleo es rico en flavonoides, además de que se demuestra por primera vez que el propóleo de Chihuahua disminuye los niveles de glucosa en sangre en ratones diabéticos tratados con propóleo. También se detectó insulina en los ratones tratados, hubo diferencias en el tamaño de los islotes del páncreas y se observó un aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes. Estas propiedades biológicas encontradas en el propóleo de Chihuahua podrían atribuirse al contenido de flavonoides ya que se ha reportado que varios de los compuestos identificados presentan efecto hipoglucemiante y antioxidante .

ABSTRACT

Propolis is a resinous and complex apicultural product, collected and processed by bees from resins, pollen, wax, floral substances, among others. It is known that its chemical composition varies depending on the area of flowering. In addition, propolis has different biological properties such as antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory and has even been shown in studies that propolis has hypoglycemic activity. Diabetes Mellitus is a global health problem and in our country, it is the main cause of mortality in the population with productive age. Diabetes is a metabolic disease characterized by hyperglycemia as a consequence of defects in the secretion and/or action of insulin. In addition, diabetes is associated with the generation of reactive oxygen species (ROS) that cause oxidative damage to different organs. The aim of this work is to evaluate the hypoglycemic and antioxidant effect of Chihuahua propolis in an experimental model of diabetes. The ethanolic extract of propolis was obtained by means of the maceration technique. In the results obtained regarding the effect of propolis on the glucose tolerance curve, the group of diabetic mice treated with propolis (D/P) showed a remarkable reduction of glucose levels (330 mg/dL) with respect to the group of diabetic mice (D) 570 mg/dL. In addition, administration of propolis to diabetic mice for 15 days showed a decrease in glucose levels where values of 350 mg/dL were recorded. At the end of the treatment, the insulin levels were determined, observing that the group D/P registered 0.3 ng/mL, on the other hand, in the group D no insulin was detected. By means of the histological technique it was found that the administration of propolis shows a difference in the size of the pancreatic islets of each of the experimental groups. Moreover, insulin was detected in the islets of the pancreas of mice of group D/P by means of immunohistochemistry. It was also observed that the activity of SOD, CAT and GPx enzymes is diminished in diabetic mice, while there is a significant increase in diabetic mice treated with propolis. The content of total phenols of Chihuahua propolis was 314 mg gallic acid equivalents per gram of extract. Regarding the content of total flavonoids of propolis, 6.28 mg of quercetin equivalents were obtained per gram of extract. In addition, the average antioxidant capacity (CA₅₀) of propolis was 15.75 µg/mL. Through the analysis of High

Resolution Liquid Chromatography (HPLC) and Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS) were identified in the propolis: pinocembrina, quercetin, naringin, naringenin, kaempferol, acacetin, luteolin, chrysin, some phenols, flavonols and flavanones. And finally, a column chromatography of propolis was performed to obtain the fractions of the extract (800) and subsequently evaluate its antioxidant capacity, observing that 58 fractions presented antioxidant capacity differently. In this research it was found that propolis is rich in flavonoids, besides it is demonstrated for the first time that the propolis of Chihuahua decreases blood glucose levels in diabetic mice treated with propolis. Insulin was also detected in the treated mice, there were differences in the size of the islets of the pancreas and an increase in the activity of the antioxidant enzymes was observed. These biological properties found in the Chihuahua propolis could be attributed to the flavonoid content since it has been reported that several of the identified compounds have a hypoglycaemic and antioxidant effect.

1. INTRODUCCIÓN

La Diabetes Mellitus (DM) es considerada un problema de salud pública a nivel mundial, actualmente representa una de las primeras causas de mortalidad en países desarrollados. Se calcula que existen 347 millones de personas con este padecimiento, lo que equivale al 5% de la población mundial, para el 2030 esta cifra habrá aumentado a más de 500 millones (1).

En nuestro país, esta enfermedad es la principal causa de mortalidad en la población con edad productiva (2); de igual forma, su prevalencia e incidencia se ha incrementado considerablemente en los últimos años. Más del 10% de la población mexicana padece DM y tan sólo en 2011 se detectaron 400,000 nuevos casos. Según la Federación Internacional de Diabetes (IDF) México ocupa el séptimo lugar de los países con mayor prevalencia de diabetes (3).

1.1. DIABETES MELLITUS

La Diabetes Mellitus es una enfermedad metabólica de diferente etiología, caracterizada por hiperglucemia como consecuencia de defectos en la secreción y/o acción de la insulina (4). Existen 3 alteraciones fundamentales asociadas a la hiperglucemia: elevada producción hepática de glucosa, secreción insuficiente de insulina y acción alterada de esta hormona (5). La hiperglucemia está asociada a largo plazo con daño y disfunción de varios órganos como los ojos, riñones, entre otros (6).

La Diabetes se ha clasificado en dos grandes grupos: La Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM-T1), representa del 5 al 10% de la prevalencia a nivel mundial. Se caracteriza por una deficiencia absoluta en la secreción de insulina, destrucción autoinmune de las células beta (β) pancreáticas. Los anticuerpos más conocidos, presentes en el 85-90% de los individuos con hiperglucemia, están asociados al Complejo Principal Histocompatibilidad (CPH), ligado a los genes DQA y DQB (3). La Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM-T2), se caracteriza por la resistencia a la acción de la insulina, es decir,

una disminución de la eficacia de la insulina para estimular la captación de glucosa en el músculo esquelético e hígado principalmente, además de presentar una deficiencia relativa de la secreción de la insulina. La DM-T2 tiene una prevalencia de aproximadamente 90 al 95% de los casos (7). No hay destrucción autoinmune de las células β pancreáticas, pero si está asociada a predisposición genética y obesidad (8).

1.2. ALTERACIONES METABÓLICAS

La hiperglucemia crónica se debe tanto a la incapacidad de los tejidos para metabolizar glucosa como a la sobre producción de ésta por el hígado. En el primer caso, estos defectos metabólicos, contribuyen a exacerbar los altos niveles de glucosa en estados postprandiales, mientras que la sobre producción de glucosa por el hígado mantiene altas las concentraciones de glucosa en sangre durante periodos de ayuno (5).

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. No obstante existe un aumento de la gluconeogénesis hepática, que puede deberse a factores como: resistencia a la insulina, deficiencia en la secreción de insulina, incremento en la presencia de precursores gluconeogénicos y ácidos grasos libres, entre otros (5).

Debido a la heterogeneidad de esta enfermedad, acompañada de diversos desordenes 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 (5). Los factores que desencadenan esta patología pueden ser variados, desde genéticos, hormonales hasta ambientales (9).

1.3. ESTRÉS OXIDATIVO EN LA DIABETES

Los seres humanos y la mayoría de los organismos eucarióticos necesitan del oxígeno para mantener una producción de energía suficiente para sobrevivir. Sin embargo, el oxígeno es potencialmente peligroso, principalmente debido a la formación de especies reactivas intermedias durante su utilización (10), las cuales pueden llegar a lesionar macromoléculas como el ADN, hidratos de carbono y las proteínas (11). Por otro lado, se le puede llamar antioxidante a aquellos compuestos que protegen a lípidos y otros componentes celulares del ataque de estos agentes oxidantes como los radicales libres de oxígeno, superóxido y grupos hidróxilo reactivos (12). Además, los seres vivos se encuentran constantemente expuestos a las especies reactivas del oxígeno, por lo tanto, es de suma importancia destacar que las células pueden tolerar estados de estrés oxidativo leve; sin embargo, situaciones severas de estrés oxidativo pueden afectar el metabolismo celular: a través de la ruptura de moléculas de ADN, del aumento de la concentración de calcio intracelular, del daño a proteínas y/o de peroxidación de lípidos (10).

En la diabetes se produce aumento de la producción de radicales libres de oxígeno y de nitrógeno, fundamentalmente, de lo cual es responsable, en esencia, la hiperglucemia crónica que manifiestan los individuos afectados por esta enfermedad metabólica que, sobre todo, no tienen un control, metabólico óptimo, y esto se acompaña además de la disminución de las defensas antioxidantes naturales. Así, las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno afectan a diferentes tejidos y órganos del organismo del diabético (13).

La hiperglicemia constituye la principal manifestación de la Diabetes Mellitus y está implicada en la aparición de las complicaciones que se presentan asociadas con la enfermedad (14, 15). En el estudio de las causas implicadas en la aparición de esta patología se ha demostrado que altos valores de glucemia conducen a un estrés oxidativo. Esto se debe a que la glucosa se autooxida y da lugar a la formación de alfacetoaldehídos, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), entre otras especies reactivas del oxígeno (ERO) (15, 16). También se plantea que el descontrol de la glicemia conduce al incremento de la velocidad de los procesos de

glicosilación y oxidación de lípidos y proteínas de membrana, lo que provoca cambios conformacionales de estas macromoléculas y por lo tanto el deterioro de sus funciones (14, 17, 18).

1.4. FÁRMACOS PARA TRATAR LA DIABETES MELLITUS

Existen dos tipos de medicamentos para tratar la diabetes: la insulina exógena y los fármacos hipoglucemiantes. La insulina se emplea principalmente para el control glucémico de pacientes con DM-T1 (19).

1.4.1. Insulina

La insulina es una hormona de naturaleza proteica con un peso molecular aproximado de 5.7 kDa. Está formada por 2 cadenas polipeptídicas, la cadena A formada por 21 aminoácidos (aa) y la cadena B constituida por 30 aa, estas cadenas están conectadas por 2 enlaces disulfuro intermoleculares entre el aminoácido 7 de cada una de las cadenas (A-Cys⁷ y B-Cys⁷) y el 20 de la cadena A (A-Cys²⁰) con el 19 de la cadena B (B-Cys¹⁹) y un enlace intramolecular en la cadena A, entre los aminoácidos 6 y 11 (A-Cys⁶ y A-Cys¹¹) (20, 21). La estructura intramolecular de la insulina es estable debido a que la configuración de la insulina monomérica es similar a la de sus formas relacionadas en solución (Figura 1) (22).

La insulina suele considerarse como el regulador principal de la glicemia, de hecho, la deficiencia de insulina eleva la glicemia, mientras que un exceso de esa hormona produce hipoglicemia. Dado que las dos circunstancias antes mencionadas resultan mortales, la insulina tiene una influencia decisiva en la regulación vital. La concentración de insulina en el plasma de la sangre arterial después de un ayuno de toda la noche en un individuo normal suele fluctuar entre 5 y 15 $\mu\text{U}/\text{mL}$. Hoy en día está muy claro que esa hormona también cumple una función primordial en el control del metabolismo de grasas y proteínas, ya que la hormona ejerce sus efectos

en músculo, tejido adiposo e hígado, tejidos que se ocupan principalmente de la regulación del metabolismo del combustible (23).

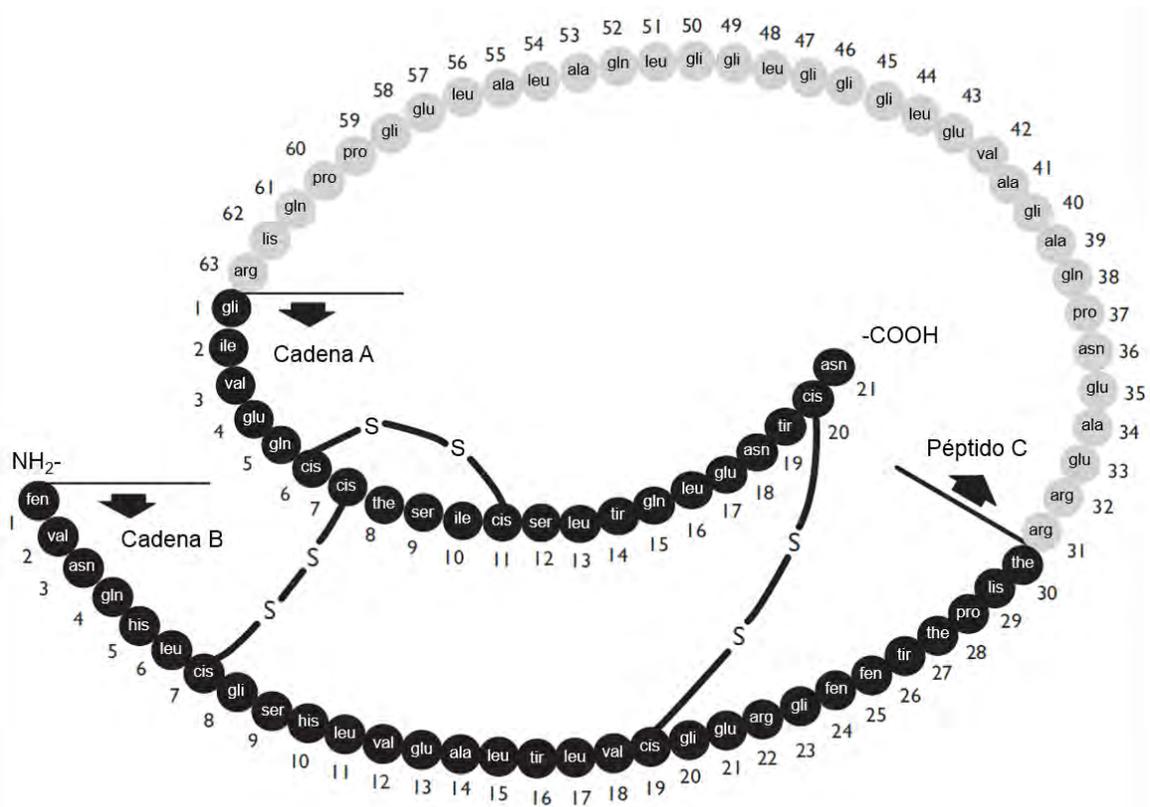


Figura 1. Estructura de la insulina. La insulina es una proteína que está formada de 2 cadenas polipeptídicas, la cadena A (con 21 residuos de aminoácidos) y la cadena B (con 30 residuos de aminoácidos). Las cadenas A y B están unidas por puentes disulfuro, además la cadena A contiene un puente disulfuro intramolecular que une a los residuo 6 y 11. El péptido C que une las cadenas A y B se libera junto con la insulina después de ruptura de la proinsulina. Monómeros de insulina se agregan para formar dímeros y hexámeros (24).

La principal función de la insulina es regular la homeostasis de la glucosa. Esta labor entraña mecanismos moleculares complejos que controlan la gluconeogénesis, la captación y el metabolismo de la glucosa en estados sensibles a la insulina. El aumento resultante en las concentraciones de la hormona en la circulación sanguínea, inhibe la producción hepática de glucosa y estimula un aumento de la captación y el almacenamiento de glucosa en el tejido adiposo y en el músculo estriado, normalizando de esta manera las concentraciones de glucosa. Los efectos

de la insulina en el metabolismo de la glucosa son inmediatos, se presentan en un lapso de pocos segundos a min. Los efectos a mediano y a largo plazo de la insulina en los fenómenos celulares incluyen regulación de la captación de iones y aminoácidos, síntesis y degradación de proteína, transcripción génica y recambio de ácido ribonucleico mensajero (mRNA), así como proliferación y diferenciación celulares (25).

La acción de la insulina puede verse en tres niveles diferentes. Las acciones del nivel I incluyen los fenómenos iniciales que ocurren en la superficie celular: la unión de la insulina a su receptor, la activación de las cinasa de tirosina del receptor de insulina con fosforilación posterior de los dos sustratos del receptor de insulina, y la interacción de estos sustratos con varias moléculas de señalización corriente abajo. Las acciones del nivel II constan de una serie compleja de cascadas de fosforilación y desfosforilación bien diferenciadas que llevan a la activación de varias enzimas reguladoras decisivas las cuales intervienen en la proliferación y el metabolismo celulares. Los efectos biológicos finales de la insulina constituyen las acciones de nivel III, esto implica el movimiento de transportadores de glucosa regulados por insulina (GLUT-4) desde almacenes o reserva intracelular hasta la membrana plasmática; la activación de enzimas que intervienen en la síntesis de glucógeno, la síntesis de lípidos y de proteínas; y la regulación de fenómenos nucleares, como son la síntesis de ácido desoxirribonucleico (DNA) y la transcripción de genes específicos. Algunos estudios sugieren que la señalización de insulina y las proteínas de señalización de insulina también podrían desempeñar funciones importantes en la secreción de esta hormona y en la proliferación de las células β del páncreas (26, 27).

La homeostasis de la glucosa depende de una óptima regulación de la secreción de insulina por parte de las células β y la acción de esta hormona en sus tejidos blanco, particularmente en el músculo, hígado y tejido adiposo. Las células β se encuentran en la fracción endocrina del páncreas, es decir, los islotes de Langerhans. En los seres humanos, las células β constituyen aproximadamente el 60% de los islotes de Langerhans, que se extienden por todo el páncreas y componen el 2% de este

órgano (28). El citoplasma de cada célula β contiene alrededor de 13,000 gránulos secretorios repletos de insulina cristalizada (29). Durante la estimulación de glucosa sólo una pequeña proporción del conjunto de gránulos se somete a exocitosis (30).

Las células pancreáticas funcionan como sensores de glucosa con la tarea crucial de ajustar perfectamente la liberación de insulina a los niveles de glucosa en sangre (30). Tanto la secreción como la acción de la insulina contribuyen a la homeostasis de la glucosa. La liberación regulada de insulina requiere un acoplamiento fuerte en la célula β entre el metabolismo de la glucosa y la respuesta secretora de insulina. El proceso de exocitosis está estrechamente controlada por señales generadas por el metabolismo de nutrientes, así como por los neurotransmisores y hormonas circulantes (31-33). La célula β reacciona rápidamente a las fluctuaciones de la concentración de glucosa en sangre mediante el ajuste de la tasa de secreción de insulina (30). El acoplamiento eficiente de reconocimiento de la glucosa para la secreción de insulina está garantizada por la mitocondria, que integra y genera señales metabólicas (34).

El tratamiento farmacológico para los pacientes con DM-T2 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 (19). Entre los fármacos hipoglucemiantes se encuentran las sulfonilureas, meglitinidas, biguanidas, tiazolidinedionas, inhibidores de alfa glucosidasa, entre otros. Sin embargo, algunos de estos medicamentos también tienen ciertos efectos adversos como causar hipoglucemia en dosis más altas, problemas hepáticos, acidosis láctica, diarrea, entre otros (35-37).

1.4.2. Fármacos hipoglucemiantes

1.4.2.1. Sulfonilureas

La secreción de insulina desde la célula β es activada por la concentración extracelular de glucosa, y dentro del complejo mecanismo sensible a la glucosa que tiene la célula encontramos a los canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}), ubicado en la membrana plasmática. Conforme la concentración extracelular de la glucosa aumenta, la razón ATP:ADP también aumenta y esto cierra un número creciente de canales de K_{ATP} lo que causa acumulación de potasio en la membrana plasmática, la cual se despolariza después y hace que se abran los canales del calcio dependientes del voltaje en la membrana plasmática. Los iones de calcio extracelular entran en la célula e incrementan la concentración de ión calcio en el citosol, lo que produce movimiento y secreción de gránulos de insulina (38).

El canal K_{ATP} en la célula β consta de dos subunidades: una que contiene sitios para la unión de sulfonilurea y ATP, llamada subunidad receptora de tipo 1 de sulfonilurea (SUR1), y un canal de potasio de rectificación hacia adentro o interna ($KIR^{6.2}$) que actúa como subunidad formadora de poros. Ambas subunidades son necesarias para que el canal de K_{ATP} sea funcional (Figura 2). Cuatro subunidades $KIR^{6.2}$ forman el poro y están rodeados por cuatro subunidades SUR1 (38).

Las sulfonilureas (SU) se unen al receptor de sulfonilurea y cierran los canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}) en las células β pancreáticas, alterando el potencial de reposo de la célula. Esto conduce a la entrada de calcio y la estimulación de la secreción de insulina. Las sulfonilureas son bien absorbidas y sus concentraciones máximas se alcanzan de 1 a 4 h (39). Dado que las sulfonilureas estimulan la secreción de insulina independiente de los niveles de glucosa en sangre, pueden causar hipoglucemia, especialmente las sulfonilureas de acción prolongada (40) y este es el efecto secundario más preocupante (41). También pueden reducir la gluconeogénesis hepática y la glucogenólisis y aumentar la captación de glucosa en el hígado y la utilización en los músculos esqueléticos (39).

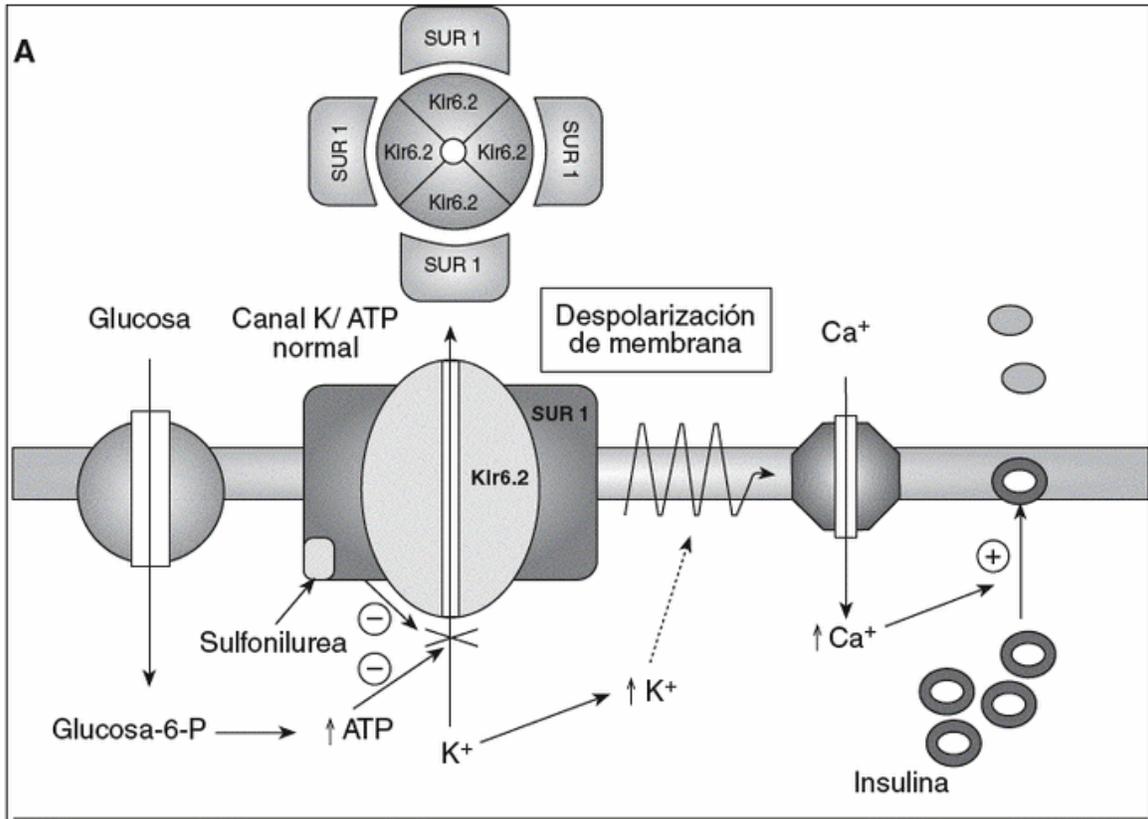


Figura 2. Subunidades del canal K_{ATP} en la célula β (42).

Las sulfonilureas primera generación incluyen tolbutamida, acetohexamida, tolazamida, clorpropamida, donde la cadena lateral es una cadena abierta alifática simple en contraste con las sulfonilureas alicíclicas de segunda generación (gliburida, glipizida, glimepirida). Glipizida y glimepirida se asocian con una menor incidencia de hipoglucemia. Todas las SU se asocian con el aumento de peso y, por tanto, puede no ser la primera opción óptima para los pacientes obesos (41).

1.4.2.2. Meglitinidas

Las meglitinidas también actúan sobre los canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}) en las células β del páncreas estimulando así la liberación de insulina (39, 41, 43). Sin embargo, la acción está mediada a través de un sitio de unión diferente en comparación con el receptor de las sulfonilureas de las células β (44). Entre las ventajas potenciales, estos agentes pueden reducir el nivel de glucosa postprandial

en un grado más alto y tener un menor riesgo de hipoglucemia. La repaglinida es el primer fármaco de la clase meglitinida, un miembro de la familia ácido benzoico carbamoilmetilo (glinidas). Esta es estructuralmente diferente de las sulfonilureas, pero muestra cierto parecido con gliburida. La repaglinida tiene un mejor perfil de farmacocinética (absorción rápida, corta duración de acción) ofrece un buen control de la glucemia a largo plazo combinado con un bajo riesgo de hipoglucemia severa (41). La repaglinida se metaboliza principalmente en el hígado con cantidades mínimas excretados por los riñones (43).

Las meglitinidas tienen un inicio rápido y una duración de acción corta (4-6 h) y por lo tanto menor riesgo de hipoglucemia. Las meglitinidas se administran antes de las comidas para el control de glucosa postprandial en sangre, además la administración preprandial permite flexibilidad en caso de que se pierda una comida sin aumentar el riesgo de hipoglucemia (39, 43).

1.4.2.3. Biguanidas

Las biguanidas son derivados sintéticos de las guanidinas que están formados por la unión de dos moléculas de guanidina con pérdida de un radical amonio. De entre los fármacos de esta clase destaca la metformina (45).

La metformina, fenformina y buformina se introdujeron en el mercado poco después de las sulfonilureas. Buformina se introdujo de forma limitada, pero los otros dos fueron ampliamente utilizados hasta 1977, cuando fue retirado fenformina en muchos países debido a los casos notificados de acidosis láctica (41).

La metformina actúa principalmente por la disminución de la producción hepática de glucosa (39) a través de la inhibición de la gluconeogénesis (41), también aumenta la captación de glucosa periférica y reduce la producción de glucosa intestinal, mejorando la tolerancia a la glucosa en ayunas y la reducción de la glucosa en plasma postprandial (43). La metformina también aumenta la actividad de la cinasa del receptor de insulina (46) y estimula el transporte de glucosa al incrementar la

actividad de la expresión genética del transportador de glucosa GLUT-4 (47, 48). Se absorbe predominantemente en el intestino delgado y sus concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan 3 h después de la ingesta. La metformina se excreta sin cambios en la orina. La vida media de eliminación ($t_{1/2}$) es de aproximadamente 5 h. La metformina no causa hipoglucemia ni aumento de peso. Las reacciones adversas más comunes a la metformina son gastrointestinales como diarrea, malestar abdominal, náuseas, sabor metálico y anorexia (49), pero la reacción más temida, aunque rara, es la acidosis láctica (50). Debido a ellos, la metformina debe utilizarse con precaución en individuos diabéticos de edad avanzada con insuficiencia renal. Puesto que la metformina mejora la sensibilidad a la insulina, se ha usado en estudios clínicos para prevenir o retrasar la aparición de Diabetes Mellitus. Además, la metformina era utilizada inicialmente como agente de tratamiento de segunda línea en pacientes con fracaso de las sulfonilureas, actualmente se usa mucho como fármaco de primera elección (45).

1.4.2.4. Tiazolidinedionas

Las tiazolidinedionas activan los receptores nucleares- γ activados por los proliferadores de peroxisomas (PPAR- γ), que están involucrados en la modulación de la expresión de genes que codifican para proteínas implicadas en el metabolismo de glucosa y lípidos. Estas proteínas amplifican las acciones post-receptor de la insulina en el hígado y tejidos periféricos, lo que resulta en un mejor control de la glucemia sin aumento en la secreción de insulina endógena (39), además aminoran de manera notoria el gasto de glucosa hepática en varios modelos diabéticos. Esos efectos parecen producto de una disminución de la tasa de gluconeogénesis en el hígado (51). Las tiazolidinedionas aumentan la sensibilidad a la insulina en tejido adiposo y músculo y en menor medida inhiben la producción hepática de glucosa. Cabe destacar que, dado que estos agentes no aumentan la secreción de insulina, la hipoglucemia puede descartarse cuando se prescriben tiazolidinedionas como monoterapia.

Algunos de los efectos adversos relacionados con las tiazolidinedionas es que hay un aumento de peso, retención de líquidos y riesgo de toxicidad hepática (52). Estos medicamentos son relativamente inseguros para los pacientes con disfunción renal (41). La rosiglitazona fue retirada del mercado europeo en el año 2010 debido a su riesgo potencial de causar la enfermedad isquémica del corazón. La pioglitazona se absorbe bien tras la administración oral, con concentraciones máximas alcanzadas aproximadamente 1.5 h más tarde y su eliminación es lenta ($t_{1/2}$ aproximadamente 9 h) (39).

1.4.2.5. Inhibidores de α -glucosidas

Los inhibidores de α -glucosidasa reducen la absorción intestinal de disacáridos mediante la inhibición de la acción de la enzima α -glucosidasa en el intestino delgado, que degradan carbohidratos más complejos en azúcares (39, 41). La acarbosa es un pseudotetrasacárido de origen microbiano que inhibe de manera competitiva la amilasa y la enzima α -glucosidasa unidas a la membrana con afinidad casi equivalente (53). El otro agente disponible en el mercado es miglitol.

La amilasa digiere el almidón para formar oligosacáridos, y después las α -glucosidasas unidas a la membrana (gluco-amilasa, isomaltasa y maltasa) fragmentan aún más éstos hasta glucosa (54). La sacarosa es fragmentada de manera similar por una sacarasa unida a la membrana (una α -glucosidasa) para generar glucosa y fructosa (53).

La acarbosa y el miglitol retardan la degradación de los hidratos de carbono, así como retardar la absorción de la glucosa derivada de las comidas. Por lo tanto, el mayor impacto de estos fármacos es sobre la hiperglucemia posprandial. Los inhibidores de la α -glucosidasa que tratan específicamente la hiperglucemia posprandial tendrán utilidad importante en pacientes ancianos con Diabetes Mellitus y tolerancia alterada a la glucosa (55). La acarbosa puede usarse con eficiencia y seguridad en combinación con sulfonilureas, metformina o insulina para alcanzar un efecto aditivo en el control de la glucemia, y ésta no produce hipoglucemia. Además,

pacientes con dietas ricas en almidones y bajas en azúcares simples, logran el máximo beneficio en el tratamiento con los inhibidores de la α -glucosidasa con pocos efectos secundarios (53).

La ventaja de los inhibidores de α -glucosidasa es que no están asociados con la hipoglucemia y el aumento de peso (41). Los efectos secundarios más preocupantes asociados con estos medicamentos son a nivel gastrointestinal, incluyendo malestar abdominal, distensión abdominal, flatulencia y diarrea, pero son reversibles cuando se interrumpe el tratamiento (41, 43). Los inhibidores de α -glucosidasa deben evitarse en pacientes con insuficiencia renal significativa (43). El tiempo medio de eliminación es de aproximadamente 2.8 h, aunque existe una fase terminal más lenta con un tiempo medio de aproximadamente 9 h. La absorción del miglitol es saturable a altas dosis y exhibe las concentraciones máximas entre 2 a 3 h. El tiempo medio de eliminación de miglitol es de aproximadamente 2 h (41).

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 y son ineficientes en el control glucémico a largo plazo (56). En muchos países desarrollados, con sistemas de salud basados primordialmente en la medicina alopática, el empleo de la medicina alternativa ha ido en aumento durante los últimos años. Paradójicamente en estos países, la esperanza de vida y el estilo de vida propician el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas, y aunque la tecnología y los tratamientos para estos padecimientos son abundantes, éstos no han sido lo suficientemente eficaces o provocan efectos adversos, por lo que la medicina alternativa ofrece para muchos pacientes un recurso terapéutico muy importante (5).

Los productos naturales constituyen una fuente de alternativas de fármacos y nuevos enfoques terapéuticos; esto es porque el grado de diversidad química que se encuentra en los productos naturales es más amplio que el de cualquier otra fuente, y el grado de novedad de la estructura molecular que se encuentra en los productos naturales es mayor que la determinada a partir de cualquier otra fuente. Se estima que dos terceras partes de la población mundial aún cuenta con los

remedios de la medicina tradicional, basados principalmente en plantas, debido a la disponibilidad o accesibilidad limitada de la medicina moderna. El interés en las fuentes naturales para proporcionar tratamientos para el dolor, paliativos o curativos para una variedad de enfermedades o el uso recreativo se remonta a los primeros puntos de la historia y muchos de estos agentes continúan existiendo de una u otra forma como tratamientos a distintas manifestaciones clínicas. La OMS estima que aproximadamente el 80% de la población mundial se basa en las medicinas tradicionales como fuentes para su atención primaria de salud (57, 58).

Un producto natural utilizado por sus diversas propiedades biológicas es el propóleo, éste no sólo es un material de construcción, es la "defensa química" más importante de las abejas contra microorganismos patógenos y ha sido utilizado por el hombre desde la antigüedad como un remedio (59). Estudios recientes han demostrado que el propóleo tiene actividad hipoglucémica, el cual se puede utilizar para prevenir o retrasar la aparición de las complicaciones diabéticas. Sobre la actividad hipoglucemiante, se han realizado diversos estudios en los cuales se ha demostrado que el propóleo de otros países (Nigeria, Arabia Saudita, Brasil y China) disminuye los niveles de glucosa en modelos de ratas diabéticas. También se ha informado que el propóleo mejora el sistema de defensa antioxidante y para proteger el tejido pancreático (36, 60-63).

