



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO FITOQUÍMICO DE PROPÓLEOS MEXICANOS Y EVALUACIÓN DEL
COMPUESTO MAYORITARIO EN UN MODELO DE NEFROPATÍA DIABÉTICA

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. JESSICA GRANADOS PINEDA

DR. JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ
FACULTAD DE QUÍMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. SEPTIEMBRE DE 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Manuel Jiménez Estrada
Vocal	Dra. Rachel Mata Essayag
Vocal	Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Vocal	Dr. José Guillermo Penieres Carrillo
Secretario	Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava

Lugares donde se llevó a cabo el proyecto:

Conjunto E, Facultad de Química, UNAM

Laboratorio de Farmacología, Instituto Nacional de Cancerología (INCAN)

Dr. J. Fausto Rivero Cruz

Tutor

M. en C. Jessica Granados Pineda

Sustentante



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Posgrado en Ciencias Químicas.

Al CONACyT por el apoyo económico otorgado con el No. de becario 273461 y a través de los proyectos de Ciencia Básica CB-25 2006 y CB 178946.

Al PAIP 5000-9138 de la facultad de Química, UNAM, por el apoyo económico otorgado al Dr. J. Fausto Rivero Cruz.

A mi tutor, el Dr. J. Fausto Rivero Cruz, FQ, UNAM, por la invaluable guía que me ha brindado durante toda mi carrera en la investigación, por su confianza y amistad.

A las Dras. Martha Macías Rubalcava, Instituto de Química, UNAM y Alejandra Rojas, UAQ, por sus valiosas recomendaciones y continua revisión de mi progreso en el proyecto.

A la Dra. Jazmin M. Pérez Rojas, INCAN, por la aportación de ideas; por su invaluable colaboración, apoyo y compromiso durante el desarrollo experimental *in vivo*; por la revisión del artículo publicado; por la revisión y corrección del manuscrito de tesis.

Al Jurado asignado, por la revisión y corrección del manuscrito de tesis.

A la Dra. Patricia García López, INCAN, por permitirme realizar en su laboratorio los experimentos relacionados con el desarrollo experimental *in vivo*.

A la M. en C. Ma. Del Pilar Ramos Godinez, INCAN, por la preparación de tejidos para la microscopía electrónica.



A la QFB. Bertha Hernández Castro, INCAN, por permitirme realizar el análisis bioquímico de muestras en su laboratorio.

A la Dra. Norma O. Uribe Uribe, INNCMSZ, por su colaboración en las mediciones de microscopía electrónica y la descripción de la histología.

Al TH. Jaime Murillo, INNCMSZ, por la preparación de tejidos para la microscopía óptica.

A los técnicos académicos de los laboratorios de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas de la USAII, UNAM, por el registro de los espectros de los compuestos.

A los Dres. José Pedraza Chaverri, Omar Medina Campos y Sobeida Sánchez Nieto, FQ, UNAM, por permitirme realizar cuantificaciones de peróxido de hidrógeno y el ensayo de blanqueamiento de β -caroteno en su laboratorio.

A los MVZ Adriana Correa Benitez y Ángel López Ramírez, FMVZ, UNAM, por proporcionar la muestra de propóleo de la Ciudad de México.



PRESENTACIONES EN FOROS ACADÉMICOS

Parte del proyecto fue presentado en Creadores Universitarios por el Dr. J. Fausto Rivero Cruz, la Dra. Jazmin Pérez Rojas y Jessica Granados Pineda, Junio 2017.

Parte de este trabajo fue presentado en los eventos:

- Jornada de Investigación en la Facultad de Química, 2015. Modalidad de cartel.
- Congreso Mexicano de Bioquímica, Aguascalientes, 2016. Modalidad de cartel.
- Congreso de la American Society of Pharmacognosy, Portland, USA, 2017. Modalidad de cartel.
- Jornada de Investigación en la Facultad de Química, 2018. Modalidad de cartel. En este evento se obtuvo el primer lugar en Cartel Científico.



ARTÍCULOS PUBLICADOS

Effect of pinocembrin isolated from Mexican brown propolis on diabetic nephropathy. *Molecules* **2018**, 23(4), 852.

Mexican propolis flavonoids affect photosynthesis and seedling growth. *J Photochem. Photobiol. B.* **2015**, 151, 213–220.



ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS (CONTINUACIÓN)	11
LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE CUADROS	13
RESUMEN	14
ABSTRACT	15
1. ANTECEDENTES	16
1.1. EPIDEMIOLOGÍA DE LA NEFROPATÍA DIABÉTICA.....	16
1.2. DEFINICIÓN Y GENERALIDADES DE LA ND	17
1.3. TRATAMIENTO DE LA ND	19
1.3.1. CONTROL GLICÉMICO.....	20
1.3.2. CAMBIOS EN EL ESTILO DE VIDA.....	20
1.3.3. CONTROL DE LA PRESIÓN ARTERIAL.....	20
1.3.4. CONTROL DE LA DISLIPIDEMIA.....	21
1.3.5. BÚSQUEDA DE NUEVOS FÁRMACOS PARA ND	21
1.3.6. TERAPIA CELULAR	25
1.3.7. ALTERNATIVAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ND	25
1.3.7.1. FLAVONOIDES Y NEFROPATÍA DIABÉTICA.....	27
1.4. PATOLOGÍA Y PATOFISIOLOGÍA	27
1.4. FACTORES NO HEREDITARIOS.....	27
1.4.1. FACTORES HEMODINÁMICOS.....	27
1.4.2. FACTORES METABÓLICOS	28
1.4.2.1. ESTRÉS OXIDANTE.....	29
1.4.2.2. CITOCINAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO	29
1.4.2.3. RESPUESTA INMUNE.....	30
1.5. FACTORES HEREDITARIOS	30
2.2. EL PROPÓLEO	30
2.2.1. DEFINICIÓN Y GENERALIDADES.....	30
2.2.2. CLASIFICACIÓN DEL PROPÓLEO.....	31
2.2.3 EL PROPÓLEO Y LA ND	33
2.3. EFECTO NEFROPROTECTOR DE LOS FLAVONOIDES.....	34
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
3. OBJETIVOS	37
4. METODOLOGÍA.....	38
4.1. PROCEDIMIENTOS GENERALES DE ANÁLISIS	38
4.1.1. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS.....	38
4.1.2. DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES ESPECTROMÉTRICAS Y ESPECTROSCÓPICAS	38
4.2. RECOLECCIÓN DEL MATERIAL DE ESTUDIO	38



4.2.1. ZACATECAS.....	39
4.2.2. DURANGO	39
4.2.3. CHIHUAHUA	39
4.3. DETERMINACIÓN DE LOS COMPONENTES VOLÁTILES DEL PROPÓLEO.....	40
4.3.1. CONDICIONES DE LA EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (HS-SPME).....	40
4.3.2. CONDICIONES DE SEPARACIÓN CROMATÓGRÁFICA Y DEL ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS..	40
4.3.3. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES	40
4.4. EXTRACCIÓN DEL PROPÓLEO	41
4.5. DETERMINACIÓN DE FENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES EN EL EXTRACTO ETANÓLICO	41
4.6. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EEP	41
4.6.1. NEUTRALIZACIÓN DEL RADICAL DPPH	41
4.6.2. ENSAYO DE PODER REDUCTOR DE HIERRO (FRAP).....	41
4.6.3. BLANQUEAMIENTO DE B-CAROTENO	42
4.7. ESTUDIO FITOQUÍMICO	42
4.7.1. ZACATECAS.....	42
4.7.1.1. FRACCIONAMIENTO PRIMARIO DEL EEP	42
4.7.1.2. FRACCIONAMIENTO SECUNDARIO Y PURIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS C01-C04.	42
4.7.2. DURANGO	44
4.7.2.1. FRACCIONAMIENTO PRIMARIO DEL EEP	44
4.7.2.2. FRACCIONAMIENTO SECUNDARIO Y AISLAMIENTO DE LOS COMPUESTOS C01, C05 Y C06	44
4.7.3. CHIHUAHUA	44
4.7.3.1. FRACCIONAMIENTO PRIMARIO DEL EEP	44
4.7.3.2. FRACCIONAMIENTO SECUNDARIO DEL EEP Y AISLAMIENTO DE LOS COMPUESTOS C07-C11.	46
4.7.4. CIUDAD DE MÉXICO (CDMX).....	48
4.7.4.1. FRACCIONAMIENTO PRIMARIO DEL EEP	48
4.7.4.2. PURIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS C12-C14	48
4.8. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE PINOCEMBRINA	48
4.8.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	50
4.8.2. RECOLECCIÓN Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS	51
4.8.2.1. MUESTRA DE SANGRE.....	51
4.8.2.2. TEJIDO RENAL Y HEPÁTICO.....	51
4.8.2.3. PREPARACIÓN DE HOMOGENADOS DE TEJIDO	51
4.8.2.4. EXTRACCIÓN DE CÉLULAS DE HOMOGENADOS	51
4.8.3. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS	52
4.8.4. PROTEINURIA	52
4.8.5. ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA RENAL POR MICROSCOPÍA	52
4.8.5.1. MICROSCOPÍA ÓPTICA.....	52
4.8.5.2. MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA	53
4.8.6. CUANTIFICACIÓN DE MARCADORES DE DAÑO RENAL.....	53
4.8.7. EVALUACIÓN DE ESTRÉS OXIDANTE EN ORINA	53
4.8.7.2. ESTRÉS OXIDANTE EN TEJIDO	54
4.8.8. CUANTIFICACIÓN DE APOPTOSIS EN CÉLULAS DE HÍGADO Y DE RIÑÓN	54
4.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	54
5. RESULTADOS	55
5.1. DETERMINACIÓN DE LOS COMPONENTES VOLÁTILES DEL PROPÓLEO POR LA TÉCNICA DE HS-SPME/GC-MS-TOF	55
5.1.2. PROPÓLEO DE ZACATECAS	55
5.1.3. PROPÓLEO DE DURANGO	55



5.1.4. VOLÁTILES DEL PROPÓLEO DE CHIHUAHUA.....	55
5.1.5. PROPÓLEO DE LA CIUDAD DE MÉXICO	55
5.2. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS	56
5.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES.....	56
5.4. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EEP	57
5.5. ESTUDIO FITOQUÍMICO	58
5.6. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA PINOCEMBRINA	59
5.6.1. EFECTO DE PINOCEMBRINA SOBRE EL PESO Y LA GLUCOSA SÉRICA.....	59
5.6.2. EFECTO DE PINOCEMBRINA SOBRE LOS NIVELES DE LÍPIDOS SÉRICOS.....	60
5.6.3. EFECTO DE PINOCEMBRINA SOBRE LOS NIVELES DE ENZIMAS HEPÁTICAS	62
5.6.2. EFECTO DE PINOCEMBRINA SOBRE LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN RENAL	63
6.6.3. EFECTO DE PINOCEMBRINA SOBRE EL ESTRÉS OXIDANTE EN TEJIDO RENAL Y HEPÁTICO	69
5.6.4. EFECTO DE PINOCEMBRINA SOBRE LA APOPTOSIS EN CÉLULAS DE RIÑÓN	71
5.6.5. EFECTO DE PINOCEMBRINA SOBRE LA APOPTOSIS EN CÉLULAS DE HÍGADO	71
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	72
6.1. VOLÁTILES DEL PROPÓLEO DE ZACATECAS	73
6.2. VOLÁTILES DEL PROPÓLEO DE DURANGO.....	74
6.3. VOLÁTILES DEL PROPÓLEO DE CDMX	74
6.4. CONTENIDO DE FENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES	74
6.5. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EEP.....	75
6.6. ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LOS EEP	75
6.7. EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LA PINOCEMBRINA	77
7. CONCLUSIONES	83
8. PROSPECTIVAS.....	84
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
ANEXO.....	103
ARTÍCULOS PUBLICADOS.....	127



Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado	Abreviatura	Significado
4-HNE	4-hidroxinonenal	ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
5-HT	5-hidroxitriptamina	eNOS	óxido nítrico sintasa endotelial
ADA	Asociación Americana de la diabetes	ENSANUT	encuesta nacional de salud y nutrición
AGE	productos finales de glicosilación avanzada	ERO	especie reactiva de oxígeno
ALP	fosfatasa alcalina	ET-1	endotelina-1
ALT	alanina aminotransferasa	EtOH	etanol
ANOVA	análisis de varianza	FRAP	poder antioxidante/reducción de Fe ³⁺
AST	aspartato aminotransferasa	GFR	tasa de filtración glomerular
BRA	bloqueadores del receptor de angiotensina	GPx	glutación peroxidasa
BUN	nitrógeno ureico en sangre	GSH	glutación reducido
CAT	catalasa	h	hora
CDMX	Ciudad de México	HbA _{1c}	hemoglobina glicosilada
CHI	Chihuahua	HDL	lipoproteína de alta densidad
Cr	creatinina	HPLC	cromatografía de líquidos de alta resolución
CRP	proteína C reactiva	HS-SPME-CG/EM-TOF	head space-solid phase microextraction-gas chromatography/mass spectrometry-time of flight
CTGF	factor de crecimiento de tejido conectivo	ICAM-1	molécula de adhesión intercelular-1
DAD	detección con arreglo de diodos	iECA	inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina
DCCT	ensayo de control de la diabetes y sus complicaciones	IL	interleucina
DM	diabetes mellitus	ip	intraperitoneal
DM1	diabetes mellitus tipo 1	IRCT	insuficiencia renal crónica terminal
DM2	diabetes mellitus tipo 2	JAK	cinasa janus
DNJC	Comité conjunto de nefropatía diabética	LDL	lipoproteína de baja densidad
DPPH	2,2-difenilo-1-picrilhidrazilo	KDIGO	la enfermedad renal: mejorando resultados globales
DUR	Durango	KIM	kidney injury molecule-1
EAC	ensayo clínico aleatorizado	MAPK	proteínas cinasas activadas por mitógenos
EEP	extracto etanólico de propóleo		



Lista de abreviaturas (Continuación)

Abreviatura	Significado	Abreviatura	Significado
MBG	membrana basal glomerular	SGLT	transportador sodio-glucosa
MCP-1	proteína quimioatrayente de monocitos-1	SOD	superóxido dismutasa
MDA	malondialdehído	TE	equivalentes de Trolox
MEC	matriz extracelular	TIC	corriente iónica total
min	minutos	TGF- β	factor de crecimiento tumoral- β
MPC	células precursoras del mesénquima	TNF- α	factor de necrosis tumoral- α
MSC	células estromales mesenquimales	UKPDS	estudio prospectivo de la diabetes del Reino Unido
NADH	nicotinamida adenina dinucleotido	UV	ultravioleta
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato	VEGF	factor de crecimiento del endotelio vascular
NAG	<i>N</i> -acetil- β -D-glucosaminidasa	VLC	cromatografía líquida al vacío
ND	nefropatía diabética	VLDL	lipoproteína de muy baja densidad
NF- κ B	factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas	ZAC	Zacatecas
NGAL	neutrophil gelatinase-associated lipocalin		
Nox4	oxidasa de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato 4		
OMS	Organización mundial de la salud		
PAI-1	inhibidor del activador de plasminógeno-1		
PBS	phosphate buffered saline		
PKC	proteína cinasa C		
po	vía oral		
ppm	partes por millón		
RAS	renin-angiotensin system		
SAGARPA	Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación		
sCr	creatinina sérica		
SEM	error estándar de la media		



Lista de Figuras

Figura 1. Estructura de un glomérulo normal (A) y un glomérulo diabético (B). Tomado de Gnudi y cols., 2016.....	18
Figura 2. Patrón quimio-geográfico del propóleo de acuerdo a Salatino y cols. (2011).....	32
Figura 3. Regionalización de la producción apícola de miel en México. Tomado de Coordinación General de Ganadería/SAGARPA.....	33
Figura 4. Resumen de los procesos cromatográficos que permitieron el aislamiento de compuestos a partir de la muestra recolectada recolectada en Zacatecas.....	43
Figura 5. Resumen de los procesos cromatográficos que permitieron el aislamiento de compuestos a partir de la muestra recolectada en Durango.....	45
Figura 6. Resumen de los procesos cromatográficos que permitieron el aislamiento de compuestos a partir de la muestra recolectada en Chihuahua.....	47
Figura 7. Resumen de los procesos cromatográficos que permitieron el aislamiento de compuestos a partir de la muestra recolectada en CDMX.....	49
Figura 8. Comparación de los tipos de compuestos presentes en las muestras de propóleo estudiadas.....	56
Figura 9. Compuestos aislados a partir de los EEP recolectados en Chihuahua, Zacatecas, Durango y CDMX.....	58
Figura 10. Parámetros metabólicos en el esquema preventivo y el esquema correctivo.....	60
Figura 11. Volumen urinario y excreción de proteínas de los grupos experimentales en los esquemas preventivo y correctivo.....	64
Figura 12. Cuantificación de biomarcadores de daño renal en el esquema preventivo.	65
Figura 13. Micrografías de secciones histológicas de riñón del esquema preventivo.....	66
Figura 14. Micrografías de secciones histológicas de riñón del esquema correctivo.....	67
Figura 15. Área de los glomérulos en los grupos experimentales del esquema preventivo y correctivo.....	67
Figura 16. Ultraestructura del glomérulo en el esquema preventivo por medio de microscopía electrónica de transmisión.....	68
Figura 17. Porcentaje de apoptosis total en los esquemas de tratamiento.....	70



Lista de Cuadros

Cuadro 1. Estadios de la ND de acuerdo al “Comité Conjunto de Nefropatía Diabética” (Haneda <i>et al.</i> , 2015).....	20
Cuadro 2. Fármacos en ensayos clínicos para reposicionarlos en el tratamiento de la ND.....	23
Cuadro 3. Nuevos fármacos para el tratamiento de la ND.....	24
Cuadro 4. Plantas medicinales y sus derivados en estudios pre-clínicos y estudios clínicos..	27
Cuadro 5. Vías de señalización activadas por las especies reactivas de oxígeno.....	29
Cuadro 6. Efecto de citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión en la ND.....	30
Cuadro 7. Resumen de las condiciones de recolección del propóleo.....	38
Cuadro 8. Rendimiento en peso de los EEP.....	56
Cuadro 9. Contenido de fenoles totales y flavonoides totales en las muestras de EEP.....	57
Cuadro 10. Resumen de las pruebas antioxidantes de las muestras de EEP.....	57
Cuadro 11. Valores del perfil lipídico en el esquema preventivo.....	61
Cuadro 12. Valores del perfil lipídico en el esquema correctivo.....	61
Cuadro 13. Valores del perfil hepático en el esquema preventivo.....	62
Cuadro 14. Valores del perfil hepático en el esquema correctivo.....	62
Cuadro 15. Valores del perfil renal en el esquema preventivo.....	63
Cuadro 16. Valores del perfil renal en el esquema correctivo.....	63
Cuadro 17. Parámetros de estrés oxidante en riñón e hígado en el esquema preventivo.....	69
Cuadro 18. Parámetros de estrés oxidante en riñón e hígado en el esquema correctivo.....	70



Resumen

El propóleo es un producto resinoso de la colmena que ha sido usado en todo el mundo dentro de la Medicina Tradicional para prevenir y tratar resfriados, heridas, reumatismo, enfermedades cardíacas y diabetes. La pinocembrina es un compuesto que se encuentra en una gran diversidad de plantas y en productos derivados de las abejas como el propóleo. La pinocembrina se considera como el compuesto marcador del propóleo de tipo del álamo de las zonas templadas. Este flavonoide tiene actividad neuroprotectora, antiinflamatoria, hepatoprotectora, antihiperlipidémica y vasorrelajante. La nefropatía diabética es el estadio final de las complicaciones renales causadas por la diabetes y para su tratamiento hay pocas alternativas. Por esta razón, es necesario encontrar nuevas alternativas que prevengan su aparición temprana y/o detengan su progresión. El presente estudio estuvo dirigido a determinar la composición química de cuatro muestras de propóleo recolectadas en México y a evaluar el efecto del componente mayoritario (pinocembrina) en un modelo de nefropatía diabética *in vivo*. Se estudiaron dos esquemas, preventivo (antes del daño renal) y correctivo (con daño renal establecido). En el esquema preventivo, la pinocembrina evitó la muerte de las ratas, mejoró el perfil lipídico, disminuyó la apoptosis en células renales, redujo el estrés oxidante y el grosor de la membrana basal glomerular. Por el contrario, en el esquema correctivo la pinocembrina exacerbó el daño y sólo mejoró el perfil lipídico. En conclusión, la pinocembrina retrasa la aparición del daño renal establecido, sin embargo, cuando éste ya está presente, pinocembrina acelera el daño renal.



Abstract

Propolis is a resinous beehive product that has been used worldwide in traditional medicine to prevent and treat colds, wounds, rheumatism, heart disease and diabetes. Pinocembrin is found in plants and in propolis, being the marker compound of poplar type propolis. It has neuroprotective, anti-inflammatory, hepatoprotective, antihyperlipidemic and vasorelaxant properties. Diabetic nephropathy (DN) is the final stage of renal complications caused by diabetes; for its treatment there are few alternatives. It is necessary to find alternatives to prevent the early appearance of DN and to stop its progression. The present study aimed to determine the chemical composition of three propolis samples collected in Mexico and to evaluate the effect of the major component (pinocembrin) in a model of diabetic nephropathy *in vivo*. Two different schemes were assessed, preventive (before renal damage) and corrective (after damage is established). In the preventive scheme, pinocembrin treatment avoids death of the rats, improves lipid profile, glomerular filtration rate, urinary protein, avoids increases in urinary biomarkers, oxidative stress and glomerular basement membrane thickness. Whereas, in the corrective scheme, pinocembrin only improves lipid profile without showing improvement in any other parameters. Furthermore pinocembrin exacerbated the renal damage. In conclusion, pinocembrin ameliorates diabetic nephropathy when there is no kidney damage, but when it is already present, pinocembrin accelerates it.



1. Antecedentes

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónico-degenerativa, de carácter heterogéneo, con grados variables de predisposición hereditaria y con participación de diversos factores ambientales y que se caracteriza por hiperglicemia crónica debido a la deficiencia en la producción o acción de la insulina, lo que afecta al metabolismo intermedio de los hidratos de carbono, proteínas y grasas (NOM-015-SSA2-1994). La Federación Internacional de la Diabetes proyecta que el número de diabéticos mayores a 20 años se elevará de 285 millones en 2010 a 439 millones en 2030 (International Diabetes Federation, 2017). La clasificación aceptada de la DM considera tres tipos de diabetes, tipo 1, tipo 2 y gestacional. En la diabetes mellitus tipo 1 (DM1) existe destrucción de las células β pancreáticas por el sistema inmune, lo que resulta en la deficiencia relativa o absoluta de insulina. En la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), la hiperglicemia es el resultado de una producción inadecuada de insulina y a la incapacidad del cuerpo de responder totalmente a la insulina. Finalmente la diabetes gestacional es la hiperglicemia que se detecta por primera vez durante el segundo y el tercer trimestre del embarazo, este estado de hiperglicemia es transitorio y generalmente se resuelve al finalizar la gestación (International Diabetes Federation, 2016). En los tipos de diabetes 1 y 2, la adopción de una dieta saludable y de un tratamiento farmacológico adecuado permiten, de manera no efectiva, retrasar o evitar las complicaciones asociadas con la diabetes. Algunas complicaciones derivadas de la hiperglicemia no controlada son la retinopatía, la neuropatía, el pie diabético, problemas auditivos y el aumento en el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Mayo Clinic, 2017). La nefropatía diabética (ND) es la principal complicación microvascular de la diabetes y la causa más común de la enfermedad renal crónica en el mundo (International Diabetes Federation, 2016).

1.1. Epidemiología de la nefropatía diabética

En nuestro país, las complicaciones renales son la primera causa de hospitalización de pacientes diabéticos y su incidencia ha aumentado un 20% en un periodo de diez años (Escobedo de la Peña et al., 1996). En el año 2016, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) recopiló los datos epidemiológicos de la DM y sus complicaciones, esta encuesta reportó un aumento en la prevalencia de esta enfermedad y sus complicaciones y fue atribuida a que el 46.4% de los diabéticos no realiza medidas preventivas para evitar o retrasar las complicaciones de la DM y sólo un 14.2% de los encuestados se realizó un estudio de laboratorio para averiguar

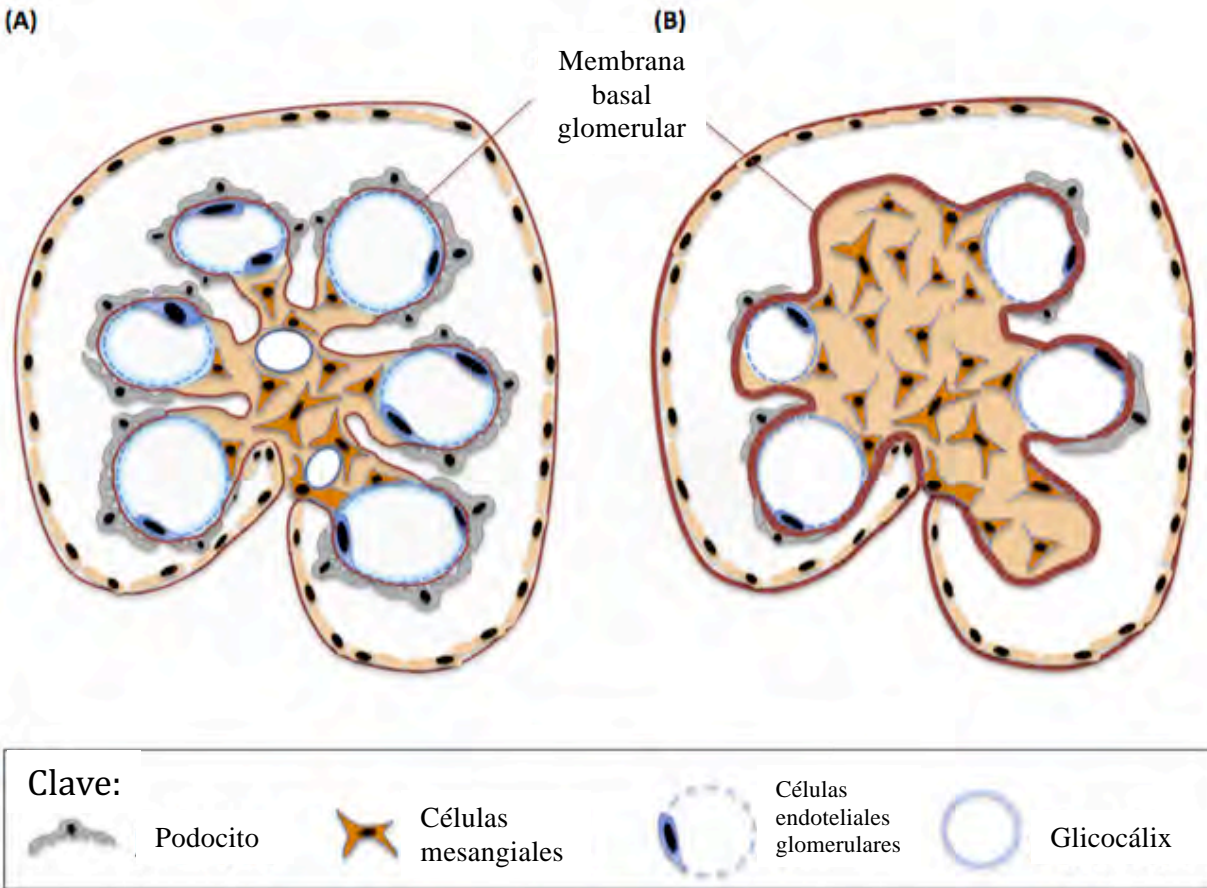


si mostraba alguna alteración renal (examen general de orina y microalbuminuria) (ENSANUT, 2016).

En pacientes diabéticos tipo 1, el riesgo de la enfermedad renal se inicia alrededor de los cinco años posteriores al inicio de la enfermedad, aumentando un 2.5% anual hasta la segunda década y luego disminuye al 1% anual (Knowler y Kunzelman, 1988). La insuficiencia renal ocasiona la muerte de alrededor un 65% de estos pacientes, mientras que un 25% de las defunciones es por causas cardiovasculares y el resto por otras causas. En los diabéticos tipo 2 la prevalencia de ND varía entre el 39 y el 50% (Torres-Viloria y Zacarías-Castillo, 2002). Alrededor del 5 al 25% de estos pacientes pueden presentar insuficiencia renal clínicamente significativa o incluso insuficiencia renal crónica terminal (IRCT) al momento del diagnóstico de la DM y aproximadamente entre el 20 y 30% llegan a IRCT después de 20 años de la duración de la DM (Ertugrul *et al.*, 2011).

1.2. Definición y generalidades de la ND

La ND se define como la presencia persistente de macroalbuminuria (> 300 mg/24h) y de una función glomerular anormal (evaluada mediante los valores de creatinina sérica). Clínicamente, se caracteriza por la presencia de hipertensión, albuminuria progresiva, declive de la tasa de filtración glomerular (GFR) y alto riesgo de morbilidad y mortalidad cardiovascular (Ahmad, 2015). Generalmente la ND sigue un curso bien definido, iniciando con microalbuminuria que cursa hacia proteinuria, con azotemia y que termina en insuficiencia renal terminal. Antes del establecimiento de la proteinuria evidente, hay varios cambios en la función renal como la hiperfiltración, la hiperperfusión y el aumento de la permeabilidad capilar a macromoléculas. Estos cambios se acompañan de cambios ultraestructurales como el engrosamiento de la membrana basal glomerular (MBG), hipertrofia glomerular y expansión mesangial con el subsecuente desarrollo de glomeruloesclerosis y fibrosis tubulointerstitial (Raptis y Viberti, 2001). En la **Figura 1** se esquematizan los cambios estructurales en la ND comparados con la estructura renal normal.



Trends in Endocrinology & Metabolism

Figura 1. Estructura de un glomérulo normal (A) y un glomérulo diabético (B). Tomado de Gnudi y cols., 2016.

Mogensen (1984) clasificó el curso de la enfermedad en cinco estadios tomando en cuenta los cambios en la ultraestructura renal, la GFR, el aclaramiento de dextrano, la excreción de albúmina, la presión arterial y la reversibilidad de la enfermedad con insulina y con antihipertensivos. Sin embargo, el “Comité Conjunto de Nefropatía Diabética” (DNJC) reclasificó los estadios de la DN, basándose en el pronóstico de un grupo de pacientes diabéticos dentro del proyecto “Investigación de la Nefropatía Diabética” del Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar de Japón (Haneda *et al.*, 2015). En el **Cuadro 1** se muestra dicha clasificación tomando en cuenta los valores de corte de proteína urinaria y la GFR. Los cambios histológicos en la ND son idénticos en la DM1 y la DM2. Las personas con DM1 y DM2 presentan tasas equivalentes de proteinuria, azotemia e IRCT. Ambos tipos de diabetes muestran grandes



similitudes en la tasa de deterioro de la función renal y en el establecimiento de la morbilidad de las complicaciones relacionadas (Muthuppalaniappan y Sheaff, 2015).

Cuadro 1. Estadios de la ND de acuerdo al “Comité Conjunto de Nefropatía Diabética” (Haneda *et al.*, 2015).

Etapas	Albúmina urinaria (mg/g) o Proteína urinaria (g/g Cr)	GFR (mL/min/1.73 m²)
1 (prenefropatía)	Normoalbuminuria (<30)	≥30
2 (nefropatía incipiente)	Microalbuminuria (30-299)	≥30
3 (nefropatía establecida)	Macroalbuminuria (≥300) o proteinuria persistente (≥ 0.5)	≥30
4 (insuficiencia renal)	Cualquier estado de albuminuria/proteinuria	≤30
5 (terapia con diálisis)	Macroalbuminuria (≥300) o proteinuria persistente (≥ 0.5)	<15

Creatinina=Cr, Tasa de filtración glomerular=GFR, 1.73 m² corresponde al peso de una persona adulta de 70 Kg de peso.

1.3. Tratamiento de la ND

El control glicémico se ha manejado como la clave para retardar, prevenir o revertir las complicaciones diabéticas, principalmente la enfermedad renal; sin embargo, varios estudios epidemiológicos no arrojan resultados concluyentes. En el caso de la DM1 los hallazgos del estudio “Control de la DM y sus Complicaciones/ Epidemiología de las Intervenciones y Complicaciones en Diabetes” (DCCT/EDIC) confirmaron que un control estricto de la terapia con insulina tiene efectos benéficos sostenidos en las complicaciones microvasculares incluyendo la reducción en la progresión a microalbuminuria y macroalbuminuria. Por otra parte, se encontró que GFR era menor en el grupo con terapia convencional que en el grupo tratado con terapia intensificada. En cuanto a la DM2, tres estudios desarrollados simultáneamente, ACCORD, ADVANCE y VADT, no han podido demostrar beneficios de la intensificación del



control glicémico en las enfermedades macrovasculares ni sobre los puntos finales de la enfermedad renal, como el aumento de la creatinina sérica o la muerte (Cooper, 2012).

1.3.1. Control glicémico

El control glicémico estricto ($HbA_{1c} < 7\%$, 53 mmol/L) disminuye el desarrollo de ND en pacientes con DM1 y DM2, tal como indica el “Ensayo de Control de la Diabetes y sus Complicaciones” (DCCT) y el “Estudio Prospectivo de la Diabetes del Reino Unido” (UKPDS). En estos estudios, pacientes con DM1 y normoalbuminuria o pacientes con DM2 fueron asignados aleatoriamente con un control intensivo de los niveles de glucosa o con cuidado estándar; aquellos con un control intensivo de los niveles de glucosa tuvieron una reducción en la incidencia de albuminuria y de mortalidad (Muthuppalaniappan *et al.*, 2015). Lamentablemente, no se ve un efecto del control glicémico en la ND establecida ya que otros factores pueden estar contribuyendo al daño glomerular (Ertugrul *et al.*, 2011).

1.3.2. Cambios en el estilo de vida

Se recomienda que los pacientes dejen de fumar, aumenten su actividad física, pierdan peso y lleven una dieta saludable y baja en sal (5–6 g/día). Además la Asociación Americana de la Diabetes (ADA) indica una dieta con un bajo contenido de proteína (0.6 g/kg/día). Estas medidas tienen modestos beneficios como el aumento de la efectividad del bloqueo farmacológico del eje Renina-Angiotensina (RAS) (por la restricción en consumo de sal) o disminución de la GFR (por la restricción de la ingesta proteica) (Muthuppalaniappan *et al.*, 2015).

1.3.3. Control de la presión arterial

La hipertensión arterial está reconocida como un factor de riesgo para el inicio y la progresión de la ND. Las guías establecidas por La Enfermedad Renal: Mejorando Resultados Globales (KDIGO) indican que presión arterial debería ser igual o menor de 140/90 mmHg en presencia de microalbuminuria o de 130/80 mmHg si existe macroalbuminuria (KDIGO, 2013). La terapia incluye inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (iECAs) y/o bloqueadores del receptor de angiotensina (BRA), que según la ADA se administran de la siguiente manera (Muthuppalaniappan *et al.*, 2015):

- iECA, para pacientes con DM1, hipertensión y albuminuria.
- iECA + BRA, para pacientes con DM2, hipertensión y microalbuminuria.
- ARB, para pacientes con DM2, hipertensión y nefropatía establecida.



Los resultados de los ensayos clínicos DCCT y UKPDS demostraron que el control estricto de la presión arterial disminuyó el desarrollo de microalbuminuria (29 %) y macroalbuminuria (39 %) en un periodo de seguimiento de 6 años (Ertugrul *et al.*, 2011). A pesar de estos beneficios, el control estricto de la presión arterial puede provocar graves efectos adversos como hipotensión, síncope, bradicardia, angioedema, hipercalcemia o insuficiencia renal aguda (Bangalore *et al.*, 2017).

1.3.4. Control de la dislipidemia

Los niveles elevados de colesterol (>220 mg/dL) en los pacientes con DM1, están asociados con la progresión de la ND, según el Centro de Diabetes Joslin (Krolewski *et al.*, 1994). Además el “Estudio de Protección del Corazón” mostró que el tratamiento con simvastatina estuvo asociado a una menor disminución de la GFR comparado con el placebo después de 4.6 años de seguimiento (Lim, 2014). Sin embargo en pacientes con DM2, no se ha observado un efecto claro del nivel de lípidos y la función renal como lo demuestra un estudio realizado con 456 pacientes con DM2 en el “Ensayo del Grupo de Estudio Cooperativo de Italia del Norte”, donde el nivel de lípidos no tuvo efecto sobre los resultados de función renal (Locatelli *et al.*, 1992).

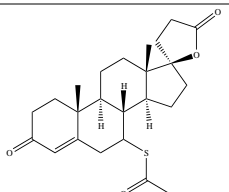
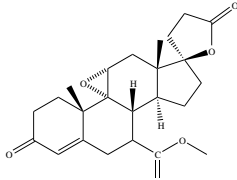
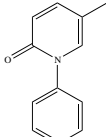
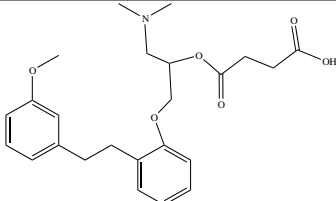
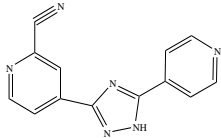
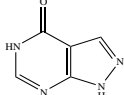
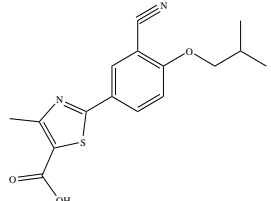
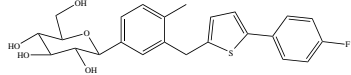
La hiperlipidemia debe monitorearse y tratarse con estatinas o fibratos. Aunque haya mejoría parcial en la función renal por el control de la dislipidemia, esta no es suficiente para detener la progresión del daño renal.

1.3.5. Búsqueda de nuevos fármacos para ND

Debido a que ha habido un gran avance en el estudio de los mecanismos que están involucrados en la ND y a la poca eficacia de la terapia actual, se ha vislumbrado el reposicionamiento de fármacos que tienen un posible efecto sobre alguno de los mecanismos involucrados en el daño renal. Estos fármacos incluyen antihipertensivos y moléculas que combaten el estrés oxidante. La mayoría de estos fármacos están indicados en enfermedades cardiovasculares o para el control de desórdenes asociados a la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) (Brenneman *et al.*, 2016). En el **Cuadro 2** se enlistan los fármacos que buscan reposicionarse para el tratamiento de la ND.



Cuadro 2. Fármacos en ensayos clínicos para reposicionarlos en el tratamiento de la ND.

Fármaco	Estructura	Mecanismo de acción	Estado de desarrollo	Fecha de término
Espironolactona		antagonista del receptor mineralocorticoide	Fase II/III (PRIORITY-NCT02040441)	2017
Eplerenona		antagonista del receptor mineralocorticoide	Fase I/II (EPOCH-NCT 01832558) Fase III (EPURE-NCT 02490904)	2016
Pirfenidona		Inhibidor de TGF-β y pan-citocinas	Fase III (NCT02689778) Fase I/II (NCT02408744)	2018 2010
Sarpogrelato		Inhibidor del receptor 5-HT _{2a}	Fase IV (SONATA-NCT01869881)	NA
Topiroxostat		Inhibidor de la xantina oxidasa	Fase II (UPWARD-NCT02327754)	2016
Alopurinol		Inhibidor de la xantina oxidasa	Fase IV (PERL-NCT01575379)	2019
Febuxostat		Inhibidor de la xantina oxidasa	NCT01350388	2013
Canaglifozina		Inhibidor de SGLT2	Fase III (NCT02065791)	2019

Factor de crecimiento tumoral-β =TGF-β, 5-hidroxitriptamina=5-HT, transportador sodio-glucosa=SGLT.

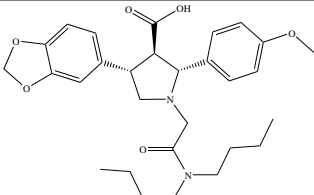
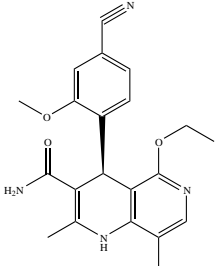
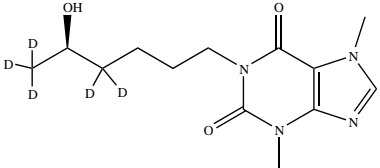
Tomado de Brenneman y cols., 2016.

Además del reposicionamiento farmacológico, existe el desarrollo de nuevos fármacos que han entrado en estudios clínicos en los últimos años. Sin embargo, muchos de ellos no han dado los



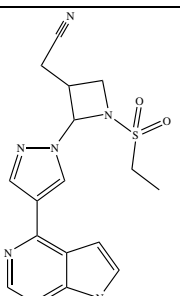
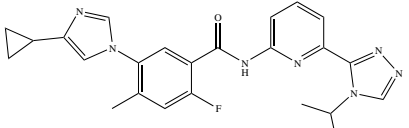
resultados que se esperaban, por lo que no han continuado. En el **Cuadro 3** se enlistan los fármacos que se encuentran bajo desarrollo clínico hasta abril de 2016 (Brenneman *et al.*, 2016).