1.5. PROPÓLEO

1.5.1. Definición

El propóleo es un producto natural recolectado y procesado por las abejas (*Apis mellifera*) a partir de diferentes secreciones y resinas de plantas y árboles así como diversas sustancias florales para ser posteriormente procesadas en su interior mediante secreciones salivales para darle una consistencia pegajosa o resinosa. Dependiendo del origen botánico del propóleo y de la época de recolección, éste es una sustancia resinosa que varía en color (de amarillo claro a marrón), sabor (amargo, ligeramente picante o insípido) y consistencia, lo cual va a depender de la cantidad de compuestos florales y de resinas arbóreas que contenga. Además, a temperaturas altas (45 a 250° C) el propóleo es una sustancia suave, flexible y muy pegajosa, mientras que a temperaturas bajas (por debajo de 15° C) se vuelve duro y quebradizo. Etimológicamente la palabra propóleo proviene del griego 'propolis' compuesta por 'pro' (a favor o en defensa) y 'polis' (ciudad) que significa "defensa de la ciudad" o "defensa de la colmena" (64-70).

Las abejas lo usan para revestir el panal, para sellar los agujeros en el mismo confiriéndole resistencia y fuerza, para barnizar el interior de las celdillas con fines desinfectantes, para mantener la humedad constante en el interior de la colmena, como aislante e impermeabilizante protegiendo a la colmena contra el flujo de aire para protegerse de las adversidades climatológicas y hacerlo más resistente a microorganismos y animales. Así, colocan una cantidad de propóleo en la entrada del panal para evitar que animales más grandes logren penetrar, pero si estos logran entrar a la colmena, las abejas lo matan y lo embalsaman para evitar su descomposición en el interior del panal. El propóleo también protege la colonia de enfermedades debido a su eficacia antiséptica y propiedades antimicrobianas (66, 67, 69, 71-73).

1.5.2. Historia

El uso del propóleo se remonta a tiempos antiguos, existen pruebas de la relación del hombre con los productos derivados de la colmena desde hace aproximadamente 5,000 años y desde tiempos antiguos se han reconocido sus propiedades terapéuticas. Por lo menos desde el año 300 a.C. se ha utilizado el propóleo como un medicamento en la medicina local y popular en muchas partes del mundo, ambas tanto interna como externamente (67, 74, 75). En el antiguo Egipto fue utilizado con fines de conservación, para embalsamar cadáveres, así como para aliviar dolencias. En la antigua Grecia, se decía que Hipócrates utilizó el propóleo para curar heridas y úlceras, tanto externas como internas y Dioscórides en su principal obra *De Materia Medica*, lo menciona como una sustancia suave y fácil de extender a manera de unguento, buena para la extracción de espinas y astillas. Los romanos también utilizaban al propóleo ampliamente, Plinio el Viejo en su célebre *Historia Nature* describe el uso práctico de esta sustancia, según él, tenía la propiedad de extraer picaduras y todos los cuerpos extraños al organismo, dispersar tumores, aliviar dolores de los nervios, y cicatrizar úlceras de la naturaleza más obstinada. Además, la cultura griega y la romana eran conscientes de sus cualidades curativas e hicieron extensivo su uso como una medicina. También, más de 15 autores griegos y romanos informaron sobre la preparación y aplicación del propóleo, el llamado tercer producto natural de las abejas (junto a la miel y la cera) (73).

En el siglo I d.C., Cornelio Celso en su obra *De Medicina Celsus*, también menciona al propóleo como un medicamento cuya acción promueve la supuración de heridas y para el tratamiento de abscesos. En manuscritos persas, el propóleo se describe como un fármaco contra mialgia y reumatismo. Galeno en el siglo II, menciona el propóleo/propolis en sus trabajos. En la Edad Media el uso del propóleo no era un tema muy popular, por ende su uso en la medicina convencional desapareció; sin embargo el conocimiento de sus propiedades curativas sobrevivió en la medicina tradicional junto con pocos manuscritos; en ellos, algunas fuentes del siglo XII describen preparaciones medicinales que contenían propóleo, utilizadas para el

tratamiento de infecciones orales y faríngeas, así como caries dentales. Años después, el interés por el propóleo regresó a Europa, trayendo consigo un interés en la antigua enseñanza de la medicina, junto con el redescubrimiento de remedios y tratamientos olvidados. Ambroise Paré, padre de la cirugía francesa menciona que en la primera mitad del siglo XVI se usaba el propóleo con fines médicos. En el siglo XVII, el propóleo ya se encontraba incluido en las farmacopeas de Inglaterra como ingrediente principal en ungüentos de curación. A principios del siglo XIX el propóleo fue estudiado y descrito por Nicolas Louis Vauquelin, un naturalista, farmacéutico y químico francés; años más tarde, en la década de 1960. A finales de los 60's y principios de los 70's, el Dr. Karl Lund Aagaard, mejor conocido como el "Dr. Propolis", realizó una serie de estudios en Dinamarca, sobre más de 50 000 pacientes, mostrando resultados prometedores en cuanto a la eficacia del propóleo en el tratamiento de: cáncer, infección de las vías urinarias, hinchazón de la garganta, gota, heridas abiertas, congestión nasal, resfriados, gripe, bronquitis, gastritis, enfermedad periodontal, infecciones intestinales, úlceras, neumonía, artritis, enfermedades en los pulmones, dolores de cabeza, la enfermedad de Parkinson, infecciones biliares, esclerosis, deficiencias de circulación, conjuntivitis, ronquera, entre otras; evidenciando su eficacia en un amplio espectro de padecimientos; así como el hecho de que casi no produce efectos secundarios (73).

La investigación sobre la composición química del propóleo se inició a principios del siglo XX y se continuó después de la Segunda Guerra Mundial. Los avances en los métodos analíticos cromatográficos han permitido la separación y extracción de varios componentes de propóleos, sin embargo, sólo ha sido en el último siglo que los científicos han sido capaces de demostrar que el propóleo es tan activo e importante como nuestros antepasados pensaban (73).

1.5.3. Elaboración

Las abejas (*Apis mellifera*), primeramente recolectan la materia prima, como las partículas resinosas que se encuentran en las yemas, brotes y pecíolos de diferentes vegetales, tales como: álamo, olmo, sauce, abedul, castaño de indias, pino, abeto, roble, entre otros. 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 (ácido 10-hidroxidecenoico) de color claro que tiene la finalidad de ablandar y hacer más manejable la resina. Finalmente con ayuda de su tercer par de patas traseras concentran y compactan la resina para transferirla a su corbícula. Al ingresar a la colmena, se dirigen al lugar donde es requerido, ya sea con fines desinfectantes, para cerrar grietas o reducir vías de acceso. El producto final se denomina propóleo (76-78).

1.5.4. Colecta

Es de importancia considerar que la cantidad de propóleo que produce una colmena aproximadamente en un año oscila entre 150 y 300 gramos, esto dependerá de la ubicación geográfica, cantidad de flora en el área y de los factores climatológicos. Se ha observado que la mejor recolección de propóleo es antes de la llegada del invierno para climas templados, mientras que en climas tropicales, la mejor época de recolección es al inicio de la estación lluviosa (76).

La recolección es realizada por el apicultor, mediante la colocación de una rejilla de nylon, sobre los paneles de la colmena, esta presenta agujeros de 1.5 por 3 mm, por donde la abejas no pueden pasar viéndose en la necesidad, por su instinto de supervivencia, de cubrir los agujeros para impedir la entrada de agentes externos, por lo que en un periodo de 1 a 6 meses rápidamente será cubierta por propóleo, posteriormente la parrilla se introduce en el congelador a una temperatura de -10 o -20°C por 1 hora con la finalidad de que se congele por trozos y en forma de escamas, obtenga rigidez y fragilidad, de esta manera con una espátula de acero

inoxidable sin mucho filo será fácilmente desprendible. El propóleo recogido en trozos se limpia con ayuda de pinzas cuidando de retirar contaminantes macroscópicos como abejas, trozos de madera y pasto. Finalmente es colocado en frascos ámbar para protegerlo de la luz y en lugares frescos, limpios y cerrados, y se entrega para su elaboración en extracto etanólico o en polvo (76).

1.5.5. Composición química

Es importante señalar que el propóleo es una sustancia compleja, constituida por una gran variedad de compuestos químicos, su composición es distinta y varía dependiendo de la zona geográfica de origen y de la estación del año, esto se debe al tipo de plantas endémicas de acuerdo al clima de la región, sin embargo, se caracteriza por tener un 50% de resinas, 30% de ceras, 10% de aceites esenciales, 5% de granos de polen y 5% de otros compuestos orgánicos (79-81). Actualmente se conoce que los diferentes propóleos del mundo presentan dentro de su composición química más de 300 compuestos tales como polifenoles (flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres, ácidos aromáticos, benzopirenos), terpenoides, aldehídos fenólicos, cumarinas, aminoácidos, aceites esenciales, esteroides y compuestos inorgánicos (67, 74, 82). En cada muestra de propóleos normalmente son identificados de 80 a 100 compuestos químicos (74).

Existe una gran diversidad en cuanto a la composición química del propóleo, ya que los propóleos de las regiones tropicales son químicamente distintos a los reportados en las zonas templadas. En las muestras procedentes de zonas templadas tales como Europa, Asia y el Norte de América, se caracterizan por tener una composición química similar, reportando principalmente compuestos de tipo fenólico, como flavonoides (flavonas y flavanonas), ácidos aromáticos y sus ésteres (59, 77). La composición química de los propóleos de las regiones áridas y semiáridas también es distinta, el trabajo de investigación en propóleos de este tipo de regiones es muy limitado. Sin embargo, en nuestro país, investigaciones de propóleos de regiones áridas y semiáridas en el Estado de Sonora han reportado

que los compuestos que constituyen mayoritariamente a estos propóleos son flavonoides, el éster fenético del ácido cafeico, pinocembrina, 3-acetato de pinobanksina y crisina (83).

Debido a que el propóleo contiene una gran cantidad de compuestos fenólicos, en específico flavonoides, es considerado como un material multifactorial (69, 71) y en las últimas décadas este material ha llamado la atención de los investigadores, desarrollándose numerosos estudios que le atribuyen una amplia gama de propiedades biomédicas, entre las que están, actividad antimicrobiana (71, 84-86), antiviral (87, 88), anticancerígena (89-91), antiinflamatoria (78, 92, 93), antiparasitaria (94-96), entre otras. Adicionalmente, algunas investigaciones han sido dirigidas hacia el estudio de la capacidad antioxidante de estos materiales de origen biológico (97-99) obteniéndose resultados altamente prometedores.

1.5.6. Propiedades biológicas

Los propóleos poseen un amplio espectro de actividades biomédicas y existe en la literatura gran cantidad de datos publicados acerca de todas estas propiedades que posee, los cuales se basan en evaluar los efectos de extractos y compuestos aislados e identificados en propóleos de diferentes partes del mundo tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. Es así que, existen reportes donde se mencionan las múltiples actividades biomédicas atribuidas al propóleo, las cuales son debido a su alto contenido en flavonoides y los mecanismos de acción son similares a los que éstos poseen (69, 71).

1.5.7. Capacidad antioxidante

Se ha establecido que la exposición de los organismos a factores exógenos y endógenos, genera diversas especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como los radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroxilo ($\cdot OH$) entre otras, estas especies inducen alteraciones en las células, citotoxicidad y/o indirectamente genotoxicidad;

favoreciendo la aceleración del envejecimiento y la aparición de cáncer, enfermedades cardiovasculares y degenerativas (100, 101).

Un antioxidante biológico es definido como “cualquier sustancia que cuando está presente en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, reduce o previene significativamente la oxidación de este sustrato” (102). Es así como los radicales libres y las ROS usualmente son removidos o inactivados *in vivo* por enzimas antioxidantes endógenas, como la superóxido dismutasa, la peroxidasa y por compuestos de bajo peso molecular como el tocoferol, el ácido ascórbico y por polifenoles, reduciendo de esta forma los posibles daños inducidos por el estrés oxidativo (103). Por ello, el consumo de alimentos funcionales está asociado a la disminución de enfermedades crónicas, debido a la presencia de compuestos bioactivos, entre los que se encuentran antioxidantes tales como vitaminas C y E, carotenoides, flavonoides, taninos y otros compuestos fenólicos (100).

Aunado a esto, se ha reportado que el propóleo presenta una potente capacidad antioxidante que se debe básicamente a la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides (76, 104). Además, existen trabajos que refieren que propóleos de otros estados de la República Mexicana (Estado de México y Guanajuato) presentaron una buena capacidad antioxidante, con una CA_{50} de 8.48 $\mu\text{g/mL}$ y de 78.63 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Esta propiedad antioxidante parece estar relacionada con el gran contenido de flavonoides y en particular de la Quercetina (78). También, se sabe que el propóleo es una de las fuentes más ricas en flavonoides y ácidos fenólicos, que son ampliamente reconocidos como fuertes antioxidantes (105). De tal modo que otros autores(106), evaluaron la capacidad antioxidante *in vitro* de propóleos provenientes de varias regiones del mundo, encontraron que los propóleos de Argentina, Australia, China, Hungría y Nueva Zelanda, presentaron capacidad antioxidante relevante como consecuencia del contenido total de polifenoles y flavonoides presentes en las muestras. De igual manera, se ha reportado que diferentes extractos de propóleos de Serbia muestran capacidad antioxidante, presentando flavonoides en su composición, siendo los más abundantes crisina, pinocembrina y galangina (107); además, compuestos como los flavonoides tienen

importantes propiedades antioxidantes, ya que minimizan la peroxidación lipídica y el efecto de los radicales libres (108). También, en estudios realizados en propóleos chinos (109), se identificaron en las muestras epicatequina, naringenina, pinocembrina y crisina como los principales compuestos fenólicos y reportaron que la mayoría de los extractos mostró una capacidad antioxidante fuerte. A este respecto, existen reportes (110) en los que se utilizaron compuestos puros y encontraron que la quercetina mostró una fuerte capacidad antioxidante, mientras que la galangina y kaempferol poseen capacidad antioxidante moderada y la acacetina, apigenina y pinocembrina mostraron una capacidad antioxidante muy baja.

Los humanos lo hemos utilizado durante miles de años a lo largo de la historia. Los egipcios lo empleaban como un material de conservación para embalsamar a sus faraones. Durante la guerra se utilizó para evitar las infecciones en las heridas y favorecer la cicatrización de quemaduras. En la medicina tradicional ha sido empleado como un remedio para las infecciones, las llagas y las supuraciones, así como antiséptico y cicatrizante. También se ha empleado como astringente en los enjuagues bucales y pasta dentrífica (64). Recientemente el propóleo ha ganado popularidad como alimento saludable en varias partes del mundo, incluido Estados Unidos, Japón y la Unión Europea, donde se ha convertido en prioridad mejorar la salud humana y prevenir patologías como inflamaciones, enfermedades del corazón, cáncer y diabetes (111).

1.5.8. Actividad hipoglucemiante

Existen pocas referencias acerca del propóleo y su actividad hipoglucemiante, sin embargo se ha reportado que algunos propóleos reducen los niveles de glucosa sanguínea, demostrando 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 (112).

Además, se sabe que el propóleo tiene la capacidad de prevenir la hiperglucemia, sin embargo, el mecanismo subyacente aún no se conoce completamente. Por lo que algunos autores investigaron si un extracto etanólico de propóleo brasileño promueve la captación de glucosa y la translocación del transportador de glucosa sensible a la insulina (GLUT-4) en las células del músculo esquelético de rata. En los miotubos L6 (línea celular de mioblastos derivada de músculo de rata, diferenciada a miotubos), el extracto promovió significativamente la translocación de GLUT-4 y la actividad de captación de glucosa. Respecto al mecanismo de translocación de GLUT-4, el extracto de propóleo indujo tanto fosforilación de PI3K como de AMPK de una manera dependiente de la dosis en los miotubos L6. Los principales polifenoles encontrados en el extracto de propóleos (artepilina C, ácido cumárico y kaempferide), promovieron la translocación de GLUT-4 en miotubos L6. Adicionalmente, estos compuestos activaron tanto la vía de señalización de PI3K como AMPK. Sin embargo, sólo kaempferide aumentó la actividad de absorción de glucosa. Además, las administraciones orales únicas de extracto de propóleo (a 250 mg/kg de peso corporal), disminuyeron los niveles de glucosa en sangre postprandial en ratones ICR. En conclusión, los autores demostraron que el propóleo brasileño tiene el potencial de prevenir la hiperglucemia promoviendo la translocación de GLUT-4 en el músculo esquelético y que el kaempferide es en parte responsable del efecto hipoglucemiante en los propóleos (113).

Sin embargo no hay información sobre propóleos mexicanos y su actividad hipoglucemiante, por ello es indispensable la investigación de las actividades de los propóleos de México y también de los compuestos que forman parte de su composición química, ya que prácticamente todos los metabolitos secundarios conocidos tienen algún tipo de actividad y esto es el propósito de programas de búsqueda de compuestos naturales con una particular actividad biológica (114).

1.6. COMPUESTOS NATURALES HIPOGLUCEMIANTES

La diabetes es una enfermedad metabólica que se ha convertido en un grave problema de salud pública debido a las graves complicaciones de salud a largo plazo asociados con ella (115). Además, algunos fármacos utilizados para su tratamiento producen efectos secundarios como hipoglucemia, problemas hepáticos, acidosis láctica, diarrea, entre otros (35-37). Por lo tanto, la investigación de compuestos naturales con efecto hipoglucemiantes se ha vuelto más importante, ya que se ha descrito que tienen una amplia eficacia (116). De tal manera, que existe un gran número de compuestos naturales que se han reportado en la literatura por sus efectos antidiabéticos; sin embargo, no se conoce su mecanismo de acción, por lo que se están realizando cada vez más estudios para dilucidar los mecanismos de acción de diferentes compuestos naturales (117).

Algunos compuestos con estructura química diferente pero con la misma actividad terapéutica se ha reportado que tienen un potencial hipoglucémico. Varios compuestos naturales incluyendo los compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, xantonas y flavonoides), alcaloides, entre otros, obtenidos de diversas fuentes de la plantas han sido reportados como agentes con actividad hipoglucémica potente (Cuadro 1) (35).

Cuadro 1. Compuestos naturales reportados con actividad hipoglucémica.

Tipo de compuesto		Compuestos	
Compuestos fenólicos	Ácidos fenólicos	Ácido ferúlico, artepilina C, ácido p-cumárico (derivados del ácido cinámico).	
	Xantonas	Mangiferina.	
	Flavonoides	Flavonas	Acacetina, diosmetina, luteolina, crisina, luteolósido.
		Flavanoles	Catequina, epigallocatechin gallate (EGCG), (-)-epicatequina.
		Flavonoles	Quercetina, rutina, kaempferol, galangina, kaempferitrin, kaempferide, myricetina.
		Flavanonas	Naringenina, hesperidina, naringina.
Isoflavonas	Genisteína, daidzeína, puerarina.		

		Antocianidinas	Cianidina, delphinidina, cianidina-3-glucósido, delphinidina-3-glucósido, pelargonidina-3-galactósido, pelargonidina
Alcaloides			Piperina, piperonaline, dehydropiperonaline, berberina, catarantina, vindolina, vindolinina.

1.6.1. Compuestos fenólicos

Son sustancias químicas con estructura que consiste en un núcleo aromático con al menos un sustituyente hidroxílico libre o sustituido.

1.6.1.1. Flavonoides

Los flavonoides son un grupo muy diverso de compuestos fenólicos de origen vegetal con un cierto grado de similitud estructural, caracterizado por un esqueleto de quince carbonos, compuesto por dos anillos de benceno (A y B) unido a través de un anillo de pirano heterocíclico (C) (Figura 3) (118). Además, hay muchas subclases de flavonoides tales como flavonas, flavanoles, flavonoles, flavanonas, isoflavonas y antocianinas. Los flavonoides se producen en varias formas, tales como agliconas, glucósidos y derivados metilados. La combinación de grupos cetónicos α,β -insaturados y grupos hidroxilo, que están presentes en flavonoides, se cree que son los responsables de la mayor parte de la actividad biológica (119).

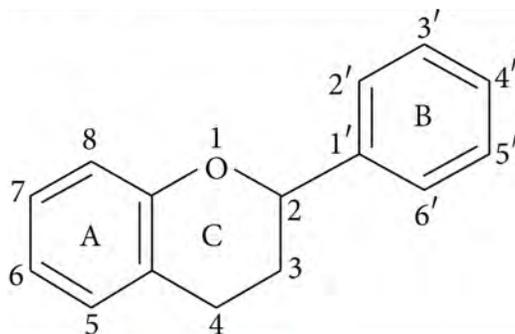


Figura 3. Estructura básica de los flavonoides (118).

Los flavonoides son algunas de las clases de compuestos que han recibido la mayor atención con respecto a sus propiedades antidiabéticas y han surgido como alternativas en enfermedades complejas, como la diabetes, que implica múltiples vías de señalización. Están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y exhiben propiedades farmacológicas distintas (35). Es tal vez porque los flavonoides ejercen un efecto multimodal en diferentes objetivos, atenuando de esta manera varias patologías interrelacionadas de forma concertada (119). También, la ingesta dietética de flavonoides podría llegar a ser importante para tratamientos alternativos contra la diabetes o la reducción del riesgo de la enfermedad (117). Inclusive, se ha reportado que algunos flavonoides tienen propiedades hipoglucemiantes debido a que mejoran el metabolismo alterado de la glucosa y los estados de oxidación de los diabéticos (117). Además, se han realizado estudios para determinar su eficacia en la prevención de la apoptosis de las células β , promoviendo la proliferación de células β y la secreción de insulina (120) mejorando así la actividad de la insulina (117, 121). Se han descrito algunos compuestos que presentan diferentes actividades hipoglucemiantes, las cuales se muestran en el cuadro 2.

Cuadro 2. Actividades biológicas reportadas para algunos flavonoides.

Compuesto	Actividad Hipoglucemiante
Acacetina	Disminuyó los niveles de glucosa en ratones con diabetes inducida con STZ y nicotinamida, ya que inhibe la actividad de la α -glucosidasa y es secretagogo de insulina (122).
Catequina	Actúa como un modulador de la secreción de insulina (117, 123).
Crisina	Inhibe la actividad de α -glucosidasa en ratas diabéticas (124, 125).
Kaempferol	Protege a las células HIT-T15 (células de insuloma de hámster) contra la apoptosis inducida por el estrés oxidativo (126). Además, inhibe la actividad de α -glucosidasa en ratas diabéticas (124, 125).
Luteolina	Inhibe la actividad de α -glucosidasa en ratas diabéticas (124, 125).
Naringenina	Aumenta el transporte de glucosa en las células del músculo esquelético de una manera dependiente de AMPK (119, 127), reduce la absorción de

	<p>glucosa en el intestino de ratas diabéticas (124, 128) y suprime la producción de glucosa hepática en células Fao (línea celular de hepatoma de rata), sugiriendo que este compuesto atenúa la hiperglucemia por inducir efectos similares a la metformina (129).</p>
Naringina	<p>Reduce los niveles de glucosa en sangre, aumenta la concentración de la actividad de la enzima glucoquinasa hepática, aumenta la concentración de glucógeno hepático y aumenta los niveles de insulina en plasma en ratones macho C57BL/KsJ-db/db y ratas diabéticas (35).</p> <p>También redujo la actividad de la Glucosa-6-fosfatasa hepática y de la enzima PEPCCK, además, aumentó significativamente la insulina en plasma y péptido C en ratones diabéticos. Esto sugiere que disminuyen la hiperglucemia, por el aumento de la concentración hepática de la glucólisis y el glucógeno y/o mediante la reducción de la gluconeogénesis hepática (35, 130).</p>
Quercetina	<p>Disminuyó el nivel de glucosa en ratas diabéticas, aumentó la actividad de la glucoquinasa hepática, promovió la regeneración de los islotes pancreáticos y aumentó la liberación de insulina en ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina (35, 131, 132).</p> <p>Protege a la línea celular productora de insulina (INS-1) contra el estrés oxidativo a través de señales antiapoptóticas (133).</p> <p>Hay autores que sugieren que el aumento en el número de islotes pancreáticos en ratas diabéticas tratadas con quercetina, puede ser por un aumento de la replicación del ADN en las células β (119).</p> <p>También se sugiere que en ratas diabéticas (inducidas con STZ y nicotinamida), redujo los niveles de glucosa en sangre por un aumento en la utilización periférica de la glucosa por estimulación directa de la captación de glucosa por el músculo esquelético (quercetina 17.65%, metformina 28%) y la inhibición de la actividad de transporte de glucosa desde el intestino (134).</p>

Los compuestos naturales están atrayendo cada vez más la atención por sus posibles usos en el tratamiento y prevención de la diabetes. Por ello, algunos han

sido probados por sus propiedades antidiabéticas utilizando enfoques tanto *in vivo* como *in vitro*. Algunos de ellos muestran efectos muy prometedores, que indican que la ingesta diaria de compuestos naturales podría ser una estrategia prometedora para la prevención de la diabetes. Además, las terapias basadas en compuestos naturales se consideran en la medicina tradicional como un enfoque para reforzar los tratamientos clínicos utilizados (117).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Tendrá el propóleo de Chihuahua un efecto en la disminución de los niveles de glucosa y estrés oxidativo en un modelo experimental de diabetes?

3. HIPÓTESIS

Si en la composición química del propóleo abundan los flavonoides y si se ha reportado que algunos flavonoides tienen actividad hipoglucemiante y antioxidante, entonces el propóleo de Chihuahua será un buen candidato para controlar la hiperglucemia y estrés oxidativo en un modelo experimental de diabetes.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto hipoglucemiante y antioxidante del propóleo en un modelo experimental de Diabetes.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto del propóleo sobre los niveles de glucosa mediante la prueba de tolerancia a la glucosa.
2. Evaluar el efecto del propóleo sobre los niveles de glucosa en sangre periférica.
3. Determinar el efecto del propóleo sobre los niveles de insulina en suero mediante la técnica de ELISA.
4. Evaluar el efecto del propóleo en los islotes del páncreas por histología e inmunohistoquímica.
5. Determinar la capacidad antioxidante del propóleo y su efecto sobre algunos parámetros del estrés oxidativo (SOD, CAT y GPx) mediante métodos colorimétricos.
6. Caracterizar la composición química del propóleo mediante el Análisis de Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-MS) y Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS).
7. Realizar una cromatografía en columna del propóleo para obtener las fracciones del extracto.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. COLECTA DE MATERIAL

El propóleo utilizado en este proyecto se obtuvo del apiario del Ingeniero Martín Balcorta Baeza ubicado en el estado de Chihuahua (APÉNDICE 1, pág. 79). Se separó y se limpió para eliminar desechos de origen animal y vegetal que pudiera contener.

5.2. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DEL PROPÓLEO

El extracto etanólico del propóleo se obtuvo por maceración a temperatura ambiente. Para esto el propóleo (300 g) se colocó en un matraz con 1 L de etanol al 70%. A continuación, la solución se filtró y luego se destiló a presión reducida en un evaporador rotativo (135). El extracto se colocó en recipientes de vidrio hasta que se evaporó por completo el disolvente. El rendimiento del extracto etanólico del propóleo de Chihuahua (EEPCh) fue de 202.45 g (67.48%).

5.3. INDUCCIÓN DE DIABETES EXPERIMENTAL MEDIANTE ESTREPTOZOTOCINA

Se usaron ratones machos de 7 semanas de edad con fondo genético CD1, a los cuales se les indujo diabetes experimental mediante la administración de una dosis de 130 mg/Kg de estreptozotocina (STZ) por vía intraperitoneal (i.p.), disuelta en buffer de citratos (0.05M) con pH de 4.5. Posteriormente se realizó una punción en la vena caudal para medir la concentración de glucosa por el método enzimático de la glucosa oxidasa utilizando un glucómetro (Accu-Chek active, Roche diagnostics) (6). Se midió la concentración de glucosa sanguínea durante 7 días (después de la administración de STZ), aquellos que presentaron concentraciones de glucosa sanguínea mayores a 250 mg/dL en estado de ayuno fueron considerados animales diabéticos y se incluyeron en los siguientes ensayos (136). Los animales utilizados

en todos los experimentos tuvieron cuidados de acuerdo con las pautas de la Norma Oficial Mexicana de Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999, Ministerio de Agricultura, México), que fueron aprobados por el Comité de Ética Institucional de la Universidad Nacional Autónoma de México - Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

5.4. ESTUDIO DE TOXICIDAD AGUDA

Este procedimiento se realizó de acuerdo con el método de clasificación de toxicidad aguda de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) (137). Se utilizaron ratones machos CD1 (7 semanas de edad), se dividieron en 7 grupos (n=6). Los animales tuvieron libre acceso de agua y de alimento durante todo el experimento, excepto por el corto periodo de ayuno (4 h) antes de la administración oral del propóleo. Las dosis administradas a cada grupo experimental se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 3. Dosis administradas para el ensayo de toxicidad aguda.

Grupos	Concentración
1	Agua potable estéril
2	Vehículo en el cual se disolvió el propóleo (alcohol al 25%)
3	300 mg/kg de propóleo
4	600 mg/kg de propóleo
5	1200 mg/kg de propóleo
6	2400 mg/kg de propóleo
7	5000 mg/kg de propóleo

Los tratamientos se administraron a un volumen de 100 μ L para cada ratón a través de una aguja metálica orogástrica (cánula). La mortalidad, el estado general y la actividad de los ratones se monitoreó cada 30 min. durante las primeras 4 h;

posteriormente cada 2 h durante las siguientes 8 h; y después cada 24 h durante 14 días. También se registró el peso corporal de los ratones se midió antes de la administración del propóleo (día 0) y los días 1, 7 y 14 después de la administración del mismo. En el día 14, los animales se sacrificaron para obtener diferentes órganos incluyendo el corazón, pulmones, riñones, hígado, bazo y estómago; los cuales se pesaron inmediatamente. Además, se obtuvieron muestras de sangre de cada grupo experimental y se procesaron para estudios hematológicos (Conteo total de leucocitos (TLC); Hemoglobina; Hematocrito; Volumen corpuscular medio (MCV); Hemoglobina corpuscular media (MCH); Concentración de hemoglobina corpuscular media y Plaquetas (MCHC)) y bioquímicos (Aspartato aminotransferasa (AST); Alanine aminotransferase (ALT); Fosfatasa alcalina (ALP); Proteínas totales; Creatinina; Nitrógeno ureico en sangre (BUN); Calcio y Fosforo) usando un analizador automatizado de FES-Cuautitlán.

5.5. CURVA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA

Para la prueba de tolerancia a la glucosa se utilizaron 4 grupos experimentales: Grupo 1 (Sanos; S); Grupo 2 (Sanos tratados con Propóleo; S/P); Grupo 3 (Diadéticos; D) y Grupo 4 (Diabéticos tratados con Propóleo; D/P). Después de un ayuno de 4 h (con acceso libre de agua), se les midió la glucosa basal a todos los animales posteriormente, a los grupos de ratones con tratamiento de propóleo (S/P y D/P) se les administró una dosis de 300 mg/Kg del extracto. Transcurrida 1 h, se les administró a todos los grupos experimentales una dosis de glucosa de 2 g/Kg. El volumen de dosificación fue de 100 μ L para cada ratón a través de una aguja metálica orogástrica (cánula). Posteriormente se midieron los niveles de glucosa sanguínea a los 30, 60, 90 y 120 min después de la administración de la carga de glucosa mediante la ayuda de tiras reactivas comerciales (Accu-Chek active, Roche diagnostics).

5.6. DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA SÉRICA EN LA ADMINISTRACIÓN DE PROPÓLEO DURANTE 15 DÍAS

Una vez que los ratones a los que se les administró STZ fueron considerados diabéticos, se inició con la administración de propóleo; a partir de este momento, el seguimiento de todos los grupos tuvo una duración de 15 días y se sacrificaron. El diseño experimental comprendió 5 grupos (n= 6):

- Grupo “S”: Sanos (vehículo: 100 μ L de etanol al 25%).
- Grupo “S/P”: Sanos tratados con propóleo (300 mg/Kg/día de propóleo en ayuno) (36).
- Grupo “D”: Diabéticos (vehículo: 100 μ L de etanol al 25%).
- Grupo “D/P”: Diabéticos tratados con propóleo (300 mg/Kg/día de propóleo en ayuno) (36).
- Grupo “D/I”: Diabéticos tratados con Insulina (inyección i.p. 5 UI/Kg/día; Humulin) (36).

Se determinaron las concentraciones de glucosa sanguínea en los diferentes grupos experimentales cada tercer día como se describe en el apartado 5.3 del presente estudio. Durante los días del tratamiento, a los animales se les permitió libre acceso de alimento y agua, se mantuvieron en las condiciones óptimas de temperatura ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$), humedad relativa ($55\% \pm 5$) y período de luz (12 h luz/12 h oscuridad) (36, 62, 138).

5.7. DETECCIÓN DE INSULINA EN SUERO POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE ELISA

Al finalizar los 15 días de tratamiento, los animales fueron sacrificados y se obtuvieron muestras de sangre de cada grupo experimental por punción cardíaca. La sangre se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente para obtener el suero, el cual se almacenó a -70°C hasta su uso. Para la determinación de las concentraciones de insulina se utilizó un KIT de ELISA (EMD Millipore,

RAT/MOUSE INSULIN ELISA KIT) bajo el siguiente procedimiento. En las placas de 96 pozos de polivinilo pretituladas (recubiertas) con el anticuerpo específico para la insulina, se pusieron 10 µL de los estándares, controles y muestras junto con 80 µL de buffer conjugado. La placa se agitó de 400 a 500 rpm durante 2 h a temperatura ambiente y después se lavó tres veces con buffer. Se añadieron 100 µL de solución enzimática a cada pozo y se volvió a agitar en las mismas condiciones durante 30 min. La placa se lavó nuevamente tres veces con buffer. Luego se añadieron 100 µL de sustrato de 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) a cada pozo y se agitó de nuevo de 5 a 20 min. finalmente, las placas se midieron a 450 nm de absorbancia.

5.8. OBTENCIÓN DEL PÁNCREAS PARA LA TÉCNICA DE HISTOLOGÍA, INMUNOHISTOQUÍMICA Y DETECCIÓN ENZIMÁTICA

Se usaron dos lotes de ratones (cada uno con los grupos S, S/D, D y D/P, con el mismo esquema de tratamiento del apartado 5.6), uno para histología e inmunohistoquímica y otro para obtener los homogeneizados del tejido pancreático. Después de 15 días de tratamiento el páncreas se obtuvo realizando una incisión en el abdomen, posteriormente se levantó el hígado hasta observar el conducto biliar a través del cual se inyectó 1 mL de Fijador de Bouin (para Histología e Inmunohistoquímica) o 1 mL de PBS (para la detección enzimática), finalmente el tejido fue cortado cuidadosamente separandolo de los órganos a los que se encontraba adherido (139, 140).

5.8.1. TÉCNICA DE HISTOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA

El análisis histológico se realizó con los 4 grupos mencionados previamente. Las muestras fueron fijadas por 24 h en frascos individuales con 30 mL de fijador de Bouin a 4 °C. Después se realizó la técnica histológica de rutina, deshidratando el tejido con un gradiente de alcohol graduado y, finalmente, se incluyeron en parafina

(Paraplast). Cada páncreas se cortó a 5 micras de espesor en un microtomo rotatorio (Leica, RM2125RT, Alemania), después se realizó una tinción con hematoxilina y eosina (H&E) para observar los cambios histopatológicos (APÉNDICE 2, pág. 80). Los cortes teñidos se examinaron con un microscopio de luz (Motic, BA310E, Europa) a un aumento de 10X. Posteriormente para realizar la técnica de Inminohistoquímica se realizaron otros cortes de cada páncreas a 4 micras de espesor, después se realizó la técnica de inmunohistoquímica para observar los islotes de cada grupo experimental (APÉNDICE 3, pág. 84). Las preparaciones se examinaron con un microscopio de luz (Motic, BA310E, Europa) a un aumento de 40X (139, 141-143).

5.8.2. PARÁMETROS DEL ESTRÉS OXIDATIVO (enzimas antioxidantes SOD, CAT Y GPx)

Después de obtener el páncreas de los 4 grupos mencionados previamente, se pesó de 100 a 300 mg de tejido (desde este punto todas las etapas se realizaron a 4 °C) el cual se colocó en un tubo de microcentrífuga y se añadieron perlas de óxido de zirconio de 0.5 mm de diámetro (un volumen igual a la masa del tejido), a esto se añadió 2 volúmenes de Buffer (PBS con inhibidor de proteasas -Complete Mini, Roche Diagnostics-). Los tubos se colocaron un homogeneizador (Bullet Blender Next Advanced) y se realizó el protocolo del distribuidor. El homogeneizado se centrifugó a 5,000 rpm durante 10 min (62, 144); el sobrenadante se recuperó y se almacenó a -70 °C hasta utilizarlo para la determinación de la SOD, CAT y GPx siguiendo las especificaciones del KIT Superoxide Dismutase Assay (APENDICE 4, pág. 88), del KIT Catalase Assay (APENDICE 5, pág. 89) y del KIT Glutathione Peroxidase Assay (APENDICE 6, pág. 90) (Cayman Chemical Company), respectivamente.

5.9. CONTENIDO DE FENOLES TOTALES DEL PROPÓLEO

Este parametro se midió por espectrofotometría con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu (APÉNDICE 7, pág. 91). Se preparó una solución metanólica de propoleo (0.2 mg/mL) de la cual se tomaron 250 μ L y se mezcló con 7750 μ L de agua destilada y 500 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu. Después de 5 min se añadió 1.5 mL de una solución de carbonato de sodio al 20%. La mezcla de reacción se dejó reposar en oscuridad (a temperatura ambiente) durante 2 h; la muestra se realizó por triplicado y se registró la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro (XP2001 XPLOERER). El contenido de fenoles totales se estimó usando una curva de calibración con ácido gálico y se expresó como miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (mg de eqAG/g de extracto).

5.10. CONTENIDO DE FLAVONOIDES TOTALES DEL PROPÓLEO

El contenido de flavonoides totales del extracto de propóleo se estimó por un método colorimétrico basado en la formación del complejo de cloruro de aluminio ($AlCl_3$) como se ha descrito previamente (145) (APENDICE 8, pág. 93). Por triplicado, de una solución de extracto de propóleo con metanol (0.2 mg/mL) se tomaron 3 mL y se añadieron 3 mL de $AlCl_3$ al 2%, esta mezcla se dejó reposar durante 10 min en oscuridad a temperatura ambiente. La absorbancia se registro a 405 nm en un lector de ELISA (Bio-Tek, EL800, USA.) y el contenido de flavonoides totales se expresó como miligramos de equivalentes de quercetina por gramo de extracto (mg de eqQ/g de extracto).

5.11. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL PROPÓLEO

Para determinar la capacidad antioxidante media (CA_{50}) del propóleo utilizó método de reducción del radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH), método modificado de Franco, 2006 (146) (APÉNDICE 9, pág. 95). En una placa de ELISA se adicionaron

100 μL de la solución problema a diferentes concentraciones (1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por triplicado, posteriormente a cada pozo con las concentraciones señaladas, se adicionaron 100 μL de una solución metanólica de DPPH (100 μM); se protegió de la luz y se mantuvo en agitación constante durante 30 min a 37 °C. Posteriormente se registró la absorbancia a 540 nm en un lector de ELISA (Bio-Tek, EL800, USA). La concentración correspondiente a la CA_{50} se determinó por interpolación.

5.12. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL PROPÓLEO

5.12.1. Análisis por Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-MS)

El análisis HPLC-MS se realizó usando un Agilent 1200 Infinity LC acoplado a un Agilent 6230 TOF con Agilent Dual ESI Source (ESI SG14289023) y Mass Hunter Workstation Software, Versión B.05.01, Build 5.01.5125.3 funcionando en el modo de ionización negativa. Voltaje capilar 4000 V; temperatura del gas seco 250 °C; se usó nitrógeno como gas seco a un caudal de 6 L/min; presión del nebulizador 60 psi; fragmentador 200 V; Intervalo de EM 50-1300 m/z; Velocidad de adquisición de MS 1 espectros/s.

La separación cromatográfica se realizó usando un HPLC (Infinity Series 1200, Agilent Technologies, Alemania) equipado con una columna Kinetex 2.6 μ , C1800A (150x2.1 mm) (Phenomenex, EE. UU.). La temperatura de la columna se mantuvo a 25 °C. Se usó el siguiente programa de gradiente, junto con una fase móvil que consta de agua: acetonitrilo (90:10) con ácido fórmico al 0,1% (disolvente A) y metanol: acetonitrilo (90:10) con ácido fórmico al 0,1% (disolvente B). Este término inicial durante 3 min en una elución isocrática que se compone con 100% de solvente A; seguido por 3-11 min: 65% A-35% B; 11-20 min: 55% A-45% B; 20-35 min: 100% B; y 25 min: 100% B, v/v. La velocidad de flujo fue de 0.2 mL/min, y el volumen de inyección fue de 20 μL (3 mg/mL).

5.12.2. Análisis por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS)

Además, se llevó a cabo un análisis GC-MS, se inyectó 1 μ L del extracto de propóleo con una concentración de 3 mg/mL al equipo. Se empleó un cromatógrafo 6850 Network GC System de Agilent Technologies acoplado a un espectrómetro de masas 5975C VL MSD con detector de triple eje, de la misma marca, equipado con una columna capilar RTX de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μ m de grosor, compuesta de dimetil polisiloxano (95%) y fenil polisiloxano (5%). El modo de inyección utilizado fue un Split, radio 80:1, flujo de corrida 37 cm/seg. La temperatura del horno se programó de la siguiente forma: temperatura inicial de 70 °C durante dos min tras lo cual se incrementó a 8 °C/min hasta alcanzar los 270 °C y después a 10 °C/min durante seis min. El tiempo total fue de 30 min; temperatura de la línea de transferencia 290 °C. Los espectros de masas que fueron obtenidos por impacto electrónico; se obtuvieron con una energía de ionización de 70 electrón Volts (eV) y se detectaron en un rango de masa desde 35 a 600 m/z. Se empleó helio como gas de arrastre. La identificación de los compuestos se llevó a cabo por medio de la base de datos de la biblioteca NIST y la PubMed Compound del Nacional Center of Biotechnology Information (NCBI).

5.13. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA DEL PROPÓLEO

Se llevó a cabo una cromatografía en columna abierta del extracto del propóleo de Chihuahua, para ello, se pesaron 10 g de propóleo y se colocaron en la columna. Las alícuotas que se obtuvieron fueron de un volumen de 100 mL. Además, se realizaron cromatografías en capa fina de cada una de las fracciones obtenidas en la cromatografía en columna, con la finalidad de agrupar las fracciones similares. Posteriormente, cada una de las fracciones obtenidas se analizaron mediante HPLC y GC-MS para identificar los compuestos presentes en cada una de ellas. Por último, a cada fracción se le realizó la prueba de capacidad antioxidante (APÉNDICE 10, pág. 97).

5.14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos sobre actividad hipoglucmiante, peso corporal, detección de insulina y actividad de las enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GPx) se expresaron como medias \pm SD. Las diferencias estadísticas entre los tratamientos y los controles se probaron mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) utilizando el software de análisis estadístico GraphPad-Prism (versión 6.0), seguido de una prueba post hoc de Student Newman-Keuls. Una diferencia en los valores medios de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativa.

6. RESULTADOS

6.1. Estudio de toxicidad aguda

El estudio de toxicidad aguda demostró que ninguna de las dosis probadas de propóleo en administración única (300, 600, 1200, 2400 o 5000 mg/Kg) alteró la condición general de los animales, ni su peso corporal en comparación con los animales del grupo control en los días 1, 7 y 14 después de su administración. Además, no se registró mortalidad en ninguno de los grupos tratados dentro de las primeras 24 h después de su administración. Tampoco el peso de los órganos (corazón, pulmones, riñones, hígado, bazo y estómago) obtenidos al día 14 mostraron diferencias significativas en comparación con los del grupo control (Cuadro 4).

Por otro lado, ni en la evaluación hematológica ni en el análisis bioquímico de los ratones administrados con propóleo se observaron diferencias significativas en comparación con los valores de los animales control (Cuadro 5). Estos resultados sugieren que el propóleo no es tóxico, de acuerdo con el método de clasificación tóxica aguda reportado en la OECD, norma #423, el propóleo es considerado como GHS (Globally Harmonised Classification System -Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación-), es decir, no se encontró clasificación tóxica porque presentó una $DL_{50} > 5000$ mg/kg.

Cuadro 4. Peso corporal de los ratones y peso de los órganos después de la administración de la única dosis oral de propóleo a diferentes concentraciones (300, 600, 1200, 24000 y 5000 mg/Kg).

Concentración (mg/Kg)	Mortalidad	Signos de toxicidad	Sobrevida (%)	Peso corporal (g)				Peso de los órganos al día 14 (g)					
				Día 0	Día 1	Día 7	Día 14	Corazón	Pulmones	Riñones	Bazo	Hígado	Estómago
Control	0/3	0/3	100	32.33±1.52	32.33±1.04	35±1.41	38.83±1.75	0.170±0.01	0.231±0.02	0.532±0.02	0.135±0.01	1.924±0.01	0.308±0.008
Vehículo (OH-25%)	0/3	0/3	100	31.67±1.39	31.6±0.9	34.4±1.9	37.3±1.3	0.173±0.07	0.220±0.62	0.563±0.04	0.124±0.03	1.846±0.32	0.329±0.1
300	0/3	0/3	100	32.17±1.72	32.86±1.21	35.7±1.5	38.26±0.95	0.172±0.06	0.219±0.36	0.548±0.077	0.118±0.004	1.821±0.13	0.346±0.04
600	0/3	0/3	100	31.13±0.98	31.46±0.57	34.4±1.02	37.9±1.22	0.175±0.39	0.233±0.05	0.495±0.035	0.117±0.006	1.912±0.16	0.317±0.05
1200	0/3	0/3	100	33.67±1.16	33.76±1.43	36.89±1.34	39.9±0.46	0.167±0.95	0.227±0.24	0.576±0.08	0.134±0.02	1.860±0.24	0.343±0.03
2400	0/3	0/3	100	31.63±0.85	32±0.91	36.17±1.75	38.75±0.95	0.173±0.006	0.248±0.04	0.573±0.005	0.127±0.005	1.858±0.10	0.333±0.02
5000	0/3	0/3	100	33.17±1.04	33.33±1.04	36.33±0.57	38.33±1.52	0.161±0.002	0.217±0.01	0.489±0.02	0.112±0.008	1.837±0.07	0.355±0.02

Los valores se expresan como media ± S.D., n = 6.

Cuadro 5. Evaluación hematológica y análisis bioquímico de los ratones después de la administración de la única dosis oral de propóleo a diferentes concentraciones (300, 600, 1200, 24000 y 5000 mg/Kg).

Parámetros hematológicos	Valores normales	Unidades	Grupos experimentales						
			Control	Vehículo (OH-25%)	Concentraciones de propóleo (mg/Kg)				
					300	600	1200	2400	5000
TLC	3-14.2	1x10 ³ células/ μ L	10.46 \pm 3.57	8.86 \pm 1.21	9.1 \pm 0.17	11.9 \pm 0.5	10.5 \pm 0.6	8 \pm 1.41	9.83 \pm 0.75
Hemoglobina	10.9-16.3	g/dL	11.2 \pm 0.85	12.4 \pm 1.02	13.33 \pm 0.52	11.33 \pm 1.04	10.63 \pm 0.85	12 \pm 0.91	11.17 \pm 1.05
Hematocrito	38.5-45.1	%	39.7 \pm 0.5	41.3 \pm 1.06	43.75 \pm 0.95	39.33 \pm 0.57	40.33 \pm 1.04	42.33 \pm 1.52	40.17 \pm 1.04
MCV	48-56	fL (1x10 ⁻¹⁵ /L)	51.7 \pm 2.7	53.6 \pm 1.9	49.3 \pm 1.04	53.2 \pm 1.02	52.8 \pm 1.07	49.5 \pm 0.5	50 \pm 1.08
MCH	11.9-19	pg	13.8 \pm 0.78	16.3 \pm 1.3					
MCHC	25.9-35.1	g/dL	30.9 \pm 0.46	31.4 \pm 0.72	31.7 \pm 0.55	29.43 \pm 0.63	30.5 \pm 0.78	28.3 \pm 0.92	31.16 \pm 0.95
Plaquetas	1084-1992	1x10 ³ plaquetas/ μ L	1530.3 \pm 15.07	1270 \pm 17.69	1380.3 \pm 19	1460 \pm 8.46	1370.5 \pm 8.2	1510.7 \pm 10.8	1470.5 \pm 19.2
Parámetros bioquímicos									
AST	69-191	U/L	80.89 \pm 2.34	85.26 \pm 6.95	83.7 \pm 4.07	85.8 \pm 3.10	86 \pm 5.24	82.1 \pm 2.13	84.6 \pm 3.32
ALT	26-120	U/L	31.4 \pm 2.9	42.3 \pm 0.78					
ALP	44-118	U/L	49.46 \pm 0.43	51.4 \pm 0.9	53 \pm 1.05	48.9 \pm 2.02	50.3 \pm 1.8	49.2 \pm 1.1	54.6 \pm 2.04
Proteínas totales	43-64	g/dL	45.46 \pm 0.43	46.4 \pm 0.9	49.91 \pm 0.16	44.24 \pm 0.81	48.31 \pm 0.42	45.19 \pm 0.36	47.20 \pm 0.62
Creatinina	0.5-0.8	mg/dL	0.67 \pm 0.16	0.7 \pm 0.16	0.61 \pm 0.13	0.78 \pm 0.04	0.59 \pm 0.06	0.74 \pm 0.12	0.67 \pm 0.15
BUN	19-34	mg/dL	24.13 \pm 2.98	22.17 \pm 1.72	23.3 \pm 1.05	22.7 \pm 2.24	24.8 \pm 1.04	21.7 \pm 1.01	23.5 \pm 2.01
Calcio	9-12	mmol/L	10.9 \pm 0.22	10.22 \pm 0.78	11.3 \pm 0.66	11.6 \pm 0.52	10.7 \pm 0.39	11.2 \pm 0.46	10 \pm 0.7
Fosforo	6-13	mmol/L	7.42 \pm 0.18	8.67 \pm 0.39	10.21 \pm 0.36	11.2 \pm 0.28	9.12 \pm 0.16	10.02 \pm 0.62	8.37 \pm 0.22

Los valores se expresan como media \pm S.D., n = 6. TLC: Conteo total de leucocitos; MCV: Volumen corpuscular medio; MCH: Hemoglobina corpuscular media; MCHC: Concentración de hemoglobina corpuscular media; AST: Aspartato aminotransferasa; ALT: Alanine aminotransferase; ALP: Fosfatasa alcalina; BUN: Nitrógeno ureico en sangre.

6.2. Efecto de la administración única del propóleo (300 mg/Kg) sobre las concentraciones de glucosa sanguínea en la prueba de tolerancia a la glucosa

En primera instancia se realizó una curva de tolerancia a la glucosa para observar si el propóleo de Chihuahua tiene un efecto en los niveles de glucosa de ratones diabéticos. Los resultados obtenidos de este ensayo se expresaron en mg/dL.

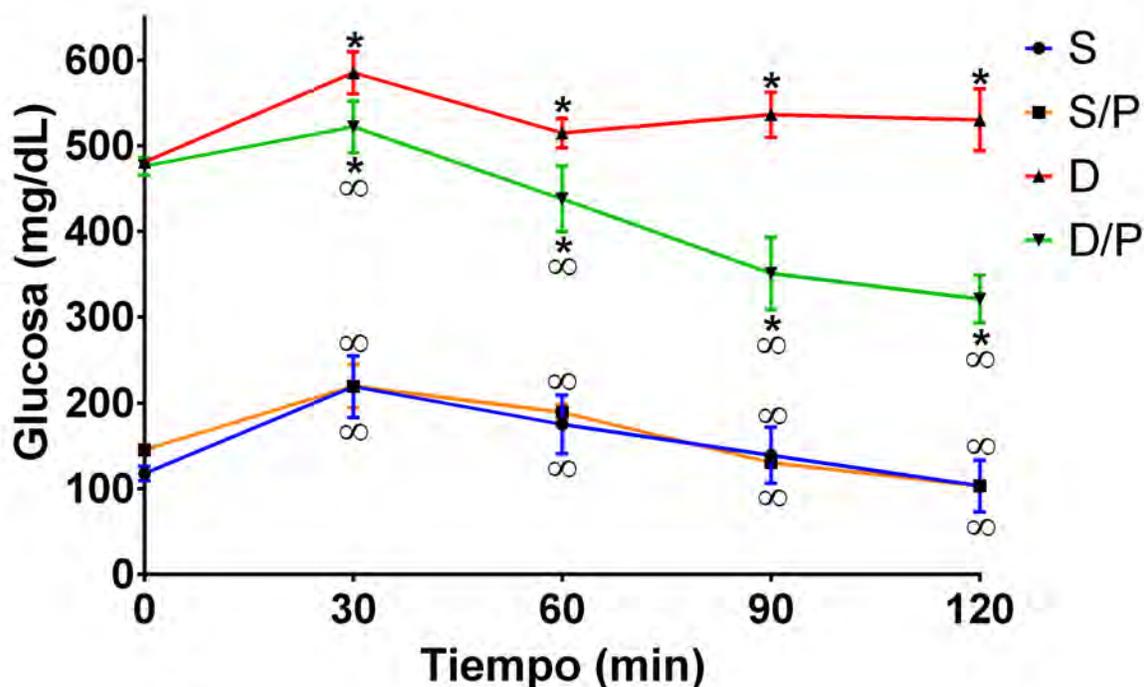


Figura 4. Curva de tolerancia a la glucosa del propóleo.

* diferencias significativas con S ($p < 0.001$).

∞ diferencias significativas con D ($p < 0.001$).

Análisis de ANOVA seguida de una prueba post hoc de Student Newman-Keuls.

Los ratones sanos (S) y sanos con propóleo (S/P) mostraron una curva de tolerancia a la glucosa normal, con valores de 115 mg/dL de glucosa sérica a los 120 min; mientras que, los ratones diabéticos (D) mostraron un incremento significativo de las concentraciones de glucosa sérica en comparación con los animales sanos (S). Por otro lado, la administración del propóleo indujo una disminución significativa de las concentraciones de glucosa sérica desde los 30 y hasta los 120 min en animales diabéticos (D/P) (Fig. 4).

6.3. Efecto de la administración del propóleo durante 15 días sobre las concentraciones de glucosa sérica

Una vez que se observó que los ratones diabéticos tratados con propóleo (D/P) presentaban una reducción considerable de los niveles de glucosa, se determinaron los niveles de glucosa en sangre administrando el propóleo durante dos semanas. Los resultados obtenidos de este ensayo se expresaron en mg/dL.

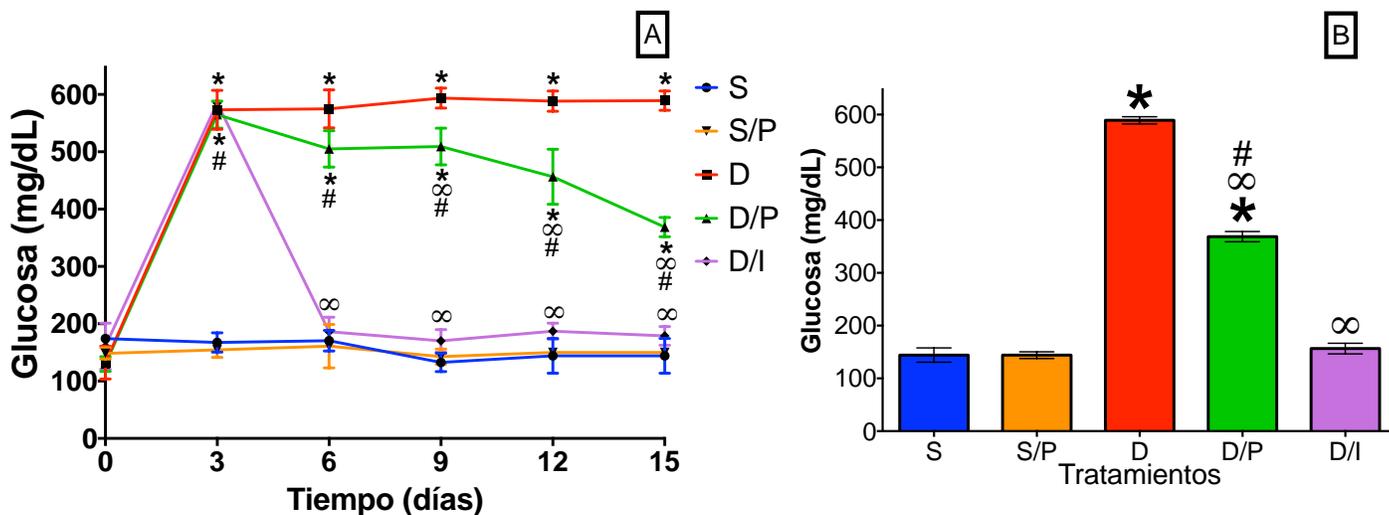


Figura 5. (A) Efecto del propóleo sobre las concentraciones de glucosa en sangre a partir del día 1 de su administración y hasta el día 15. (B) Efecto del propóleo sobre las concentraciones de glucosa en sangre en el día 15.

* diferencias significativas con S ($p < 0.001$).

∞ diferencias significativas con D ($p < 0.001$).

diferencias significativas con D/I ($p < 0.001$).

Análisis de ANOVA seguida de una prueba post hoc de Student Newman-Keuls.

Los ratones diabéticos (D) mostraron concentraciones de glucosa sanguínea de alrededor de 600 mg/dL durante todo el tiempo de evaluación, y la administración de propóleo (D/P, 300 mg/Kg/día durante 15 días) disminuyó significativamente estas concentraciones en animales diabéticos a partir del día 9 y hasta el día 15, donde se alcanzó una concentración de glucosa de 350 mg/dL. Por otro lado, los ratones sanos (S) mantuvieron las concentraciones de glucosa sérica por debajo de los 200 mg/dL durante todo el tiempo de evaluación, y estas concentraciones no fueron alteradas en los animales con tratamiento de propóleo (S/P). Finalmente, los animales diabético tratados con insulina (D/I, 5 UI/Kg/día), nuestro control positivo,

mostraron una disminución significativa de las concentraciones de glucosa desde el día 6 y hasta el día 15; pero en este caso, este grupo alcanzó concentraciones de glucosa similares a las del grupo sano (Fig. 5A y 5B).

6.3.1. Efecto de la administración del propóleo durante 15 días sobre el peso corporal

También se determinó la pérdida de peso en cada uno de los grupos experimentales. Los ratones se pesaron cada tercer día y los resultados obtenidos se expresaron en gramos (g).

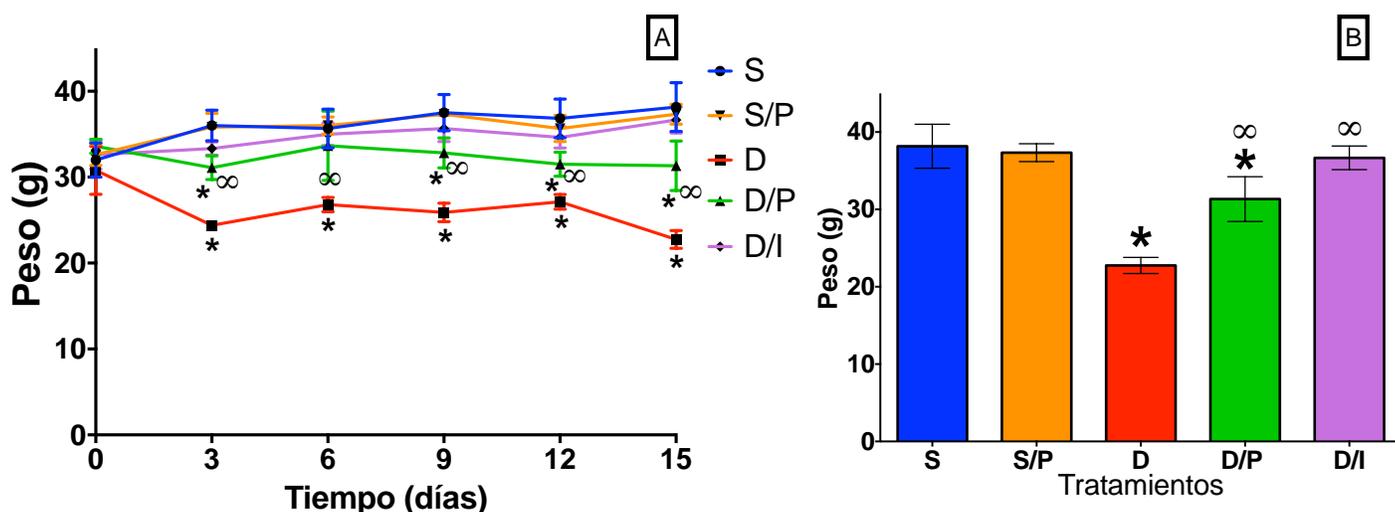


Figura 6. (A) Efecto del propóleo sobre el peso corporal a partir del día 1 y hasta el día 15. (B) Efecto del propóleo sobre el peso corporal en el día 15.

* diferencias significativas con S ($p < 0.05$).

∞ diferencias significativas con D ($p < 0.05$).

Análisis de ANOVA seguida de una prueba post hoc de Student Newman-Keuls.

Con relación al registro de peso de los mismos grupos experimentales los resultados muestran que el tratamiento con propóleo evitó la pérdida de peso registrada en animales diabéticos, a los 3, 6, 9, 12 y 15 días; de la misma manera que lo hizo el tratamiento con insulina (D/I). Por otro lado, el propóleo tampoco alteró el peso de los animales sanos (S/P) durante el tiempo de registro (Fig. 6A y 6B).

6.4. Efecto de la administración del propóleo durante 15 días sobre las concentraciones de insulina en sangre

Ya que se encontró una disminución en los niveles de glucosa en sangre se procedió a determinar los niveles de insulina a los grupos experimentales. Se realizaron las mediciones al final del tratamiento (día 15), los resultados obtenidos se expresan en ng/mL.

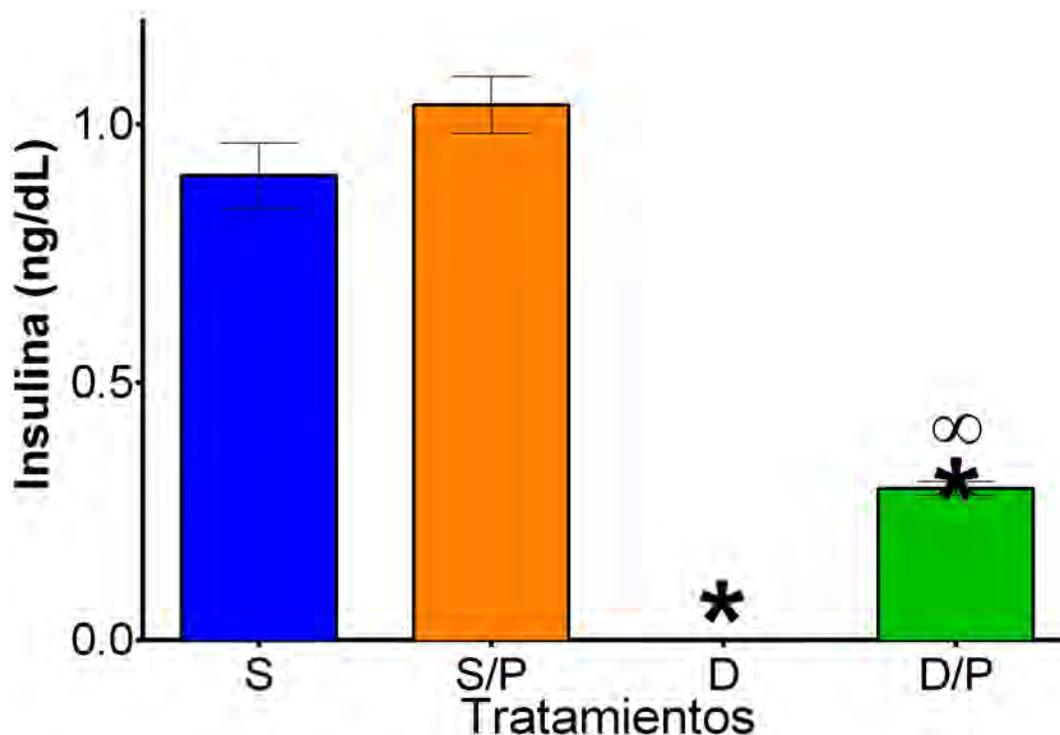


Figura 7. Detección de los niveles de insulina en sangre al final del tratamiento.

* diferencias significativas con S ($p < 0.001$).

∞ diferencias significativas con D ($p < 0.001$).

Análisis de ANOVA seguida de una prueba post hoc de Student Newman-Keuls.

Al final del tratamiento (15 días), el propóleo no alteró las concentraciones de insulina en animales sanos (S/P: 1.03 ng/mL). Por otro lado, en los animales diabéticos sin tratamiento (D) no se lograron detectar concentraciones séricas de insulina; mientras que, en animales diabéticos con el tratamiento de propóleo se detectaron concentraciones de insulina de 0.3 ng/mL (Fig. 7).

6.5. Efecto de la administración del propóleo durante 15 días sobre los islotes de langerhans del páncreas.

6.5.1. Histología

Al encontrar que en los ratones tratados con propóleo sigue habiendo producción de insulina, se decidió observar cómo se encontraban los islotes de páncreas por medio de la técnica histológica. En este ensayo se encontró que la administración de propóleo (300 mg/Kg/día) durante 15 días no alteró el tamaño de los islotes de Langerhans en los animales sanos (S/P); mientras que, en los animales diabéticos, los islotes de Langerhans disminuyeron significativamente con relación a los animales sanos. Por otro lado, el tratamiento con el propóleo en animales diabéticos (D/P) evitó la disminución del tamaño de los islotes de Langerhans del páncreas (Fig. 8).