Cuadro 3. Nuevos fármacos para el tratamiento de la ND.

Fármaco	Estructura	Mecanismo de acción	Estado de desarrollo	Fecha de término
Antagonistas de los receptores acoplados a proteínas G				
Atrasentan		Antagonista del receptor de endotelina-1	Fase III (SONAR-NCT01858532)	2018
SER150 (EV-077)	No revelada	Antagonista de receptores a tromboxano A2/Inhibidor de síntesis de tromboxano	Fase II (2014-003985-25)	NA
Antagonistas de los receptores nucleares				
Finerenona		Antagonista de receptor a mineralocorticoide	Fase III (FIDELIO-DKD-NCT02540993)	2019
MT-3995	No revelada	Antagonista de receptor a mineralocorticoide	Fase II (NCT02517320)	2016
CS-3150	No revelada	Antagonista de receptor a mineralocorticoide	Fase II (NCT02345057)	2016
KBP-5074	No revelada	Antagonista de receptor a mineralocorticoide	Fase I/II (NCT02653014)	2016
Inhibidores de enzimas				
CTP-499		Inhibidor no selectivo de fosfodiesterasas	Fase II (NCT01487109)	2015



Cuadro 3. Nuevos fármacos para el tratamiento de la ND (Continuación).

Fármaco	Estructura	Mecanismo de acción	Estado de desarrollo	Fecha de término
Inhibidores de enzimas				
ASP-8232	No revelada	Proteína de adhesión vascular-1 (VAP-1)	Fase II (NCT 02358096)	2017
Inhibidores de receptores de quimiocinas e inhibidores de quimiocinas				
CCX-140	No revelada	antagonista de receptor de quimiocina 2 (CCR2)	Fase II (NCT01447147)	2014
NOX-E36	Aptámero de RNA pegilado	Proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1)	Fase II (NCT 01547897)	2013
Inhibidores de cinasas				
Baricitinib		JAK1/2	Fase II (NCT 01683409)	2014
Selonsertib		Inhibidor de la cinasa regulada por señal de apoptosis (ASK1)	Fase II (NCT 02177786)	2016
Inhibidores misceláneos				
PBI-4050	No revelada	TGF-β1, CTGF, IL23p19, IL-16	Fase II (NCT02562573)	2016

Factor de crecimiento tumoral-β =TGF-β, IL= interleucina, cinasa janus=JAK, factor de crecimiento de tejido conectivo=CTGF. Tomado de Brennehan y cols., 2016.



1.3.6. Terapia celular

Otra alternativa que se está estudiando en modelos animales, es la terapia con células madre con células estromales mesenquimales y células precursoras de la mesénquima. Las células estromales mesenquimales (MSCs) son células multipotentes no diferenciadas que se han usado satisfactoriamente en modelos de daño renal. Se ha encontrado que la administración endovenosa de las MSCs reduce la albuminuria y protege los riñones de ratones con DM1. En un modelo de rata diabética por estreptozotocina (STZ), la administración de MSCs autólogas a los 30 días de la inyección de STZ, resultó en la disminución de la albuminuria, menor glomeruloesclerosis y dilatación tubular, sin efectos sobre la glucosa sanguínea. Las MSCs además mejoraron el aclaramiento de creatinina y previnieron la pérdida de podocitos. Por otra parte, las células precursoras del mesénquima (MPCs) son líneas celulares derivadas de médula ósea adulta que poseen actividad antiinflamatoria. Usando estas células, se llevó a cabo un estudio clínico piloto controlado por placebo y aleatorizado, para evaluar la seguridad y tolerabilidad de la infusión intravenosa de MCPs en pacientes con DM2 (con control inadecuado de uno o dos hipoglicemiantes). No se encontraron eventos adversos durante y después de la infusión de las MPCs y 12 semanas después sólo el 44.3% de los pacientes reportaron eventos adversos leves. Además se encontró que poseen eficacia para disminuir la hemoglobina glicosilada (Lacava *et al.*, 2017). De tal manera que las células madre podrían considerarse como una alternativa para el tratamiento de la ND.

1.3.7. Alternativas para el tratamiento de la ND

El tratamiento estándar empleado en la clínica no ha sido suficiente para evitar la aparición o progresión de la enfermedad, por lo que se ha recurrido al uso de productos naturales con este fin. Las plantas y sus derivados se han usado de manera empírica, sin embargo en las últimas dos décadas ha surgido el interés por el estudio de los efectos y los posibles mecanismos de los extractos de plantas en modelos animales de ND o en estudios clínicos con pacientes diabéticos. A continuación, se enlistan en el **Cuadro 4** algunos ejemplos de extractos de plantas y compuestos que han sido objeto de estudio.



Cuadro 4. Plantas medicinales y sus derivados en estudios pre-clínicos y estudios clínicos.

Planta/ compuesto	Tipo de diabetes	Diseño	Mecanismo posible	Resultado clave	Referencia
<i>Lycium barbarum</i>	DM1	ratas Wistar diabetizadas con STZ	Antioxidante	Administrado por 2 meses (10 mg/kg/día) aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes, disminuye activación de PKC	Zhao <i>et al.</i> , 2009
silimarina	DM2	Pacientes diabéticos en EAC	Antioxidante Antiinflamatorio Antiapoptótico	Administrada por 3 meses (140 mg, 3 veces al día) redujo albuminuria, TNF- α en orina y MDA en suero	Fallahzadeh <i>et al.</i> , 2012
curcumina	DM2	Pacientes diabéticos en EAC	Antioxidante	Administrada por 2 meses (500 mg, 3 veces al día) redujo albuminuria, TGF- β e IL-8	Khajehdehi <i>et al.</i> , 2011
galato de epigaloca- tequina	DM1 y DM2	Pacientes diabéticos en EAC	Antioxidante	Administrada por 3 meses (800 mg) redujo albuminuria y apoptosis de podocitos	Borges <i>et al.</i> , 2016
propóleo	DM1	ratas Wistar diabetizadas con STZ	Antioxidante	Administrado por 6 semanas (100 y 200 mg/kg/día) disminuyó glucosa sérica y MDA	Sameni <i>et al.</i> , 2016

Ensayo clínico aleatorizado=EAC, Factor de crecimiento tumoral- β =TGF- β , malondialdehído=MDA, factor de necrosis tumoral- α =TNF- α , proteína cinasa C=PKC, IL= interleucina. Modificado de Lim, 2014.



1.3.7.1. Flavonoides y nefropatía diabética

Además de los extractos, se han evaluado los efectos de los compuestos aislados de las plantas como los flavonoides. Los flavonoides principalmente actúan sobre el estrés oxidante por disminución de la peroxidación de lípidos, incremento de la actividad de enzimas antioxidantes (glutación peroxidasa (GPx), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT)). Además, reducen la expresión de MCP-1, TNF- α , TGF- β , fibronectina y colágena-IV y reducen los niveles de IL-1 β e IL-6 en suero (Vessal *et al.*, 2010; Tsai *et al.*, 2012; Ahad *et al.*, 2014). Por lo tanto, los flavonoides son capaces de mejorar la ND al disminuir el estrés oxidante y al modular la expresión y la producción de citocinas y quimiocinas.

La naringenina, la crisina y la quercetina, se encuentran en el propóleo y tienen individualmente efecto sobre la ND, por lo que el uso de un solo compuesto del propóleo es una alternativa para tratar la ND.

1.4. Patología y patofisiología

La extensa investigación en las últimas décadas sobre el mecanismo responsable del daño renal en la ND, ha permitido saber que no se trata de un solo mecanismo sino de la interacción entre factores hereditarios y los factores no hereditarios. En la siguiente sección se describen de manera general, los factores involucrados en la patofisiología de la ND.

1.4. Factores no hereditarios

Los factores principales que contribuyen al inicio y progresión del daño glomerular son los factores hemodinámicos y los factores metabólicos (Hostetter, 1982).

1.4.1. Factores hemodinámicos

En la ND existe un desbalance en la resistencia de las arteriolas aferente y eferente que resulta en un aumento de la presión hidrostática glomerular e hiperfiltración. La activación del sistema renina-angiotensina aumenta los niveles de angiotensina II llevando a la vasoconstricción arteriolar eferente y a la producción de moléculas pro-inflamatorias y pro-fibróticas (Lim, 2014) (**Cuadro 2**). Además, altos niveles de angiotensina II se han asociado con altos niveles de albuminuria y nefropatía en ratones y humanos diabéticos (Rudberg *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2001).

La endotelina-1 (ET-1) es un vasoconstrictor que participa en la homeostasis del sodio y del control de la presión arterial. Sin embargo, niveles elevados de ET-1 estimulan la producción de factores de crecimiento y citocinas, que a su vez promueven la adhesión de neutrófilos, la



agregación plaquetaria y la formación de matriz extracelular (MEC), generando fibrosis en el glomérulo (Chandrashekar, 2014).

1.4.2. Factores metabólicos

La hiperglicemia es la determinante principal y el pre-requisito para el inicio y progresión de la ND, ya que ejerce efectos por múltiples vías de señalización, incluyendo la reacción no enzimática de glucosa con proteínas, resultando en la formación de productos finales de glicosilación avanzada (AGEs), la activación de la vía de la proteína cinasa C (PKC), la estimulación de la vía de poliol, la generación EROs y atenuación de los mecanismos antioxidantes (Brownlee, 2005; Vessal *et al.*, 2010).

La resistencia a la insulina es una característica de la diabetes mellitus. Además de causar hiperglicemia, la resistencia a la insulina en podocitos lleva a la pérdida de la morfología, la apoptosis, la albuminuria, el engrosamiento de la membrana basal glomerular, el aumento de MEC y finalmente a la glomeruloesclerosis (Welsh *et al.*, 2010).

Cuadro 5. Vías de señalización activadas por las especies reactivas de oxígeno.

Vía	Efecto	Referencia
Poliol	Estrés osmótico inducido por sorbitol. Aumento de la relación NADH/NAD ⁺ . Disminución del NADPH citosólico. Depleción de GSH.	Brownlee, 2005
Hexosamina	Aumento de PAI-1 y producción de TGF- β .	Brownlee, 2005
PKC	Afecta la expresión de eNOS, ET-1, VEGF, TGF- β and PAI-1. Activa NF- κ B y oxidasas de NADPH.	Brownlee, 2005
AGE	Modificación covalente de proteínas intracelulares, proteínas de MEC y proteínas plasmáticas. Expresión de citocinas pro-inflamatorias y factores de crecimiento.	Brownlee, 2005; Lim 2014
MAPK	Activación de la vía AGE, poliols y PKC. Activación del gen de angiotensinógeno. Esclerosis por señalización de TGF- β 1. Inflamación.	Forbes <i>et al.</i> , 2007

Óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), endotelina-1 (ET-1), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento tumoral- β (TGF- β), inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), matriz extracelular (MEC), factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B).



1.4.2.1. Estrés oxidante

El estrés oxidante y la generación de EROs dañan el ácido desoxirribonucleico, los lípidos y las proteínas, pero también funcionan como amplificadores de señales para activar las vías de estrés celular como la vía de la PKC, de los polioles, de las hexosaminas, de los AGEs y de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK). En el **Cuadro 5** se resumen los efectos de estas vías de señalización en el tejido renal.

Las EROs directamente ejercen efectos deletereos en el riñón, ya que contribuyen a la disfunción endotelial, el engrosamiento de las paredes y la formación de lesiones (Griendling *et al.*, 2000). En la corteza renal, el aumento de EROs se debe especialmente a la regulación a la alta de la oxidasa de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato 4 (Nox4) (Brownlee, 2005).

1.4.2.2. Citocinas y factores de crecimiento

El factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) regula la expresión de los genes de citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión, las principales se enlistan en el **Cuadro 6** con sus efectos sobre el daño renal.

Cuadro 6. Efecto de citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión en la ND.

Citocina	Efecto
CRP	Inmunidad innata durante el daño renal.
TNF- α	Sus efectos citotóxicos pueden inducir daño directamente al glomérulo, mesangio y células epiteliales. Promueve la generación local de O ₂ ⁻ . Contribuye a la retención de sodio e hipertrofia renal. Participa en la inflamación sistémica por el aumento de los niveles de quimioatrayentes de linfocitos y expresión de ICAM-1.
MCP-1	Media la infiltración y acumulación de macrófagos.
ICAM-1	Promueve la adhesión de leucocitos. Responsable de la infiltración renal de macrófagos.
TGF- β	Aumenta la producción de MEC, llevando a glomeruloesclerosis y fibrosis intersticial.
CTGF	Efector río abajo de la señalización de TGF- β .
IL-6	Regula a la alta la proliferación mesangial y la fibronectina. Afecta la dinámica de la MEC de las células mesangiales y los podocitos.
IL-1	Aumenta la permeabilidad vascular, la proliferación de las células mesangiales y deposición de la MEC.

Proteína C reactiva (CRP), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), proteína de quimioatracción de monocitos-1 (MCP-1), molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 (IL-1), matriz extracelular (MEC), factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B). Modificado de Elmarakby, 2010.



1.4.2.3. Respuesta inmune

Los macrófagos y las células T se acumulan en el glomérulo y en el intersticio desde etapas tempranas de la enfermedad (Lim y Tesch, 2012).

Los macrófagos son las principales células involucradas en el daño renal ya que su acumulación correlaciona con la severidad de la ND en modelos experimentales. Los macrófagos tipo M1 pueden aumentar la respuesta inflamatoria mediante la expresión de citocinas (ILs, TNF, interferón- γ) y de EROs, y los macrófagos tipo M2 promueven la reparación, remodelación y neovascularización mediante la expresión de citocinas anti-inflamatorias. Por lo que una estrategia para detener la ND consiste en bloquear la acción de los macrófagos M1 y mejorar las funciones de los macrófagos M2 (Durán-Salgado y Rubio-Guerra, 2014).

Las células T regulan la resolución de la inflamación o la falta de ésta. Las células CD4⁺ activadas organizan los sellos distintivos de la inflamación como el reclutamiento y liberación de quimiocinas, sobre todo se intercomunican con los fibroblastos para producir fibrosis (Zheng y Zheng, 2016).

1.5. Factores hereditarios

Actualmente, se han tratado de identificar qué locus de los genes y/o qué genes son factores de riesgo para desarrollar ND. Para este fin se han usado varias estrategias, entre las que se encuentran el análisis de genes candidato, el análisis de asociación basado en la familia, el mapeo de mezcla basado en la población y estudios de asociación de genoma ampliado.

Estos análisis genéticos han demostrado la participación de diversos genes relacionados con la vía del óxido nítrico, de renina-angiotensina, de bradicinina, del metabolismo de la glucosa, de la producción de lípidos y de la resistencia a insulina. Algunos ejemplos de los genes identificados son el gen de la carnosinasa 1 en el cromosoma 18q, el gen de adiponectina en el cromosoma 3q y el gen de engullición y motilidad celular en el cromosoma 7p (Satirapoj y Adler, 2014; Tang *et al.*, 2015).

2.2. El propóleo

2.2.1. Definición y generalidades

El propóleo es una mezcla resinosa colectada por las abejas de la miel (*Apis mellifera*), a partir de exudados y brotes de árboles, como el olmo, el sauce, el álamo, el abedul, entre otros, los cuales son mezclados con cera y enzimas de estos animales quienes, lo utilizan para sellar las paredes de su colmena (Hernández *et al.*, 2007). Las abejas lo utilizan en el panal para cubrir



huecos, mantener la temperatura y embalsamar a los intrusos que no pueden trasladar fuera de la colmena (Burdock, 1998). Es una mezcla compleja compuesta aproximadamente de resina y bálsamo en un 50%, 30% de cera, 10% de aceites esenciales y aromáticos, 5% de polen y 5% de otros componentes. Estas proporciones dependen de la fuente natural de recolecta de las abejas (Cirasino *et al.*, 1987; Toreti *et al.*, 2013). La composición química del propóleo es altamente dependiente de la flora de la región de donde es recolectado (Melliou *et al.*, 2007). Hasta la fecha se han estudiado propóleos de España, Cuba, Chile, Portugal, Países Bajos, Bulgaria, Argentina, Argelia, Japón, Nueva Zelanda, Jordania, China, Rumania, Croacia, Grecia, Turquía, México, Canadá y Brasil. De estas muestras se han identificado ácidos fenólicos y sus ésteres, flavonoides, isoflavonoides, lignanos, terpenos, benzofenonas preniladas, azúcares, aminoácidos y ácidos grasos.

En la literatura existen escasos reportes sobre la composición química del propóleo de México y corresponden a muestras recolectadas en las zonas del norte y de la Península de Yucatán. Li y cols. (2010) aislaron pinocembrina, 3-acetato de pinobanksina, tectocrisina, galangina y crisina, así como ácidos aromáticos y sus ésteres, de un propóleo recolectado en Sonora. Lotti y cols. (2010) aislaron pinocembrina además de isoflavanos y ptercarpanos de un propóleo de Yucatán. Boisard y cols. (2015) analizaron por HPLC-DAD una muestra de Quintana Roo e identificaron triterpenos pentacíclicos como α -amirenona, β -sitosterol, fucosterol, y α -amirina IV. Guzmán y cols. (2018) aislaron epoxipinocembrina, pinocembrina, pinostrobina, izalpinina, kaempferol, ramnetina y ácidos aromáticos de propóleos de Chiapas y Yucatán. Rivera-Yáñez y cols. (2018) analizaron por HPLC-DAD un propóleo de Chihuahua e identificaron naringina, naringenina, kaempferol, quercetina, acacetina, luteolina, crisina y pinocembrina. Las muestras de Quintana Roo y Yucatán pueden ser consideradas aparte de las otras muestras, porque las fuentes botánicas presentes en estos estados están constituidas principalmente por las especies *Bursera simaruba*, *Lysiloma latisiliquum* y *Dalbergia sp* (Lotti *et al.*, 2010; Boisard *et al.*, 2015).

2.2.2. Clasificación del propóleo

Con base en los reportes de la composición de los propóleos de diferentes países, Salatino y cols. (2011) realizaron la clasificación quimio-geográfica que se ilustra en la **Figura 2**. Esta clasificación divide a los propóleos del mundo en cinco tipos. A continuación se describen las características químicas de cada clase (tipo I a tipo V).



Figura 2. Patrón quimio-geográfico del propóleo de acuerdo a Salatino y cols. (2011).

Los propóleos tipo I son denominados del tipo del álamo de las zonas templadas, caracterizados por flavonoides sin sustitución en el anillo B y por ésteres de fenilpropanoides. El propóleo tipo II es el verde brasileño, compuesto principalmente de fenilpropanoides prenilados y ácidos cafeilquínicos. El propóleo tipo III se deriva del género *Clusia* y contiene benzofenonas polipreniladas. El propóleo tipo IV proviene de la *Macaranga* y se caracteriza por contener geraniilflavonoides. El propóleo tipo V proviene de Grecia, Creta y Turquía, los cuales pueden contener diterpenoides o antraquinonas. Claramente, el propóleo mexicano pertenece al tipo I, según esta clasificación. Por otra parte, internamente en México se distinguen cinco regiones apícolas (**Figura 3**), caracterizadas por la flora néctar-polinífera y la existencia de explotaciones apícolas. Esta regionalización solamente hace distinción entre los tipos de mieles de cada zona, pero no hace referencia al tipo de propóleo. No obstante, se infiere que en cada zona habrá un tipo de propóleo diferente debido a la diversidad de climas y vegetación que hay a lo largo del país.



Figura 3. Regionalización de la producción apícola de miel en México. Tomado de Coordinación General de Ganadería/SAGARPA (2010).

2.2.3 El propóleo y la ND

Debido a que el propóleo ha demostrado modular alteraciones en el metabolismo de la glucosa y de lípidos en la diabetes, también se han evaluado sus efectos en la ND.

El grupo de Abo Salem y cols. (2009) estudiaron el efecto de un propóleo verde brasileño en ratas diabetizadas con STZ. Encontraron que mejoró el peso corporal, la glucosa en sangre, el perfil lipídico, los niveles de malondialdehído (MDA) y las pruebas de funcionamiento renal; estos resultados se asociaron a un aumento de la SOD, la CAT y de glutatión reducido (GSH). En conjunto estos resultados indican que el propóleo tiene un efecto protector contra el daño renal de manera dosis-dependiente.

Por otra parte, Orsolich y cols. (2012) administraron un extracto de propóleo croata a ratones diabetizados con aloxana y encontraron mejoría en el peso corporal, la sobrevivencia, el perfil de lípidos y la histología renal. Con estos resultados, los autores concluyeron que la capacidad antioxidante y la modulación de lípidos evitaron el daño renal.