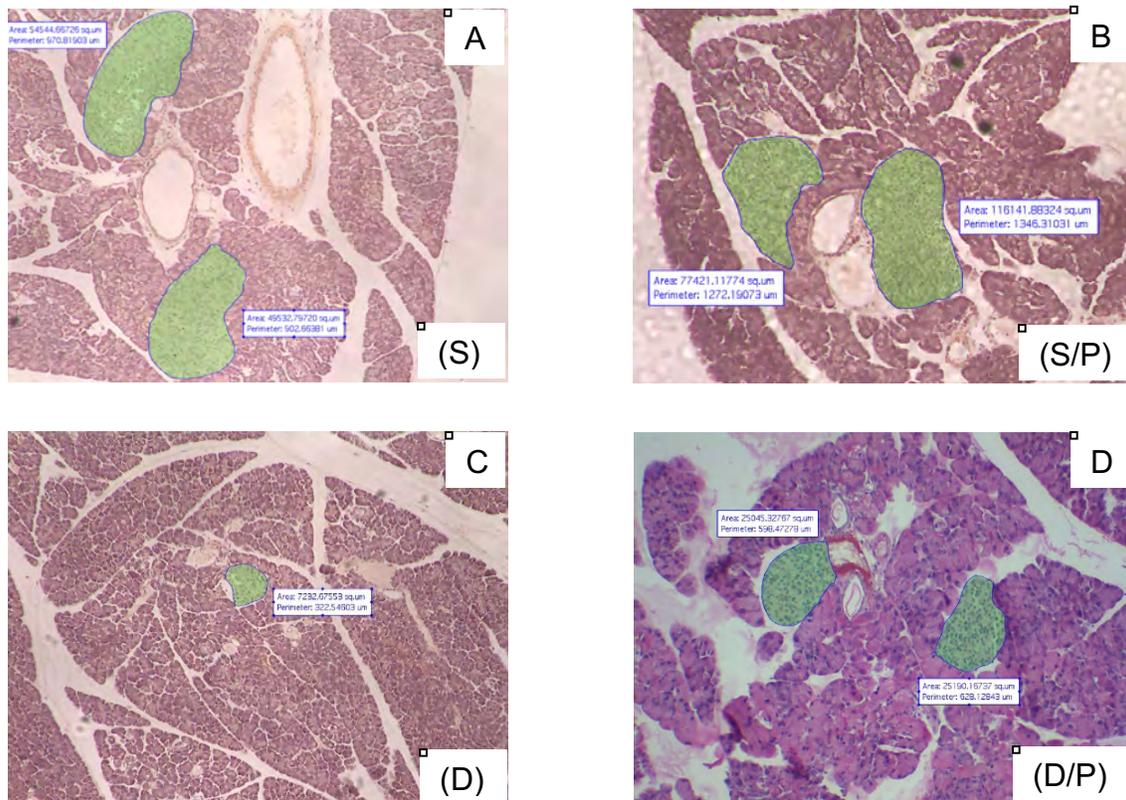


Figura 8. Microfotografías (10X) de páncreas de los diferentes grupos experimentales, tinción de Hematoxilina y Eosina.

6.5.2. Inmunohistoquímica

Después de observar que la administración oral de propóleo muestra diferencias en el tamaño de los islotes, se decidió realizar la técnica de inmunohistoquímica para saber si los islotes encontrados todavía eran productores de insulina. El estudio demostró que en los islotes de Langerhans de animales sanos existe una producción basal de insulina y esta producción no fue alterada por la administración de propóleo (S/P); mientras que, en los animales diabéticos (D) no se detectó producción de insulina. Por otro lado, el tratamiento con el propóleo en animales diabéticos (D/P) mostró una producción de insulina en los islotes de Langerhans que no se observó en los animales diabéticos sin tratamiento (Fig. 9).

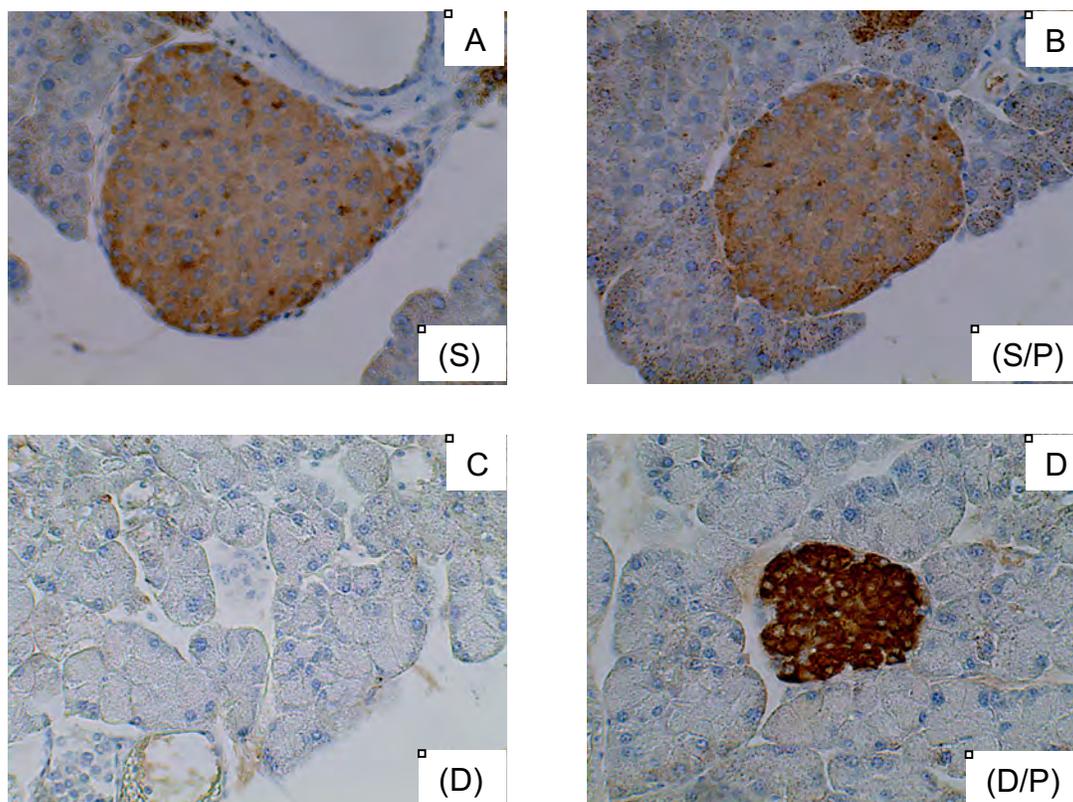


Figura 9. Microfotografías (40X) de páncreas de los diferentes grupos experimentales, inmunohistoquímica.

6.6. Efecto de la administración del propóleo durante 15 días sobre algunos parámetros del estrés oxidativo (SOD, CAT y GPx)

Como se ha mencionado con anterioridad, en condiciones de hiperglucemia crónica en la diabetes, se ha reportado que existe estrés oxidativo, debido principalmente a la autoxidación de la glucosa que genera una liberación de radicales libres. Debido a lo mencionado se determinó la actividad antioxidante de las enzimas SOD, CAT y GPx en homogeneizados de páncreas al final del tratamiento.

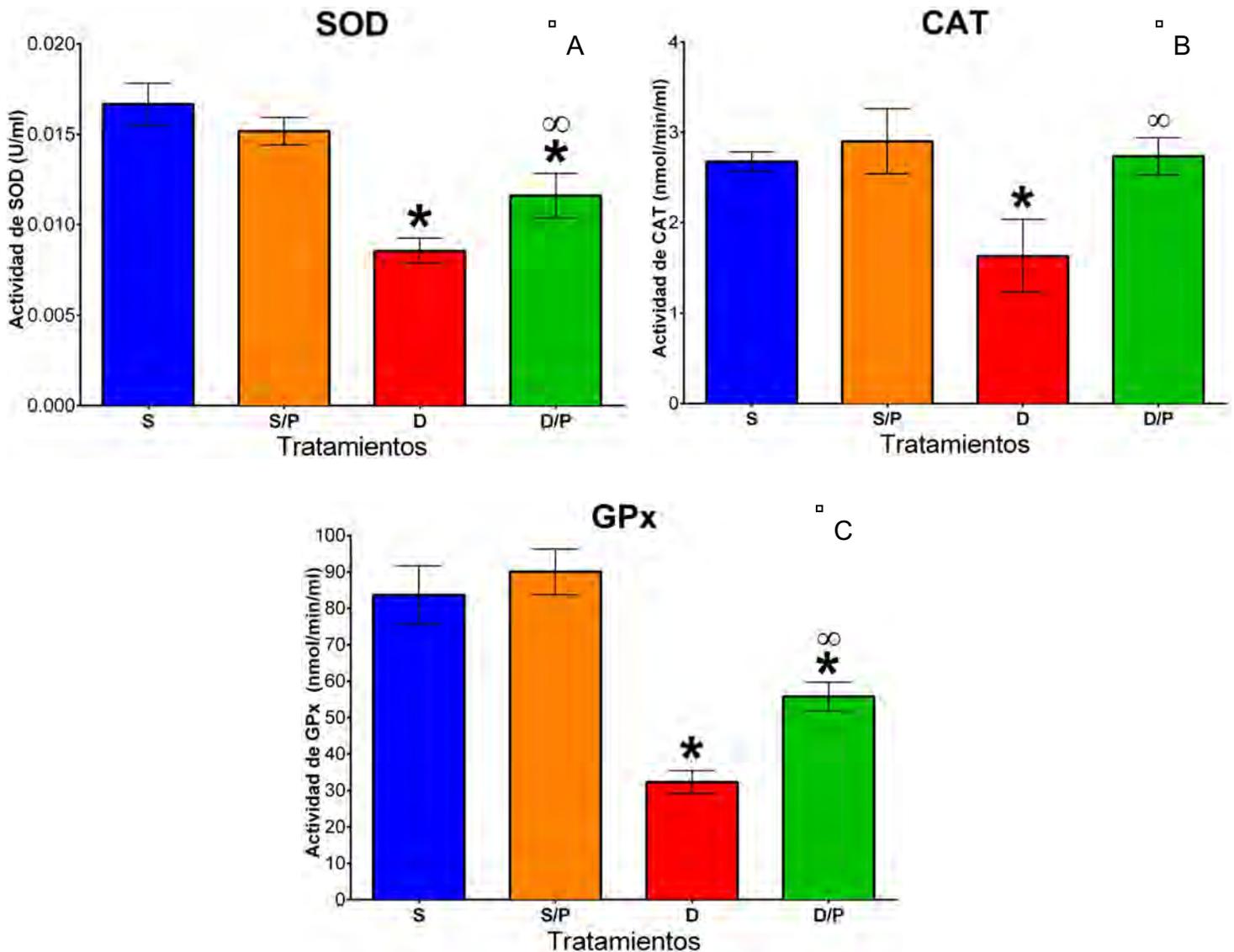


Figura 10. Efecto del propóleo sobre la actividad de las enzimas SOD, CAT y GPx.

* diferencias significativas con S ($p < 0.05$).

∞ diferencias significativas con D ($p < 0.05$).

Análisis de ANOVA seguida de una prueba post hoc de Student Newman-Keuls.

Como se puede observar en la figura 10-A, 10-B y 10-C, la actividad de estas tres enzimas se ve disminuida en los ratones diabéticos, mientras que hay un aumento significativo en los ratones diabéticos tratados con propóleo.

6.7. Contenido de fenoles totales en el propóleo

De acuerdo con la literatura, los fenoles son los principales compuestos responsables de la actividad antioxidante, además, durante el metabolismo de la estreptozotocina se producen una gran variedad de intermediarios tóxicos, entre los que se encuentran agentes alquilantes como los radicales metilo, así como especies reactivas de oxígeno, además de esto la estreptozotocina libera óxido nítrico (NO). Por esta razón se determinó el contenido fenólico total del propóleo Chihuahua por el método de Folin-Ciocalteu. El contenido de fenoles totales del propóleo de Chihuahua fue de 314 mg de eqAG/g de extracto, esta concentración se determinó calculando gráficamente a partir de la curva patrón de ácido gálico.

6.8. Contenido de flavonoides totales en el propóleo

El contenido de flavonoides totales del propóleo se determinó por medio del método de cloruro de aluminio. El contenido de flavonoides se reportó como miligramos de equivalentes de quercetina por gramo de extracto (mg eqQ/g de extracto) calculados gráficamente a partir de la curva patrón de quercetina, observándose que el propóleo de Chihuahua presentó 6.25 mg eqQ/g de extracto.

6.9. Determinación de la capacidad antioxidante del propóleo

Se evaluó la capacidad antioxidante del propóleo de Chihuahua por la técnica de DPPH, en donde el extracto mostró una CA_{50} de 15.75 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 11), mientras que la quercetina, que es un compuesto puro, mostró una CA_{50} de 1.89 $\mu\text{g/mL}$. La

concentración que conduce a un 50% de la capacidad antioxidante (CA_{50}) se determinó gráficamente.

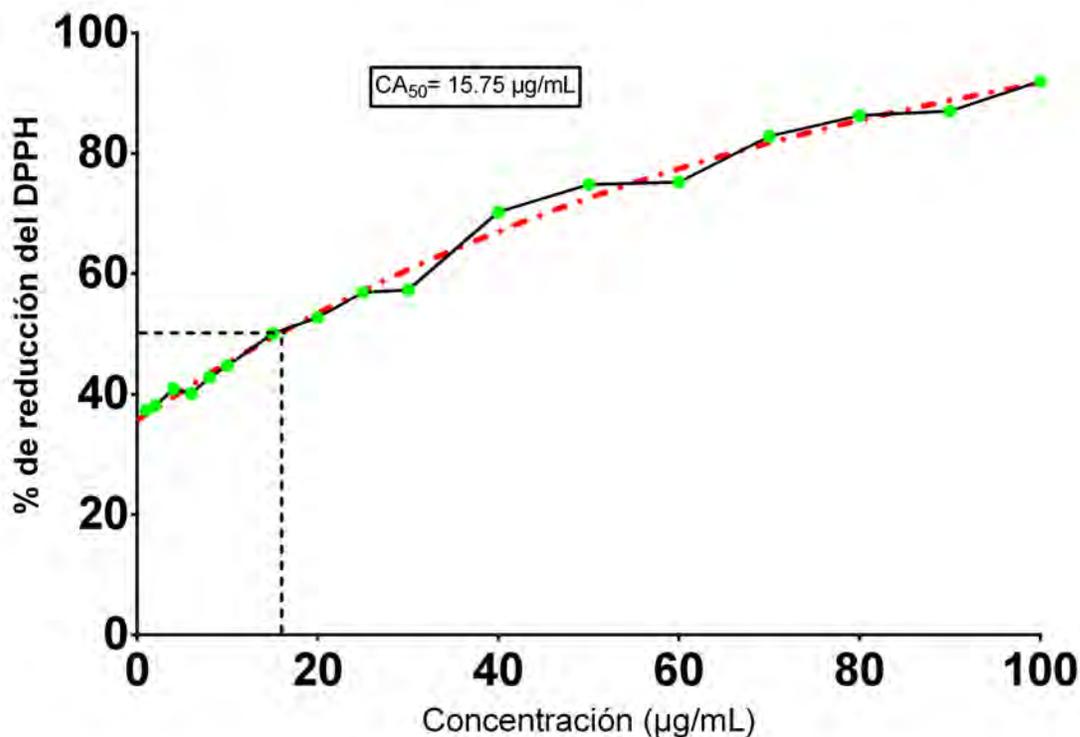


Figura 11. Capacidad antioxidante del propóleo de Chihuahua.

Como se muestra en esta figura el propóleo tiene una capacidad antioxidante (CA_{50}) de 15.75 $\mu\text{g/mL}$. Al-Fatimi (147), refieren que las concentraciones por debajo de 96.6 $\mu\text{g/mL}$ para los extractos se consideran con capacidad antioxidante adecuada.

6.10. Caracterización de la composición química del propóleo

6.10.1. Análisis de Cromatografía Líquida acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS)

El cromatograma del extracto que fue obtenido mediante el análisis por medio de HPLC-MS se muestra en la Figura 12. Así mismo, se pudieron identificar compuestos como pinocembrina, quercetina, naringina, naringenina, kaempferol, acetina, luteolina y crisina los cuales se muestran en el cuadro 6.

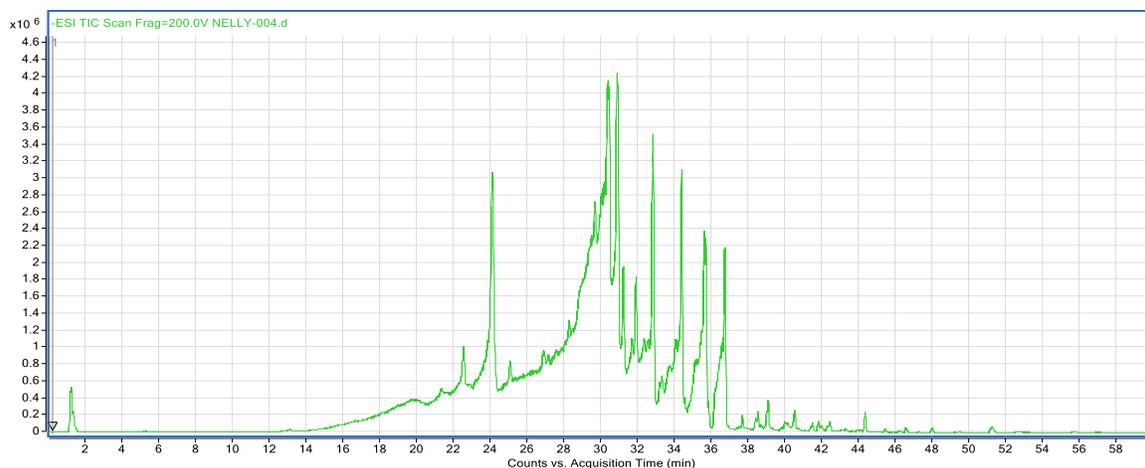


Figura 12. Cromatograma del análisis por HPLC-MS del propóleo de Chihuahua

Cuadro 6. Compuestos identificados por HPLC-MS del propóleo de Chihuahua.

Compuesto	TR (min)	λ_{\max} (nm)	Ion padre (m/z) [M-H] ⁻	Error relativo (ppm)
Naringina	17.11	214, 282	315.8400	2.98
Naringenina	24.07	290, 325 (sh)	271.0621	-3.18
Kaempferol	26.89	200, 266, 366	285.0412	-2.58
Quercetina	23.15	256, 372	301.0361	-2.48
Acacetina	32.32	210, 268, 324	283.0619	-2.32
Luteolina	22.51	252, 348	285.0774	-1.98
Pinocembrina	30.37	290	255.0672	-3.34
Crisina	31.17	268, 314	253.0509	-1.18

6.10.2. Análisis de Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

El propóleo de Chihuahua fue sometido a un análisis de GC-MS para identificar los compuestos presentes en el extracto, el cromatograma se muestra en la figura 13. De acuerdo al tiempo de retención y por sus patrones de fragmentación se identificaron 6 compuestos en el propóleo, el más abundante fue la pinocembrina

con 10.273%, los siguientes 5 compuestos representan menos del 3% como se muestra en el cuadro 7.

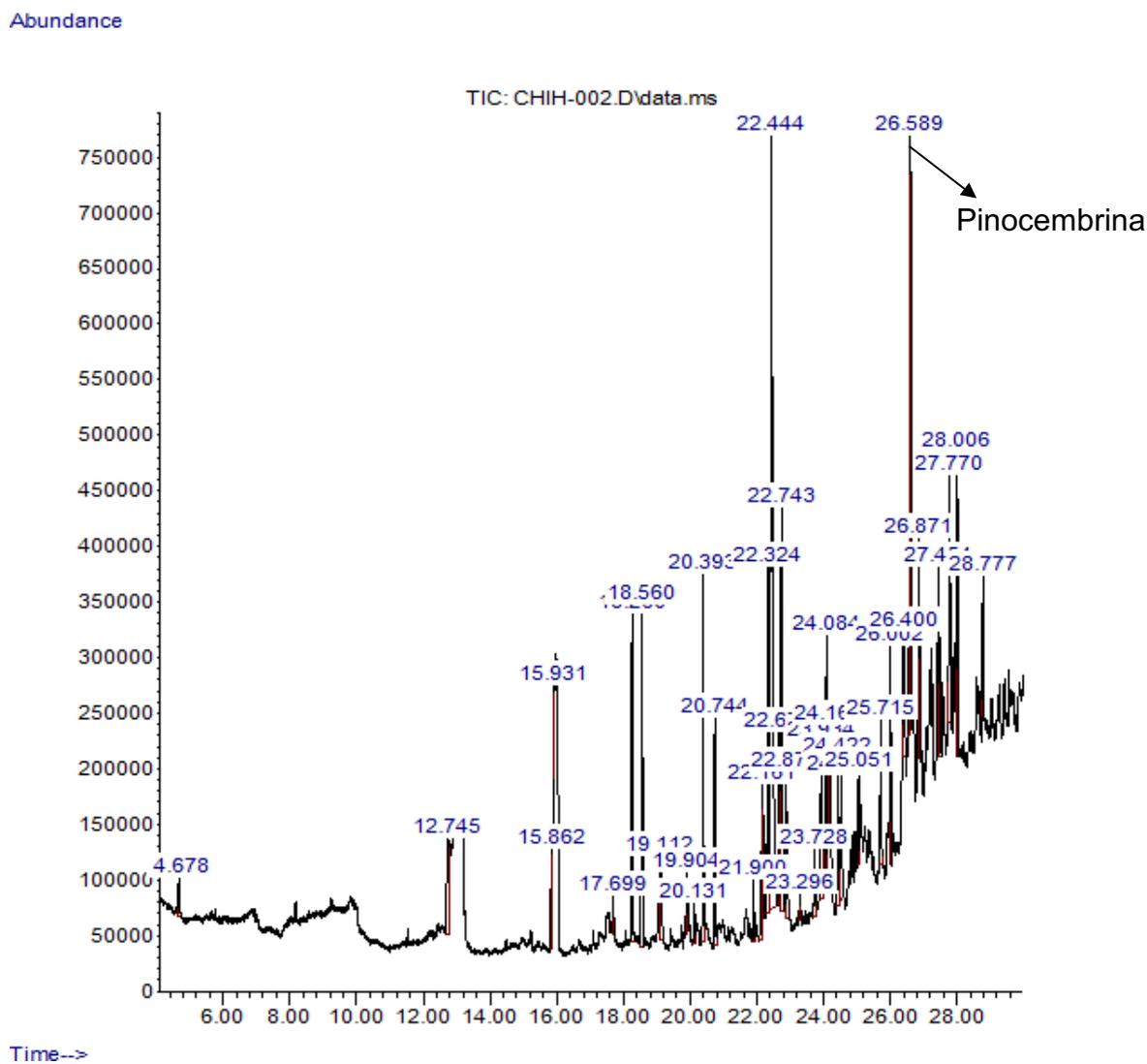
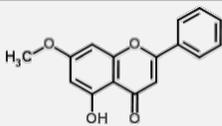
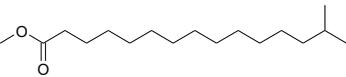
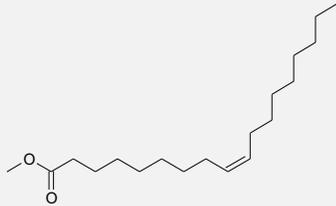
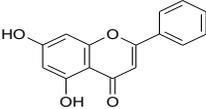
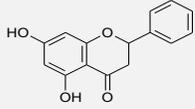
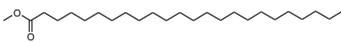


Figura 13. Cromatograma del análisis por GC-MS del propóleo de Chihuahua.

Cuadro 7. Compuestos identificados por GC-MS del propóleo de Chihuahua.

Nombre	TR (min)	Porcentaje de abundancia	Estructura química
Tectocrisina	22.161	2.270%	
Isohexadecanoato de metilo	22.876	2.438%	
Ester metílico del ácido oléico	25.051	1.009%	
Crisina	26.400	2.275%	
Pinocembrina	26.589	10.273%	
Tetracosanoato de metilo	26.871	2.954%	

6.11. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA DEL PROPÓLEO DE CHIHUAHUA

Se obtuvieron 800 alícuotas de 100 mL cada una, las cuales se agruparon en 58 de acuerdo a su similitud en cromatografía en capa fina (Cuadro 8).

Cuadro 8. Fracciones obtenidas de la cromatografía en columna del propóleo.

Fase Móvil	Proporción de solvente*	Fracción obtenida
Hexano / Acetato de Etilo	9:1	1-16
Hexano / Acetato de Etilo	8:2	17-20
Hexano / Acetato de Etilo	7:3	21
Hexano / Acetato de Etilo	6:4	22
Hexano / Acetato de Etilo	5:5	23

Hexano / Acetato de Etilo	4:6	24-28
Hexano / Acetato de Etilo	3:7	29-32
Hexano / Acetato de Etilo	2:8	33
Hexano / Acetato de Etilo	1:9	34-36
Acetato de Etilo	10	37-39
Acetato de Etilo / Metanol	9:1	40-44
Acetato de Etilo / Metanol	8:2	45-49
Acetato de Etilo / Metanol	7:3	50
Acetato de Etilo / Metanol	5:5	51-54
Acetato de Etilo / Metanol	4:6	55-56
Metanol	10	57
Metanol acidulado	0.1% de ác. fosfórico	58

*Proporción de solvente: Es la cantidad que hay en 100 mL de cada uno de los solventes utilizados (90 mL de Hexano y 10 mL de Acetato de Etilo; 9:1. Y así sucesivamente).

6.11.1. Análisis de las fracciones del propóleo mediante HPLC

Una vez que se agruparon las diferentes fracciones, se procedió a inyectar 30 µL de cada una con una concentración de 3 mg/mL y fueron comparadas con los 15 estándares y se pudieron identificar diferentes compuestos (Cuadro 9).

Cuadro 9. Compuestos identificados mediante el análisis de HPLC en cada una de las fracciones obtenidas en la Cromatografía en columna del Propóleo de Chihuahua.

Compuesto	Fracciones con presencia del compuesto
Acacetina	20, 21 y 23
Apigenina	20, 23 y 53
Catequina	26, 27, 29, 31, 33, 35, 47 y 55
Crisina	19, 20, 21, 23, 26, 31, 32 y 53
Kaempferol	20, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 36, 37, 38, 39, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 50, 51, 53 y 54
Luteolina	20 y 44
Naringina	20, 24, 25, 37 y 39
Naringenina	11, 13, 18, 20, 21, 22, 23, 32 y 38
Pinocembrina	4, 7, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 25, 49 y 50
Quercetina	20, 25, 27, 31, 33, 42, 43, 44, 45, 46, 46, 48, 49 y 50
Genisteína	12
Cafeína	2

Ácido Gálico	26
--------------	----

Nota: Los tiempos de retención y la $\lambda_{\text{máx}}$ de cada uno de los compuestos identificados se muestran en el APÉNDICE 11 (pág. 98).

6.11.2. Análisis de las fracciones del propóleo mediante GC-MS

Las 58 fracciones del propóleo de Chihuahua fueron sometidas a un análisis de GC-MS para identificar los compuestos presentes en cada una de ellas. Para este análisis también se inyectó 1 μL de cada una de las fracciones con una concentración de 3 mg/mL. De acuerdo con el tiempo de retención y por sus patrones de fragmentación se identificaron diversos compuestos que forman parte de cada una de las fracciones (Cuadro 10).

Cuadro 10. Compuestos identificados mediante el análisis de GC-MS en cada una de las fracciones obtenidas en la Cromatografía en columna del Propóleo de Chihuahua.

Compuesto	Fracciones con presencia del compuesto
2-Heptadecanona	2
Ácido Palmítico	2, 3, 9, 20, 21, 22, 46 y 55
Ácido Mirístico	2
Ácido Octadecenoico	2, 3 y 9
2-Nonadecanona	2, 3, 19 y 29
Ácido Eicosanoico	2
Ácido Docosanoico	2 y 3
Ácido Tetracosanoico	2 y 3
Eicosano	3, 16, 20, 21, 22, 26, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 42, 43, 46 y 47
Chalcona Pinostrobin	4 y 22
Tectocrisina	12
Pinocembrina	13, 14, 15, 16, 17, 18, 19,
Heptacosano	16
Octacosano	16, 28, 29, 32, 34 y 35
Tricosano	16, 19 y 33
Naringenina	17, 18 y 19
Apigenina	17
Crisina	18, 19, 20 y 21
Nonadecano	19, 21, 26, 28, 31, 32, 33 y 34

Octadecano	19, 20, 21, 26 y 34
Tridecano	20 y 30
Hexadecano	20, 26, 30, 34, 46 y 55
Tetradecanal	20 y 28
Ácido Oleico	20
Heptadecano	20, 26, 28, 29, 32, 35 y 46
Pentadecanal	20, 22, 23 y 34
Ácido Bezoico	21 y 27
Ácido Octadecanoico	21, 22, 23, 25, 29 y 55
Nonadecanona	21
Ácido Heptadecanoico	21 y 32
Ácido Decanoico	21
Vitamina E	22
Octadecanal	22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 32, 43, 51 y 54
Ácido Decanedioico	22
Hexadecanal	23, 25 y 27
1-Nonadeceno	23, 31, 32 y 43
10-Heneicoseno	24
9-Tricoseno	24
Heneicosano	26, 32, 34, 35, 36 y 46
Hexacosano	26
Pentadecano	28
Ácido Hexadecanoico	29 y 32
Tetradecano	30 y 46
Lupeol	30
1-Docoseno	32
Tetratetracontano	34
Tetradecanal	44 y 55
Tritriacontano	46

Nota: Los tiempos de retención de cada uno de los compuestos identificados se muestran en el APÉNDICE 12 (pág. 102).

6.11.3. Capacidad antioxidante de las fracciones del propóleo

Se evaluó la capacidad antioxidante de cada una de las fracciones obtenidas del propóleo de Chihuahua por la técnica de DPPH. Los resultados se muestran en el cuadro 11, en donde se puede observar que todas las fracciones presentaron una CA₅₀ diferente, siendo 17, 30, 42, 43, 44, 52, 53 y 55 las más representativas ya que muestran una CA₅₀ por debajo de 96.6 µg/mL.

Cuadro 11. Capacidad antioxidante de cada una de las fracciones obtenidas en la Cromatografía en columna del Propóleo de Chihuahua.

Fracción	CA₅₀ μg/mL	Fracción	CA₅₀ μg/mL	Fracción	CA₅₀ μg/mL	Fracción	CA₅₀ μg/mL
2	>700	17	9.82	30	49.98	45	116.69
4	>700	18	235.14	31	424.84	46	554.77
5	>700	19	>700	32	>700	47	690.89
7	>700	20	>700	33	>700	48	305.53
10	>700	21	>700	34	>700	50	334.96
11	>700	22	>700	36	>700	51	219.42
12	360.94	23	378.10	37	>700	52	50.05
13	>700	25	>700	39	190.28	53	40.52
14	>700	26	686.65	42	94.05	55	68.39
15	>700	27	189.15	43	45.76	57	425.94
16	>700	28	484.06	44	30.23	58	504.66

7. DISCUSIÓN

El estudio del propóleo durante los últimos años ha tenido una gran importancia, ya que se han reportado un gran número de propiedades que éste contiene, tales como antibacteriana, antifúngica, antioxidante, antiinflamatoria, hipoglucemiante, entre otras (36, 61, 62, 108, 148-153). Además, diversos autores han mencionado que las actividades biológicas de cada propóleo va a depender de su composición química, la cual se ve influenciada por factores como la región geográfica de donde se obtienen y la flora existente, ya que el ambiente ejerce influencia en el contenido de los metabolitos secundarios (154, 155).

La Diabetes Mellitus es un trastorno metabólico caracterizado por una hiperglucemia como resultado de defectos en la secreción y/o acción de la insulina, o ambos (36). Sin embargo, a pesar de que existe una gran variedad de fármacos hipoglucemiantes, algunos de ellos provocan diferentes efectos adversos como diarrea, dolor de cabeza, dolor muscular, entre otros (5).

Sobre la actividad hipoglucemiante, se han realizado diversos estudios en los cuales se ha demostrado que el propóleo de otros países (Nigeria, Arabia Saudita, Brasil y China) disminuye los niveles de glucosa en modelos de ratas diabéticas (36, 60-62, 153). Hasta ahora, en cuanto a la composición química del propóleo, se han identificado más de 300 compuestos diferentes, entre los que destacan los flavonoides, de los cuales existe evidencia de que el propóleo posee diferentes propiedades biológicas, como antioxidante y disminuyendo los niveles de glucosa sanguínea, atribuidas a la presencia de estos flavonoides (109, 151, 156, 157). Sin embargo, son muy pocos los estudios que se han realizado para evaluar las actividades biológicas de propóleos mexicanos (158).

El propóleo de Chihuahua utilizado en éste estudio, de acuerdo a la OECD norma #423, no mostró toxicidad aguda ya que ni la dosis más alta de 5000 mg/Kg indujo mortalidad, ni cambios en el peso corporal de los ratones, así como tampoco alteró el peso de los órganos, ni parametros hematológicos ni bioquímicos. Nuestros resultados coinciden con otros autores (159, 160) los cuales reportaron para un

estudio de toxicidad aguda, que la administración de un propóleo de Brasil en ratas (dosis: 1000, 2000 o 4000 mg/Kg) no muestra diferencias significativas entre los grupos experimentales y el grupo control en cuanto a peso corporal, parámetros hematológicos y parámetros bioquímicos, concluyendo que el propóleo de Brasil no es tóxico.

Los resultados obtenidos en esta investigación, demuestran por primera vez que un propóleo mexicano (de Chihuahua) disminuye los niveles de glucosa en sangre (alrededor de un 40%) en ratones diabéticos tratados con propóleo durante 15 días, en comparación con los ratones diabéticos sin tratamiento. Además, este mismo tratamiento evitó la disminución del peso corporal de los ratones. Existen reportes que demuestran que en ratas con inducción de diabetes mediante estreptozotocina, que la administración de un extracto de propóleo de China y de Brasil conduce a la reducción de los niveles de glucosa sanguínea y también evita la disminución del peso corporal de ratas diabéticas (61, 62).

En la Diabetes Mellitus, uno de los problemas es que puede haber un daño al páncreas que induce menor secreción de insulina. La insulina es una hormona secretada por las células β de los islotes de Langerhans del páncreas. Una de sus funciones es la de favorecer la incorporación de glucosa a los tejidos, disminuyendo los niveles de glucosa sanguínea (24). En el modelo de STZ, se induce un daño en los islotes del páncreas por lo cual disminuye la producción y secreción de insulina. En este trabajo se demostró que en ratones diabéticos disminuyó el tamaño de los islotes de Langerhans y por lo tanto, la producción de insulina. El tratamiento con propóleo disminuyó el daño inducido por STZ evitando así el daño a los islotes del páncreas ya que la detección de insulina en los ratones diabéticos tratados con propóleo, sugiere que la administración del propóleo de Chihuahua podría estar mejorando la secreción de insulina por parte de las células beta de los islotes del páncreas, lo cual podría estar relacionado con que el propóleo evita un mayor deterioro de los islotes del páncreas, ya que se ha sugerido por algunos autores que la actividad de eliminación de radicales libres del propóleo de Brasil, junto con las actividades que encontraron, como inhibición de la IL-1 β y la óxido nítrico sintasa,

son probablemente los factores principales para el efecto protector del propóleo (36, 161). Existen reportes con resultados similares donde es posible detectar niveles de insulina (0.84 ± 0.3 ng/mL) con la administración de un propóleo de Arabia Saudita en ratas diabéticas (36).

En este estudio se demostró, mediante histología, que el área de los islotes de ratones diabéticos tratados con propóleo es mayor en comparación con el grupo de ratones diabéticos sin tratamiento. Cabe destacar que existen pocos reportes acerca del efecto del propóleo en el área de los islotes, sin embargo, algunos autores (143) encontraron, de igual manera, que los islotes de sus grupos de ratones diabéticos tratados con un flavonoide (rutina) tienen mayor área que los ratones no tratados. Y los resultados de inmunohistoquímica demostraron que en los ratones con tratamiento de propóleo se detectó presencia de insulina en los islotes. Además, hay poca información sobre el propóleo y la detección de insulina mediante inmunohistoquímica, sin embargo, algunos autores (162) reportan que el propóleo de Nigeria posee compuestos antioxidantes que pudieran tener efectos protectores en las células beta pancreáticas y también pudiera estar actuando indirectamente mediante la estimulación de las pocas células beta supervivientes para secretar más insulina y de esta manera disminuir los niveles de glucosa en sangre.

La hiperglucemia es un factor responsable del intenso estrés oxidativo en la diabetes, y la toxicidad inducida por la autooxidación de la glucosa una de las fuentes importantes de especies reactivas de oxígeno. Existen varios mecanismos de defensa antioxidantes intra y extracelulares que contrarrestan los efectos destructivos de los radicales libres por la atenuación o la inactivación de estos. SOD, CAT y GPx son enzimas antioxidantes que juegan un papel vital en la prevención de las células a la exposición del daño oxidativo. SOD reduce el radical superóxido en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), mientras que CAT y GPx reducen el peróxido de hidrógeno a agua y protegen los tejidos contra los radicales hidroxilo reactivos. En la diabetes, los altos valores de glucosa pueden inactivar las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx por la glicación de estas proteínas lo que produce estrés oxidativo,

el cual supera los mecanismos de defensa antioxidantes del organismo (36, 163, 164). Por lo que es de gran importancia encontrar compuestos o productos naturales que tengan una buena capacidad antioxidante. En este estudio se encontró que el extracto de propóleo de Chihuahua posee una buena capacidad antioxidante (CA_{50} de 15.75 $\mu\text{g/mL}$) con base en el criterio que menciona Al-Fatimi (147) que concentraciones menores a 96.6 $\mu\text{g/mL}$ para extractos se consideran con capacidad antioxidante adecuada. Aunado a esto, se encontró que el extracto tiene 31.4 % de fenoles y 6.2 % de flavonoides. A este respecto, se ha reportado que propóleos de otros países (China, Egipto, Polonia, Argentina, Australia, China, Hungría, Nueva Zelanda, Uruguay, Italia, Rusia y Brasil) contienen fenoles y flavonoides como parte importante de su composición química, teniendo una buena capacidad antioxidante y además mencionan que existe una correlación directa entre el contenido de fenoles y flavonoides y su capacidad antioxidante, ya que se ha demostrado que estos compuestos son capaces de eliminar los radicales que interfieren con el metabolismo normal de las células, protegiendo a la membrana celular contra la peroxidación lipídica (73, 106, 144, 165-170). En cuanto a la actividad de las enzimas antioxidantes en este estudio, se encontró que en ratones diabéticos tratados con propóleo se incrementó la actividad de cada una de las enzimas estudiadas (SOD, CAT y GPx) en comparación los ratones diabéticos sin tratamiento. Además, e ha demostrado en investigaciones llevadas a cabo en ratas diabéticas, que la administración de un extracto de propóleo de China y de Brasil, incrementa la actividad de las enzimas SOD, CAT y GPx (61, 62, 153). Todo lo anterior es un mecanismo que contrarresta los daños causados por los radicales libres que se producen en eventos de hiperglucemia en la diabetes (171). Esto sugiere que el tratamiento con propóleo incrementa la actividad de estas enzimas en los ratones diabéticos mejorando el funcionamiento en el sistema antioxidante del organismo; disminuyendo así el daño a diferentes tejidos, como las células beta de los islotes del páncreas, las cuales son muy susceptibles a los cambios oxidativos ya que poseen una baja capacidad antioxidante (62, 172, 173).

Estos efectos del propóleo de Chihuahua se pueden relacionar con sus componentes químicos, ya que al analizar su composición química se encontraron

flavonoides como naringina, pinocembrina, naringenina, kaempferol, quercetina, acacetina, luteolina y crisina. Existen reportes que señalan que entre los principales compuestos del propóleo están los flavonoides, tales como, flavonas, flavonas y flavononas (174, 175). También, en estudios realizados en propóleos de China, Uruguay, Italia, Rusia y Brasil (extractos metanólicos, acuosos o etanólicos) los resultados mostraron que los principales compuestos presentes fueron apigenina, luteolina, quercetina, kaempferol, galangina, pinobanksina, epicatequina, naringenina, pinocembrina y crisina (109, 152, 169, 170). Los flavonoides son de los compuestos que han recibido la mayor atención ya que han surgido como alternativas potenciales en enfermedades complejas, como la diabetes, que implica alteración en múltiples vías de señalización. Estos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y exhiben propiedades farmacológicas distintivas (35). Existen reportes de que la administración de flavonoides como quercetina, naringina, genisteína o floridzina reducen las concentraciones de glucosa sanguínea, detectan insulina en suero o en islotes y aumentan la liberación de insulina, probablemente por el cambio del metabolismo del Ca^{2+} , ejerciendo así sus efectos antidiabéticos (35, 131, 132, 138, 171, 176). Por otro lado, otro blanco por el cual el propóleo de Chihuahua pudiera estar actuando, es a través de su potente capacidad antioxidante, de la cual, diferentes trabajos han reportado que la administración de quercetina en ratas diabéticas aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx, además de proteger la mayoría de las células de los islotes de Langerhans, concluyendo que el tratamiento con quercetina previene parcialmente la degeneración de las células β , probablemente a través de señales anti-apoptóticas (61, 62, 132, 133, 153). También, algunos estudios *in vitro* e *in vivo* reportan que la administración de algunos flavonoides como acacetina, luteolina, crisina, kaempferol o naringenina disminuyen los niveles de glucosa en ratas y ratones diabéticos inhibiendo la actividad de la enzima α -glucosidasa (122, 124, 125, 128) y podría ser otro blanco de acción del propóleo. Otros reportes indican que la administración de flavonoides como quercetina o naringenina, inducen un aumento en la absorción de glucosa en las células del músculo esquelético (119, 127), probablemente otro blanco de acción del propóleo. También, en diversos

estudios se ha reportado que la administración de flavonoides como naringina, quercetina o naringenina aumentaron la concentración de la actividad de la enzima glucoquinasa hepática y redujeron la actividad de la Glucosa-6-fosfatasa hepática y de la enzima PEPCCK, sugiriendo que hay una prevención de la progresión de la hiperglucemia por el aumento de la concentración hepática de la glucólisis y/o mediante la reducción de la gluconeogénesis hepática (35, 119, 129-131, 177). De tal manera que los resultados encontrados en esta investigación sugieren que el tratamiento con propóleo de Chihuahua, por su alto contenidos de flavonoides, podría estar actuando en diferentes blancos para disminuir la hiperglucemia.

Si bien, el presente trabajo demostró que el propóleo de Chihuahua posee actividad antidiabética y antioxidante, sugiriendo que sus efectos están directamente relacionados con su composición química ya que la mayoría de los compuestos encontrados en el propóleo se han reportado con actividad en los diferentes parámetros evaluadas en este trabajo; sin embargo, se requieren de más investigaciones que amplíen el conocimiento de todos los efectos biológicos del propóleo, efectos adversos y sus mecanismos de acción para su posible aplicación en diferentes blancos terapéuticos y poder así apoyar su uso en el control de las alteraciones causadas por la diabetes.

8. CONCLUSIONES

- El propóleo de Chihuahua disminuye los niveles de glucosa sanguínea.
- Existe presencia de insulina en suero y en islotes pancreáticos en ratones diabéticos tratados con propóleo.
- El propóleo de Chihuahua presenta capacidad antioxidante.
- El propóleo aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes.
- Se identificaron algunos flavonoides que forman parte de la composición química del propóleo y que se ha reportado que tienen actividad hipoglucemiante y antioxidante.

9. ARTÍCULO PUBLICADO

Hindawi
Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine
Volume 2018, Article ID 4360356, 10 pages
<https://doi.org/10.1155/2018/4360356>



Research Article

Hypoglycaemic and Antioxidant Effects of Propolis of Chihuahua in a Model of Experimental Diabetes

Nelly Rivera-Yañez ¹, Mario Rodríguez-Canales ²,
Oscar Nieto-Yañez ¹, Manuel Jiménez-Estrada,³ Maximiliano Ibarra-Barajas,⁴
M. M. Canales-Martínez ⁵ and M. A. Rodríguez-Monroy ¹

¹Lab. Inmunobiología (L-321), UNAM FES Iztacala, Avenida de los Barrios Número 1, Colonia Los Reyes Iztacala, 54090 Tlalnepantla, MEX, Mexico

²IPN, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Av. Wilfrido Massieu, Gustavo A Madero, 07738 Ciudad de México, Mexico

³Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, 04510 Coyoacán, DF, Mexico

⁴UBIMED, UNAM FES Iztacala, Avenida de los Barrios Número 1, Colonia Los Reyes Iztacala, 54090 Tlalnepantla, MEX, Mexico

⁵Lab. Farmacognosia, UBIPRO, UNAM FES Iztacala, Carrera Biología, Tlalnepantla, MEX, Mexico

Correspondence should be addressed to M. A. Rodríguez-Monroy; dr.marcorodriguezmonroy@gmail.com

Received 8 August 2017; Revised 21 December 2017; Accepted 7 February 2018; Published 11 March 2018

Academic Editor: Eman Al-Sayed

Copyright © 2018 Nelly Rivera-Yañez et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Propolis is a bee-collected natural product that has been proven to have various bioactivities. This study tested the effects of a Mexican propolis on streptozotocin-induced diabetes mellitus in a murine model. The results showed that an ethanolic extract of propolis of Chihuahua (EEPCh) significantly inhibited increases in blood glucose and the loss of body weight in diabetic mice. EEPCh increased plasma insulin levels in STZ-diabetic mice, whereas, in untreated diabetic mice, there was no detection of insulin. EEPCh had a high antioxidant capacity ($SA_{50} = 15.75 \mu\text{g/mL}$), which was directly related to the concentrations of total phenols (314 mg GAE/g of extract) and flavonoids (6.25 mg QE/g of extract). In addition, increased activities of the enzymes superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase were observed in diabetic mice treated with EEPCh. Compounds such as pinocembrin, quercetin, naringin, naringenin, kaempferol, acacetin, luteolin, and chrysin were identified by HPLC-MS analysis. This investigation demonstrated that propolis of Chihuahua possesses hypoglycaemic and antioxidant activities and can alleviate symptoms of diabetes mellitus in mice. These effects may be directly related to the chemical composition of propolis, as most of the compounds identified in propolis are reportedly active in terms of the different parameters evaluated in this work.

1. Introduction

Propolis is a resinous, complex apiarian product that is collected and produced by honey bees from different floral substances, beeswax, and salivary secretions [1]. Propolis is characterized by its contents of resins (approximately 50%), wax (30%), essential oils (10%), pollen (5%), and other organic components (5%) [2]. Importantly, each propolis varies in composition depending on its geographical area of origin and the type of flora in that region [3]. Notably, propolis possesses a broad spectrum of biological activities, including

antimicrobial, anti-inflammatory, antiviral, cytotoxic, antioxidant, and immunomodulatory [4, 5]. In addition, recent studies have shown that propolis has hypoglycaemic effects and antioxidant capacity [6, 7].

Diabetes is a chronic metabolic disorder characterized by hyperglycaemia that presents a major worldwide health problem [1]. In view of its epidemic proportions, diabetes stands out as one of the most urgent medical problems of the 21st century [8]. According to the World Health Organization (WHO), in the year 2000, the prevalence of diabetes mellitus was 171,000,000, and it is estimated that the prevalence of

this disease will reach 439,000,000 by 2030 [9]. Diabetes mellitus is characterized by absolute or relative deficiencies in insulin secretion and/or insulin action associated with chronic hyperglycaemia and disturbances of carbohydrate, lipid, and protein metabolism [8].

Hyperglycaemia is an important factor responsible for intense oxidative stress in diabetes, and the toxicity induced by glucose autooxidation is likely to be one of the important sources of reactive oxygen species. Several intra- and extracellular antioxidant defence mechanisms counteract the destructive effects of free radicals by attenuating or inhibiting their activities. However, in diabetes mellitus, the oxidative stress exceeds the antioxidant defence mechanisms of the body [7].

Diabetes is associated with the generation of reactive oxygen species (ROS), which cause oxidative damage to the heart, kidneys, eyes, nerves, liver, small and large blood vessels, and the gastrointestinal system [8].

As a result of the plethora of scientific evidence proposing the involvement of oxidative stress in the pathogenesis of diabetes and its complications, interest has grown in the use of natural antioxidants as a new strategy for alleviating the oxidative damage associated with diabetes [9]. Therefore, the present study aimed to investigate the hypoglycaemic and antioxidant activities of EEPCh in a model of experimental diabetes.

2. Material and Methods

2.1. Chemicals. Streptozotocin (STZ) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) and stored at -20°C . Rat/mouse insulin ELISA kits were obtained from EMD Millipore. Aluminium chloride (AlCl_3), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Folin-Ciocalteu reagent, sodium carbonate, and ethanol were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Authentic flavonoid standards (vanillin, quercetin, catechin, luteolin, pinocembrin, chrysin, baicalein, myricetin, naringenin, naringin, gallic acid, catechol, apigenin, acacetin, and kaempferol) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.2. Biological Materials. Propolis samples were collected by Ing. Martín Balcorta Baeza in November, 2014, from the apiary located in Ejido Concordia, Aquiles Serdán municipality, Chihuahua, Chihuahua, Mexico.

2.3. Preparation of the Ethanolic Extract of Propolis of Chihuahua (EEPCh). The propolis extract was obtained by maceration at room temperature. Propolis (300 g) was placed in a flask containing 1 L of 70% ethanol. Next, the solution was filtered and then distilled under reduced pressure in a rotary evaporator [10]. The extract was placed in glass containers until evaporation of the solvent was complete, thus yielding the ethanol extract of propolis of Chihuahua (EEPCh). The yield of EEPCh was 202.45 g (67.48%).

2.4. Experimental Animals. Healthy male adult CD1 mice (seven weeks old) were used. The animals were cared for according to the guidelines of the Federal Regulations for

Animal Experimentation and Care (NOM-062-ZOO-1999, Ministry of Agriculture, Mexico), which were approved by the Institutional Ethics Committee of the Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. All animals were housed with six mice per cage and were fed with a standard pellet diet and were allowed free access to water. The animals were maintained at a constant temperature ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) and $50 \pm 5\%$ relative humidity with a 12 h light-dark cycle.

2.5. Induction of Experimental Diabetes. Diabetes was induced by intraperitoneal injection (i.p.) of a single dose of 130 mg/kg body weight of streptozotocin (STZ). STZ was dissolved in freshly prepared 0.05 M citrate buffer (pH 4.5). After 72 h, all mice were fasted for 4 h and their blood glucose levels were monitored from the tip of the tail vein using a glucose kit and an autoanalyser (ACCU-CHEK Active, Roche diagnostics). The mice used in the experiments were considered diabetic when their fasting blood glucose levels were above 250 mg/dL [11].

2.6. Experimental Groups and Treatment. Two batches (groups) of mice were used, one for immunohistochemistry and the other to obtain the homogenates of the pancreatic tissue.

The experimental animals were randomly assigned into 3 groups of six animals each and received the following treatments: Group I, healthy (H); Group II, diabetics (D); and Group III, diabetics treated with propolis (D/P) 0.3 g/kg/day of propolis [7]. The freshly prepared extracts of propolis were orally administered one week after the mice were considered as diabetics (glucose levels greater than 250 mg/dL). The propolis administration was daily for 15 days. Body weights and blood glucose levels were measured at 3-day intervals after fasting for 4 h.

2.7. Effects of EEPCh on Blood Glucose Levels and Body Weight in Experimental Groups. During the study period of 15 days, the blood glucose levels of the mice were recorded every 3 days. Blood was extracted from the tip of the tail vein after fasting for 4 h, and the blood glucose levels were determined using a glucometer. The body weights of mice were also recorded at the same times using an electronic balance (ADAM, 120 g \times 0.001 g, USA).

2.8. Effect of EEPCh on Serum Insulin Levels. Blood was collected at the end of treatment (day 15) in tubes without heparin or EDTA and centrifuged at 10,000 rpm for 5 min. The serum insulin levels were determined using a mouse insulin ELISA kit (EMD Millipore, rat/mouse insulin ELISA kit, USA), which quantifies insulin using a sandwich-technique enzyme immunoassay. After incubation, the plate was read at 450 nm in a Bio-Tek EL800 plate reader (Bio-Tek). The intensity of the colour generated was directly proportional to the amount of insulin in the sample.

2.9. Effects of EEPCh on Pancreatic Islets. At the end of the experimental period, the animals were sacrificed and each pancreas was quickly removed. An incision was made in the

abdomen and the liver was lifted to allow for observation of the bile duct, through which 1 mL of Bouin fixative was injected. The pancreas was then obtained by carefully cutting along the borders of the pancreas to separate it from the organs to which it was adhered. The samples were fixed for 24 h at 4°C, the tissues were dehydrated using a graded alcohol series, and finally, the samples were embedded in paraffin (Paraplast, Merck Millipore, USA) following routine histological techniques. Each pancreas was cut to 4 microns of thickness on a rotary microtome (Leica, RM2125RT, Germany). Immunohistochemistry using an insulin antibody (H-86, sc-9168; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) was performed to detect insulin in the pancreatic islets of each experimental group, and the slides were examined under a light microscope (Motic, BA310E, China) at 40x magnification.

2.10. Antioxidant Capacity of EEPCh. The antioxidant capacity of the propolis extract was measured using a DPPH assay according to a previously described procedure [12]. In an ELISA plate, 50 μ L of propolis extract was added at different concentrations (1–100 μ g/mL) in triplicate. DPPH solution (150 μ L) was added and the plate was then shaken and kept in the dark at room temperature for 30 min at 37°C. The absorbance was measured at 540 nm using a Bio-Tek EL800 plate reader (Bio-Tek). LC-MS grade methanol was used as a blank sample, and a DPPH solution (100 μ M) was used as the control. Quercetin was used as the reference (positive control) under the same conditions as the problem solution. The antioxidant capacity was determined according to the following equation:

$$\% \text{ reduction} = \left[\frac{(\text{absorbance of control} - \text{absorbance of sample})}{\text{absorbance of control}} \right] * 100. \quad (1)$$

The concentration with 50% antioxidant capacity (SA_{50}) was determined graphically.

2.11. Total Phenolic Content of EEPCh. The total phenolic content (TPC) of the propolis extract was determined by Folin–Ciocalteu reagent [13]. The sample was tested in triplicate and the absorbance of the resulting blue coloured solution was measured at 760 nm using a UV–Vis spectrophotometer (DU 640 Spectrophotometer, Beckman, Brea). The total phenolic content was estimated using a calibration curve generated using serial concentrations of gallic acid (0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, and 0.2 mg/mL), and total phenolics were expressed as milligrams of gallic acid equivalent per gram of extract (mg of GAE/g of extract).

2.12. Total Flavonoid Content of EEPCh. The total flavonoid content (TFC) of the propolis extract was estimated using a previously described colorimetric method based on the formation of an aluminium chloride complex [13]. In an ELISA plate, 200 μ L of the mixture was added in triplicate and the samples were incubated for 10 min in the dark

at room temperature. A calibration curve was generated using different concentrations (1–100 μ g/mL) of quercetin. The absorbance was read at 415 nm in a Bio-Tek EL800 plate reader (Bio-Tek) and the total flavonoid content was expressed as milligrams of quercetin equivalent per gram of extract (mg of QE/g of extract).

2.13. Effects of EEPCh on Some Parameters of Oxidative Stress. At the end of the experimental period, the animals were sacrificed, each pancreas was quickly removed, and the pancreatic tissues were homogenized (100–300 mg) using a Bullet Blender (Next Advance, Inc. USA). The homogenate was centrifuged at 10,000 rpm for 5 min and the collected supernatant was stored at –80°C. The enzymatic activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx) were all determined using the methods provided by the assay kits (Cayman Chemical Company, USA).

2.14. Analysis of the Chemical Composition of EEPCh by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC-DAD). HPLC was used to chemically characterize 30 μ L of the propolis extract. The extract was injected at a concentration of 3 mg/mL into a Hewlett-Packard HP model 1100 series (Hewlett-Packard, Wilmington DE, USA) HPLC equipped with a diode array detector (DAD) 1100 operated with ChemStation A0903 under the following parameters: separation isocratic using a mobile phase, methanol: acetonitrile: water (25:25:50) acidified with formic acid (1%) for 60 minutes; column, Discovery C-18 (250 \times 4.6 mm), at 269 bar pressure and a temperature range of 22°C–23°C; flow rate, 1 mL/min; detector array of diodes with detector setting at 260 nm; and full scanning of 200–400 nm. The constituents were identified based on a comparison of the retention time and UV spectrum with those of the standards.

2.15. Analysis of the Chemical Composition of EEPCh by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (HPLC-MS). HPLC-MS analysis was performed using an Agilent 1200 Infinity LC coupled to an Agilent 6230 TOF with an Agilent Dual ESI Source (ESI SG14289023) and Mass Hunter Workstation Software, Version B.05.01, Build 5.01.5125.3 operating in the negative ionization mode. Capillary voltage was 4000 V; dry gas temperature was 250°C; nitrogen was used as the dry gas at a flow rate 6 L/min; nebulizer pressure was 60 psi; fragmentor was 200 V; MS range was 50–1300 m/z ; MS acquisition rate was 1 spectrum/s.

The chromatographic separation was accomplished using a HPLC (Infinity Series 1200, Agilent Technologies, Germany) equipped with a Kinetex 2.6 μ , C1800A column (150 \times 2.1 mm) (Phenomenex, USA). The column temperature was maintained at 25°C. The following gradient program was used, along with a mobile phase consisting of water: acetonitrile (90:10) with 0.1% formic acid (solvent A) and methanol: acetonitrile (90:10) with 0.1% formic acid (solvent B). This initial term for 3 min in an isocratic elution is composed of 100% solvent A followed by 3–11 min: 65% A–35% B; 11–20 min: 55% A–45% B; 20–35 min: 100% B; and 25 min: 100% B, v/v. The flow rate was 0.2 mL/min, and the injection volume was 20 μ L (3 mg/mL).

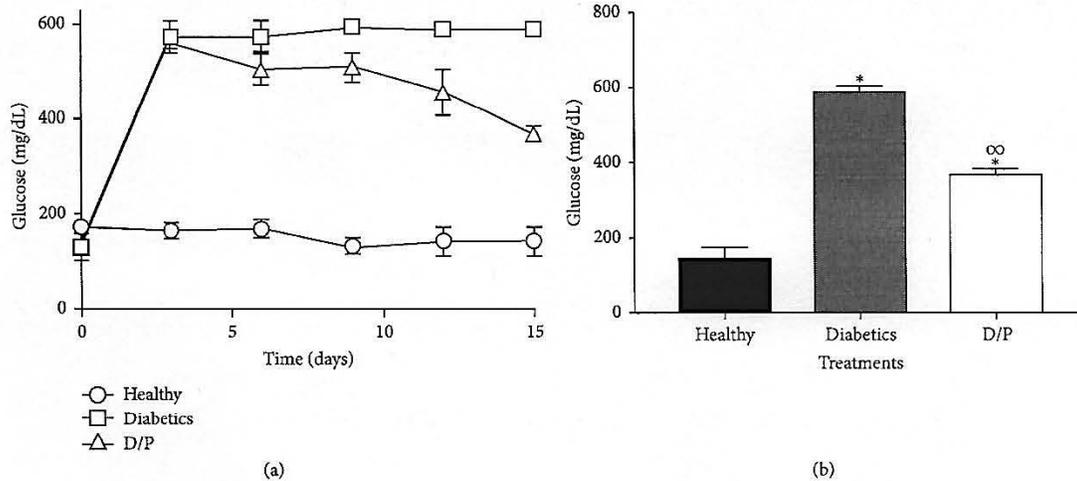


FIGURE 1: Effect of propolis on blood glucose levels. Results are from 15 days of treatment. Diabetic mice treated daily with propolis (300 mg/kg) have decreased glucose levels compared with the untreated diabetic group (Figures 1(a) and 1(b)). The values represent the means of $n = 6$. Significant differences were determined with multiple t -tests, $P < 0.05$. * indicates statistically significant differences with respect to the healthy group. ∞ indicates statistically significant differences with respect to the diabetic group.

2.16. Statistical Analysis. All data concerning hypoglycaemic activity, body weight, detection of insulin, *in vitro* antioxidant capacity, total phenolic content, total flavonoids content, and the antioxidant enzymes activity (SOD, CAT and GPx) were expressed as the means \pm SD. Statistical differences between the treatments and the controls were tested by one-way analysis of variance (ANOVA) using the GraphPad-Prism (version 6.0) statistical analysis software. A difference in the mean values of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Effects of EEPCh on Blood Glucose Levels and Body Weight. During the treatment period, diabetic mice showed constant hyperglycaemia from day 3 until day 15, whereas the group of diabetic mice treated with propolis showed significantly decreased glucose levels from day 9 until the end of the treatment period. In the healthy mice, constant glucose levels were maintained below 200 mg/dL (Figure 1).

It is important to note that the dose used (0.3 g/Kg/day of propolis) is not toxic, according to the OECD 423 acute toxicity test [14] (data not shown).

3.2. Body Weight Monitoring. The administration of propolis during the 15 days of treatment showed a considerable effect on the weight loss of the diabetic mice. As shown in Figure 2(a), the mice that were given propolis showed significantly greater body weights of above 30 g compared to the diabetic mice, which weighed below 30 g; the healthy mice maintained the highest weight at a constant 35 g. At the end of treatment (Figure 2(b)), the weights of the diabetic mice treated with propolis (D/P) were significantly different compared to those of the diabetic mice.

3.3. Effects of EEPCh on Serum Insulin Levels. Since a decrease in blood glucose levels was found, the insulin levels were then determined in the experimental groups. At the end of treatment (day 15), the insulin levels (expressed in ng/mL) in the group of healthy mice (H) showed a value of 0.9 ng/mL, whereas in the group of diabetic mice the presence of insulin was not detected. In the group of mice treated with propolis, insulin levels of 0.3 ng/mL (Figure 3) were recorded, with significant differences compared with those of the diabetic mice (D).

3.4. Effects of EEPCh on Pancreatic Islets. After the oral administration of propolis, differences in the size of the islets were observed. Thus, immunohistochemistry was performed to determine whether the islets were still producing insulin. In this assay, it was found that the islets in the group of healthy mice (H) and the diabetic group treated with propolis (D/P) contained insulin, whereas the islets in the group of diabetic mice (D) did not contain insulin (Figures 4(a), 4(b), and 4(c)).

3.5. Antioxidant Capacity (SA_{50}), Total Phenolic Content (TPC), and Total Flavonoid Content (TFC) of EEPCh. The EEPCh showed a $SA_{50} = 15.75 \mu\text{g/mL}$. According to the literature, phenols are primarily responsible for antioxidant capacity. The total phenolic content of EEPCh was 314 mg GAE/g of extract, and the total flavonoid content was 6.25 mg QE/g of extract.

3.6. Effects of EEPCh on Some Parameters of Oxidative Stress (SOD, CAT, and GPx). High concentrations of glucose in diabetes lead to oxidative stress by increasing the levels of reactive oxygen species (ROS) and decreasing the antioxidant defences of the organism. Therefore, the effects of propolis

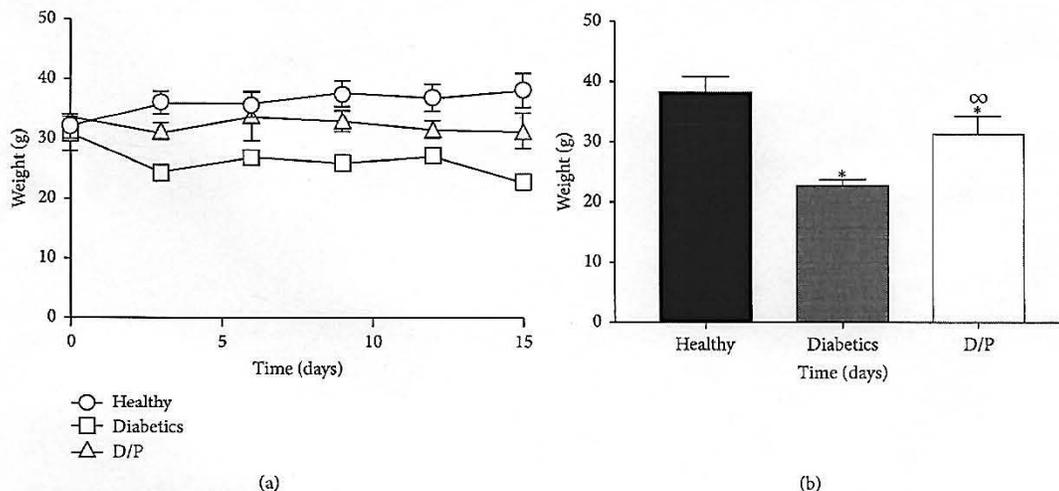


FIGURE 2: Effect of propolis on body weight of mice. Results from 15 days of treatment are shown. Unlike the group of diabetic mice without treatment, the diabetic mice treated with propolis daily (300 mg/kg) showed no drastic weight loss (Figures 2(a) and 2(b)). The values represent the means of $n = 6$. Significant differences were determined with multiple t -tests, $P < 0.05$. * indicates statistically significant differences with respect to the healthy group. ∞ indicates statistically significant differences with respect to the diabetic group.

on the enzymatic activities of enzymes involved in the antioxidant system (SOD, CAT, and GPx) were determined at the end of treatment (day 15) with propolis (Figure 5) using colorimetric methods. As shown in Figure 5, the activities of these three enzymes were diminished in the diabetic mice. Nevertheless, the mice treated with propolis showed increased enzymatic activities of SOD, CAT, and GPx. This is an important result that indicates a reduction in oxidative stress in the D/P group compared with the D group.

3.7. Analysis of the Chemical Composition of EEPCh by HPLC-DAD and HPLC-MS. The compounds in the sample were identified according to their absorption maxima under low ultraviolet light (λ_{max}), their retention times, and HPLC-MS. In total, 8 compounds were identified (Table 1).

4. Discussion

Since ancient times, propolis has been used extensively by humans for its beneficial effects and to treat many diseases and conditions. Propolis is a natural remedy and a popular alternative medicine for various diseases. Current applications of propolis include formulations for cold syndromes (upper respiratory tract infections, common cold, and flu-like infections), and dermatological preparations are useful in wound healing and in treating burns, acne, herpes simplex and genitalis, and neurodermatitis [15]. Propolis is known to have antibacterial, antifungal, antioxidant, anti-inflammatory, antiviral, immunomodulatory, and anti-carcinogenic properties [16, 17].