Finalmente, Semani y cols. (2016) administraron un extracto etanólico de origen iraní a ratas diabéticas, encontraron que impidió la pérdida de peso corporal, disminuyó la glucosa sérica y los niveles de MDA, aumentaron la actividad de la SOD y de la GPx y disminuyó el área



glomerular y el grosor de la MBG. El efecto del extracto de propóleo se puede deber al aumento de los niveles de antioxidantes en los riñones y a la disminución de la glucosa sanguínea.

Los hallazgos de los tres estudios indican que el propóleo disminuye el daño renal por disminución del estrés oxidante y en parte, por la disminución de la lipidemia y la glicemia.

2.3. Efecto nefroprotector de los flavonoides

Un grupo de compuestos particularmente abundante en el propóleo son los flavonoides. Los flavonoides son compuestos fenólicos que poseen una amplia gama de actividades farmacológicas como vasodilatadoras, anticarcinogénicas, antiinflamatorias, antibacterianas, inmuno-estimuladoras, anti-virales, entre otras (Rice-Evans *et al.*, 1996). La mayoría de sus efectos benéficos en la salud son atribuidos a su propiedad antioxidante y a su capacidad para quelatar metales (Heim *et al.*, 2002).

Los efectos benéficos del propóleo sobre la ND se deben mayoritariamente a su alta actividad antioxidante, misma que se debe en gran parte a los flavonoides; es por ello que probablemente el flavonoide mayoritario del propóleo podría ser el responsable de los efectos benéficos de éste.

El efecto nefroprotector de flavonoides y de productos ricos en flavonoides se ha estudiado en modelos murinos de toxicidad por gentamicina, ciclosporina, arsenito de sodio, tetracloruro de carbono (CCl₄) y cadmio. Los mecanismos por los cuales los flavonoides protegen al riñón son a través de la disminución de estrés oxidante, mejoría de parámetros de la función renal (nitrógeno ureico en sangre (BUN) y creatinina sérica (sCr)) y disminución de la apoptosis de las células renales (Dahal y Mulukuri, 2015).



2. Planteamiento del problema

A pesar de las opciones de tratamiento y prevención de los factores de riesgo asociados a la diabetes mellitus, la ND sigue siendo un problema de salud de alto impacto en la morbilidad y mortalidad de los pacientes diabéticos, cuya cifra de estos con IRCT va en aumento tanto en México como en otros países latinoamericanos. El aumento de los pacientes con IRCT además se encuentra aumentada debido al incremento del número de pacientes diabéticos, que también ocurre en los países desarrollados. Tan sólo en Estados Unidos el 44% de nuevos pacientes que inician diálisis son diabéticos (Ertugrul *et al.*, 2011).

Las medidas para prevenir y tratar la nefropatía diabética no han sido efectivas para evitar la aparición de la enfermedad, de allí la necesidad de encontrar nuevas alternativas para el tratamiento de la ND. En este sentido, los productos naturales han sido un medio para que el ser humano procure su salud. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en los países industrializados al menos 50% de la población ha utilizado medicina complementaria o alternativa al menos una vez. Mientras que en los países en desarrollo, una gran parte de la población, depende del uso de plantas medicinales como primer o único recurso para cuidar la salud (OMS, 2013).

Debido a la asequibilidad y por la amplia tradición en plantas medicinales, la población mexicana recurre a éstas para el tratamiento de la diabetes y sus complicaciones (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005). El propóleo es un producto natural que se comercializa bajo diferentes formulaciones en México, como tinturas, extractos etanólicos, jarabes, extractos acuosos, emulsiones y ungüentos. La composición del propóleo varía enormemente con el sitio y la fecha de recolección, entre otros factores; dando origen a varios tipos de propóleo en el mundo pero hasta el momento no existe un criterio para estandarizarlos. Aunado a esto, se cuenta con escasos reportes de la composición del propóleo mexicano. Cabe resaltar que aunque los propóleos de México están considerados dentro de los tipo I o de clima templado, pero existen cuatro tipos de clima en México y por tanto, hay diferente distribución de la vegetación de acuerdo a éste. A causa de la alta variabilidad en su composición y a la problemática para estandarizar dicha composición, resulta pertinente la evaluación del compuesto mayoritario del propóleo en vez del extracto.



En este marco de referencia, en el presente proyecto se propone la investigación química de propóleos de la zonas melíferas de México, así como la investigación farmacológica del efecto del compuesto mayoritario de propóleo mexicano en la nefropatía diabética.



3. Objetivos

Objetivos principales

1. Determinar composición química (volátiles y no volátiles) de propóleos recolectados en diferentes regiones de México.
2. Evaluar el efecto del compuesto mayoritario de alguno de estos propóleos en un modelo murino de nefropatía diabética de forma preventiva y correctiva.

Objetivos particulares

- a. Identificar los compuestos volátiles del propóleo crudo de Durango, Chihuahua, Zacatecas y Ciudad de México, mediante la técnica HS-SPME-GC/MS-TOF.
- b. Realizar el estudio fitoquímico para obtener el compuesto mayoritario del extracto etanólico de los propóleos objeto de estudio.
- c. Evaluar la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos del propóleo *in vitro* mediante los ensayos de neutralización del radical libre 2,2-difenilo-1-picrilhidrazilo, de poder reductor de hierro y blanqueamiento de β -caroteno.
- d. Evaluación del efecto del compuesto mayoritario sobre las alteraciones hepáticas, renales y lipídicas en un modelo murino de nefropatía diabética.
- e. Determinar el efecto del compuesto mayoritario sobre la estructura renal durante la nefropatía diabética.
- f. Estudiar si el compuesto mayoritario del propóleo modifica el estrés oxidativo en tejido renal durante la nefropatía diabética.



4. Metodología

4.1. Procedimientos generales de análisis

4.1.1. Análisis cromatográficos

La cromatografía en columna abierta se realizó sobre gel de sílice 60 (Merck), Sephadex LH-20 (Fluka) y Poliamida 6 (Merck).

Los análisis cromatográficos en capa fina se realizaron sobre placas de aluminio cubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck, tamaño de partícula 0.063 - 0.200 mm) en diversos tamaños y sistemas de elución. Se observaron bajo luz UV a $\lambda = 254$ nm y 315 nm, posteriormente se revelaron con vainillina sulfúrica, a 100 °C.

4.1.2. Determinación de las constantes espectrométricas y espectroscópicas

Los espectros de masas se generaron en un equipo Agilent 6890L por impacto electrónico a 70 eV y el analizador másico de tiempo de vuelo.

Los espectros de RMN de ¹H y ¹³C se obtuvieron de un equipo Varian, a una radiofrecuencia de 400 MHz y 100 MHz, respectivamente. Las muestras se disolvieron en CDCl₃, DMSO-*d*₆, MeOH-*d*₄ y acetona-*d*₆, según el caso. Los desplazamientos químicos se expresan en el parámetro δ (ppm) y están referidos al tetrametilsilano.

4.2. Recolección del material de estudio

El propóleo se recolectó en las zonas melíferas del norte y del Altiplano de México. En el **Cuadro 7** se resume el lugar, método de recolección y cantidad recolectada. Posteriormente, el material se limpió, desecó y se conservó a -20 °C hasta su extracción.

Cuadro 7. Resumen de las condiciones de recolección del propóleo.

Clave	Lugar de recolección	Fecha de recolección	Método de recolección	Cantidad (g)
ZAC	Fresnillo	2013	raspado	160.0
DUR	Comarca Lagunera	2014	raspado	85.0
CHI	El Parral	2015	raspado	169.5
CDMX	San Luis Tlaxiátemalco	2013	malla	320.0

ZAC= Zacatecas, DUR=Durango, CHI=Chihuahua, CDMX=Ciudad de México.

A continuación se describen las especies vegetales que abundan en cada una de las zonas de recolección.



4.2.1. Zacatecas

La localidad de Fresnillo, Zacatecas está localizada en las coordenadas 23° 10' 19''N, 102° 51' 39''O, en una zona de pastizal, donde las especies principales son zacatón (*Muhlenbergia macroura*), liendrilla (*Astrophytum ornatum* (DC.) Britton & Rose), zacate tres barbas (*Aristida adscensionis* var. *coarctata* (HBK.) Kuntze), zacate navajita (*Bouteloua gracilis* (Willd. ex Kunth) Lag. ex Griffiths), huizache chino (*Acacia schaffneri*) y zacate chino (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.). Dentro de la misma localidad, se puede encontrar una zona de bosque donde la especies principales son pino blanco (*Pinus halepensis*), pino chino (*Pinus armandii*), piñón (*Pinus cembroides*) y encino colorado (*Quercus oleoides* Schltdl. & Cham.) (INEGI, 2009).

4.2.2. Durango

Gómez Palacios es una localidad de Durango situada en 25° 33' 40''N, 103° 29' 54''O, una zona árida. La vegetación predominante es el matorral desértico micrófilo asociado a la vegetación secundaria. El mezquite (*Prosopis juliflora* Sw. DC) es la especie silvestre más prominente para la apicultura en la Comarca Lagunera. Además, se puede encontrar huizache (*Acacia farnesiana* (L.) Willd.), yucas (*Yucca* sp.), nopales (*Opuntia* sp.), maguey (*Agave asperrima* Jacobi), diversos cactus, gobernadora (*Larrea divaricata* Cav.) y lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.) (INEGI, 2001). Por otra parte, la alfalfa, los cultivos forrajeros anuales y los hortícolas conforman el conglomerado vegetal cultivado de mayor importancia en esta región. A 57.8 km de Gómez Palacio se encuentra el Parque Estatal Cañón de Fernández, donde resaltan los sauces (*Salix* sp.), ahuehuetes (*Taxodium mucronatum*), álamos (*Populus* sp.), jarilla (*Bracharis glutinosa*), zacate chino, mezquite (*Prosopis laevigata*) (Flores-Aldana, 2007).

4.2.3. Chihuahua

Hidalgo de Parral está situado en las coordenadas 26° 55' 57''N, 105° 39'O. La vegetación es predominantemente pastizal conformado por las especies *Sporobolus airoides*, *Atriplex canescens* (chamizo), *Hilaria mutica* (toboso), acompañadas de algunos arbustos como *Larrea tridentata* y *Prosopis glandulosa*. Sin embargo, existe una pequeña región boscosa denominada Bosque de Tásate, ya que está conformado por árboles del género *Juniperus* o tásates (también nombrados enebros o cedros) (Secretaría de Desarrollo Rural del Estado de Chihuahua, 2015).

4.2.4. CDMX

Acuexcomatl es un Centro de Educación Ambiental localizado en la zona lacustre de Xochimilco, Ciudad de México. La flora presente en este lugar es tanto endémica como



introducida. Algunas especies que se encuentran son colorín (*Erythrina americana* Miller), ciruelo, ahuejote (*Salix bonplandiana*), ocote (*Pinus greggii* Engelm), abeto (*Abies alba*), magueyes, acezintle (*Acer negundo*), trueno (*Ligustrum lucidum*), roble australiano (*Grevillea robusta*) y ahuehuete (*Taxodium huegelii* C.Lawson) (iNaturalist Org., 2015).

4.3. Determinación de los componentes volátiles del propóleo

Se realizó la determinación de los componentes volátiles de la muestra de propóleo en “bruto” utilizando la técnica acoplada head space-microextracción en fase sólida/cromatografía de gases-espectrometría de masas-tiempo de vuelo (HS-HSPME/GC-MS-TOF) (Torto *et al.*, 2013).

4.3.1. Condiciones de la extracción en fase sólida (HS-SPME)

La cantidad de muestra utilizada fue de 0.5 g, con 20 mL de agua destilada, 0.25 g de NaCl en un vial con tapón de silicón/PTFE y septo de teflón (Supelco Bellefonte, PA, USA). La extracción se llevó a cabo con agitación magnética a una temperatura de 45 °C por 30 min y utilizando una fibra de divinilbencen-carboxen-polidimetilsiloxano 50/30 µm (DVB/CAR/PDMS; 1 cm, fibra gris), sobre un soporte de fibras para inyección manual.

4.3.2. Condiciones de separación cromatográfica y del análisis por espectrometría de masas

Para la realización del análisis se empleó el espectrómetro de masas marca LECO, modelo Pegasus 4D, acoplado a un cromatógrafo de gases Agilent, modelo Agilent 6890N equipado con una columna capilar DB-5 (5 % difenil-95 % dimetilpolisiloxano) con dimensiones de 10 m × 0.18 mm x 0.18 µm. La temperatura del inyector se mantuvo a 300 °C, utilizando como gas acarreador Helio (Praxair, 5.0) a una velocidad lineal de 1 mL/min (medido a 250 °C). La temperatura del horno se programó a 40 °C (durante 1 min) y la rampa de calentamiento fue de 20 °C/min hasta los 300 °C durante 5 min. Las inyecciones fueron realizadas mediante el modo de inyección “splitless” por 3 min.

En el espectrómetro de masas se utilizó ionización electrónica a 70 eV, la temperatura de la cámara de ionización fue de 200 °C y de la línea de transferencia de 250 °C. Se programó una velocidad espectral de 20 espectros/segundo. El barrido de masas fue de 33-400 uma.

4.3.3. Identificación de los compuestos volátiles

La identificación de los compuestos volátiles se realizó en primer lugar por comparación de los espectros de masas obtenidos con los encontrados en la base de datos NIST (National Institute of Standards Technology). Por otra parte, se utilizó la metodología de Kovats para determinar los



índices de retención y realizar la identificación de los compuestos al comparar los índices con los descritos en la biblioteca NIST (Linstrom y Mallard, 2011) y en Adams (2007).

4.4. Extracción del propóleo

Los extractos etanólicos de las muestras de propóleo (EEP) se prepararon utilizando el método de maceración con etanol al 70% como disolvente (2 L × 3) por un período de 2 semanas. La cantidad de propóleo extraída para cada muestra se enlista en el **Cuadro 4**.

4.5. Determinación de fenoles y flavonoides totales en el extracto etanólico

Se realizó la determinación de los fenoles totales mediante la técnica de Folin-Ciocalteu utilizando la metodología modificada por Singleton y Rossi (1965). Para realizar la cuantificación se construyó una curva patrón de ácido gálico y los resultados se expresan en equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (mg de AG/g exto). Por otra parte, se determinó la cantidad de flavonoides totales de acuerdo a la técnica de Kumazawa y colaboradores (2004). Se construyó una curva patrón utilizando el flavonoide quercetina y los resultados se expresan en equivalentes de quercetina por gramo de extracto (mg de Q/g exto).

4.6. Evaluación de la capacidad antioxidante de los EEP

La capacidad antioxidante de los extractos se midió *in vitro* mediante los ensayos de neutralización del radical libre 2,2-difenilo-1-picrilhidrazilo (DPPH[•]), poder antioxidante/reducción de Fe³⁺ (FRAP) y blanqueamiento de β-caroteno. El antioxidante comercial Trolox se usó como referencia en todos los ensayos.

4.6.1. Neutralización del radical DPPH

Se utilizó el método descrito por Habsah y cols. (2004) con modificaciones. La mezcla de reacción consistió en 100 μL de una disolución metanólica del radical DPPH 0.208 mM y una solución etanólica de la muestra. Se midió la absorbancia al cabo de 30 min en un espectrofotómetro (Multiskan MCC Type 355, Thermo Fisher Scientific) a 540 nm.

4.6.2. Ensayo de poder reductor de hierro (FRAP)

Se utilizó el método descrito por Thaipong y colaboradores (2006) con modificaciones. Se preparó la disolución de trabajo con solución amortiguadora de acetatos 300 mM a pH=3.6, 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina) 10 mM y FeCl₃ 20 mM, en una proporción 10:1:1, respectivamente. De la disolución anterior se tomaron 180 μL y se adicionaron en una placa de 96 pozos junto con 20 μL del extracto total etanólico. Se incubó por 30 min a temperatura



ambiente. Posteriormente se realizó la lectura en espectrofotómetro (Multiskan MCC Type 355, Thermo Fisher Scientific) a 593 nm.

4.6.3. Blanqueamiento de β -caroteno

Se utilizó el método descrito por Wang y colaboradores (2008) con modificaciones. Se preparó una mezcla de reacción que consiste en una emulsión de β -caroteno de 1mg/mL en CHCl_3 , ácido linolénico, Tween 40 y H_2O desionizada, a la cual se adicionó el EEP (0.5 mg/mL). Se realizó la lectura de tiempo cero en el espectrofotómetro (Beckmn Coulter DU 530) a 470 nm y posteriormente se sometió la mezcla de reacción a baño María a 50°C por 1 h, al cabo de la cual se realizó la segunda medición, utilizando como blanco una emulsión de ácido linolénico, Tween 40 y H_2O desionizada.

4.7. Estudio fitoquímico

4.7.1. Zacatecas

En la **Figura 4** se resume el estudio fitoquímico de la muestra recolectada en Fresnillo, Zacatecas.

4.7.1.1. Fraccionamiento primario del EEP

El EEP seco (83.0 g) se fraccionó utilizando cromatografía en columna al vacío (VLC), gel de sílice 60 como adsorbente y como fase móvil mezclas de CH_2Cl_2 y acetona en un gradiente de polaridad creciente. Se recolectaron en total 52 fracciones que fueron reunidas bajo el criterio de similitud cromatográfica en ocho fracciones combinadas (FZ I a FZ VIII).

4.7.1.2. Fraccionamiento secundario y purificación de los compuestos C01-C04.

A partir de la fracción FZ IV, precipitó espontáneamente un sólido blanco, que fue cristalizado con CH_2Cl_2 y acetona para obtener 1.53 g de polvo cristalino que fue identificado como pinocembrina (**C01**).

De la fracción FZ VI precipitó un polvo blanco (30.0 mg) que fue lavado con metanol en frío. El sólido se identificó como la mezcla de los flavonoides 5-*O*-metilpinobanksina (**C02**) y alpinetina (**C03**), en una proporción relativa de 1:2. Las aguas madres obtenidas de la FZ VI se concentraron y recromatografiaron en una columna abierta de Sephadex LH-20 (1.5 × 40 cm) y metanol como eluyente. De este proceso se obtuvieron ocho fracciones que se combinaron de acuerdo con su similitud cromatográfica en tres fracciones secundarias (F1, F2 y F5). Se obtuvo un sólido amarillo (50.0 mg) de la fracción F5, que se caracterizó como isoramnetina (**C04**).

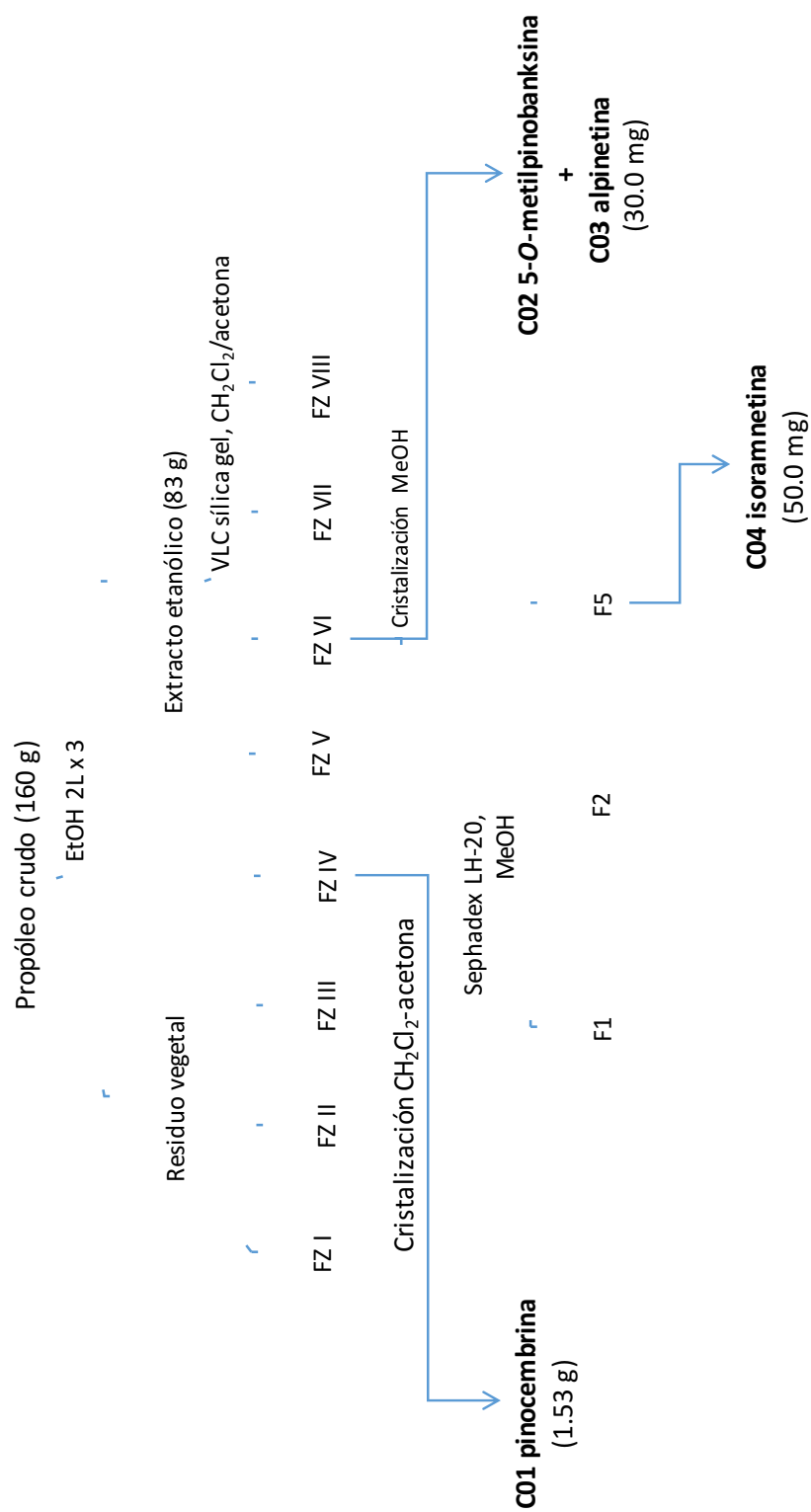


Figura 4. Resumen de los procesos cromatográficos que permitieron el aislamiento de compuestos a partir de la muestra recolectada en Zacatecas.



4.7.2. Durango

En la **Figura 5** se resume el estudio fitoquímico de la muestra recolectada en Gómez Palacios, Durango.

4.7.2.1. Fraccionamiento primario del EEP

El EEP seco (49.8 g) se fraccionó utilizando VLC, gel de sílice 60 como adsorbente y como fase móvil mezclas de CH_2Cl_2 y acetona en un gradiente de polaridad creciente. Se recolectaron un total de 30 fracciones que se reunieron en 10 fracciones combinadas (FD I a FD X).

4.7.2.2. Fraccionamiento secundario y aislamiento de los compuestos C01, C05 y C06

A partir de la fracción FD II y la FD III precipitó espontáneamente un sólido blanco, que fue cristalizado con CH_2Cl_2 para obtener 2.44 g de polvo cristalino, el cual se caracterizó como pinocembrina (**C01**).

Las aguas madres obtenidas de la filtración de **C01** (42.03 g), se sometieron a un fraccionamiento secundario utilizando una columna VLC, gel de sílice como adsorbente y como eluyente mezclas de CH_2Cl_2 – acetona en polaridad creciente. Este proceso permitió la obtención de 23 fracciones secundarias las cuales fueron agrupadas de acuerdo con su similitud cromatográfica en 10 fracciones secundarias combinadas (Fx 1 a Fx 10). La fracción Fx 6 se sembró en una columna con poliamida 6 como adsorbente y se eluyó con una mezcla EtOH/ H_2O 1:1 y EtOH 100%, recolectando 35 fracciones que se reunieron en doce fracciones terciarias. A partir de la fracción F2', se obtuvo un sólido cristalino incoloro (6.0 mg) que se caracterizó como pinobanksina (**C05**). Por otra parte, de las fracciones F14' a F20' se obtuvo un sólido amarillo (30.0 mg), caracterizado como crisina (**C06**).

4.7.3. Chihuahua

En la **Figura 6** se resume el estudio fitoquímico de la muestra recolectada en Parral de Hidalgo, Chihuahua.

4.7.3.1. Fraccionamiento primario del EEP

Una porción del extracto de propóleo (52.1 g) se adsorbió sobre gel de sílice. El fraccionamiento se realizó en una columna al vacío. La elución se realizó utilizando un gradiente de polaridad con mezclas de CH_2Cl_2 y acetona. El proceso resultó en la obtención de seis fracciones combinadas (FC I a FC VI).

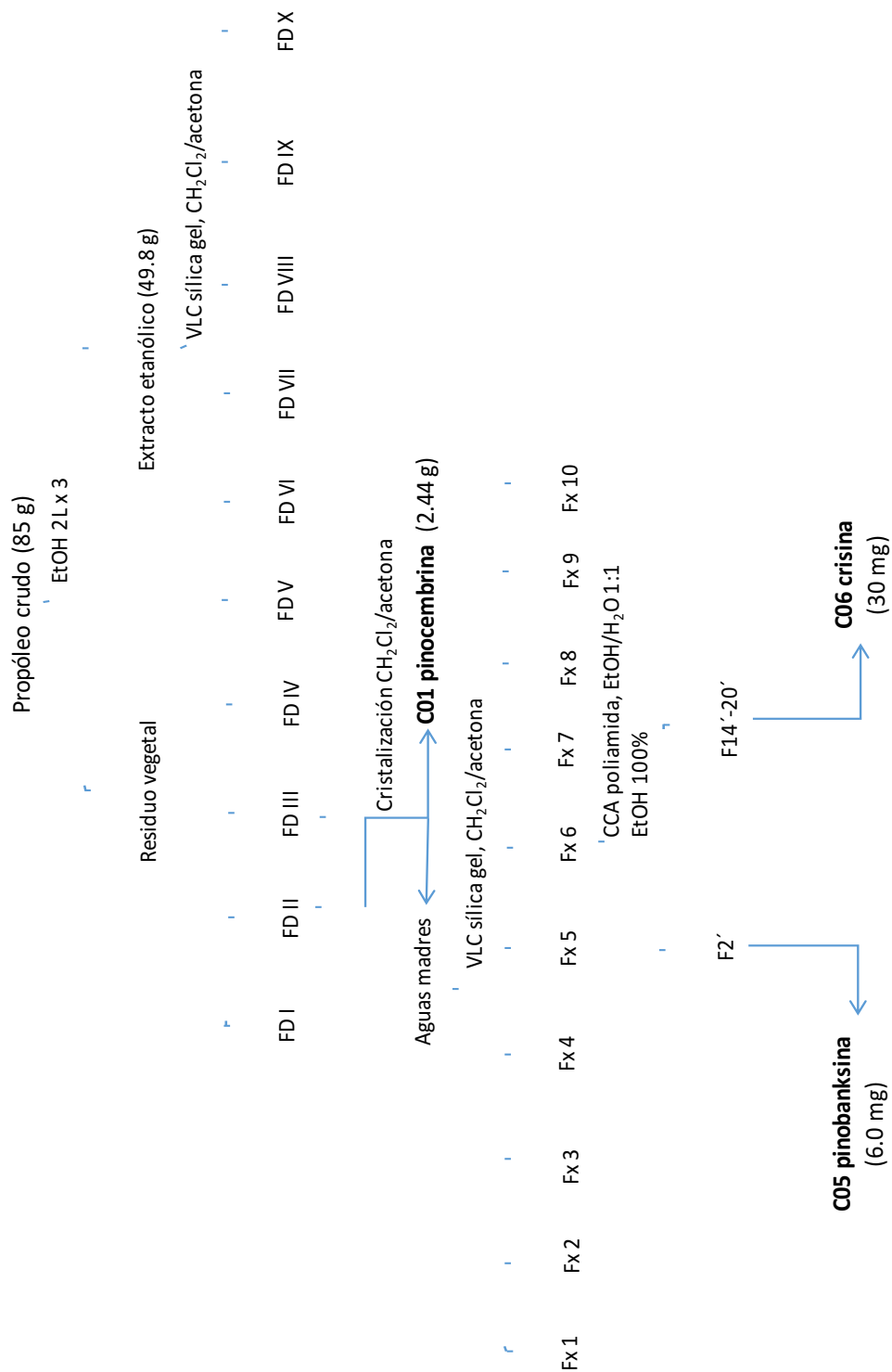


Figura 5. Resumen de los procesos cromatográficos que permitieron el aislamiento de compuestos a partir de la muestra recolectada en Durango.



4.7.3.2. Fraccionamiento secundario del EEP y aislamiento de los compuestos C07-C11.

A partir de la FC II precipitó espontáneamente un sólido blanco-amarillo, el cual se filtró y secó para obtener 2.96 g de un polvo blanco. Este sólido se sometió a un segundo fraccionamiento sobre Sephadex LH-20 en columna abierta y metanol como fase móvil. Se colectaron 30 fracciones secundarias que se reunieron por similitud en seis fracciones combinadas (FI a FVI). De la fracción FII se obtuvo un sólido que se recrystalizó con una mezcla de CH_2Cl_2 /acetona 95:5 para obtener 1.51 g de un polvo blanco (**C01**) que se caracterizó como pinocembrina.

La fracción FC III se sembró en una columna abierta, como fase estacionaria Sephadex y como fase móvil metanol. Esto permitió obtener un total de 32 fracciones que se reunieron por similitud cromatográfica para tener un total de seis fracciones combinadas (Fx I a Fx VI). La fracción Fx II se sometió a un tercer fraccionamiento en columna abierta sobre gel de sílice que se eluyó con mezclas de CH_2Cl_2 /acetona en polaridad creciente. Este proceso cromatográfico permitió generar 10 fracciones terciarias (Fx 1 a Fx 10). En la fracción Fx5 se obtuvo un sólido cristalino incoloro (251.7 mg) que se identificó como pinocembrina (**C01**). Posteriormente, reunieron las fracciones Fx 7 a Fx 10 y se sembraron en una columna abierta de gel de sílice. La elución se realizó utilizando un gradiente de polaridad creciente con mezclas de CH_2Cl_2 /acetona. Se recolectaron 37 fracciones que se reunieron por similitud cromatográfica para dar un total de 12 fracciones (Fx7a10-1' a Fx7a10-12'). De la fracción Fx7a10-1' se aisló un sólido naranja (10.7 mg) que fue caracterizado como 2',4',6'-trihidroxichalcona (**C07**).

De la fracción primaria FC IV precipitó espontáneamente un sólido amarillo tenue (1.4 g), el cual se sometió a una segunda cromatografía sobre Sephadex LH-20 y metanol como fase móvil. Se colectaron 40 fracciones que se reunieron en un total de 8 fracciones combinadas (Fx I' a Fx VII'). En la fracción Fx III' se obtuvo un sólido blanco (238 mg) que se caracterizó como una mezcla de alpinona y pinostrobinina (**C08+C09**). En la fracción Fx VII' se obtuvo un sólido naranja claro (9.2 mg) identificado como 5-O-metilgalangina (**C10**), y de Fx VIII', un sólido amarillo (10.0 mg) que fue caracterizado como kaempferida (**C11**).

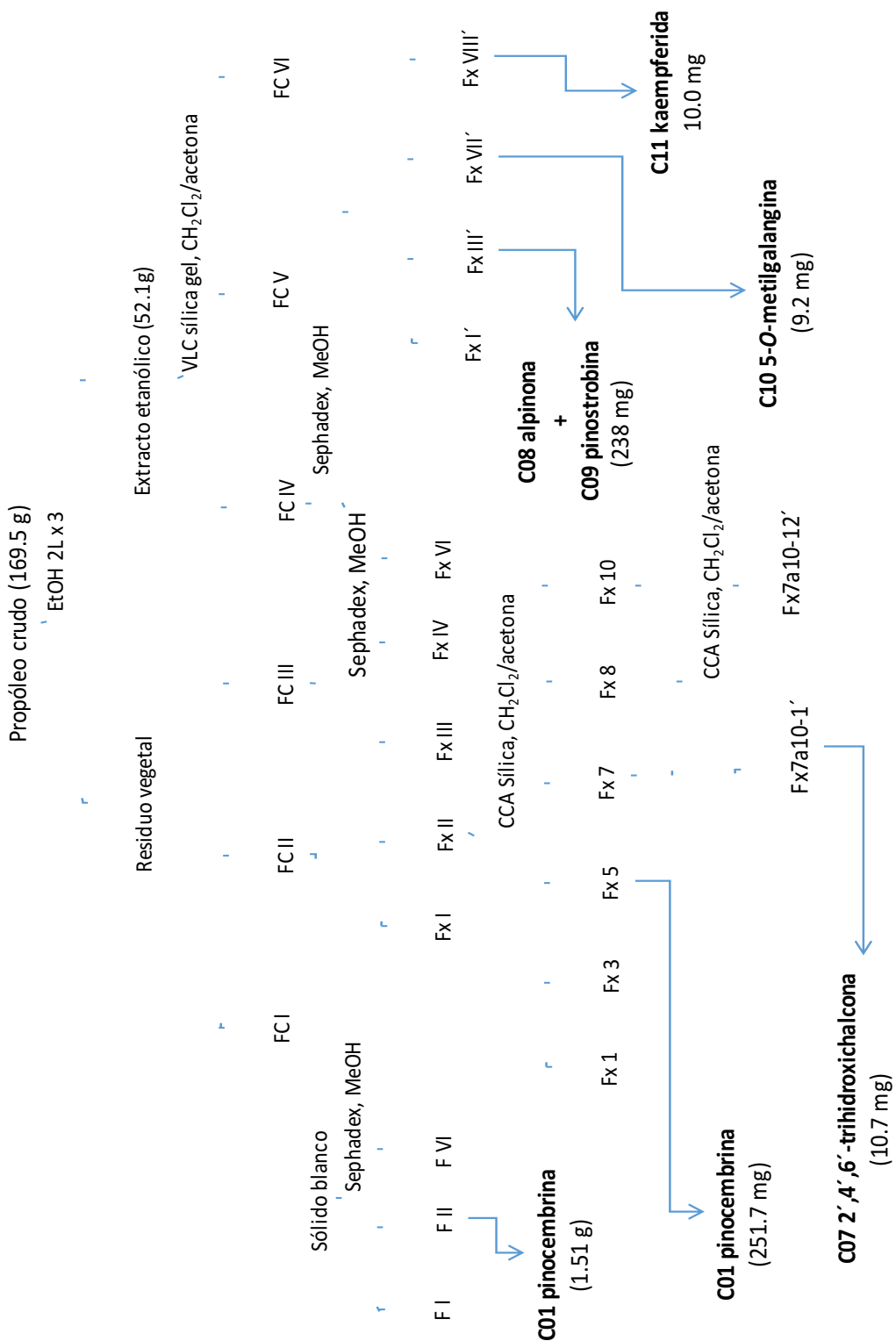


Figura 6. Resumen de los procesos cromatográficos que permitieron el aislamiento de compuestos a partir de la muestra recolectada en Chihuahua.



4.7.4. Ciudad de México (CDMX)

En la **Figura 7** se resume el estudio fitoquímico de la muestra recolectada en Xochimilco, CDMX.

4.7.4.1. Fraccionamiento primario del EEP

El EEP seco (137.4 g) se fraccionó utilizando VLC, gel de sílice 60 como adsorbente y como fase móvil mezclas de CH_2Cl_2 y acetona en un gradiente de polaridad creciente. Se recolectó un total de 30 fracciones que se reunieron en 10 fracciones combinadas (FA I a FA X).

4.7.4.2. Purificación de los compuestos C12-C14

La fracción primaria FA I se sometió a un fraccionamiento secundario utilizando cromatografía en columna abierta, con Sephadex LH-20 como adsorbente y metanol como eluyente. Este proceso permitió la purificación del flavonoide (13.0 mg) 4',7-*O*-dimetilnaringenina (**C12**).

La fracción primaria FA IV se sembró en una columna con poliamida 6 como adsorbente y se eluyó con una mezcla EtOH/ H_2O 1:1 y EtOH 100%, recolectando 45 fracciones que se reunieron en seis fracciones secundarias (Fx 1 a Fx 6). A partir de la fracción Fx 4, se obtuvo un sólido amarillo (15.0 mg) que se caracterizó como 4',7-*O*-dimetilkaempferol (**C13**). Por otra parte, de la fracción Fx 6 se obtuvo un sólido amarillo (18.0 mg) que se caracterizó como kaempferida (**C11**).

A partir de la fracción Fx V precipitó espontáneamente un sólido amarillo, que fue cristalizado con CH_2Cl_2 para obtener un polvo amarillo cristalino (320.0 mg) el cual se caracterizó como acetina (**C14**).

4.8. Evaluación de la actividad biológica de pinocembrina

Todos los procedimientos del manejo de animales se realizaron bajo la Norma Oficial Mexicana para la experimentación y cuidado animal (NOM-062-ZOO-1999) y la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011). Los residuos peligrosos fueron desechados de acuerdo a la norma NOM-087-ECOL-SSA1-2001.

Se adquirieron ratas Wistar macho (250 – 280 g) del Instituto Nacional de Ciencias médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”. Los animales se mantuvieron a 25 °C, 70% humedad y con un ciclo de 12 h de luz - 12 h de oscuridad. Los animales tuvieron libre acceso al agua, mientras que el alimento se proporcionó de manera pareada (NOM-062-ZOO-1999).

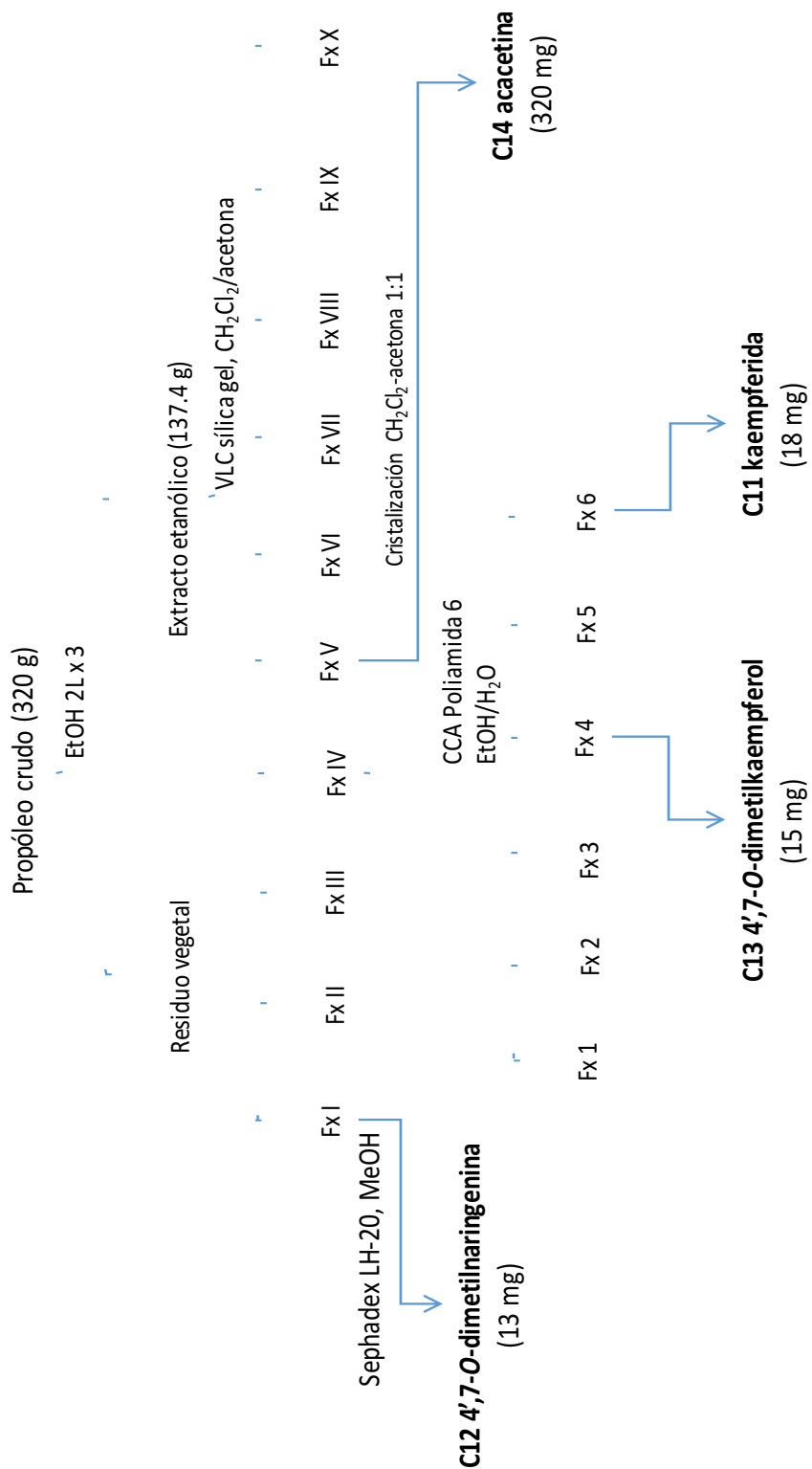


Figura 7. Resumen de los procesos cromatográficos que permitieron el aislamiento de compuestos a partir de la muestra recolectada en CDMX.