Propolis is a naturally occurring resinous mixture collected by honey bees from tree buds, sap, and other botanical sources. Due to its antiseptic and antimicrobial properties, propolis has long been utilized in folk medicine [18]. Propolis

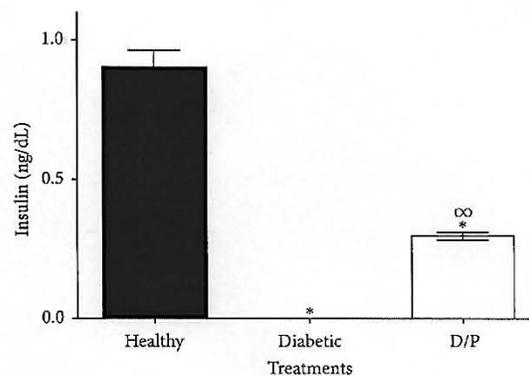


FIGURE 3: Serum insulin levels on day 15 of treatment. Serum insulin was detected (0.3 ± 0.02 ng/mL) in diabetic mice treated daily with propolis (300 mg/kg), whereas untreated mice showed no insulin levels. The values represent the means of $n = 6$. Significant differences were determined by ANOVA. * indicates significant differences with respect to the healthy group. ∞ indicates significant differences with respect to the diabetic group ($P < 0.05$).

is a highly complex substance; thus, the chemical composition and biological properties of propolis obtained from different regions or countries can be very different [19, 20]. Importantly, different extraction processes can also yield different bioactive ingredients [21]. The composition and properties of propolis may also depend on the bee species that produced it due to their preferences for specific plants [22, 23].

In terms of the hypoglycaemic activity of propolis, several studies have shown that propolis from various countries, including Nigeria, Saudi Arabia, Brazil, and China, can lower glucose levels in diabetic rat models [7, 24, 25]. However, to

TABLE 1: HPLC-DAD and HPLC-MS analysis of EPCh.

Name	Retention time (min)		λ_{\max} (nm)	Parent ion (m/z) $[M-H]^-$	Relative error (ppm)
	HPLC-DAD	HPLC-MS			
Naringin	5.71	17.116	214, 282	315.8400	2.98
Naringenin	7.88	24.071	290, 325 (sh)	271.0621	-3.18
Kaempferol	8.31	26.892	200, 266, 366	285.0412	-2.58
Quercetin	8.94	23.158	256, 372	301.0361	-2.48
Acacetin	9.40	32.32	210, 268, 324	283.0619	-2.32
Luteolin	10.05	22.51	252, 348	285.0774	-1.98
Pinocebrin	14.82	30.378	290	255.0672	-3.34
Chrysin	17.58	31.175	268, 314	253.0509	-1.18

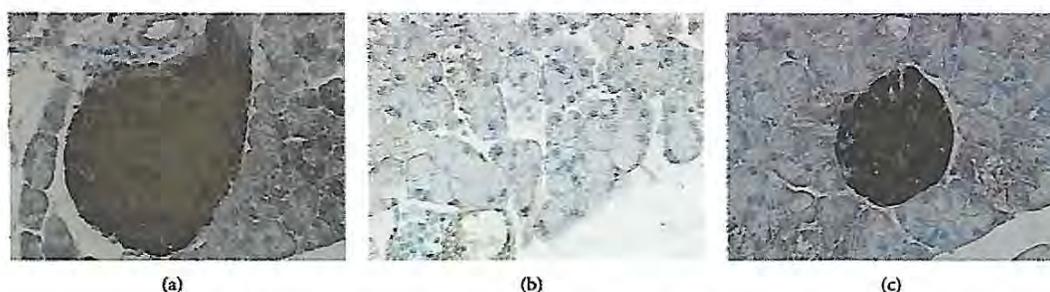


FIGURE 4: Immunohistochemical detection of pancreatic insulin in the different experimental groups. Healthy mice showed insulin production (Figure 4(a)), whereas untreated diabetic mice show no insulin production (Figure 4(b)). The oral administration of propolis to diabetic mice favours the production of insulin in the pancreatic islets (Figure 4(c)). Each image is representative of 6 independent experiments. Microphotographs (40x).

our knowledge, there are very few studies of the biological and medicinal properties of Mexican propolis. Thus, the results presented here comprise the first evidence that a propolis of Mexican origin has a hypoglycaemic effect.

The Chihuahua propolis sample used in this study was collected from a hive of *Apis mellifera* honey bees. Treatment of diabetic mice with an ethanolic extract of this propolis for 15 days decreased blood glucose levels by approximately 40% compared with those levels in untreated diabetic mice. In addition, this same treatment prevented decreases in body weight of the mice. There are reports that the administration of propolis extracts from China and Brazil in rats with streptozotocin-induced diabetes leads to reduced blood glucose levels and prevents decreases in body weight [6, 25].

Insulin is a hormone secreted by β -cells of the islets of Langerhans in the pancreas. One function of insulin is to favour the incorporation of glucose into tissues, thereby decreasing blood glucose levels [26]. Therefore, once the Chihuahua propolis extract was shown to lower blood glucose levels, whether this effect was related to the production of insulin was evaluated. The insulin levels were determined in each of the experimental groups. Insulin was detected in diabetic mice treated with propolis (0.3 ± 0.02 ng/mL), whereas in the group diabetic mice insulin was not detected. The detection of insulin in propolis-treated diabetic mice suggests that the administration of Chihuahua propolis may have improved the secretion of insulin by the β -cells of the

pancreatic islets, which may have been due to the possibility that propolis prevented further deterioration of the pancreatic islets. Some authors have suggested that propolis from Brazil shows activity in removing free radicals; together with the inhibition of IL- 1β and nitric oxide synthase, these activities are probably the main factors for the protective effect of propolis [27]. In other reports with similar results, insulin levels (0.84 ± 0.3 ng/mL) can be detected after the administration of propolis from Saudi Arabia in experimental groups of diabetic rats [7].

Because insulin, a hormone that is only produced by the β -cells of the pancreatic islets, was detected, the presence of insulin in the pancreatic islets was evaluated in each of the experimental groups. The results showed that insulin was present in the islets of mice treated with propolis. There are few reports on propolis and insulin detection by immunohistochemistry. Nonetheless, some authors have reported that propolis from Nigeria possesses antioxidant compounds that could have indirect protective effects on pancreatic β -cells by stimulating the few surviving β -cells to secrete more insulin, thereby decreasing blood glucose levels [28].

Hyperglycaemia is an important factor responsible for the intense oxidative stress in diabetes, and the toxicity induced by glucose autoxidation is an important source of reactive oxygen species. There are several intra- and extracellular antioxidant defence mechanisms that counteract the destructive effects of free radicals by attenuating or inactivating

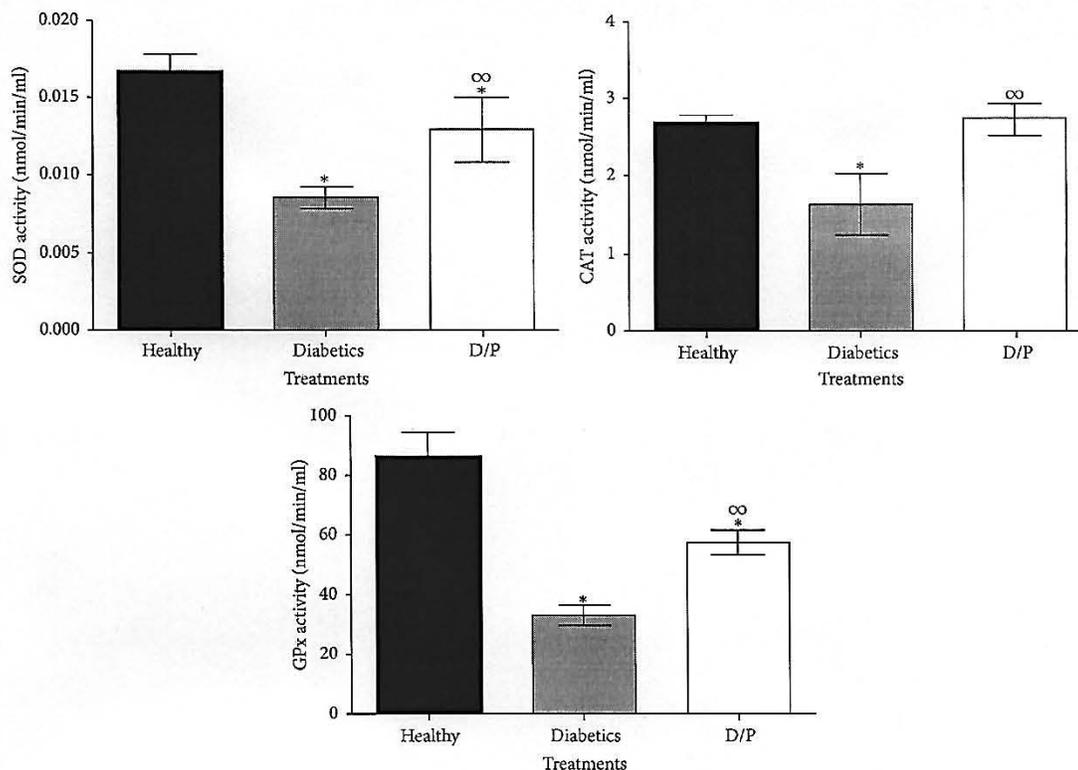


FIGURE 5: Effects of EEPCh on the enzymatic activities SOD, CAT, and GPx. Diabetic mice treated with propolis (D/P) showed increased activities of antioxidant enzymes compared with those of untreated mice. Notably, in the treated mice, the CAT activity shows no differences relative to that of healthy mice. The values represent the means of $n = 6$. Significant differences were determined by ANOVA. * indicates significant differences with respect to the healthy group. ∞ indicates significant differences with respect to the diabetic group ($P < 0.05$).

these compounds. SOD, CAT, and GPx are antioxidant enzymes that play vital roles in preventing the exposure of cells to oxidative damage. SOD can reduce the superoxide radical in hydrogen peroxide (H_2O_2), whereas CAT and GPx reduce hydrogen peroxide to water and protect tissues against reactive hydroxyl radicals. In diabetes, high glucose levels can inactivate the antioxidant enzymes SOD, CAT, and GPx via glycation of these proteins, which produces oxidative stress that overcomes the antioxidant defence mechanisms of the body [7, 29]. Therefore, it is of great importance to identify compounds or natural products with good antioxidant capacities. In this study, the Chihuahua propolis extract was found to possess good antioxidant capacities (SA_{50} of $15.75 \mu\text{g/mL}$) based on Al-Fatimi et al.'s criteria for extracts with concentrations lower than $96.6 \mu\text{g/mL}$ to be considered as having adequate antioxidant capacity [30]. In addition, the extract was found to consist of 31.4% phenols and 6.2% flavonoids. Propolis from other countries, such as China, Italy, Russia, and Brazil, has been reported to contain phenols and flavonoids as important parts of their chemical compositions, as these compounds have good antioxidant capacities. Some authors also mention that there is a direct correlation between the phenol and flavonoid contents and antioxidant capacity, as it

has been shown that these compounds are able to eliminate the radicals that interfere with the normal cell metabolism, thereby protecting the cell membrane against lipid peroxidation [18, 19, 31]. In addition, in terms of antioxidant enzyme activity, in the propolis-treated diabetic, increases in the activities of each studied enzyme (SOD, CAT, and GPx) were observed compared with those in the untreated diabetic mice. Research carried out in diabetic rats has demonstrated that the administration of separate propolis extracts from China and Brazil increased the activity of SOD, CAT, and GPx enzymes [6, 25]. All of the effects described above are indispensable for counteracting the damage caused by free radicals that occur in diabetes-induced hyperglycaemia [32]. Thus, it can be suggested that treatment with propolis increases the activity of these enzymes in diabetic mice, and for the antioxidant defence system of the body to function well, there must be a decrease in the damage to different tissues, including the β -cells of the pancreatic islets, which are very susceptible to oxidative changes due to their low antioxidant capacity [6].

All of these results can be correlated with the data obtained from the chemical composition analysis, which showed that Chihuahua propolis is rich in flavonoids. Some of the compounds identified were naringin, pinocembrin,

naringenin, kaempferol, quercetin, acacetin, luteolin, and chrysin. There are reports that flavonoids, such as flavones and flavonones, are among the main compounds in propolis [18]. Moreover, in studies performed using methanolic, aqueous, or ethanolic extracts of propolis from China, Italy, Russia, and Brazil, the main compounds identified included apigenin, luteolin, quercetin, kaempferol, galangin, pinobanksin, epicatechin, naringenin, pinocembrin, and chrysin [5, 31]. Flavonoids comprise a class of compounds that have received substantial attention for their potential roles as alternative treatments for complex diseases, such as diabetes, which implies alterations in multiple signalling pathways. Flavonoids are widely distributed in the plant kingdom and exhibit distinctive pharmacological properties [33]. As such, the results of the present study suggest that treatment with Chihuahua propolis, which contains several flavonoids, could affect different targets to lower blood glucose levels. Some authors have administered flavonoids, such as quercetin, naringin, or genistein, and have reported reduced blood glucose concentrations, detected insulin in serum or islets, and showed increased insulin release; these effects likely resulted from changes in Ca^{2+} metabolism, thus facilitating the hypoglycaemic effects of flavonoids [32–35]. Flavonoids have the ability to scavenge free radicals and chelate metals [36]. Given the hypothesized relation between diabetes and inflammation [37] and the potential for flavonoids to protect the body against free radicals and other prooxidative compounds [38], it is biologically plausible that the consumption of flavonoids or flavonoid-rich products may reduce the risk of diabetes complications [39, 40]. There is evidence that flavonoids such as naringin, a natural flavanone glycoside, has been widely used in traditional medicine. Naringin has been reported to possess antiapoptotic, antiosteoporosis, antiulcer, antioxidant, anti-inflammatory, and anticarcinogenic properties [41, 42]. Moreover, emerging data indicate that naringin is involved in ameliorating hyperglycaemia. Naringin possesses lipid-lowering and insulin-like properties that decrease insulin resistance, hyperglycaemia, and dyslipidaemia [43].

Another possible mechanism through which Chihuahua propolis might act is through its potent antioxidant capacity. Different studies have reported that the administration of quercetin in diabetic rats results in an increase in the activity of the antioxidant enzymes SOD, CAT, and GPx, which further protect the majority of Langerhans islet cells. It was thus concluded that quercetin treatment partially prevents β -cell degeneration, probably through antiapoptotic signals [34, 44].

Another possible effect of the Chihuahua propolis extract is the decreased absorption of glucose in the intestine via the inhibition of the enzymatic activity of α -glucosidase. Different *in vitro* and *in vivo* studies have reported that the administration of some flavonoids, such as acacetin, luteolin, chrysin, kaempferol, or naringenin, decreases glucose levels in diabetic rats and mice and shows inhibitory effects against the enzymatic activity of α -glucosidase [45–48]. Additionally, Chihuahua propolis might also have an effect on the reduction of serum glucose at the muscle level, as mentioned in some studies. Those researchers administered flavonoids

such as quercetin or naringenin to isolated muscles and reported an increase in the uptake of glucose by skeletal muscle cells as well as the inhibition of the enzyme glycogen phosphorylase [49–51].

Chihuahua propolis might lower blood glucose levels via the activity of certain enzymes in the liver, as has been reported in several studies. In that previous research, the administration of flavonoids such as naringin, quercetin, or naringenin increased the concentration and activity of the hepatic enzyme glucokinase and markedly reduced the enzymatic activities of hepatic glucose-6-phosphatase and PEPCK. These findings suggested that the progression of hyperglycaemia is prevented partly by an increase in the hepatic concentration of glycolysis and/or by the reduction of hepatic gluconeogenesis [33, 49, 50, 52, 53].

This investigation demonstrated that propolis of Chihuahua possesses hypoglycaemic and antioxidant activities. These effects are directly related to its chemical composition, as most of the compounds found in propolis have been reported to have activities in terms of the different parameters evaluated in this work. However, more research is needed to increase the knowledge of all the biological effects of propolis, its possible adverse effects, and its mechanisms of action in order to promote the possible use of propolis in different therapeutic applications, including counteracting the various alterations caused by diabetes.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

Nelly Rivera-Yañez is a doctoral student in the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) who received a fellowship from CONACYT (no. 265778).

Supplementary Materials

Table 1: mice body weight after administration of the single oral dose of propolis at different concentrations (300, 600, 1200, 24000, and 5000 mg/Kg). Table 2: mice organ weight after administration of the single oral dose of propolis at different concentrations (300, 600, 1200, 24000, and 5000 mg/Kg). Table 3: hematological evaluation and biochemical analysis of the mice after administration of the single oral dose of propolis at different concentrations (300, 600, 1200, 24000, and 5000 mg/Kg). (*Supplementary Materials*)

References

- [1] M. S. El-Awady, D. S. El-Agamy, G. M. Suddek, and M. A. Nader, "Propolis protects against high glucose-induced vascular endothelial dysfunction in isolated rat aorta," *Journal of Physiology and Biochemistry*, vol. 70, no. 1, pp. 247–254, 2014.
- [2] P. Olczyk, K. Komosińska-Vassev, and K. Olczyk, "Propolis-chemical composition, properties and application," *Farmacja Polska*, vol. 63, no. 24, p. 1102, 2008.

- [3] M.-R. Ahn, S. Kumazawa, Y. Usui et al., "Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China," *Food Chemistry*, vol. 101, no. 4, pp. 1383–1392, 2007.
- [4] J. C. Silva, S. Rodrigues, X. Feás, and L. M. Estevinho, "Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 50, no. 5, pp. 1790–1795, 2012.
- [5] H. Shi, H. Yang, X. Zhang, and L. Yu, "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*, vol. 60, no. 50, pp. 12403–12410, 2012.
- [6] E. M. El-Sayed, O. M. Abo-Salem, H. A. Aly, and A. M. Mansour, "Potential antidiabetic and hypolipidemic effects of propolis extract in streptozotocin-induced diabetic rats," *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 22, no. 2, pp. 168–174, 2009.
- [7] M. Al-Hariri, T. G. Eldin, B. Abu-Hozaifa, and A. Elnour, "Glycemic control and anti-osteopathic effect of propolis in diabetic rats," *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, vol. 4, article 377, 2011.
- [8] N. Oršolić and I. Bašić, *Honey Bee Products and Their Polyphenolic Compounds in Treatment of Diabetes*, Recent Progress in Medicinal Plants, Studium Press, 2008.
- [9] N. Oršolić, D. Sirovina, G. Gajski, V. Garaj-Vrhovac, M. J. Jembrek, and I. Kosalec, "Assessment of DNA damage and lipid peroxidation in diabetic mice: effects of propolis and epigallocatechin gallate (EGCG)," *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 757, no. 1, pp. 36–44, 2013.
- [10] XA. Domínguez, "Métodos de investigación fitoquímica," 1973.
- [11] K. K. Wu and Y. Huan, "Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats," in *Current Protocols in Pharmacology*, chapter 5, unit 5.47, 2008.
- [12] P. N. Okusa, O. Penge, M. Devleeschouwer, and P. Duez, "Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gillettii* De Wild (Boraginaceae)," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 112, no. 3, pp. 476–481, 2007.
- [13] P. K. Ramamoorthy and A. Bono, "Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes," *Journal of Engineering Science and Technology*, vol. 2, no. 1, pp. 70–80, 2007.
- [14] OECD, *Guideline for Testing of Chemicals. Acute Oral Toxicity—Acute Toxic Class Method*: OECD.org, 2001, <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948370.pdf>.
- [15] V. D. Wagh, "Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials," *Advances in Pharmacological Sciences*, vol. 2013, Article ID 308249, 11 pages, 2013.
- [16] G. Bilgin, K. Kismet, S. Kuru et al., "Ultrastructural investigation of the protective effects of propolis on bleomycin induced pulmonary fibrosis," *Biotechnic & Histochemistry*, vol. 91, no. 3, pp. 195–203, 2016.
- [17] K. Kismet, C. Ozcan, S. Kuru et al., "Does propolis have any effect on non-alcoholic fatty liver disease?" *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 90, pp. 863–871, 2017.
- [18] A. K. Kuropatnicki, E. Szliska, and W. Krol, "Historical aspects of propolis research in modern times," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, Article ID 964149, 11 pages, 2013.
- [19] J. Zhang, X. Cao, S. Ping et al., "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*, vol. 2015, Article ID 307594, 15 pages, 2015.
- [20] V. Bankova, M. Popova, and B. Trusheva, "Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review," *Chemistry Central Journal*, vol. 8, no. 1, article 28, 2014.
- [21] B. A. S. Machado, R. P. D. Silva, G. de Abreu Barreto et al., "Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil," *PLoS ONE*, vol. 11, no. 1, Article ID e0145954, 2016.
- [22] A. C. H. F. Sawaya, P. V. Abdelnur, M. N. Eberlin et al., "Fingerprinting of propolis by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry," *Talanta*, vol. 81, no. 1-2, pp. 100–108, 2010.
- [23] F. Li, S. Awale, Y. Tezuka, H. Esumi, and S. Kadota, "Study on the constituents of Mexican propolis and their cytotoxic activity against PANC-1 human pancreatic cancer cells," *Journal of Natural Products*, vol. 73, no. 4, pp. 623–627, 2010.
- [24] M. I. Oladayo, "Nigerian propolis improves blood glucose, glycated hemoglobin A1c, very low-density lipoprotein, and high-density lipoprotein levels in rat models of diabetes," *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, vol. 5, no. 3, pp. 233–238, 2016.
- [25] W. Zhu, M. Chen, Q. Shou, Y. Li, and F. Hu, "Biological activities of Chinese propolis and Brazilian propolis on streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus in rats," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2011, Article ID 468529, 8 pages, 2011.
- [26] S. R. Joshi, R. M. Parikh, and A. K. Das, "Insulin-history, biochemistry, physiology and pharmacology," *Journal of the Association of Physicians of India*, vol. 55, pp. 19–25, 2007.
- [27] K. Matsushige, P. Basnet, K. Hase, S. Kadota, K. Tanaka, and T. Namba, "Propolis protects pancreatic β -cells against the toxicity of streptozotocin (STZ)," *Phytomedicine*, vol. 3, no. 2, pp. 203–209, 1996.
- [28] I. R. Babatunde, A. Abdulbasit, M. I. Oladayo, O. I. Olasile, F. R. Olamide, and B. W. Gbolahan, "Hepatoprotective and pancreatoprotective properties of the ethanolic extract of Nigerian propolis," *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, vol. 4, no. 2, pp. 102–108, 2015.
- [29] S. S. Irudayaraj, C. Sunil, V. Duraipandiyar, and S. Ignacimuthu, "Antidiabetic and antioxidant activities of *Toddalia asiatica* (L.) Lam. leaves in Streptozotocin induced diabetic rats," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 143, no. 2, pp. 515–523, 2012.
- [30] M. Al-Fatimi, M. Wurster, G. Schröder, and U. Lindequist, "Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 111, no. 3, pp. 657–666, 2007.
- [31] S. Fabris, M. Bertelle, O. Astafyeva et al., "Antioxidant properties and chemical composition relationship of Europeans and Brazilians propolis," *Pharmacology & Pharmacy*, vol. 4, no. 1, pp. 46–51, 2013.
- [32] M. A. Abdelmoaty, M. A. Ibrahim, N. S. Ahmed, and M. A. Abdelaziz, "Confirmatory studies on the antioxidant and antidiabetic effect of quercetin in rats," *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, vol. 25, no. 2, pp. 188–192, 2010.
- [33] P. K. Mukherjee, K. Maiti, K. Mukherjee, and P. J. Houghton, "Leads from Indian medicinal plants with hypoglycemic potentials," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 106, no. 1, pp. 1–28, 2006.

- [34] O. Coskun, M. Kanter, A. Korkmaz, and S. Oter, "Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas," *Pharmacological Research*, vol. 51, no. 2, pp. 117–123, 2005.
- [35] Z. Fu, E. R. Gilbert, L. Pfeiffer, Y. Zhang, Y. Fu, and D. Liu, "Genistein ameliorates hyperglycemia in a mouse model of nongenetic type 2 diabetes," *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, vol. 37, no. 3, pp. 480–488, 2012.
- [36] I. C. Arts and P. C. Hollman, "Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies," *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 81, no. 1, pp. 317S–325S, 2005.
- [37] J. C. Pickup, "Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes," *Diabetes Care*, vol. 27, no. 3, pp. 813–823, 2004.
- [38] C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, and G. Paganga, "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids," *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 20, no. 7, pp. 933–956, 1996.
- [39] Z. Bahadoran, P. Mirmiran, and F. Azizi, "Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review," *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, vol. 12, no. 1, article 43, 2013.
- [40] R. Vinayagam and B. Xu, "Antidiabetic properties of dietary flavonoids: A cellular mechanism review," *Journal of Nutrition and Metabolism*, vol. 12, no. 1, article 60, 2015.
- [41] R. M. S. Pereira, N. E. D. Andrades, N. Paulino et al., "Synthesis and characterization of a metal complex containing naringin and Cu, and its antioxidant, antimicrobial, antiinflammatory and tumor cell cytotoxicity," *Molecules*, vol. 12, no. 7, pp. 1352–1366, 2007.
- [42] L. Cui, Z.-H. Zhang, E. Sun, and X.-B. Jia, "Effect of β -cyclodextrin complexation on solubility and enzymatic conversion of naringin," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 13, no. 11, pp. 14251–14261, 2012.
- [43] X. Liu, M. Liu, Y. Mo et al., "Naringin ameliorates cognitive deficits in streptozotocin-induced diabetic rats," *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, vol. 19, no. 4, pp. 417–422, 2016.
- [44] M. Kim, H. Jung, C. Yoon et al., "EGCG and quercetin protected INS-1 cells in oxidative stress via different mechanisms," *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, vol. 2, pp. 810–817, 2009.
- [45] G. Brahmachari, "Bio-flavonoids with promising antidiabetic potentials: a critical survey," *Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry*, vol. 2, pp. 187–212, 2011.
- [46] K. Juárez-Reyes, F. Brindis, O. N. Medina-Campos et al., "Hypoglycemic, antihyperglycemic, and antioxidant effects of the edible plant *Anoda cristata*," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 161, pp. 36–45, 2015.
- [47] J. M. Li, C. T. Che, C. B. S. Lau, P. S. Leung, and C. H. K. Cheng, "Inhibition of intestinal and renal Na⁺-glucose cotransporter by naringenin," *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 38, no. 5–6, pp. 985–995, 2006.
- [48] T. Matsui, M. Kobayashi, S. Hayashida, and K. Matsumoto, "Luteolin, a flavone, does not suppress postprandial glucose absorption through an inhibition of α -glucosidase action," *Bio-science, Biotechnology, and Biochemistry*, vol. 66, no. 3, pp. 689–692, 2002.
- [49] S. Jakobs, D. Fridrich, S. Hofem, G. Pahlke, and G. Eisenbrand, "Natural flavonoids are potent inhibitors of glycogen phosphorylase," *Molecular Nutrition & Food Research*, vol. 50, no. 1, pp. 52–57, 2006.
- [50] M. K. Unnikrishnan, V. Veerapur, Y. Nayak, P. P. Mudgal, and G. Mathew, "Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of the flavonoids," *Polyphenols in Human Health and Disease*, vol. 1, pp. 143–161, 2014.
- [51] K. Zygmunt, B. Faubert, J. MacNeil, and E. Tsiani, "Naringenin, a citrus flavonoid, increases muscle cell glucose uptake via AMPK," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 398, no. 2, pp. 178–183, 2010.
- [52] A. Purushotham, M. Tian, and M. A. Belury, "The citrus fruit flavonoid naringenin suppresses hepatic glucose production from FaO hepatoma cells," *Molecular Nutrition & Food Research*, vol. 53, no. 2, pp. 300–307, 2009.
- [53] U. J. Jung, M.-K. Lee, K.-S. Jeong, and M.-S. Choi, "The hypoglycemic effects of hesperidin and naringin are partly mediated by hepatic glucose-regulating enzymes in C57BL/KsJ-db/db mice," *Journal of Nutrition*, vol. 134, no. 10, pp. 2499–2503, 2004.

10. APÉNDICES

10.1. APÉNDICE 1

Zona de Colecta

El apiario donde se realizó la colecta del propóleo de Chihuahua se encuentra ubicado en Ejido Concordia en la zona centro de Chihuahua, abarca los municipios de Aquiles Serdán y Chihuahua, en las coordenadas 28° 36' 00" N y 105° 53' 00" O (Figura 14).

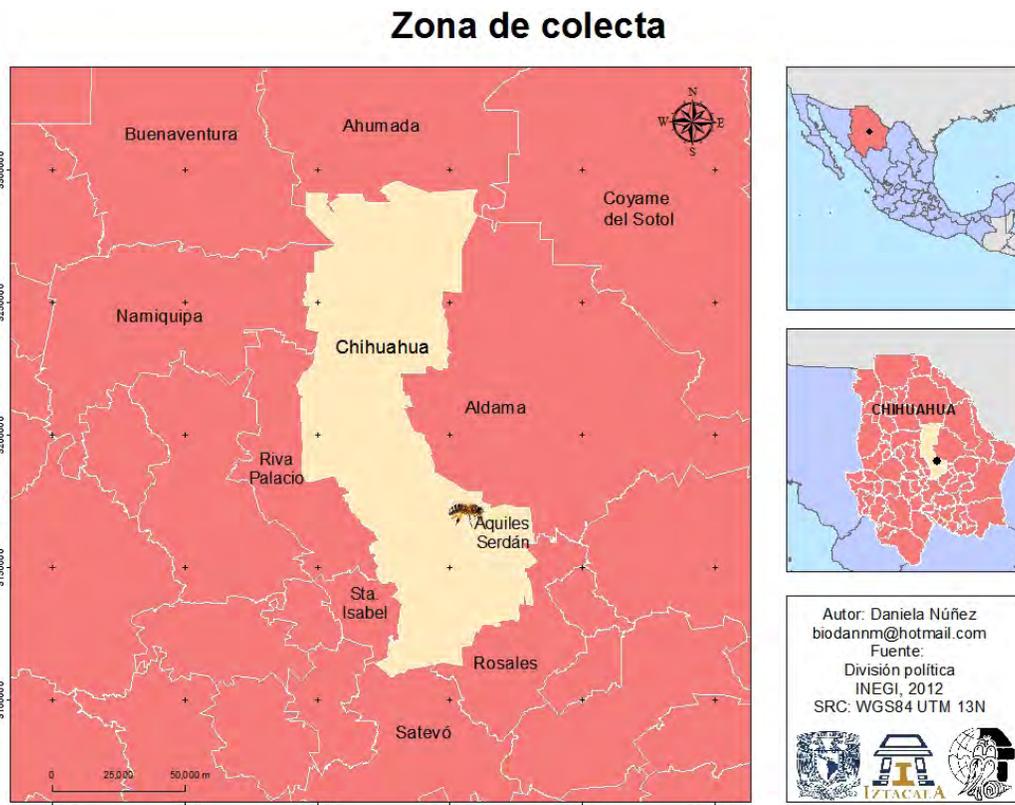


Figura 14. Ubicación del apiario donde se realizó la colecta del propóleo de Chihuahua.

Esta zona tiene un clima semiárido, extremo, con una temperatura máxima de 40° C y mínima de -7.4° C. Su vegetación está constituida por xerófilas, herbáceas, arbustos de diferentes tamaños, entremezclados con algunas especies de agaves, yucas y cactáceas leguminosas como el huizache, guamúchil, quiebre hacha, zacates, peyote, bonete, hojosas, chaparral espinoso y árboles de mezquite (*Prosopis*) (178).

10.2. APÉNDICE 2

Técnica Histológica

Una vez que las muestras se fijaron durante 24 h en Fijador de Bouin, se lavaron con agua destilada (se les cambió el agua del frasco) de 2 a 3 veces al día, durante 5 a 7 días o hasta retirar el color amarillo del Fijador de Bouin y posteriormente se inició con la deshidratación, impregnación e infiltración del tejido. En el mismo frasco donde se encuentran las muestras individualmente, se va agregando (30 mL aprox.) y cambiando cada alcohol.

No.	Solvente	Tiempo (Horas)	
1	Alcohol 70%	2 h	Deshidratación
2	Alcohol 80%	2 h	
3	Alcohol 90%	2 h	
4	Alcohol 100%	2 h	
5	Butanol I	2 h	Impregnación (aclaración)
6	Butanol II	2 h	
7	Parafina I	24 h	Infiltración
8	Parafina II	24 h	

Formación de bloques de parafina

Se llena el molde con parafina de inclusión caliente, con una pinza calentada en el mechero se toma el tejido y se sumerge hasta la base del molde procurando extender el páncreas lo más que se pueda, sin dañar el tejido, en toda la superficie del molde. Se deja enfriar la parafina del molde y después se retira el cubo que contiene inmerso el tejido.

Cortes en el micrótopo

Un día antes de cortar, el bloque se coloca en el congelador para evitar que se caliente rápido con la fricción de la navaja, ya que si está caliente el bloque no se puede cortar. Colocar la navaja en el micrótopo, colocar el cubo y ajustar el portabloques, rebajar el bloque hasta alcanzar el tejido. Los cortes finales tendrán un grosor de 5 micras, una vez obtenidos los cortes se colocan en un portaobjetos y se agregan unas gotas de Ruyter, desde una orilla del portaobjetos, para extender

el tejido. El portaobjetos con el corte se coloca en una parrilla que está a 53° C (No rebasar esta temperatura porque se quema el tejido) y dejarlo aproximadamente 5 segundos, hasta ver que se extendió el tejido y evitando que se formen burbujas en el corte (las burbujas en el corte no permiten una buena tinción posteriormente).

Tinción con Hematoxilina-Eosina

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

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

Montaje

Concluido el proceso de tinción de los cortes, se procedió al montaje de los mismos. Este procedimiento consiste en colocar encima del corte una gota de resina sintética (sustancia adherente, marca HYCEL) y después, muy cuidadosamente colocar encima un cubreobjetos, procurando que no queden burbujas de aire. A

continuación se deja secar la resina para que adquiriera solidez suficiente y observar las muestras.

Preparación de reactivos

Fijador de Bouin

El Fijador de Bouin se prepara con tres reactivos, ácido pícrico, formaldehído y ácido acético glacial. Primero se prepara el ácido pícrico que se va a utilizar para preparar el Fijador de Bouin.

Ácido pícrico

- Preparar 0.25 g de ácido pícrico en 2 L de agua destilada.

Para preparar el Fijador de Bouin se utilizan las cantidades de los tres reactivos de la siguiente tabla y después se guarda a 4° C.

Reactivo	Cantidad (mL)
Ácido pícrico	750 mL
Formaldehído al 37%	250 mL
Ácido acético glacial	50 mL

Ruyter

El Ruyter se prepara con dos soluciones, la solución A y la solución B. Primero se prepara la albúmina glicerizada que se va a utilizar en la solución A.

Albúmina glicerizada

- Albúmina – Glicerina 1:1 (proporción 1 mL y 1 mL).

Vaciar una clara de huevo de gallina en una probeta y agregar el mismo volumen de glicerina. Guardar a 4° C, dura aprox. 6 meses.

Solución A:

- Albúmina glicerizada (20 gotas).

- Agua destilada (80 mL).

Solución B:

- Acetona (20 mL).

- Benzoato de metilo (20 gotas).

Adicionar la solución A en la solución B (en ese orden), gota a gota y muy lentamente, pues de no hacerlo se forma un precipitado. Guardar en un frasco ámbar a 4° C, dura aprox. 1 año.

Hematoxilina

- A 1 L de hematoxilina (HYCEL) se le agregan 4 mL de ácido acético glacial (J. T. Baker).

Eosina

- Solución matriz

Preparar 1 g de eosina Y en 20 mL de agua destilada y después añadir 80mL de etanol al 95%.

- Solución diaria

A 1 parte de solución matriz, añada 3 partes de etanol al 80% y 0.5 mL de ácido acético glacial por cada 100 mL de colorante.

Alcohol ácido al 1%

- 1 mL de ácido clorhídrico en 99 mL de etanol al 70%.

Carbonato de litio

Solución al 0.5%

- 0.5 g de carbonato de litio en 100 mL de agua destilada.

10.3. APÉNDICE 3

Técnica de inmunohistoquímica

Para realizar la técnica de inmunohistoquímica, los tejidos se procesan de igual manera que en la técnica de histología hasta obtener las muestras en bloques de parafina. Para esta técnica se tienen que colocar los cortes de tejido en portaobjetos lisinados o electrocargados.

Cortes en el micrótopo

Un día antes de cortar, el bloque se coloca en el congelador para evitar que se caliente rápido con la fricción de la navaja, ya que si está caliente el bloque no se puede cortar. Preparar el baño de flotación antes de cortar (1 L de agua destilada + 0.5 g de grenetina). Colocar la navaja en el micrótopo, colocar el cubo y ajustar el portabloques, rebajar el bloque hasta alcanzar el tejido. Los cortes finales tendrán un grosor de 4 micras, una vez obtenidos los cortes se colocan con mucho cuidado en el baño de flotación para extender el tejido y después se agarra (se pesca) con el portaobjetos, para posteriormente dejarlos secar.

Procedimiento de Inmunohistoquímica

Colocar las muestras (portaobjetos) en canastillas y desparafinarlas en la estufa durante 30 minutos, después someterlas al tren de alcoholes para terminar de desparafinarlas.

Alcohol	Tiempo
Xilol I	3-5 baños
Xilol II	3-5 baños
Xilol III	3-5 baños
Alcohol etílico 100 % I	3-5 baños
Alcohol etílico 100% II	3-5 baños
Alcohol etílico 96 %	3-5 baños
Agua bidestilada	3-5 baños

Posteriormente se colocan los portaobjetos en unos recipientes especiales de plástico (coping) y se le agrega la solución recuperadora (Buffer de Citratos) hasta

cubrir los portaobjetos. Después, poner los copling en una olla de presión que se calienta con un mechero (a la olla agregarle agua, (500 mL aprox.), abajo poner una rejita y el agua tiene q ir 2 cm arriba aprox.). Esperar a que se caliente y alcance la presión, cuando suene la olla, contar 5 min y después esperar a que se enfríe la olla sola. Posteriormente, se abre la olla, se sacan los copling para abrirlos con cuidado y después se va sacando y enjuagando cada portaobjetos con agua bidestilada de una piceta, para pasarlos a otro copling que contiene agua bidestilada. Después, se van montando uno por uno los portaobjetos en los coverplate de los racks. La laminilla se saca del copling, se coloca a un lado, al coverplate se le agrega PBS evitando burbujas, colocar el portaobjetos con el tejido hacia el coverplate, atorandolo en los círculos que tiene el coverplate, apretarlo con los dedos y colocar el coverplate en los racks. Posteriormente, se le agrega PBS hasta llenar cada coverplate y se deja 5 min. No se tapa el rack. Transcurrido el tiempo, se realiza el bloqueo de la peroxidasa endógena, para lo cual se agregan **10 gotas de peróxido de hidrógeno** (Kit) y se deja durante **10 min**. No se tapa el rack. Después, se enjuaga agregando PBS hasta el tope y dejar durante 5 min. Enjuagar nuevamente con PBS y dejar y 5 min más. Posteriormente, se agregan **100 µL del anticuerpo primario** ya preparado a cada portaobjetos y se incuba durante **45 min**. De aquí en adelante si se tapa el rack. Después, se enjuaga con PBS y se deja durante 5 min. Transcurrido el tiempo, se le agregan **8 gotas del anticuerpo secundario** a cada portaobjetos y se incuba durante **30 min**. Posteriormente, enjuagar con PBS y dejar durante 5 min. Después, agregar **8 gotas de estreptavidina** (Kit) a cada portaobjetos e incubar **30 min**. Transcurrido el tiempo, se enjuaga con PBS y se deja durante 5 min. Posteriormente, se sacan los portaobjetos del rack y se colocan en una canastilla con agua bidestilada. Después, se va sacando cada uno de los portaobjetos de la canastilla y se le agregan **3 gotas del cromógeno DAB** (viene en el kit pero se prepara; 1 mL de diluyente (Kit) y 1 gota de DAB). Se prepara casi al momento de utilizar. Al observar que el tejido del portaobjetos cambia a color café claro, se enjuaga el portaobjetos con agua bidestilada de una piceta y se coloca en una canastilla que contiene agua bidestilada. Y después se vuelven a someter los portaobjetos a diferentes lavados, como se muestra en la siguiente tabla.

Solvente	Tiempo
Hematoxilina	5-8 seg. o 8 lavados
Agua corriente	10 lavados
Agua corriente	10 lavados
Agua amoniacal	10 lavados
Agua corriente	10 lavados
Alcohol etílico 96 % I	10 lavados
Alcohol etílico 96 % II	10 lavados
Alcohol etílico 100 % I	10 lavados
Alcohol etílico 100% II	10 lavados
Xilol I	10 lavados
Xilol II	10 lavados
Xilol III	10 lavados

Por último, el montaje de las muestras se realiza de la misma manera que en la técnica de histología.

NOTA: Lavar los coverplate y los racks solo con agua bidestilada y dejar secar a temperatura ambiente.

Preparación de reactivos

Solución recuperadora (Buffer de Citratos)

La solución se compra concentrada (Target Retrieval Solution, 10X, Dako) y se diluye con PBS 1X para obtener una solución recuperadora a una concentración de 1X. Ésta solución se prepara un día antes de usar.

- A 100 mL de solución recuperadora agregarle 900 mL de PBS 1X y mezclar perfectamente.

PBS 10X (solución madre)

Para preparar 1 litro de PBS 10X:

- 80 g de Cloruro de Sodio (NaCl)
- 2 g de Cloruro de Potasio (KCl)
- 11.5 g de Fosfato de Sodio Dibásico (Na_2HPO_4)
- 2 g de Fosfato de Potasio Monobásico (KH_2PO_4)

Disolver en agua destilada agregando uno a uno los reactivos y aforar a 1 litro, almacenar a 4°C.

PBS 1X (solución para usar)

Para preparar 1 L de PBS 1X:

- Se toman 100 mL de la solución madre de PBS 10X que se preparó previamente y se le agregan 900 mL de agua destilada, mezclar perfectamente. Posteriormente, se coloca el PBS 1X en frascos para esterilizarlos en el autoclave, si así se requiere. Almacenar a 4° C.

Anticuerpo primario (anticuerpo anti-insulina de conejo)

El anticuerpo de Insulina (H-86) es un anticuerpo policlonal de conejo que reconoce los aminoácidos 25-110 de insulina de origen humano. Insulin (H-86): sc-9168, Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Los demás reactivos utilizados en esta técnica, se preparan dependiendo del Kit que se compre, en este caso se utilizó el Kit LSAB+ System-HRP; K0679, Dako.

10.4. APÉNDICE 4

Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD)

Las superóxido dismutasas (SODs) son metaloenzimas que catalizan la dismutación del anión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular y por lo tanto forman una parte crucial del mecanismo de defensa antioxidante celular. El Kit de ensayo de Cayman de Superóxido dismutasa utiliza una sal de tetrazolio para la detección de radicales superóxido generados por la xantina oxidasa e hipoxantina. Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para exhibir 50% de dismutación del radical superóxido. Se utilizaron placas de 96 pozos de polivinilo. Se añadieron 200 μL del Radical Detector diluido y 10 μL de los estándares y las muestras en los pozos de la placa. Iniciar las reacciones mediante la adición de 20 μL de xantina oxidasa diluida a todos los pocillos que se está utilizando. Agitar con cuidado la placa durante unos segundos para mezclar y tapar con la cubierta de la placa. A continuación, se incubó la placa en un agitador durante 20 min a temperatura ambiente. Después de la incubación se leyó la absorbancia a 440-460 nm en un lector de placas de Bio-Tek EL800 (Bio-Tek). La densidad óptica fue inversamente proporcional a la actividad enzimática. La actividad se expresó como unidades por mililitro (U/mL). Los reactivos utilizados en esta técnica, se preparan dependiendo del Kit que se compre, en este caso se utilizó el Kit (Cayman Chemical Company; 706002).

10.5. APÉNDICE 5

Determinación de la actividad de catalasa (CAT)

La catalasa es una enzima antioxidante que está involucrada en la detoxificación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), una especie reactiva de oxígeno (ROS), que es un producto tóxico. Esta enzima cataliza la conversión de dos moléculas de H_2O_2 a oxígeno molecular y dos moléculas de agua (actividad catalítica). El Kit de ensayo de catalasa de Cayman utiliza la función peroxidática de CAT para la determinación de la actividad enzimática. El método se basa en la reacción de la enzima con metanol en presencia de una concentración óptima de H_2O_2 . El formaldehído producido se mide colorimétricamente con 4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol (Purpald) como cromógeno. Purpald forma específicamente un heterociclo bicíclico con aldehídos, que, en los cambios de oxidación, de incoloro da un color púrpura (179, 180). Se utilizaron placas de 96 pozos de polivinilo. Se añadieron 100 μ L de Buffer de Ensayo diluido, 30 μ L de metanol y 20 μ L de los estándares, la catalasa diluida (control) y las muestras en los pozos de la placa. Iniciar las reacciones mediante la adición de 20 μ L de peróxido de hidrógeno diluido a todos los pozos que se están utilizando. Luego tapar la placa con la cubierta de la placa y se incubó en un agitador durante 20 min a temperatura ambiente. Después, añadir 30 μ L de hidróxido de potasio diluido a cada pozo para terminar la reacción y luego añadir 30 μ L de Purpald (cromógeno) a cada pozo. A continuación, tapar la placa con la cubierta de la placa e incubar durante 10 min a temperatura ambiente en el agitador. Después, añadir 10 μ L Periodato de potasio a cada pozo. A continuación, tapar con la cubierta de placa e incubar 5 min a temperatura ambiente en un agitador. Después de la incubación, se leyó la absorbancia a 540 nm en un lector de placas de Bio-Tek EL800 (Bio-Tek). La densidad óptica fue inversamente proporcional a la actividad enzimática. Los reactivos utilizados en esta técnica, se preparan dependiendo del Kit que se compre, en este caso se utilizó el Kit (Cayman Chemical Company; 707002).

10.6. APÉNDICE 6

Determinación de la actividad de glutatión peroxidasa (GPx)

La glutatión peroxidasa (GPx) cataliza la reducción de hidroperóxidos, incluyendo peróxido de hidrógeno, por la reducción de glutatión y las funciones para proteger a la célula del daño oxidativo. El Kit de ensayo de GPx de Cayman mide la actividad de GPx indirectamente por una reacción acoplada con la glutatión reductasa (GR). El glutatión oxidado (GSSG), producido después de la reducción de hidroperóxido por GPx, se recicla a su estado reducido por GR y NADPH. La oxidación de NADPH a NADP^+ se acompaña de una disminución de la absorbancia a 340 nm. En condiciones en que la actividad GPx es limitante de la velocidad, la velocidad de disminución de la absorbancia a 340 nm es directamente proporcional a la actividad de GPx en la muestra (181). Se utilizaron placas de 96 pozos de polivinilo. Se añadieron 100 μL de Buffer de ensayo, 50 μL de la mezcla de Co-sustrato, y 20 μL de GPx diluido (control) y las muestras en los pozos de la placa. Iniciar las reacciones mediante la adición de 20 μL de hidroperóxido de cumeno a todos los pozos que se están utilizando. Luego agitar cuidadosamente la placa durante unos segundos para mezclar y después se leyó la absorbancia a 340 nm en un lector de placas de Bio-Tek EL800 (Bio-Tek). La densidad óptica fue inversamente proporcional a la actividad enzimática. Los reactivos utilizados en esta técnica, se preparan dependiendo del Kit que se compre, en este caso se utilizó el Kit (Cayman Chemical Company; 703102).

10.7. APÉNDICE 7

Contenido de Fenoles Totales (CFT)

Método modificado de Singleton (182)

La concentración de fenoles totales (CFT) se mide por espectrofotometría en 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 (183).

Se utiliza una solución estándar de ácido gálico de 0.2 mg/mL (se pesa 1 mg de ácido gálico en 5 mL de agua destilada, para que quede a la concentración 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. Tabla.

Para el análisis de fenoles totales del extracto, se prepara una solución estándar (0.2 mg/mL; se pesa 1 mg de extracto en 5 mL de metanol, para que quede a la concentración de 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.

A continuación se adicionan 500 μ L de reactivo Folin-Ciocalteu. Después de 5 min se añaden 1.5 mL de una solución de Carbonato de Sodio (Na_2CO_3) (200 g/L).

Después de 2 h de reacción a temperatura ambiente se determina la absorbancia a 760nm. Cada concentración se determina por triplicado.

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

Curva patrón de ácido gálico.

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

10.8. APÉNDICE 8

Contenido de Flavonoides Totales

Método de Dowd (145)

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

PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN STOCK:

1 mg de quercetina - 1 mL de MeOH

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

Curva patrón de quercetina.

[quercetina] µg/mL	µL STOCK	µL MeOH	mL AlCl ₃ al 2%
1	3	2997	3
2	6	2994	3
3	9	2991	3
4	12	2988	3
5	15	2985	3
6	18	2982	3
7	21	2979	3
8	24	2976	3
9	27	2973	3
10	30	2970	3
20	60	2940	3
30	90	2910	3
40	120	2880	3
50	150	2850	3
60	180	2820	3
70	210	2790	3
80	240	2760	3
90	270	2730	3
100	300	2700	3
Problema	3 mL	0	3

PREPARACIÓN DEL EXTRACTO EN SOLUCIÓN:

Concentración a probar: 0.2 mg – 1 mL de MeOH

0.2 mg – 1 mL de MeOH

X – 3mL de MeOH

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

Considerando que no se puede pesar 0.6 mg en la balanza analítica, se pesa 1 mg de extracto y se disuelve en 5 mL de metanol para que quede a la concentración de 0.2 mg/mL. Para comenza la reacción se utiliza cloruro de aluminio (AlCl_3) al 2% en metanol.

En una placa de ELISA se adicionarán 200 μL de la curva de quercetina a diferentes concentraciones (1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y de la solución muestra (extracto) por triplicado. Se tiene que agregar también por triplicado el metanol, el cloruro de aluminio con metanol (preparado), la solución de extracto con metanol, la solución de extracto con metanol mas cloruro de aluminio (toda la reacción), para realizar diversas fórmulas y poder obtener los resultados del contenido total de flavonoides en el extracto.

LECTURA:

- Después de 10 min de reacción a temperatura ambiente se determina la absorbancia a 415 nm.
- Los resultados se expresan como equivalentes de quercetina/g de extracto (eqQ/g).

10.9. APÉNDICE 9

Capacidad antioxidante (146)

Método de reducción del radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH)

La capacidad 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, por medio de espectrometría UV-VIS.

Preparación del Stock

Se prepara un stock del extracto, pesar 5 mg de muestra y disolverlos en 5 mL de metanol (MeOH) grado HPLC.

Las concentraciones del extracto o fracción a probar serán las siguientes 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µg/mL. Las cuales se prepararan siguiendo la tabla, en frascos de 1 mL.

Del stock (5 mg de muestra en 5 mL)

µg/mL	µL de Stock	µL de MeOH
1	4	996
2	8	992
4	16	984
6	24	976
8	32	968
10	40	960
15	60	940
20	80	920
25	100	900
30	120	880
40	160	840
50	200	800
60	240	760
70	280	720
80	320	680
90	360	640
100	400	600

Preparación del DPPH.

- Para preparar 100 mL de DPPH:

Se pesa 0.0039 g (0.004 g) de DPPH en 100 mL de MeOH grado HPLC.

- Para preparar 50 mL de DPPH:

Se pesa 0.0019 g (0.002 g) de DPPH en 50 mL de MeOH grado HPLC.

Se coloca en un matraz aforado y se cubre con papel aluminio. Es importante utilizar guantes al preparar el DPPH y al ponerlo en los pozos.

En una placa de ELISA se adicionarán 100 μ L de la solución problema a diferentes concentraciones (1-100 μ g/mL) por triplicado, posteriormente a cada pozo con las concentraciones señaladas, se adicionaron 100 μ L de una solución metanólica de DPPH cuya concentración final fue de 100 μ M; inmediatamente se protege de la luz envolviendo la placa con papel aluminio 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. Como blanco se utilizó metanol grado HPLC (100 μ L por triplicado), como control negativo fue utilizada una solución de DPPH (100 μ L por triplicado) y como control positivo se usa quercetina a las mismas condiciones que el compuesto problema. Los valores de la capacidad antioxidante se determinaron de acuerdo con la siguiente ecuación:

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

En donde:

C= Absorbancia del control (DPPH)

E= Absorbancia de la muestra (DPPH + compuesto problema).

La concentración que conduce a un 50% de la capacidad antioxidante (CA_{50}) se determinó gráficamente.

10.10. APÉNDICE 10

Capacidad antioxidante de las fracciones del propóleo

Método de reducción del radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH). Método modificado de Franco, 2006(146).

Para evaluar la capacidad antioxidante de cada una de las fracciones del extracto, se siguió la misma metodología utilizada en la evaluación del propóleo completo, modificando solamente las concentraciones a evaluar.

Preparación del Stock

Se prepara un stock cada una de las fracciones a probar, pesar 5 mg de la fracción y disolverlos en 5 mL de metanol (MeOH) grado HPLC.

Las concentraciones de la fracción a probar serán las siguientes 30, 50, 100, 300, 500 y 700 µg/mL. Las cuales se prepararan siguiendo la tabla, en frascos de 1 mL.

Del stock (5 mg de la fracción en 5 mL)

µg/mL	µL de Stock	µL de MeOH
30	30	970
50	50	950
100	100	900
300	300	700
500	500	500
700	700	300

El DPPH se utiliza y prepara a la misma concentración que en la técnica anterior, además, el procedimiento para colocar en la placa de ELISA las diferentes concentraciones de la fracción a probar también sigue como marca la técnica previamente descrita (APÉNDICE 9).

10.11. APÉNDICE 11

Tiempo de retención y $\lambda_{\text{máx}}$ de cada uno de los compuestos identificados mediante HPLC en cada una de las fracciones obtenidas en la Cromatografía en columna del Propóleo de Chihuahua.

Fracción	Pico identificado	TR (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Compuesto
2	1	6.64	216, 274	Cafeína
4	1	15.95	210, 228, 290	Pinocembrina
7	1	9.82	210, 228, 290	Pinocembrina
10	1	9.70	214, 230, 290	Pinocembrina
11	1	10.42	220, 292	Naringenina
12	1	4.00	214, 256	Genisteína
	2	8.88	210, 228, 290	Pinocembrina
13	1	9.60	210, 228, 290	Pinocembrina
13A	1	9.02	210, 228, 290	Pinocembrina
13B	1	9.75	214, 228, 290	Naringenina
	2	16.37	210, 230, 290	Pinocembrina
14	1	9.07	210, 228, 290	Pinocembrina
14A	1	9.46	210, 228, 290	Pinocembrina
15	1	9.95	210, 228, 290	Pinocembrina
15A	1	9.92	210, 228, 290	Pinocembrina
15B	1	10.11	210, 228, 290	Pinocembrina
15C	1	9.70	210, 228, 290	Pinocembrina
15D	1	9.90	210, 228, 290	Pinocembrina
16	1	9.02	210, 228, 290	Pinocembrina
16A	1	8.57	210, 228, 290	Pinocembrina
16B	1	8.52	210, 228, 290	Pinocembrina
17	1	9.23	210, 228, 290	Pinocembrina
	2	11.45	212, 294	Pinocembrina
18	1	8.87	216, 230, 296	Naringenina
	2	10.11	210, 292	Pinocembrina
18B	1	8.37	210, 228, 290	Pinocembrina
	2	8.81	212, 228, 294	Pinocembrina
	3	10.23	212, 230, 294	Pinocembrina
	4	12.63	210, 230, 292	Pinocembrina*
	5	14.71	212, 296	Pinocembrina
19	1	12.09	210, 266, 314	Crisina
	2	15.27	208, 266, 326	Crisina*
19B	1	13.24	210, 266, 314	Crisina
20	1	8.51	204, 256, 268, 358	Kaempferol*
	2	13.56	210, 268, 314	Crisina
20A	1	5.20	214, 228, 290	Naringenina

	2	7.97	210, 266, 348	Apigenina
	3	8.78	204, 256, 268, 354	Kaempferol
	4	14.32	208, 268, 318	Crisina
20B	1	5.23	212, 226, 290	Naringina
	2	8.04	208, 266, 344	Apigenina*
	3	8.94	204, 254, 268, 354	Luteolina
	4	14.41	210, 268, 316	Crisina
	5	19.08	212, 268, 336	Acacetina*
20C	1	5.13	212, 226, 290	Naringina
	2	7.74	210, 266, 344	Apigenina
	3	8.55	204, 254, 268, 356	Luteolina
	4	13.71	210, 268, 316	Crisina
20D	1	4.74	212, 288	Naringenina
	2	5.02	212, 230, 290	Naringenina
	3	8.24	204, 254, 266, 354	Quercetina
	4	13.11	210, 268, 314	Crisina
	5	16.78	266, 348	Acacetina
21	1	4.69	210, 286	Naringenina
	2	12.75	210, 268, 314	Crisina
21A	1	8.63	210, 230, 290	Pinocembrina
	2	12.57	210, 268, 314	Crisina
	3	16.03	268, 348	Acacetina
22	1	3.22	222, 298	Naringenina
23	1	3.29	222, 266, 296	Naringenina
	2	7.01	224, 266, 370	Kaempferol
	3	7.37	206, 266, 304	Apigenina
23A	1	3.34	220, 298, 308	Naringenina
	2	7.60	266, 368	Kaempferol
	3	14.45	266, 350	Crisina
	4	22.42	204, 272, 332	Acacetina
24A	1	3.84	224, 284	Naringina
	2	7.28	266, 366	Kaempferol
25	1	3.86	226, 284	Naringina
	2	6.30	228, 288	Pinocembrina
	3	7.32	268, 368	Kaempferol
	4	8.13	202, 256, 370	Quercetina
25A	1	3.81	226, 286	Naringina
	2	6.91	266, 368	Kaempferol
	3	7.64	202, 254, 372	Quercetina
26	1	11.01	260, 354	Kaempferol
26A	1	4.51	210, 282	Catequina
	2	6.36	214, 286	Acido gálico
	3	14.08	206, 226, 266, 328	Crisina
27	1	4.27	204, 288	Catequina
	2	5.41	204, 264, 324	Catequina

	3	6.81	202, 264, 370	Kaempferol
	4	7.53	204, 254, 370	Quercetina
	6	10.84	262, 250	Kaempferol
27A	1	7.27	266, 366	Kaempferol
	2	8.10	204, 254, 368	Quercetina
	4	11.74	262, 352	Kaempferol
28	1	11.68	260, 352	Kaempferol
28A	1	11.73	262, 354	Kaempferol
29	1	10.41	260, 350	Kaempferol
29A	1	6.04	216	Catequina
	2	6.90	216, 268	Catequina
30	1	11.49	260, 300, 352	Kaempferol
30A	1	10.95	204, 256, 270, 356	Kaempferol
	2	11.52	262, 300, 352	Kaempferol
31	1	4.46	214, 286	Catequina
	2	10.30	210, 264, 312	Crisina
	3	11.08	262, 300, 352	Kaempferol
31A	1	5.46	202, 292	Catequina
	2	9.11	210, 264, 320	Crisina
	3	10.86	204, 256, 268, 358	Quercetina
	4	11.47	202, 260, 350	Kaempferol
32	1	6.38	210, 230, 286	Naringenina*
	2	9.39	210, 264, 316	Crisina
32A	1	9.22	210, 264, 320	Crisina
33	1	6.34	214, 282	Catequina
	2	11.06	204, 256, 270, 358	Quercetina
	3	11.63	260, 300, 350	Kaempferol
34	1	11.03	202, 256, 268, 358	Kaempferol
35	1	6.13	216, 286	Catequina
36	1	11.13	206, 256, 270, 358	Kaempferol
37	1	3.65	224, 284	Naringina*
	2	10.56	204, 256, 270, 358	Kaempferol
38	1	4.30	226, 284	Naringenina
	2	11.27	206, 258, 270, 358	Kaempferol
39	1	4.36	226, 284	Naringina
	2	11.81	204, 256, 270, 356	Kaempferol
	3	12.41	260, 352	Kaempferol
42	1	5.53	204, 254, 270, 356	Quercetina
	2	10.74	204, 254, 270, 356	Kaempferol
	3	11.28	264, 304, 356	Kaempferol
43	1	5.57	204, 254, 270, 356	Quercetina
	2	11.04	204, 254, 270, 356	Kaempferol
	3	11.59	260, 252	Kaempferol
44	1	5.71	204, 256, 268, 356	Quercetina
	2	11.28	204, 256, 268, 356	Luteolina

	3	11.83	260, 300, 354	Kaempferol
45	1	5.54	204, 256, 268, 356	Quercetina
	2	10.79	204, 256, 268, 356	Kaempferol
	3	11.37	260, 300, 352	Kaempferol
46	1	5.40	210, 256, 266, 356	Quercetina*
	2	10.40	256, 270, 358	Kaempferol
	3	10.99	260, 352	Kaempferol
47	1	4.40	210	Catequina
	2	5.25	208, 254, 270, 356	Quercetina
	3	9.99	210, 254, 270, 356	Kaempferol
	4	10.55	262, 354	Kaempferol
48	1	5.40	210, 254, 270, 356	Quercetina*
	2	10.43	210, 254, 268, 358	Kaempferol
	3	11.01	260, 298, 352	Kaempferol
49	1	6.25	204, 256, 270, 354	Quercetina
	2	6.62	260, 300, 358	Quercetina
	3	11.10	210, 228, 294	Pinocembrina
50	1	5.34	256, 356	Quercetina
	2	8.61	210, 230, 290	Pinocembrina
	3	10.88	260, 300, 352	Kaempferol
51	1	11.51	260, 300, 360	Kaempferol
53	1	8.92	210, 266, 244	Apigenina
	2	9.88	204, 254, 268, 352	Kaempferol
	3	16.07	210, 268, 316	Crisina
54	1	12.43	260, 294, 354	Kaempferol
55	1	6.36	214	Catequina

*Compuestos que coinciden en un 99% con los estándares, con base en el tiempo de retención y $\lambda_{\text{máx}}$. Todos los demás compuestos identificados coinciden en más de un 90% con cada estandar referido.

10.12. APÉNDICE 12

Tiempo de retención de cada uno de los compuestos identificados mediante GC-MS en cada una de las fracciones obtenidas en la Cromatografía en columna del Propóleo de Chihuahua.