4.8.1. Diseño experimental

Después de un periodo de aclimatación de dos semanas, los animales se mantuvieron en jaulas metabólicas para recolectar la orina de 24 h y se extrajo sangre del seno retro-orbital para obtener los valores basales de los parámetros bioquímicos y urianálisis.

Las ratas fueron administradas con STZ en amortiguador de fosfatos (60 mg/kg, dosis única, i.p.) para inducir diabetes. Cuarenta y ocho horas posteriores a la inyección de STZ, se midió la glucosa sanguínea con un glucómetro comercial (ACCU-CHEK, Suiza) con un ayuno previo de doce horas. Las ratas con una glicemia ≥ 126 mg/dL fueron divididas de forma aleatoria en dos grupos: Diabéticas y Diabéticas + Pinocembrina. Los animales se mantuvieron individualmente en jaulas metabólicas para obtener una muestra de orina de 24 h y se extrajo sangre del seno retro-orbital en diferentes tiempos y dependiendo del esquema de tratamiento en que estaban incluídos.

Se contemplaron dos esquemas de administración: esquema preventivo y esquema correctivo. A continuación se describe cada uno de los esquemas.

I. Esquema preventivo

En este esquema, se administró el flavonoide antes de la aparición de la nefropatía diabética, esto es, una vez que la glicemia se ha confirmado (≥ 126 mg/dL) (NOM-015-SSA2-2010; Abo-Salem *et al.*, 2009). La pinocembrina se administró una dosis de 10 mg/kg diariamente por vía oral por 40 días (Saad *et al.*, 2015).

- a. Control ($n = 7$). Son ratas sanas que recibieron un volumen de amortiguador de citratos. Este grupo no recibe tratamiento.
- b. Pinocembrina ($n = 7$). Son ratas sanas que recibieron un volumen de amortiguador de citratos y son administradas con pinocembrina.
- c. Diabéticas ($n = 8$). Se administraron con STZ. Este grupo no recibe tratamiento.
- d. Diabéticas + Pinocembrina ($n = 8$). Se administraron con STZ. Estas ratas recibieron pinocembrina.

Se realizó el seguimiento de peso y glucosa semanalmente a cada grupo. A los tiempos 20 y 40 días se obtuvieron muestras de sangre y orina.

II. Esquema correctivo



Se administra pinocembrina a una dosis de 10 mg/kg diariamente por vía oral a ratas Wistar macho. En este tratamiento se administra el flavonoide después de la aparición de la nefropatía diabética, a los 40 días de mantener altos niveles de glicemia (≥ 126 mg/dL).

- a. Control ($n = 6$). Son ratas sanas que recibieron amortiguador. Este grupo no recibe tratamiento.
- b. Pinocembrina ($n = 6$). Son ratas sanas administradas con amortiguador de citratos. Estas ratas recibieron pinocembrina.
- c. Diabéticas ($n = 9$). Se administraron con STZ. Este grupo no recibe tratamiento.
- d. Diabéticas + Pinocembrina ($n = 9$). Se administraron con STZ. Estas ratas recibieron pinocembrina.

Se realizó el seguimiento de peso y glucosa semanalmente a cada grupo. A los tiempos 20, 40, 50 y 60 días se obtuvieron muestras de sangre y orina.

4.8.2. Recolección y tratamiento de las muestras

4.8.2.1. Muestra de sangre

Las muestras de sangre se obtuvieron del seno retro-orbital por medio de un capilar con heparina al 0.02%. Se centrifugó a 10,000 rpm/10 min/4 °C y se separó el plasma del paquete celular. Por otra parte, se midió el volumen de orina de 24 h y se guardó una alícuota de 2.0 mL. Todas las muestras se conservaron a -75 °C hasta su análisis.

4.8.2.2. Tejido renal y hepático

Al término de los tratamientos, los animales se anestesiaron con una mezcla de isoflurano/oxígeno (3%) para extraer 10 mL de sangre de la vena caudal, así como un riñón y una porción de hígado. Se perfundió el otro riñón con formaldehído en PBS al 10%. Los tejidos se conservaron a -75 °C.

4.8.2.3. Preparación de homogenados de tejido

Se homogenizó el tejido (riñón o hígado) en una relación 0.1 g de tejido/1 mL de amortiguador de fosfatos 50 mM pH = 7.4 (con 10 μ l de dibutilhidroxitolueno 0.5 M en acetonitrilo), con un Homogenizador PRO250 a 18,000 rpm por 1 min (Gèrard-Monnier *et al.*, 1998). Posteriormente, se centrifugó el homogenado a 10,000 rpm / 20 min / 4 °C y se guardó a -75 °C.

4.8.2.4. Extracción de células de homogenados

Para la extracción de células a partir de homogenados de tejido se utilizó la siguiente metodología: se mezclaron 100 μ L de homogenado y 200 μ L de colagenasa 0.33%. Se incubó a



400 rpm/25 °C por 2 h. Para el homogenado de hígado se incubó por 45 min. La mezcla se filtró con filtro millex-HN, 0.45 µm, 4 mm, membrana de nylon (Millipore, Bedford, MA, USA). Se centrifugó el filtrado a 2,000 rpm por 10 min. Se separó el botón del sobrenadante. Se agregaron 250 µL de *Red Blood Cell* lysis buffer 1X e incubó a -20 °C por 5 min. Se adicionaron 250 µL de PBS. Se centrifugó el filtrado a 2,000 rpm por 10 min y se separó el botón que se resuspendió en 250 µL de PBS. Las células obtenidas se contaron y se midió su viabilidad con azul de tripano 0.4% (Bio-Rad) y el contador de células Cell Counter TC20® (Bio-Rad) y se midió por fluorescencia en un citómetro de flujo Guava®easyCyte (Millipore, Bedford, MA) con el reactivo Guava ViaCount® (Millipore, Bedford, MA) (50 µL células + 50 µL PBS + 100 µL Guava ViaCount®) (Guava Technologies, Inc., 2008).

4.8.3. Parámetros bioquímicos

En plasma se cuantificó Cr y BUN para el perfil renal; fosfatasa alcalina (ALP), alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) para el perfil hepático; triglicéridos (TRIG), colesterol, lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), lipoproteína de baja densidad (LDL) y lipoproteína de alta densidad (HDL) dentro del perfil de lípidos (Abo-Salem *et al.*, 2009; Rauter *et al.*, 2010). Mientras que en orina se cuantificó Cr. Estas cuantificaciones se realizaron en un autoanalizador de químicas (Beckman Coulter AU680, CA, USA). Los resultados se expresan en mg/dL y en U/L.

4.8.4. Proteinuria

En orina se cuantificaron proteínas totales en orina por el método del ácido bicinconínico (Smith *et al.*, 1985). Primero, se estandarizó la dilución apropiada de las muestras. Se determinó que para los animales control la dilución adecuada fue de 1:3, en tanto que para los diabéticos, 1:20. Se construyó una curva de calibración de albúmina en un rango de 0 a 15 µg/ µL. La proteinuria se expresa en mg albúmina en 24 h.

4.8.5. Estudio de la estructura renal por microscopía

La estructura renal se analizó por microscopía óptica y microscopía electrónica.

4.8.5.1. Microscopía óptica

Una porción del riñón perfundido se incluyó en parafina, se cortaron secciones de 3–4 µm. Se realizó una tinción de ácido peryódico de Schiff (PAS) para observar membrana basal y glucógeno. Se observaron las laminillas a 400X para determinar el daño al glomérulo y a los túbulos. Por otra parte, se midió el área de 40 glomérulos por rata con el programa Image-Pro



Express 6.3 (Media Cybernetics Inc, Bethesda, MD, USA) (Sameni *et al.*, 2016). Los resultados se expresan en nm.

4.8.5.2. Microscopía electrónica

Una porción del riñón perfundido se incluyó en resina Epon y se cortaron secciones ultrafinas (70 nm). Se usó uranilo alcohólico y acuoso y plomo de Reynolds para contrastar la microestructura renal. Se estimó el grosor de la MBG en fotografías de microscopía electrónica de transmisión de cortes de riñón. La distancia perpendicular del límite de las células endoteliales hasta el límite de las células epiteliales de la MBG, se midió con un digitalizador TEM Imaging and Analysis, versión 4.7 SP3 (FEI Company, Hillsboro, OR, USA) (Neumann *et al.*, 2004). Se realizaron 20 mediciones de dos paredes capilares periféricos de dos glomérulos distintos. Los resultados se expresan en nm.

4.8.6. Cuantificación de marcadores de daño renal

En orina se cuantificaron los niveles de molécula de daño renal (Kim-1), lipocalina de neutrófilo asociada a gelatinasa (NGAL) y *N*-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG) con un estuche comercial (Cloud-Clone Corporation, TX, USA) (Vaidya *et al.*, 2008). Brevemente, se agregaron 100 μ L de muestra o estándar en los pozos de una placa de ELISA de 96 pozos (Multiskan MCC Type 355, Thermo Fisher Scientific) y se incubó a 37 °C por 2 h. Se realizaron varios lavados y se desarrolló color con el reactivo 3,3',5,5'-tetrametilbencidina. Finalmente, se leyó la absorbancia a 450 nm. Los resultados se expresaron como ng o pg del marcador correspondiente por mL de muestra.

4.8.7. Evaluación de estrés oxidante en orina

La excreción de H₂O₂ en orina se midió como marcador de estrés oxidante. Se utilizó el estuche comercial Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) (Bartosz, 2006). Brevemente, se utilizaron 50 μ L de muestra y 50 μ L de la solución Amplex Red de trabajo, que consistió en Amplex Red 100 μ M y peroxidasa de rábano 0.2 U/mL. La placa se incubó a temperatura ambiente por 30 min en la oscuridad. La fluorescencia se midió en un fluorómetro Synergy HT (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA) y se utilizó el software Gen 5™ (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA). Se construyó una curva de calibración de H₂O₂ en un rango de 0.078 μ M a 10 μ M. Los resultados se expresan como la concentración en μ M de H₂O₂ en 24 h.



4.8.7.2. Estrés oxidante en tejido

El MDA y el 4-hidroxinonal (4-HNE) fueron los marcadores de estrés oxidativo que se cuantificaron en el tejido renal y hepático con la metodología de Gérard-Monnier y cols. (1998). Se utilizaron 200 μ L del estándar o de la muestra, 650 μ L de una solución de 1-metil-2-fenilindol y HCl concentrado (para cuantificar 4-HNE se usó ácido metansulfónico y FeCl_3). Se preparó una curva estándar de 1,1,3,3-tetrametoxipropano en un rango de concentración de 0 a 23.6 μ M. Se incubaron los tubos a 45 °C durante 40 min, posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm/10 min/4 °C y el sobrenadante se leyó a una absorbancia de 570 nm. Los resultados se expresaron como nmol de MDA (o 4-HNE) por mg de proteína.

4.8.8. Cuantificación de apoptosis en células de hígado y de riñón

Se tomaron 10,000 células de la suspensión celular y se incubaron con 100 μ L de reactivo Guava Nexin (Millipore, Bedford, MA, USA) por 20 min, a temperatura ambiente y en la oscuridad. La cuantificación del porcentaje de células viables, células en apoptosis y células en necrosis se realizó con el software Guava CytoSoft® (Millipore, Bedford, MA, USA). Los resultados se expresan como la suma del porcentaje apoptosis temprana y de apoptosis tardía

4.9. Análisis estadístico

Los resultados se muestran como el promedio \pm error estándar de la media (SEM). Se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía seguida con una prueba *post-hoc* de Newman-Keuls. La sobrevida se calculó con un análisis Kaplan-Meier. Se consideraron valores estadísticamente significativos con una $p < 0.05$.



5. RESULTADOS

5.1. Determinación de los componentes volátiles del propóleo por la técnica de HS-SPME/GC-MS-TOF

La identificación de cada componente se realizó mediante la comparación de los espectros de masas obtenidos con los recopilados en la biblioteca NIST utilizada por programa ChromaTOF 3.34 del equipo Leco. Además, se calcularon los índices de retención para cada compuesto y se compararon con los recopilados en las bases de datos Pherobase (El-Sayed, 2018) y NIST (Linstrom y Mallard, 2014).

5.1.2. Propóleo de Zacatecas

Se separaron e identificaron 77 compuestos en la muestra analizada. Los compuestos más abundantes fueron los terpenos mirceno, α -pineno, (Z)- β -ocimeno, verbenona, β -humuleno, *trans*-piperitol, 2-hidroxi-1,8-cineol, shisofurano, acetato de mentilo y karahananona; heptanoato de butilo y anetol. En la **Figura A1 (Anexo)** se muestra el cromatograma obtenido.

5.1.3. Propóleo de Durango

Se separaron e identificaron 49 compuestos en la muestra analizada. Los compuestos más abundantes fueron los ésteres de hidrocarburos, acetato de hexilo, *n*-hexanoato de butilo y butanoato de hexilo; y los monoterpenos *allo*-ocimeno y β -pineno. En la **Figura A2 (Anexo)** se observa el cromatograma obtenido.

5.1.4. Volátiles del propóleo de Chihuahua

La muestra de Chihuahua no fue analizada debido a problemas técnicos con el equipo.

5.1.5. Propóleo de la Ciudad de México

Se separaron e identificaron 60 compuestos en la muestra analizada. Los compuestos más abundantes fueron los monoterpenos α -pineno, verbeneno y sabineno. En la **Figura A3 (Anexo)** se observa el cromatograma obtenido.

En la **Figura 8** se muestra una clasificación de los tipos de compuestos encontrado en la fracción volátil de las muestras estudiadas. Se observa que en las muestras de Zacatecas y de CDMX los terpenos son los compuestos mayoritarios, mientras que los ésteres alifáticos son los compuestos mayoritarios en la muestra de Durango.

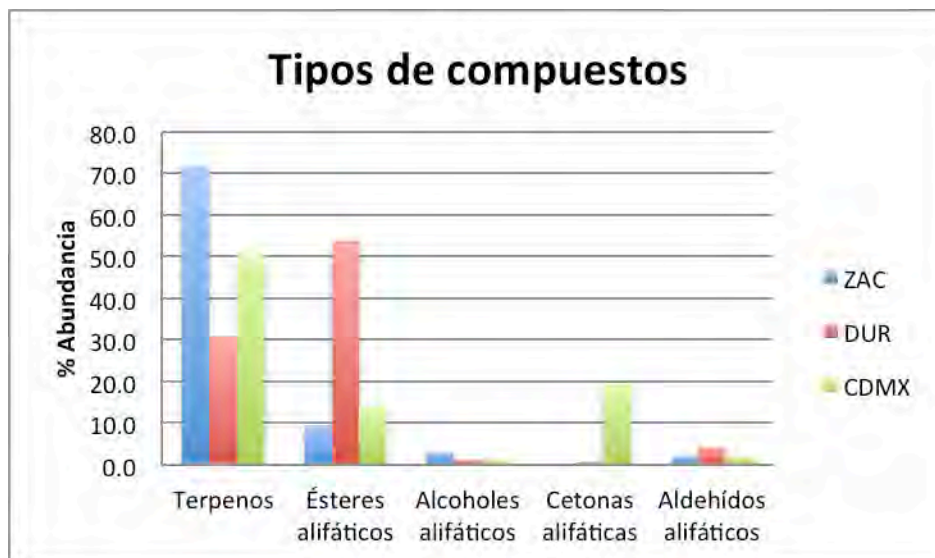


Figura 8. Comparación de los tipos de compuestos presentes en las muestras de propóleo estudiadas.

5.2. Preparación de los extractos etanólicos

Se obtuvieron rendimientos de extracción con etanol en un rango de 30.7% a 58.6%. En el **Cuadro 8** se detalla el rendimiento obtenido para cada muestra.

Cuadro 8. Rendimiento en peso de los EEP.

Muestra	Peso (g) del propóleo crudo	Peso (g) del EEP	% Rendimiento
Zacatecas	160.0	83.0	51.9
Durango	85.0	49.8	58.6
Chihuahua	169.5	52.1	30.7
CDMX	320.0	137.4	42.9

Extracto etanólico de propóleo=EEP, Ciudad de México=CDMX

5.3. Determinación del contenido de fenoles y flavonoides totales

El contenido de fenoles totales determinado para los extractos etanólicos tuvo un rango de 109 ± 2 a 139 ± 1 mg eq. AG/g EEP. Mientras que el contenido de flavonoides totales se encontró en un rango de 70 ± 1 a 90 ± 2 mg eq. Q/g EEP. En el **Cuadro 9** se resumen los valores obtenidos para cada una de las muestras estudiadas.



Cuadro 9. Contenido de fenoles totales y flavonoides totales en las muestras de EEP.

Muestra	Fenoles totales (eq. AG/g EEP)	Flavonoides totales (eq. Q/g EEP)
Zacatecas	109 ± 2	70 ± 1
Durango	139 ± 1	90 ± 2
Chihuahua	126 ± 3	71 ± 2
CDMX	102 ± 2	59 ± 2

El contenido de fenoles totales está expresado como miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (mg eq. AG/g EEP). El contenido de flavonoides totales está expresado como miligramos de equivalentes de quercetina por gramo de extracto (mg eq. Q/g EEP).

5.4. Actividad antioxidante de los EEP

La actividad antioxidante se midió *in vitro* usando tres ensayos colorimétricos (**Cuadro 10**). El ensayo de neutralización del radical DPPH es un método indirecto, el cual mide la capacidad del extracto o del compuesto de prueba para donar un hidrógeno (Roginsky y Lissi, 2005). El radical libre DPPH es estable y de color morado, cuando es reducido se mide la pérdida de color. Para este ensayo se encontraron valores entre 974 ± 32 a 1145 ± 10 TE/mg exto. El ensayo de FRAP mide la capacidad de los compuestos fenólicos para reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} , este último forma un complejo colorido con 2,4,6-tripiridil-*s*-triazina, por lo que se mide la aparición de color del complejo. Para las muestras se obtuvieron valores que variaron de 13.4 ± 1.2 a 21.0 ± 0.7 TE/mg exto. Por último, el ensayo de blanqueamiento de β -caroteno es un método directo que evalúa el retardo de la pérdida de color del β -caroteno como resultado de la auto-oxidación del ácido linoleico (Roginsky & Lissi, 2005). Los porcentajes de actividad antioxidante calculados en este ensayo se encontraron en un rango de 39.1 ± 7.7 % a 65.6 ± 1.9 %.

Cuadro 10. Resumen de las pruebas antioxidantes de las muestras de EEP.

Muestra	DPPH TE/mg EEP	FRAP TE/mg EEP	β -caroteno%AA
Zacatecas	1098 ± 22	13.4 ± 1.2	48.5 ± 5.2
Durango	1145 ± 10	19.9 ± 0.8	45.9 ± 12.5
Chihuahua	975 ± 32	21.0 ± 0.7	39.1 ± 7.7
CDMX	902 ± 30	15.9 ± 1.6	65.6 ± 1.9

La actividad anti-radical se calculó con el ensayo de neutralización del radical DPPH y está expresado como equivalentes de Trolox por gramo de EEP (TE/g EEP). La capacidad antioxidante total se calculó con el ensayo FRAP y está expresado como equivalentes de Trolox por gramo de extracto (TE/g EEP). El porcentaje de actividad antioxidante (%AA) se midió con el ensayo de blanqueamiento de β -caroteno. Los valores se expresan como promedio ± error estándar, $n=3$.