Fracción	Compuesto identificado	TR (min)	Fracción	Compuesto identificado	TR (min)	
2	2-Heptadecanona	14.61	19	Nonadecano	13.87	
	Ácido Palmítico	14.73		Octadecano	15.22	
	Ácido Mirístico	15.14		Tricosano	17.11	
	Ácido Octadecenoico	15.92		Crisina	21.37	
	2-Nonadecanona	15.95		2-Nonadecanona	17.23	
	Ácido Eicosanoico	17.32		Pinocembrina	19.08	
	Ácido Docosanoico	18.86		Naringenina	20.04	
	Ácido Tetracosanoico	21.01		Tridecano	5.87	
	Eicosano	21.87		Hexadecano	11.97	
3	Ácido Palmítico	14.73	20	Tetradecanal	13.12	
	Ácido Octadecenoico	15.92		Ácido Oleico	14.97	
	2-Nonadecanona	15.95		Ácido Palmítico	15.80	
	Eicosano	16.79		Crisina	21.43	
	2-Nonadecanona	17.22		Octadecano	15.87	
	Ácido Docosanoico	18.86		Crisina	21.48	
	Ácido Tetracosanoico	21.00		Eicosano	14.55	
4	Chalcona Pinostrobina	18.28	21	Heptadecano	15.88	
9	Ácido Palmítico	14.46		Octadecano	13.87	
	Ácido Octadecenoico	17.75		Eicosano	15.23	
12	Tectocrisina	20.26		Nonadecano	15.87	
13	Pinocembrina	19.24		Ácido Bezoico	12.15	
14	Pinocembrina	19.04		Ácido Palmítico	14.71	
15	Pinocembrina	19.20		Ácido Octadecanoico	15.90	
	Pinocembrina	19.26		Nonadecanona	15.93	
	16	Heptacosano		14.95	Ácido Heptadecanoico	16.03
		Octacosano		18.23	Crisina	21.36
		Heptacosano		21.56	Ácido Decanoico	21.90
17	Tricosano	21.59		Eicosano	14.55	
	Eicosano	21.61		Chalcona Pinostrobina	21.43	
	17	Pinocembrina		19.04	Ácido Palmítico	16.41
		Naringenina	21.80	Vitamina E	16.89	
18	Apigenina	21.99	22	Octadecanal	16.70	
	Naringenina	20.69		Ácido Octadecanoico	17.71	
	Pinocembrina	19.10		Pentadecanal	18.07	
18	Crisina	21.78		Ácido Decanedioico	21.90	

23	Hexadecanal	15.42	32	Ácido Heptadecanoico	16.04	
	1-Nonadeceno	15.85		Ácido Hexadecanoico	16.41	
	Pentadecanal	16.08		Nonadecano	16.49	
	Octadecanal	17.36		1-Nonadeceno	16.93	
	Ácido Octadecanoico	17.72		Heneicosano	17.79	
	Ácido Palmítico	16.41		1-Docoseno	18.07	
24	Octadecanal	15.42	33	Heptadecano	18.85	
	10-Heneicoseno	15.84		Octacosano	21.88	
	9-Tricoseno	17.09		Tricosano	17.13	
25	Hexadecanal	15.41	34	Nonadecano	17.81	
	Ácido Octadecanoico	17.70		Octadecano	13.82	
26	Octadecanal	15.41	35	Hexadecano	13.86	
	Eicosano	15.86		Nonadecano	14.53	
	Hexadecano	16.48		Eicosano	15.21	
	Heptadecano	17.11		Pentadecanal	15.41	
	Octadecano	13.82		Heneicosano	15.86	
	Octadecanal	15.41		Tetratetracontano	17.11	
	Heneicosano	15.86		Octacosano	21.89	
	Nonadecano	17.79		Eicosano	15.97	
27	Hexacosano	19.49	36	Heptadecano	17.79	
	Octadecanal	15.41		Heneicosano	18.57	
	Hexadecanal	18.07		Octacosano	19.48	
28	Ácido Benzoico	8.66	37	Heneicosano	15.88	
	Tetradecanal	15.43		Eicosano	16.50	
	Octadecanal	16.71		Eicosano	16.50	
	Eicosano	17.13		Eicosano	17.12	
	Pentadecano	18.09		Eicosano	17.13	
	Eicosano	15.88		Eicosano	16.50	
	Octacosano	17.80		43	1-Nonadeceno	16.34
	Hepadecano	18.58			Eicosano	17.79
29	Nonadecano	21.89	46	Octadecanal	18.07	
	Octadecanal	15.41		44	Tetradecanal	16.70
	2-Nonadecanona	15.93		46	Tetradecano	10.20
	Ácido Octadecanoico	17.70			Hexadecano	12.22
	Ácido Hexadecanoico	16.42			Ácido Palmítico	14.98
	Heptadecano	16.50			Eicosano	18.09
	Eicosano	17.12			Heptadecano	18.25
	Ácido Octadecanoico	17.72			Tritriacontano	18.29
Octacosano	18.58	Heneicosano	18.43			
30	Tridecano	8.36	47		Eicosano	18.33
	Tetradecano	10.11	51	Octadecanal	16.70	
	Hexadecano	12.20	54	Octadecanal	16.70	
	Lupeol	16.67	55	Hexadecano	11.79	
	Eicosano	14.57		Ácido Palmítico	14.96	
31	Eicosano	15.24		Tetradecanal	15.41	

	Nonadecano	15.88		Ácido Octadecanoico	16.29
	1-Nonadeceno	16.68			
32	Eicosano	15.21			
	Octadecanal	15.41			

11. REFERENCIAS

1. Organization WH. Global report on diabetes. 2016.
2. Hernández-Ávila M, Gutiérrez JP, Reynoso-Noverón N. Diabetes mellitus in Mexico: Status of the epidemic. *salud pública de méxico*. 2013;55:s129-s36.
3. Federation ID. IDF diabetes atlas: International Diabetes Federation, Executive Office; 2011.
4. Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*. 2014;37(Supplement 1):S81-S90.
5. Vazquez CCP. Evaluación del efecto hipoglucemiante de un sesquiterpeno (Eudesmano) aislado de *Verbesina persicifolia* DC. Mexico, D.F.: UNAM; 2013.
6. García RE. Caracterización del Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF) en la fisiopatogenia de la diabetes mellitus tipo 2 en un modelo murino. México, D. F.: UNAM; 2012.
7. Gayton A, Hall J. Tratado de fisiología médica Mc-Graw-Hill Interamericana de España. Madrid; 2001.
8. Harrison TR, Cosendey CH. Principios de medicina interna 2006.
9. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2006;6(10):772-83.
10. Soledad Abilés J. Estrés oxidativo y su relación con el aporte de antioxidantes nutricionales en el paciente crítico. 2007.
11. Cabrera TC, Serrano DS. Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. *Rev Cubana Cardiol*. 2000;14(1):55-60.
12. Serrano MD, López ML, Espuñes TdR. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 2006;37(004):58-68.
13. Hernández JC, Puig MEL, García PH, Marcel EAA, Quesada MY. Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *Rev Mex Patol Clin*. 2011;58(1):4-15.
14. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*. 1991;40(4):405-12.
15. Van Dam P, Bravenboer B, Van Asbeck B, Van Oirschot J, Marx J, Gispen W. Effects of insulin treatment on endoneurial and systemic oxidative stress in relation to nerve conduction in streptozotocin-diabetic rats. *European journal of clinical investigation*. 1996;26(12):1143-9.
16. Pieper GM, Siebeneich W, Roza AM, Jordan M, Adams MB. Chronic treatment in vivo with dimethylthiourea, a hydroxyl radical scavenger, prevents diabetes-induced endothelial dysfunction. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1996;28(6):741-5.
17. Bucala R, Makita Z, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H. Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993;90(14):6434-8.
18. Feldman EL, Stevens MJ, Greene DA. Clinical management of diabetic neuropathy. *Clinical Management of Diabetic Neuropathy*: Springer; 1998. p. 89-105.

19. Cheng AY, Fantus IG. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Canadian Medical Association Journal*. 2005;172(2):213-26.
20. Olivares-Reyes JA, Arellano Plancarte A. Bases moleculares de las acciones de la insulina. *REB*. 2008;27(1):9-18.
21. Evans M, Schumm-Draeger PM, Vora J, King AB. A review of modern insulin analogue pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles in type 2 diabetes: improvements and limitations. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2011;13(8):677-84.
22. Rhodes CJ. Procesamiento de la molecula de insulina. In: Leroith D, Taylor SI, Olefsky JM, editors. *Diabetes mellitus: texto basico y clinico*. 2da. ed: MCGRAW-HILL.; 2003. p. 24-47.
23. Flakoll PJ, Carlson MG, Cherrington AD. Accion fisiologica de la insulina. In: LeRoith D, Taylor SI, Olefsky JM, editors. *Diabetes mellitus: texto basico y clinico*. 2da. ed: MCGRAW-HILL.; 2003. p. 184-200.
24. Joshi SR, Parikh RM, Das AK. Insulin--history, biochemistry, physiology and pharmacology. *The Journal of the Association of Physicians of India*. 2007;55 Suppl:19-25.
25. Ueki K, Kahn CR. Bioquimica de la accion de la insulina. In: LeRoith D, Taylor SI, Olefsky JM, editors. *Diabetes mellitus: texto basico y clinico*. 2da. ed: MCGRAW-HILL.; 2003. p. 227-39.
26. Leibiger IB, Leibiger B, Moede T, Berggren PO. Exocytosis of insulin promotes insulin gene transcription via the insulin receptor/PI-3 kinase/p70 s6 kinase and CaM kinase pathways. *Molecular cell*. 1998;1(6):933-8.
27. Kulkarni RN, Bruning JC, Winnay JN, Postic C, Magnuson MA, Kahn CR. Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell*. 1999;96(3):329-39.
28. Rahier J, Goebbels RM, Henquin JC. Cellular composition of the human diabetic pancreas. *Diabetologia*. 1983;24(5):366-71.
29. Dean PM. Ultrastructural morphometry of the pancreatic -cell. *Diabetologia*. 1973;9(2):115-9.
30. Maechler P. Mitochondrial function and insulin secretion. *Molecular and cellular endocrinology*. 2013;379(1-2):12-8.
31. Huypens P, Ling Z, Pipeleers D, Schuit F. Glucagon receptors on human islet cells contribute to glucose competence of insulin release. *Diabetologia*. 2000;43(8):1012-9.
32. Schuit FC, Huypens P, Heimberg H, Pipeleers DG. Glucose sensing in pancreatic beta-cells: a model for the study of other glucose-regulated cells in gut, pancreas, and hypothalamus. *Diabetes*. 2001;50(1):1-11.
33. Rubi B, Maechler P. Minireview: new roles for peripheral dopamine on metabolic control and tumor growth: let's seek the balance. *Endocrinology*. 2010;151(12):5570-81.
34. Maechler P, Carobbio S, Rubi B. In beta-cells, mitochondria integrate and generate metabolic signals controlling insulin secretion. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2006;38(5-6):696-709.
35. Mukherjee PK, Maiti K, Mukherjee K, Houghton PJ. Leads from Indian medicinal plants with hypoglycemic potentials. *Journal of ethnopharmacology*. 2006;106(1):1-28.
36. Al-Hariri M, Eldin TG, Abu-Hozaifa B, Elnour A. Glycemic control and anti-osteopathic effect of propolis in diabetic rats. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy*. 2011;4:377-84.
37. El-Awady MS, El-Agamy DS, Suddek GM, Nader MA. Propolis protects against high glucose-induced vascular endothelial dysfunction in isolated rat aorta. *Journal of physiology and biochemistry*. 2014;70(1):247-54.

38. Lebovitz HE. Secretagogos de insulina. Sulfonilureas y meglitinidas. In: LeRoith D, Taylor SI, Olefsky JM, editors. Diabetes mellitus: texto basico y clinico. 2da. ed: MCGRAW-HILL.; 2003. p. 960-9.
39. Nogueira C, Souto SB, Vinha E, Braga DC, Carvalho D. Oral glucose lowering drugs in type 2 diabetic patients with chronic kidney disease. Hormones. 2013;12(4):483-94.
40. Bryan J, Crane A, Vila-Carriles WH, Babenko AP, Aguilar-Bryan L. Insulin secretagogues, sulfonilurea receptors and K(ATP) channels. Current pharmaceutical design. 2005;11(21):2699-716.
41. Das SK, Chakrabarti R. Non-insulin dependent diabetes mellitus: present therapies and new drug targets. Mini reviews in medicinal chemistry. 2005;5(11):1019-34.
42. Sebastian-Ochoa A, Fernandez-Garcia D, Rozas-Moreno P, Reyes-Garcia R, Lopez-Ibarra PJ, Fernandez-Garcia JM. Diabetes neonatal: implicaciones de la genética en el tratamiento. Endocrinol Nutr. 2008;55(3):142-5.
43. Olokoba AB, Obateru OA, Olokoba LB. Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. Oman medical journal. 2012;27(4):269-73.
44. Fuhlendorff J, Rorsman P, Kofod H, Brand CL, Rolin B, MacKay P, et al. Stimulation of insulin release by repaglinide and glibenclamide involves both common and distinct processes. Diabetes. 1998;47(3):345-51.
45. Garber AJ. Metformina. In: LeRoith D, Taylor SI, Olefsky JM, editors. Diabetes mellitus: texto basico y clinico. 2da. ed: MCGRAW-HILL; 2003. p. 970-82.
46. Stith BJ, Woronoff K, Wiernsperger N. Stimulation of the intracellular portion of the human insulin receptor by the antidiabetic drug metformin. Biochemical pharmacology. 1998;55(4):533-6.
47. Hamann A, Benecke H, Greten H, Matthaer S. Metformin increases glucose transporter protein and gene expression in human fibroblasts. Biochemical and biophysical research communications. 1993;196(1):382-7.
48. Wu MS, Johnston P, Sheu WH, Hollenbeck CB, Jeng CY, Goldfine ID, et al. Effect of metformin on carbohydrate and lipoprotein metabolism in NIDDM patients. Diabetes Care. 1990;13(1):1-8.
49. Kecskemeti V, Bagi Z, Pacher P, Posa I, Kocsis E, Koltai MZ. New trends in the development of oral antidiabetic drugs. Current medicinal chemistry. 2002;9(1):53-71.
50. Lalau JD. Lactic acidosis induced by metformin: incidence, management and prevention. Drug safety. 2010;33(9):727-40.
51. Fujiwara T, Okuno A, Yoshioka S, Horikoshi H. Suppression of hepatic gluconeogenesis in long-term Troglitazone treated diabetic KK and C57BL/KsJ-db/db mice. Metabolism: clinical and experimental. 1995;44(4):486-90.
52. Foyt HL, Ghazzi MN, Hanley RM, Saltiel AR, Whitcomb RW. Tiazolidinedionas. In: LeRoith D, Taylor SI, Olefsky JM, editors. Diabetes mellitus: texto basico y clinico. 2da. ed: MCGRAW-HILL.; 2003. p. 982-93.
53. Magner J, Amatruda JM. Inhibidores de α -glucosidasa en el tratamiento de la diabetes. In: LeRoith D, Taylor SI, Olefsky JM, editors. Diabetes mellitus: texto basico y clinico. 2da. ed: MCGRAW-HILL. p. 994-1000.
54. Bischoff H. Pharmacology of alpha-glucosidase inhibition. Eur J Clin Invest. 1994;24 Suppl 3:3-10.
55. Rabasa-Lhoret R, Chiasson JL. Potential of alpha-glucosidase inhibitors in elderly patients with diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. Drugs & aging. 1998;13(2):131-43.
56. Saxena A, Vikram NK. Role of selected Indian plants in management of type 2 diabetes: a review. The Journal of Alternative & Complementary Medicine. 2004;10(2):369-78.
57. Sepúlveda-Jiménez G, Porta-Ducoin H, Rocha-Sosa M. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. Revista Mexicana de Fitopatología. 2003;21(3):355-62.

58. Vanaclocha BV, Folcara SC. *Fitoterapia: vademécum de prescripción*: Masson Barcelona; 2003.
59. Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of ethnopharmacology*. 2005;100(1):114-7.
60. Oladayo MI. Nigerian propolis improves blood glucose, glycated hemoglobin A1c, very low-density lipoprotein, and high-density lipoprotein levels in rat models of diabetes. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*. 2016;5(3):233.
61. Zhu W, Chen M, Shou Q, Li Y, Hu F. Biological activities of Chinese propolis and Brazilian propolis on streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011;2011.
62. El-Sayed E-SM, Abo-Salem OM, Aly HA, Mansour AM. Potential antidiabetic and hypolipidemic effects of propolis extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009;22(2).
63. Matsui T, Ebuchi S, Fujise T, Abesundara KJ, Doi S, Yamada H, et al. Strong antihyperglycemic effects of water-soluble fraction of Brazilian propolis and its bioactive constituent, 3, 4, 5-tri-O-caffeoylquinic acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2004;27(11):1797-803.
64. Burdock G. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical toxicology*. 1998;36(4):347-63.
65. Sommez S, Kirilmaz L, Yucesoy M, Yücel B, Yılmaz B. The effect of bee propolis on oral pathogens and human gingival fibroblast. *Journal of ethnopharmacology*. 2005;102:371-6.
66. Salatino A, Teixeira ÉW, Negri G. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2005;2(1):33-8.
67. Sforcin J. Propolis and the immune system: a review. *Journal of ethnopharmacology*. 2007;113(1):1-14.
68. Jaganathan SK, Mandal M. Antiproliferative effects of honey and of its polyphenols: a review. *BioMed Research International*. 2009;2009.
69. Lotti C, Campo Fernandez M, Piccinelli AL, Cuesta-Rubio O, Márquez Hernández I, Rastrelli L. Chemical constituents of red Mexican propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010;58(4):2209-13.
70. Vargas-Sánchez RD, TORRESCANO-URRUTIA GR, Sánchez-Escalante A. El propóleo: conservador potencial para la industria alimentaria. *Interciencia*. 2013;38(10):705.
71. Uzel A, Öñçağ Ö, Çoğulu D, Gençay Ö. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological research*. 2005;160(2):189-95.
72. Gómez-Romero M, Arráez-Román D, Moreno-Torres R, García-Salas P, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Antioxidant compounds of propolis determined by capillary electrophoresis–mass spectrometry. *Journal of separation science*. 2007;30(4):595-603.
73. Kuropatnicki AK, Szliszka E, Krol W. Historical aspects of propolis research in modern times. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013;2013.
74. Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*. 1995;26(2):83-99.
75. Castaldo S, Capasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*. 2002;73:S1-S6.
76. Farré R, Frasquet I, Sánchez A. *El própolis y la salud*. 2004.
77. Bankova V. Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*. 2009;1(2):23-8.
78. Rivera-Yáñez N. *Comparación de las propiedades biológicas del propóleo de diferentes estados de la República Mexicana*. . Mexico, D.F.: IPN; 2013.

79. Grange J, Davey R. Antibacterial properties of propolis (bee glue). *Journal of the Royal Society of Medicine*. 1990;83(3):159-60.
80. Asís M. Los productos de la colmena. Composición y uso de la miel, cera, polen, jalea real, propoleo y veneno de las abejas. 1988.
81. Ahn M-R, Kumazawa S, Usui Y, Nakamura J, Matsuka M, Zhu F, et al. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry*. 2007;101(4):1383-92.
82. Lotfy M. Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2006;7(1):22-31.
83. Hernandez J, Goycoolea FM, Quintero J, Acosta A, Castañeda M, Dominguez Z, et al. Sonoran propolis: chemical composition and antiproliferative activity on cancer cell lines. *Planta medica*. 2007;73(14):1469-74.
84. Marcucci MC, Ferreres F, Garcia-Viguera C, Bankova V, De Castro S, Dantas A, et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of ethnopharmacology*. 2001;74(2):105-12.
85. Lu L-C, Chen Y-W, Chou C-C. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*. 2005;102(2):213-20.
86. Vargas-López ES. Actividad antimicrobiana del extracto metanólico de un propóleo de Chihuahua. México, D. F.: UNAM; 2017.
87. Amoros M, Lurton E, Boustie J, Girre L, Sauvager F, Cormier M. Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-but-2-enyl caffeate. *Journal of natural products*. 1994;57(5):644-7.
88. Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of ethnopharmacology*. 1999;64(3):235-40.
89. Banskota AH, Tezuka Y, Midorikawa K, Matsushige K, Kadota S. Two novel cytotoxic benzofuran derivatives from Brazilian propolis. *Journal of Natural Products*. 2000;63(9):1277-9.
90. Oršolić N, Knežević AH, Šver L, Terzić S, Bašić I. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *Journal of ethnopharmacology*. 2004;94(2):307-15.
91. Mishima S, Inoh Y, Narita Y, Ohta S, Sakamoto T, Araki Y, et al. Identification of caffeoylquinic acid derivatives from Brazilian propolis as constituents involved in induction of granulocytic differentiation of HL-60 cells. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2005;13(20):5814-8.
92. Cardile V, Panico A, Gentile B, Borrelli F, Russo A. Effect of propolis on human cartilage and chondrocytes. *Life Sciences*. 2003;73(8):1027-35.
93. Hu F, Hepburn H, Li Y, Chen M, Radloff S, Daya S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *Journal of ethnopharmacology*. 2005;100(3):276-83.
94. Dantas AP, Olivieri BP, Gomes FH, De Castro SL. Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected mice with propolis promotes changes in the immune response. *Journal of ethnopharmacology*. 2006;103(2):187-93.
95. Machado GMdC, Leon LL, Castro SLd. Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of *Leishmania*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2007;102(1):73-7.
96. Balderas-Cordero D. Actividad anti-leishmánica del propóleo de Chihuahua. México, D. F.: UNAM; 2016.
97. Wang B-J, Lien Y-H, Yu Z-R. Supercritical fluid extractive fractionation—study of the antioxidant activities of propolis. *Food Chemistry*. 2004;86(2):237-43.

98. Ahn M-R, Kumazawa S, Hamasaka T, Bang K-S, Nakayama T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(24):7286-92.
99. Trusheva B, Popova M, Bankova V, Simova S, Marcucci MC, Miorin PL, et al. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2006;3(2):249-54.
100. Dasgupta N, De B. Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: A comparative study. *Food chemistry*. 2007;101(2):471-4.
101. Tripathi R, Mohan H, Kamat J. Modulation of oxidative damage by natural products. *Food chemistry*. 2007;100(1):81-90.
102. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*. 1996;239(1):70-6.
103. Adelman J. Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante. 2005.
104. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Álvarez J. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of food science*. 2008;73(9).
105. Jasprica I, Bojic M, Mornar A, Besic E, Bucan K, Medic-Saric M. Evaluation of antioxidative activity of croatian propolis samples using DPPH[•] and ABTS^{•+} stable free radical assays. *Molecules*. 2007;12(5):1006-21.
106. Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food chemistry*. 2004;84(3):329-39.
107. Žižić JB, Vuković NL, Jadranin MB, Anđelković BD, Tešević VV, Kacaniová MM, et al. Chemical composition, cytotoxic and antioxidative activities of ethanolic extracts of propolis on HCT-116 cell line. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013;93(12):3001-9.
108. Bedascarrasbure E, Maldonado L, Álvarez A, Rodríguez E. Contenido de fenoles y flavonoides del propoleos Argentino. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. 2004;23:369-72.
109. Guo X, Chen B, Luo L, Zhang X, Dai X, Gong S. Chemical compositions and antioxidant activities of water extracts of Chinese propolis. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2011;59(23):12610-6.
110. Ahn MR, Kunimasa K, Kumazawa S, Nakayama T, Kaji K, Uto Y, et al. Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis. *Molecular nutrition & food research*. 2009;53(5):643-51.
111. Usia T, Banskota AH, Tezuka Y, Midorikawa K, Matsushige K, Kadota S. Constituents of Chinese propolis and their antiproliferative activities. *Journal of natural products*. 2002;65(5):673-6.
112. Jachak SM. Herbal drugs as antidiabetic: an overview. *CRIPS*. 2002;3(2):9-13.
113. Ueda M, Hayashibara K, Ashida H. Propolis extract promotes translocation of glucose transporter 4 and glucose uptake through both PI3K-and AMPK-dependent pathways in skeletal muscle. *Biofactors*. 2013;39(4):457-66.
114. Almaraz Abarca N, Ávila Reyes JA, Delgado Alvarado EA, Naranjo Jiménez N. EL METABOLISMO SECUNDARIO DE LAS PLANTAS, UN NUEVO CONCEPTO. 2006.
115. Mlinar B, Marc J, Janez A, Pfeifer M. Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2007;375(1-2):20-35.
116. Suba V, Murugesan T, Arunachalam G, Mandal SC, Saha BP. Anti-diabetic potential of *Barleria lupulina* extract in rats. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2004;11(2-3):202-5.

117. Coman C, Rugina OD, Socaciu C. Plants and natural compounds with antidiabetic action. *Not Bot Horti Agrobo*. 2012;40(1):314-25.
118. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*. 2013;2013.
119. Unnikrishnan MK, Veerapur V, Nayak Y, Mudgal PP, Mathew G. Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of the flavonoids. *Polyphenols in Human Health and Disease*. 2014;1:143-61.
120. Pinent M, Castell A, Baiges I, Montagut G, Arola L. Bioactivity of flavonoids on insulin-secreting cells. *Compr Rev Food Sci Food Safety*. 2008;7:299-308.
121. Ahmed OM, Moneim AA, Yazid IA, Mahmoud AM. Antihyperglycemic antihyperlipidemic and antioxidant effects and the probable mechanisms of action of *Ruta graveolens* infusion and rutin in nicotinamide-streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia Croatica*. 2010;39:15-35.
122. Juárez-Reyes K, Brindis F, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J, Bye R, Linares E, et al. Hypoglycemic, antihyperglycemic, and antioxidant effects of the edible plant *Anoda cristata*. *Journal of ethnopharmacology*. 2015;161:36-45.
123. Chemler JA, Lock LT, Koffas MA, Tzanakakis ES. Standardized biosynthesis of flavan-3-ols with effects on pancreatic beta-cell insulin secretion. *Applied microbiology and biotechnology*. 2007;77(4):797-807.
124. Brahmachari G. Bio-flavonoids with promising antidiabetic potentials: A critical survey. Opportunity, challenge and scope of natural products in medicinal chemistry. 2011;2:187-212.
125. Matsui T, Tanaka T, Tamura S, Toshima A, Tamaya K, Miyata Y, et al. alpha-Glucosidase inhibitory profile of catechins and theaflavins. *J Agric Food Chem*. 2007;55(1):99-105.
126. Lee YJ, Suh KS, Choi MC, Chon S, Oh S, Woo JT, et al. Kaempferol protects HIT-T15 pancreatic beta cells from 2-deoxy-D-ribose-induced oxidative damage. *Phytotherapy research : PTR*. 2010;24(3):419-23.
127. Zygmunt K, Faubert B, MacNeil J, Tsiani E. Naringenin, a citrus flavonoid, increases muscle cell glucose uptake via AMPK. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;398(2):178-83.
128. Li JM, Che CT, Lau CB, Leung PS, Cheng CH. Inhibition of intestinal and renal Na⁺-glucose cotransporter by naringenin. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2006;38(5-6):985-95.
129. Purushotham A, Tian M, Belury MA. The citrus fruit flavonoid naringenin suppresses hepatic glucose production from Fao hepatoma cells. *Mol Nutr Food Res*. 2009;53(2):300-7.
130. Jung UJ, Lee MK, Jeong KS, Choi MS. The hypoglycemic effects of hesperidin and naringin are partly mediated by hepatic glucose-regulating enzymes in C57BL/KsJ-db/db mice. *The Journal of nutrition*. 2004;134(10):2499-503.
131. Vessal M, Hemmati M, Vasei M. Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. *Comparative biochemistry and physiology Toxicology & pharmacology : CBP*. 2003;135C(3):357-64.
132. Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. *Pharmacological research*. 2005;51(2):117-23.
133. Kim MK, Jung HS, Yoon CS, Ko JH, Chun HJ, Kim TK, et al. EGCG and quercetin protected INS-1 cells in oxidative stress via different mechanisms. *Frontiers in bioscience*. 2010;2:810-7.
134. Puchchakayala G, Jadhav R. Hypoglycemic and antidiabetic activity of flavonoids: boswellic acid, ellagic acid, quercetin, rutin on streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetic rats. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2012;4(2):251-6.
135. Domínguez XA. Métodos de investigación fitoquímica. 1973.

136. Wu KK, Huan Y. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Current protocols in pharmacology / editorial board*, SJ Enna. 2008;Chapter 5:Unit 5 47.
137. OSHA U. *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*. 2013.
138. Li D, Peng C, Xie X, Mao Y, Li M, Cao Z, et al. Antidiabetic effect of flavonoids from *Malus toringoides* (Rehd.) Hughes leaves in diabetic mice and rats. *Journal of ethnopharmacology*. 2014;153(3):561-7.
139. Arunachalam K, Parimelazhagan T. Antidiabetic activity of *Ficus amplissima* Smith. bark extract in streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of ethnopharmacology*. 2013;147(2):302-10.
140. Pandit R, Phadke A, Jagtap A. Antidiabetic effect of *Ficus religiosa* extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of ethnopharmacology*. 2010;128(2):462-6.
141. Hossain MA, Mostofa M, Awal MA, Chowdhury EH, Sikder MH. Histomorphological and morphometric studies of the pancreatic islet cells of diabetic rats treated with aqueous extracts of *Momordica charantia* (karela) fruits. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2014;4:S698-S704.
142. Oršolić N, Sirovina D, Končić MZ, Lacković G, Gregorović G. Effect of Croatian propolis on diabetic nephropathy and liver toxicity in mice. *BMC complementary and alternative medicine*. 2012;12(1):117.
143. Verma PR, Itankar PR, Arora SK. Evaluation of antidiabetic antihyperlipidemic and pancreatic regeneration, potential of aerial parts of *Clitoria ternatea*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2013;23(5):819-29.
144. Yassa HD, Tohamy AF. Extract of *Moringa oleifera* leaves ameliorates streptozotocin-induced Diabetes mellitus in adult rats. *Acta Histochemica*. 2014;116(5):844-54.
145. Ramamoorthy PK, Bono A. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. *Journal of Engineering Science and Technology*. 2007;2(1):70-80.
146. Franco EM. Actividad antioxidante in vitro de las bebidas de frutas. *Bebidas-Alfa Editores Técnicos*, Junio/Julio. 2006:20-7.
147. Al-Fatimi M, Wurster M, Schroder G, Lindequist U. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. *Journal of ethnopharmacology*. 2007;111(3):657-66.
148. Chaillou LL, Herrera HA, Maidana JF. Estudio del propóleos de Santiago del Estero, Argentina. *Food Science and Technology (Campinas)*. 2004;24(1):11-5.
149. Cafarchia C, De Laurentis N, Milillo M, Losacco V, Puccini V. Antifungal activity of Apulia region propolis. *Parassitologia*. 1999;41(4):587-90.
150. Martins RS, Péreira ES, Lima Jr SM, Senna MI, Mesquita RA, Santos VR. Effect of commercial ethanol propolis extract on the in vitro growth of *Candida albicans* collected from HIV-seropositive and HIV-seronegative Brazilian patients with oral candidiasis. *Journal of oral science*. 2002;44(1):41-8.
151. GIL G JH, ROJANO BA. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). *Vitae*. 2009;16(3):388-95.
152. Shi H, Yang H, Zhang X, Yu L. 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*. 2012;60(50):12403-10.
153. Fuliang H, Hepburn H, Xuan H, Chen M, Daya S, Radloff S. Effects of propolis on blood glucose, blood lipid and free radicals in rats with diabetes mellitus. *Pharmacological research*. 2005;51(2):147-52.

154. Mercan N. Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different regions. *African Journal of Biotechnology*. 2006;5(11).
155. Anttonen MJ, Karjalainen RO. Environmental and genetic variation of phenolic compounds in red raspberry. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2005;18(8):759-69.
156. Sanderson J, McLauchlan WR, Williamson G. Quercetin inhibits hydrogen peroxide-induced oxidation of the rat lens. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999;26(5):639-45.
157. Kurek-Górecka A, Rzepecka-Stojko A, Górecki M, Stojko J, Sosada M, Świerczek-Zięba G. Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules*. 2013;19(1):78-101.
158. Quintero-Mora ML, Londoño-Orozco A, Hernández-Hernández F, Manzano-Gayosso P, López-Martínez R, Soto-Zárate CI, et al. Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento in vitro de *Candida albicans*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2008;25(1):22-6.
159. Araújo M, Mattar N, Reis A, Serra I, Fialho E, Assunção A, et al. Pharmacognostic and acute toxicological evaluation of *Scaptotrigona aff. postica* propolis extract in pre-clinical assays. *Natural product research*. 2011;25(11):1037-46.
160. da Silva RO, Andrade VM, Rêgo ESB, Dória GAA, dos Santos Lima B, da Silva FA, et al. Acute and sub-acute oral toxicity of Brazilian red propolis in rats. *Journal of ethnopharmacology*. 2015;170:66-71.
161. Matsushige K, Basnet P, Hase K, Kadota S, Tanaka K, Namba T. Propolis protects pancreatic β -cells against the toxicity of streptozotocin (STZ). *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 1996;3(2):203-9.
162. Babatunde IR, Abdulbasit A, Oladayo MI, Olasile OI, Olamide FR, Gbolahan BW. Hepatoprotective and Pancreatoprotective Properties of the Ethanolic Extract of Nigerian Propolis. *J Intercult Ethnopharmacol*. 2015;4(2):102-8.
163. Irudayaraj SS, Sunil C, Duraipandiyar V, Ignacimuthu S. Antidiabetic and antioxidant activities of *Toddalia asiatica* (L.) Lam. Leaves in Streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of ethnopharmacology*. 2012;143(2):515-23.
164. Eliza J, Daisy P, Ignacimuthu S. Antioxidant activity of costunolide and eremanthin isolated from *Costus speciosus* (Koen ex. Retz) Sm. *Chemico-biological interactions*. 2010;188(3):467-72.
165. Zhang J, Cao X, Ping S, Wang K, Shi J, Zhang C, et al. 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*. 2015;2015.
166. Kokozsko-Bilska A, Stepniak J, Lewinski A, Karbownik-Lewinska M. Protective antioxidative effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in the thyroid and the liver are similar to those caused by melatonin. *Thyroid research*. 2014;7(1):5.
167. Choi Y, Noh D, Cho S, Suh H, Kim K, Kim J. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT-Food Science and Technology*. 2006;39(7):756-61.
168. Moreira L, Dias LG, Pereira JA, Estevinho L. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical toxicology*. 2008;46(11):3482-5.
169. Fabris S, Bertelle M, Astafyeva O, Gregoris E, Zangrando R, Gambaro A, et al. Antioxidant properties and chemical composition relationship of Europeans and Brazilians propolis. 2013.
170. Paulino Zunini M, Rojas C, De Paula S, Elingold I, Alvareda Migliaro E, Casanova MB, et al. Phenolic contents and antioxidant activity in central-southern Uruguayan propolis extracts. *Journal of the Chilean Chemical Society*. 2010;55(1):141-6.
171. Abdelmoaty MA, Ibrahim MA, Ahmed NS, Abdelaziz MA. Confirmatory studies on the antioxidant and antidiabetic effect of quercetin in rats. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*. 2010;25(2):188-92.

172. Hotta M, Tashiro F, Ikegami H, Niwa H, Ogihara T, Yodoi J, et al. Pancreatic β cell-specific expression of thioredoxin, an antioxidative and antiapoptotic protein, prevents autoimmune and streptozotocin-induced diabetes. *Journal of Experimental Medicine*. 1998;188(8):1445-51.
173. Kajimoto Y, Kaneto H. Role of Oxidative Stress in Pancreatic β -Cell Dysfunction. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004;1011(1):168-76.
174. Tolosa L, Cañizares E. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. 2002.
175. Cárdenas E. Química y evaluación del efecto hipoglicemiante de propólis en ratones diabéticos inducidos con aloxano. Chile; 2008.
176. Fu Z, Gilbert ER, Pfeiffer L, Zhang Y, Fu Y, Liu D. Genistein ameliorates hyperglycemia in a mouse model of nongenetic type 2 diabetes. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 2012;37(3):480-8.
177. Jakobs S, Fridrich D, Hofem S, Pahlke G, Eisenbrand G. Natural flavonoids are potent inhibitors of glycogen phosphorylase. *Mol Nutr Food Res*. 2006;50(1):52-7.
178. Estadística INd, Informática, Chihuahua, State). Cuaderno estadístico municipal: Estado de Chihuahua: Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática; 1999.
179. Johansson LH, Borg LH. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Analytical biochemistry*. 1988;174(1):331-6.
180. Wheeler CR, Salzman JA, Elsayed NM, Omaye ST, Korte DW. Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. *Analytical biochemistry*. 1990;184(2):193-9.
181. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Translational Research*. 1967;70(1):158-69.
182. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*. 1999;299:152-78.
183. Aguilar A, Camacho JR. Uso popular de las plantas medicinales y su distribución por aparatos y sistemas. *Archivos de investigación médica México, DF Suplemento*. 1985;6:13-4.