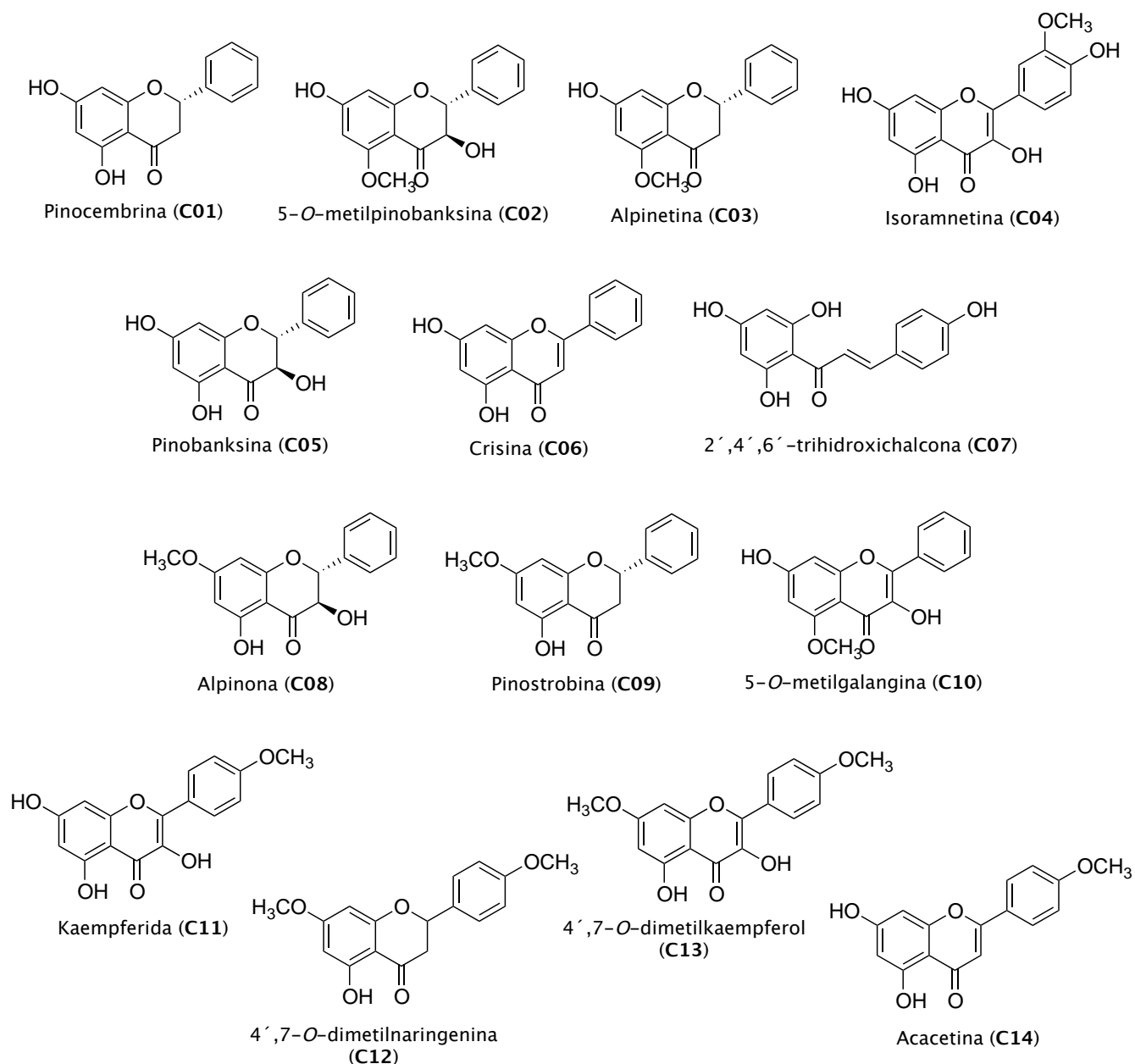


Figura 9. Compuestos aislados a partir de los EEP recolectados en Chihuahua, Zacatecas, Durango y CDMX.

5.5. Estudio fitoquímico

Se estudiaron cuatro propóleos de dos zonas melíferas de México, la zona norte (Durango, Zacatecas y Chihuahua) y la zona del Altiplano (CDMX). Como resultado de los estudios fitoquímicos realizados, se aislaron y caracterizaron catorce compuestos. Del propóleo recolectado en Zacatecas se aislaron la pinocembrina (1), 5-*O*-metilpinobanksina (2), alpinetina



(3) e isoramnetina (4). Del propóleo de Durango se aislaron la pinocembrina (1), pinobanksina (5) y crisina (6). Del propóleo de Chihuahua se aislaron la pinocembrina (1), 2',4',6'-trihidroxichalcona (7), alpinona (8), pinostrobina (9), 5-*O*-metilgalangina (10) y kaempferida (11). Por último, del propóleo de la zona rural de la CDMX se aislaron la kaempferida (11), 4',7-*O*-dimetilnaringenina (12), 4',7-*O*-dimetilkaempferol (13) y acetina (14). En la **Figura 9** se ilustran las estructuras de los compuestos aislados.

5.6. Evaluación de la actividad biológica de la pinocembrina

Para evaluar la actividad biológica, se utilizó el compuesto pinocembrina debido a que fue el compuesto mayoritario aislado de las tres muestras de la zona melífera del norte de México. Cabe mencionar que no se utilizaron los EEPs debido a que estos presentan una alta variabilidad en su composición química.

5.6.1. Efecto de pinocembrina sobre el peso y la glucosa sérica

El peso corporal es un parámetro de toxicidad general y nos indica el estado de salud de los animales. En este trabajo se registró en los animales diabéticos de ambos esquemas una pérdida de peso estadísticamente significativo con respecto al grupo control que es congruente con la literatura respecto a este modelo animal (Wu y Huan, 2008; Deeds *et al.*, 2011). Dentro del esquema preventivo, la administración de pinocembrina evitó la pérdida de peso en el grupo diabético tratado (285.6 ± 14.5 g) comparado con el grupo diabético no tratado (241.7 ± 15.8 g), en el día 40 de tratamiento. Mientras que en el esquema correctivo se observó una tendencia a conservar el peso en los animales tratados con pinocembrina, sin embargo no se observó una diferencia significativa con respecto a los animales diabéticos (**Figura 10**).

Con respecto a los niveles de glucosa, en el grupo de animales administrado con STZ hubo un claro incremento en los niveles plasmáticos de ésta con diferencias significativas respecto al grupo control, tanto en el esquema preventivo como en el correctivo (**Figura 10**). En el esquema preventivo, la administración de pinocembrina evitó parcialmente el aumento de glucosa (601.1 ± 55.4 mg/dL) con respecto al grupo diabético (737.1 ± 44.1 mg/dL), en el día 40 de tratamiento. En el esquema correctivo la administración de pinocembrina no disminuyó la glicemia respecto al grupo diabético.

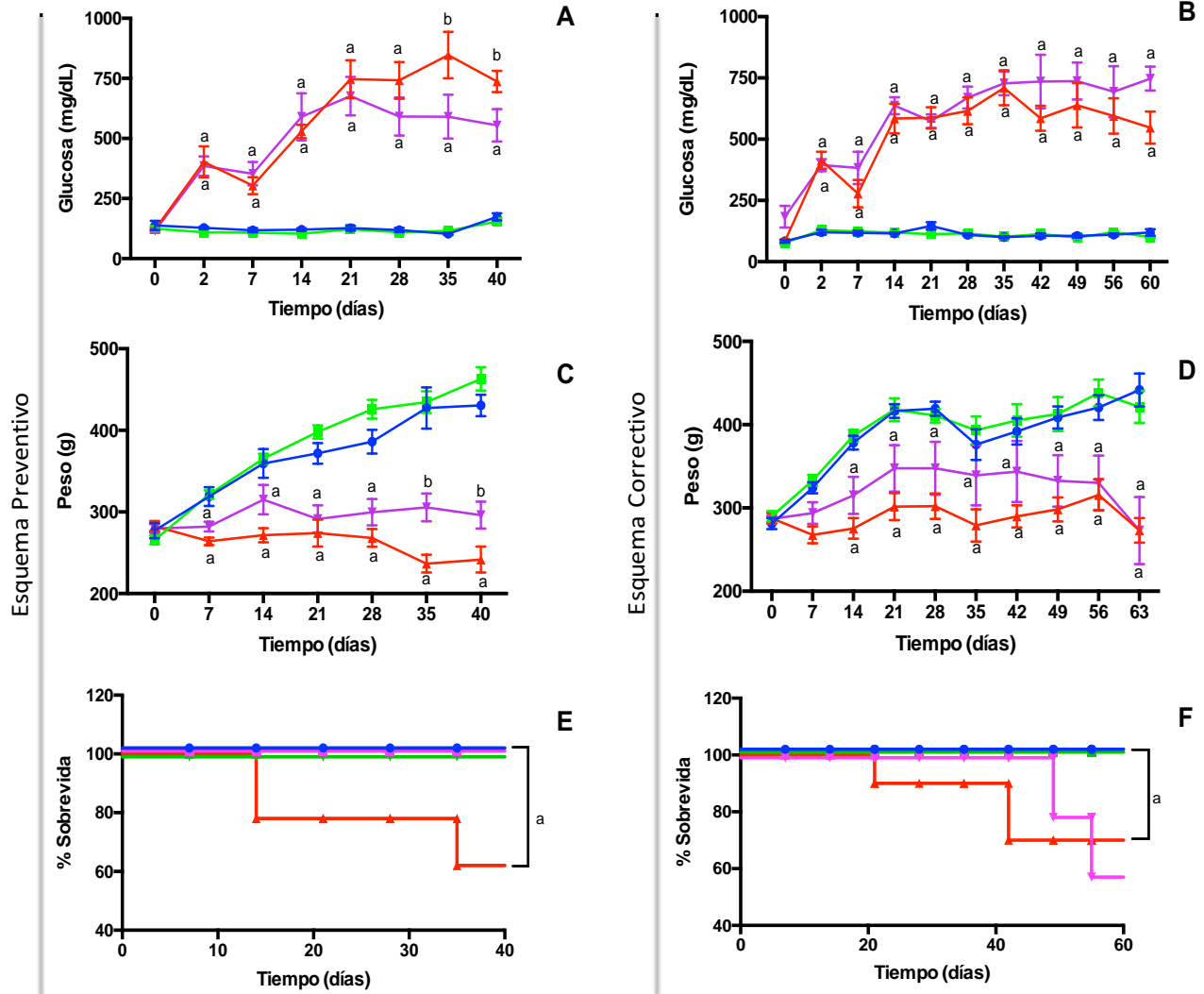


Figura 10. Parámetros metabólicos en el esquema preventivo y el esquema correctivo. Control (—●—), Pinocembrina (—■—), Diabéticas (—▲—), Diabéticas + Pinocembrina (—▼—). A) Monitoreo semanal de la glucosa sanguínea en el esquema preventivo. B) Monitoreo semanal de la glucosa sanguínea en el esquema correctivo. C) Monitoreo semanal del peso corporal en el esquema preventivo. D) Monitoreo semanal del peso corporal en el esquema correctivo. E) Sobrevida global durante el esquema preventivo. F) Sobrevida global durante el esquema correctivo. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM, ^a $p < 0.05$ vs. Control, ^b $p < 0.05$ vs. Diabéticas, $n = 6-10$.

5.6.2. Efecto de pinocembrina sobre los niveles de lípidos séricos

Los Cuadros 11 y 12 muestran los valores de lípidos en los diferentes esquemas de tratamiento. Se cuantificaron los valores de colesterol, triglicéridos, VLDL, LDL y HDL. En el grupo diabético se encontró un aumento significativo de colesterol, triglicéridos, VLDL y LDL, comparado con el grupo control. No se encontraron cambios en el valor de HDL. La



administración de pinocembrina evitó de manera significativa el aumento de colesterol y LDL, en tanto que en los triglicéridos se observa una tendencia a disminuir.

Cuadro 11. Valores del perfil lipídico en el esquema preventivo.

	Control	Pinocembrina	Diabéticas	Diabéticas + Pinocembrina
Colesterol (mg/dL)	65.11 ± 5.44	58.77 ± 5.22	108.3 ± 14.82 ^a	67.56 ± 6.93 ^b
Triglicéridos (mg/dL)	45.50 ± 5.91	77.38 ± 5.97	362.5 ± 74.51 ^a	307.0 ± 62.58 ^a
VLDL (mg/dL)	11.06 ± 2.15	15.46 ± 1.91	72.52 ± 14.91 ^a	54.42 ± 12.73 ^a
LDL (mg/dL)	9.12 ± 1.49	5.73 ± 0.81	25.33 ± 2.97 ^a	9.50 ± 2.40 ^b
HDL (mg/dL)	22.87 ± 1.34	22.86 ± 2.35	28.48 ± 2.38	26.97 ± 1.69

VLDL=lipoproteína de muy baja densidad, LDL= lipoproteína de baja densidad, HDL= lipoproteína de alta densidad. Los resultados se expresan como el promedio ± SEM. ^a $p < 0.01$ vs. Control; ^b $p < 0.002$ vs. Diabéticas, $n = 7-8$.

Cuadro 12. Valores del perfil lipídico en el esquema correctivo.

	Control	Pinocembrina	Diabéticas	Diabéticas + Pinocembrina
Colesterol (mg/dL)	52.0 ± 6.41	63.2 ± 6.21	93.8 ± 8.53 ^a	82.7 ± 12.2 ^a
Triglicéridos (mg/dL)	48.9 ± 9.68	57.9 ± 10.49	332.3 ± 89.15 ^a	90.1 ± 31.3 ^b
VLDL (mg/dL)	9.78 ± 1.94	14.7 ± 3.54	63.5 ± 15.5 ^a	38.9 ± 14.1 ^a
LDL (mg/dL)	5.93 ± 1.49	7.07 ± 0.36	13.50 ± 1.56 ^a	8.59 ± 2.08 ^{a,b}
HDL (mg/dL)	21.5 ± 2.0	22.9 ± 2.19	30.5 ± 3.59	27.5 ± 2.97

VLDL=lipoproteína de muy baja densidad, LDL= lipoproteína de baja densidad, HDL= lipoproteína de alta densidad. Los resultados se expresan como el promedio ± SEM. ^a $p < 0.02$ vs. Control; ^b $p < 0.01$ vs. Diabéticas, $n = 6-9$.

En el esquema correctivo (**Cuadro 12**), se observa una alteración de los parámetros del perfil de lípidos en los animales diabéticos respecto a los del grupo control. Sin embargo, en las ratas



diabéticas tratadas con la pinocembrina sólo se observó una disminución significativa de LDL y una tendencia a disminuir los niveles de colesterol.

5.6.3. Efecto de pinocembrina sobre los niveles de enzimas hepáticas

En los Cuadros 13 y 14 se resumen los valores de actividad de las tres enzimas hepáticas consideradas tradicionalmente dentro del perfil hepático. Tanto en el esquema preventivo como en el esquema correctivo se observó que los animales administrados con STZ presentaron un incremento significativo en los niveles séricos de las aminotransferasas y de la fosfatasa alcalina con respecto a los controles. La administración de pinocembrina no modificó estos parámetros (Cuadro 13).

Cuadro 13. Valores del perfil hepático en el esquema preventivo.

	Control	Pinocembrina	Diabéticas	Diabéticas + Pinocembrina
AST (U/L)	67.56 ± 8.55	67.17 ± 4.76	578.4 ± 113.0 ^a	415.4 ± 94.35 ^a
ALT (U/L)	47.09 ± 4.08	39.80 ± 3.13	315.3 ± 71.66 ^a	321.7 ± 40.20 ^a
ALP (U/L)	185.4 ± 24.2	155.1 ± 19.9	513.7 ± 90.6 ^a	424.4 ± 70.7 ^a

U/L=unidades de actividad por litro. Los resultados se expresan como el promedio ± SEM. ^a $p < 0.0002$ vs. Control, $n = 7-8$.

En el esquema correctivo, el grupo diabético presentó elevación de las enzimas ALT, AST y ALP significativamente mayor comparado con el grupo control. La administración de pinocembrina no modificó estos parámetros (Cuadro 14).

Cuadro 14. Valores del perfil hepático en el esquema correctivo.

	Control	Pinocembrina	Diabéticas	Diabéticas + Pinocembrina
AST (U/L)	63.85 ± 16.90	57.44 ± 5.38	186.3 ± 85.15 ^a	191.5 ± 99.32 ^a
ALT (U/L)	36.15 ± 2.98	46.36 ± 4.60	157.6 ± 12.51 ^a	137.2 ± 12.37 ^a
ALP (U/L)	133.9 ± 10.2	171.8 ± 21.6	715.0 ± 101.1	617.6 ± 97.3

U/L=unidades de actividad por litro. Los resultados se expresan como el promedio ± SEM. ^a $p < 0.01$ vs. Control, $n = 6-9$.



5.6.2. Efecto de pinocembrina sobre la estructura y función renal

Los Cuadros 15 y 16 muestran los parámetros de función renal en ambos esquemas de tratamiento. Se midieron los valores de BUN, GFR, volumen urinario y proteínas en orina.

En el esquema preventivo, los niveles de BUN y de la GFR aumentaron de forma estadísticamente en comparación con el grupo control (Cuadro 15). La administración de pinocembrina evitó la modificación de la GFR, lo que sugiere que la pinocembrina evita la hiperfiltración glomerular.

Cuadro 15. Valores del perfil renal en el esquema preventivo.

	Control	Pinocembrina	Diabéticas	Diabéticas + Pinocembrina
BUN (mg/dL)	19.51 ± 1.11	21.05 ± 1.07	37.76 ± 3.43 ^a	40.72 ± 3.19 ^a
GFR (mL/min/100g)	0.71 ± 0.05	0.80 ± 0.14	1.39 ± 0.20 ^a	0.83 ± 0.15 ^b

BUN=nitrógeno ureico en sangre, GFR=tasa de filtración glomerular. Los resultados se expresan como el promedio ± SEM. ^a $p < 0.05$ vs. Control; ^b $p < 0.05$ vs. Diabéticas, $n = 7-8$.

En el esquema correctivo, se observó un aumento significativo en el BUN en el grupo de las ratas diabéticas, comparados con el grupo control. No se encontraron diferencias significativas en los valores de la GFR entre los grupos (Cuadro 16).

Cuadro 16. Valores del perfil renal en el esquema correctivo.

	Control	Pinocembrina	Diabéticas	Diabéticas + Pinocembrina
BUN (mg/dL)	18.30 ± 0.88	18.81 ± 1.06	24.94 ± 1.57 ^a	24.73 ± 2.16 ^a
GFR (mL/min/100g)	0.93 ± 0.18	0.99 ± 0.10	1.93 ± 0.22 ^a	1.94 ± 0.40 ^a

BUN=nitrógeno ureico en sangre, GFR=tasa de filtración glomerular. Los resultados se expresan como el promedio ± SEM. ^a $p < 0.05$ vs. Control.

Se observó un incremento en la concentración de proteínas en orina y de volumen urinario en los grupos de ratas diabéticas en ambos esquemas (Figura 11). La administración de pinocembrina redujo significativamente la proteinuria y el volumen urinario, en el esquema preventivo. Sin embargo, en el esquema correctivo hubo un aumento significativo de la proteinuria y en el volumen urinario en los animales diabéticos administrados con pinocembrina (Figura 11).

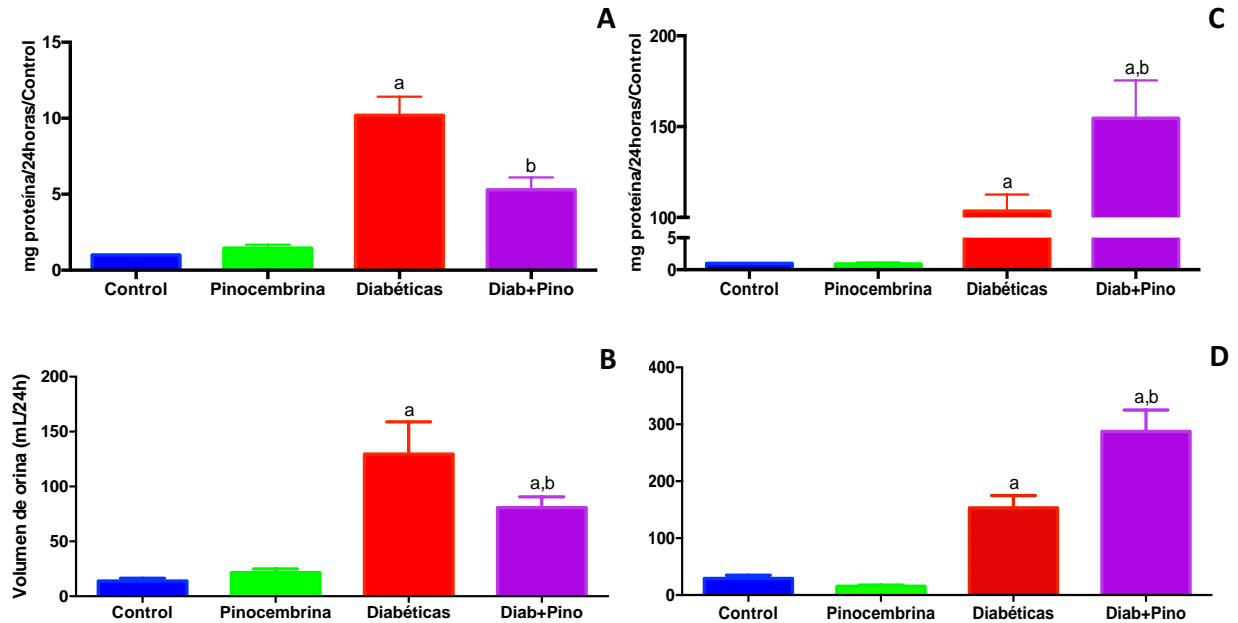


Figura 11. Volumen urinario y proteinuria de los grupos experimentales en los esquemas preventivo y correctivo. Los valores mostrados son el promedio \pm SEM. **A)** Excreción de orina en los grupos de estudio en el esquema preventivo. **B)** Excreción de proteínas en los grupos de estudio en el esquema preventivo. **C)** Excreción de orina en los grupos de estudio en el esquema correctivo. **D)** Excreción de proteínas en los grupos de estudio en el esquema correctivo. ^a $p < 0.05$ vs. Control, ^b $p < 0.05$ vs. Diabéticas, $n = 6-8$.

La **Figura 12** resume los valores determinados para los biomarcadores de daño renal en orina en ambos esquemas de tratamiento. Se midieron las concentraciones de Kim-1, NAG y NGAL. No se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo de pinocebrina. En los grupos diabéticos se observó un aumento significativo en todos los biomarcadores estudiados en comparación con los grupos control. En el esquema preventivo la administración de pinocebrina evitó el aumento de los tres biomarcadores. Por el contrario, en el esquema correctivo la administración de pinocebrina no evitó el aumento de los biomarcadores sino que los aumentó, esto indica que pinocebrina aumenta el daño renal.

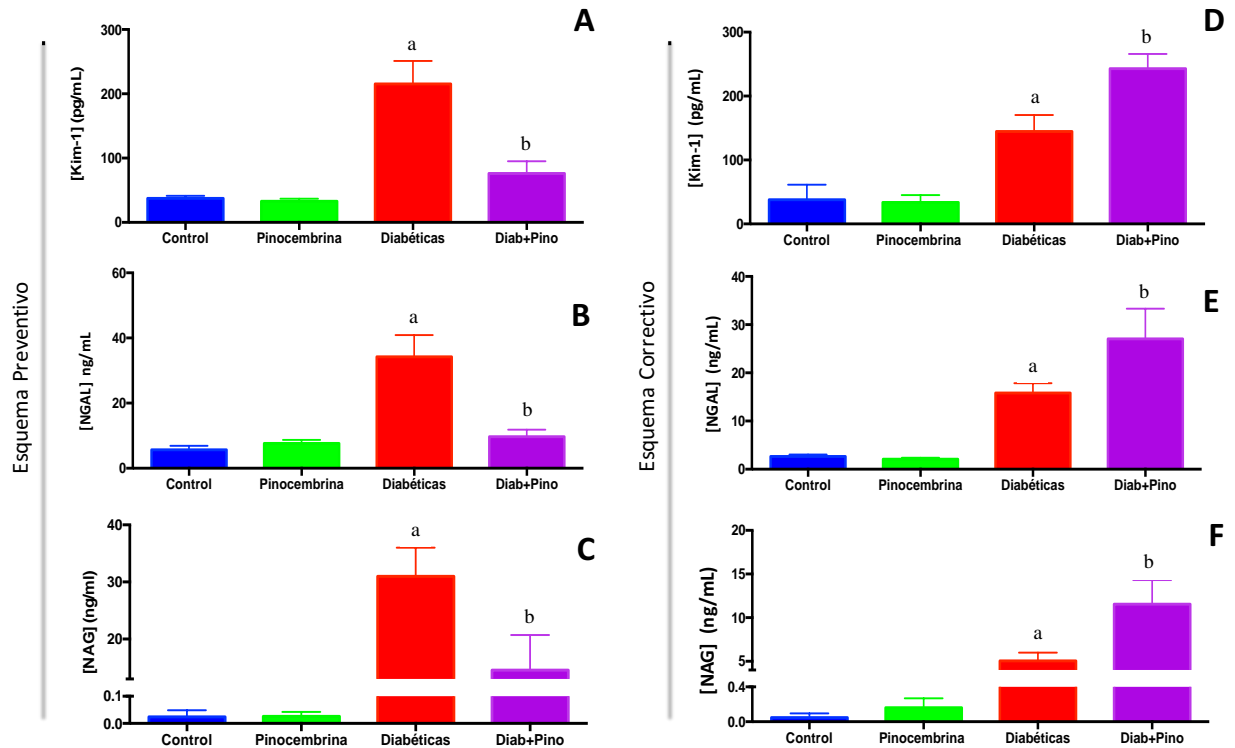


Figura 12. Cuantificación de biomarcadores de daño renal en el esquema preventivo: **A)** Kim-1, **B)** NGAL, **C)** NAG. Cuantificación de biomarcadores de daño renal en el esquema correctivo: **A)** Kim-1, **B)** NGAL, **C)** NAG. Los valores mostrados son el promedio \pm SEM. ^a $p < 0.05$, vs. Control, ^b $p < 0.05$ vs. Diabéticas.

En ambos esquemas de tratamiento, en los glomérulos de los riñones tienen una estructura petaloide lleno de capilares y los túbulos proximales exhibieron bordes en cepillo (**Figura 13 y 14**). La administración de pinocebrina en animales sanos no modificó las estructuras observadas. Mientras que, en las ratas diabéticas se observó una pérdida del penacho de capilares, aumento en la MEC, existió una marcada lobulación de los glomérulos y la luz tubular se encontró disminuida (**Figura 13**). En los glomérulos y los túbulos de las ratas diabéticas que fueron tratadas con pinocebrina, se observó una disminución del cierre de los capilares. Sin embargo, cuando se realizó el análisis de las áreas de los glomérulos no se encontraron diferencias significativas entre los grupos y esquemas estudiados (**Figura 15**).

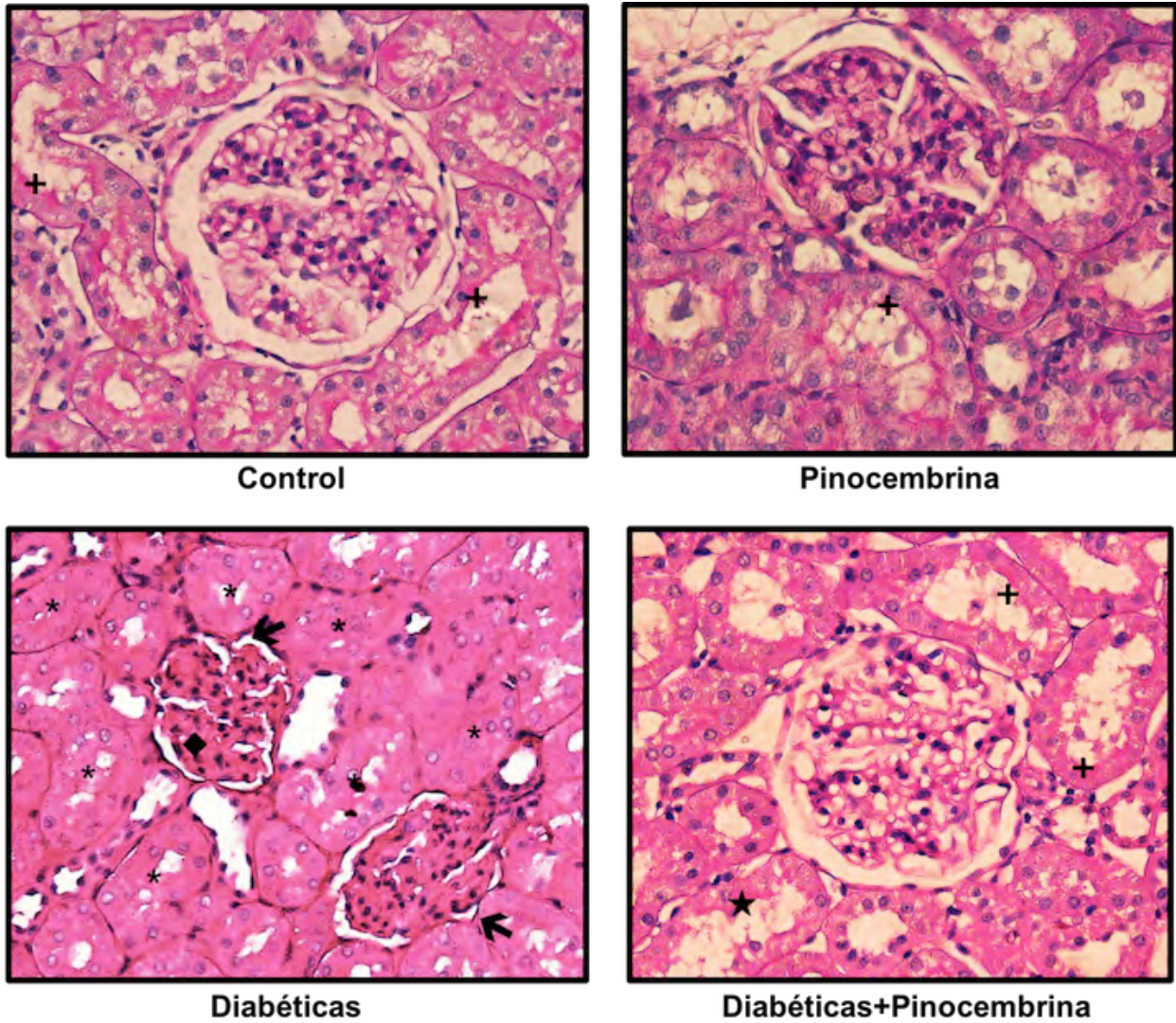


Figura 13. Micrografías de secciones histológicas de riñón del esquema preventivo. (*) disminución de luz tubular, (+) túbulos proximales con borde en cepillo, (◆) acumulación de matriz extracelular, (◀) lobulación excesiva en glomérulo.

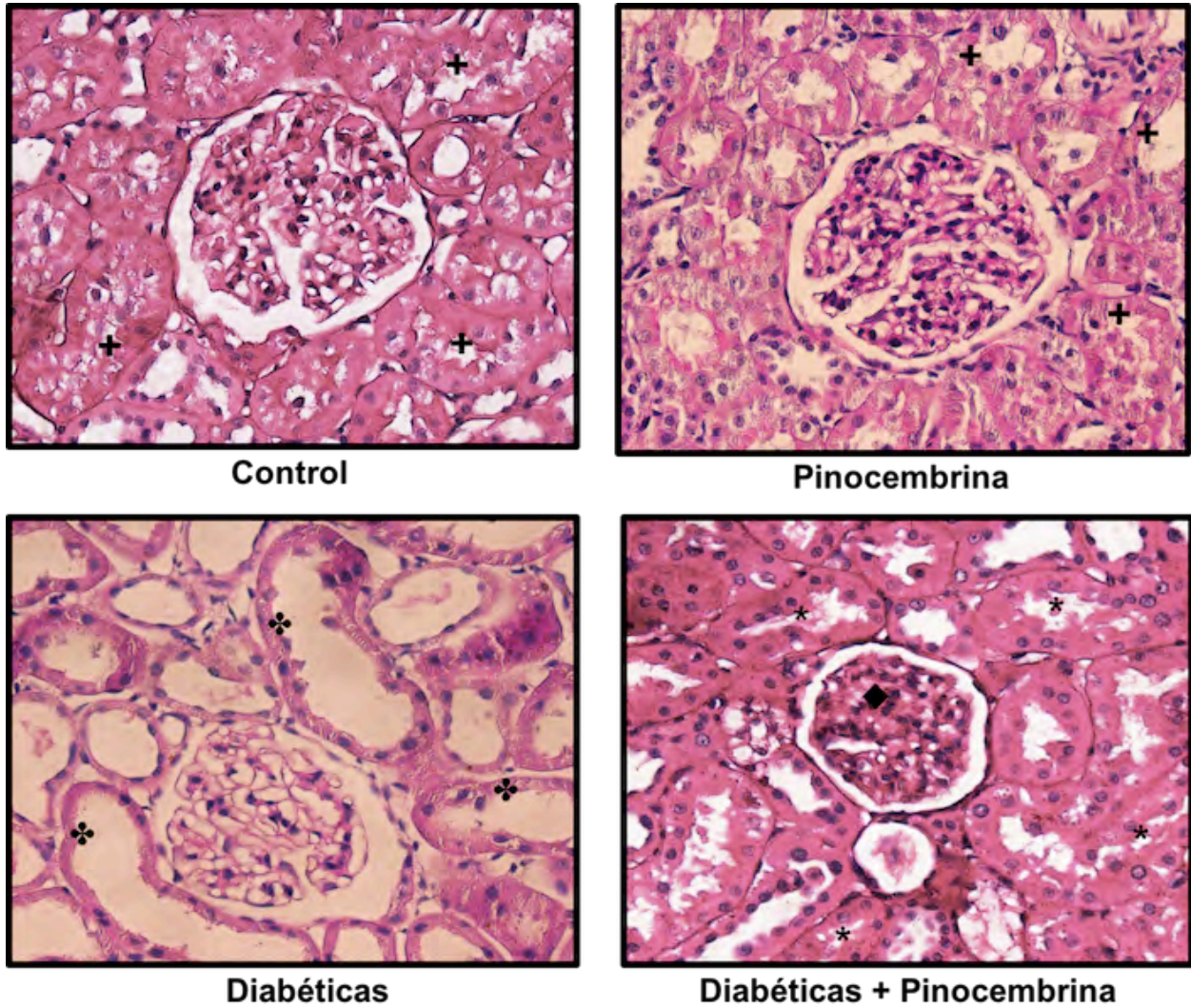


Figura 14. Micrografías de secciones histológicas de riñón del esquema correctivo. (*) disminución de luz tubular, (+) túbulos proximales con borde en cepillo, (◆) dilatación tubular, (◆) acumulación de matriz extracelular.

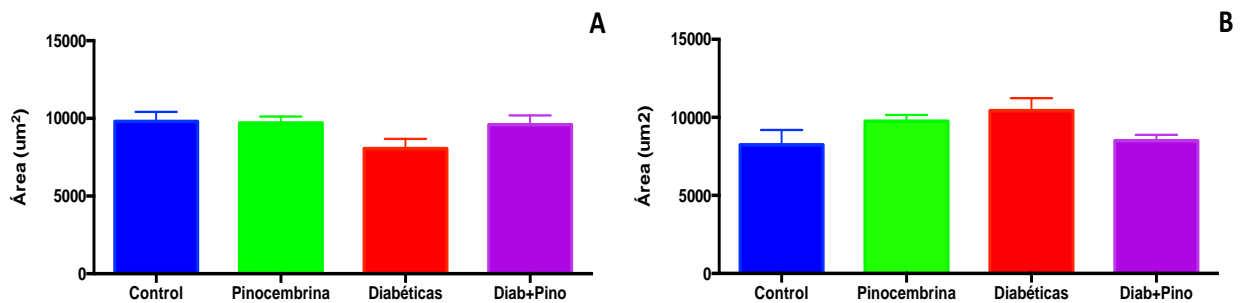


Figura 15. Área de los glomérulos en los grupos experimentales del esquema preventivo y correctivo. **A)** Área de glomérulos en el esquema preventivo. **B)** Área de glomérulos en el esquema correctivo. Los valores mostrados son el promedio \pm SEM.

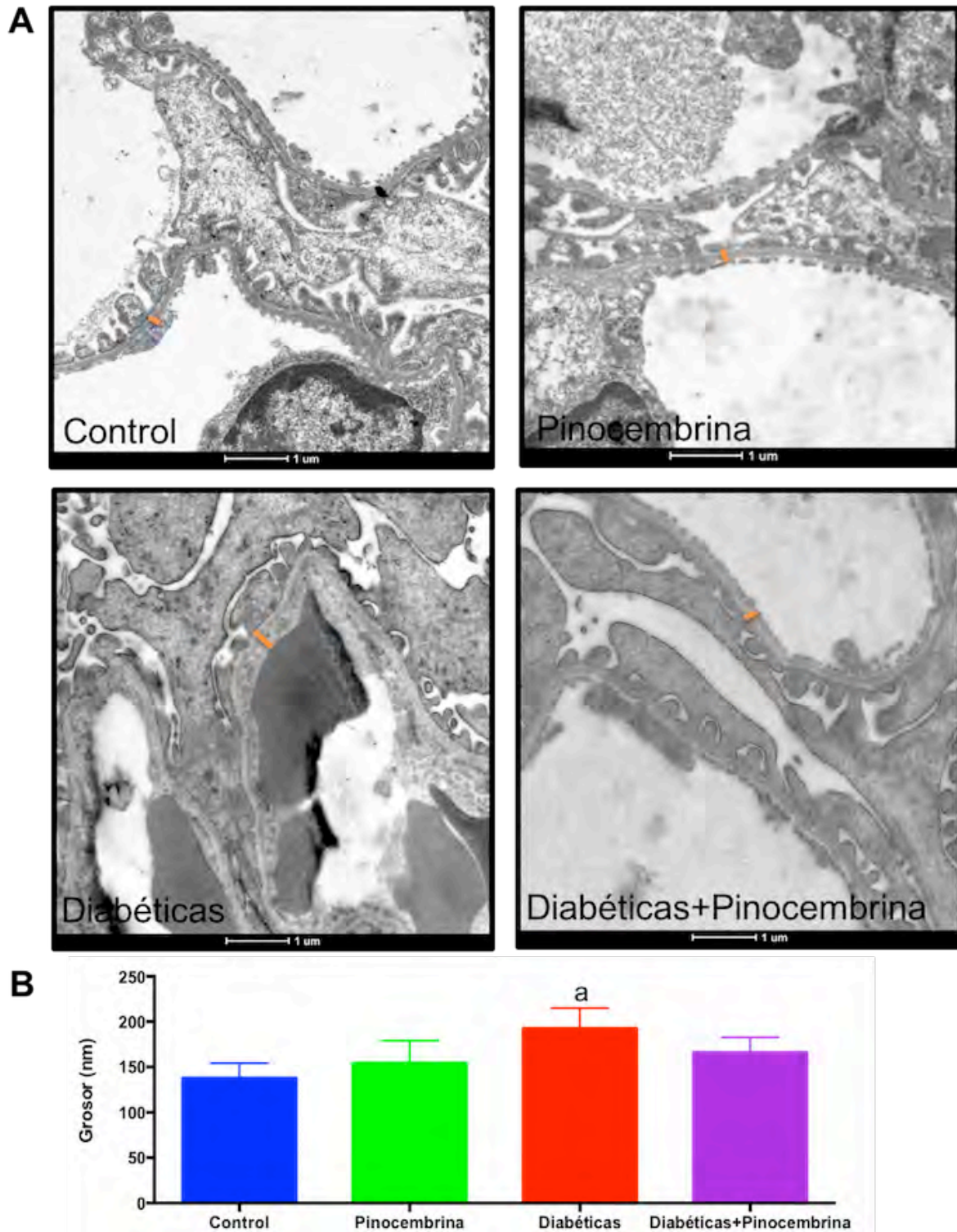


Figura 16. Ultraestructura del glomérulo por microscopía electrónica de transmisión en el esquema preventivo. **A)** Fotomicrografías representativas de los grupos experimentales. **B)** Comparación del grosor de la MBG, valores expresados en nm. Escala = 1 µm. Promedio ± SEM. ^a $p < 0.01$ vs. Control, $n = 3-5$.



La medición del grosor de la membrana basal glomerular se realizó por microscopía electrónica de transmisión. El grosor de la MBG del grupo control fue de 137.8 ± 9.6 nm, del grupo de pinocembrina de 154.6 ± 14.3 , de las ratas diabéticas de 192.6 ± 22.5 nm y de las ratas diabéticas tratadas con pinocembrina de 165.9 ± 7.5 nm. Se encontró un aumento significativo del grosor de la MBG en el grupo diabético, en comparación con el grupo control. Con la administración de pinocembrina se observó una tendencia a disminuir el engrosamiento de la MBG (**Figura 16**).

6.6.3. Efecto de pinocembrina sobre el estrés oxidante en tejido renal y hepático

En el **Cuadro 17** se presentan los valores de los parámetros de estrés oxidante en el esquema preventivo. Se midió la excreción urinaria de H_2O_2 , el contenido de MDA en plasma, hígado y riñón, así como, el contenido de 4-HNE en riñón e hígado. La administración de pinocembrina en ratas sanas no modificó significativamente ninguno de estos parámetros. En el grupo diabético hubo un aumento de excreción urinaria de H_2O_2 , el contenido de MDA en plasma y en riñón, comparado con el grupo control. La administración de pinocembrina a animales diabéticos disminuyó la cantidad de MDA en plasma y en riñón. Por otra parte, con respecto al contenido de MDA y 4-HNE en hígado, no se observaron diferencias significativas entre los grupos de estudio.

Cuadro 17. Parámetros de estrés oxidante en riñón e hígado en el esquema preventivo.

	Control	Pinocembrina	Diabéticas	Diabéticas + Pinocembrina
H₂O₂ en orina (μM/24h)	0.04 ± 0.04	0.14 ± 0.09	2.7 ± 0.7^a	2.5 ± 0.7^a
MDA plasma (μM)	0.93 ± 0.2	1.0 ± 0.1	2.2 ± 0.3^a	1.3 ± 0.2^b
MDA riñón (nM/mg prot)	21.76 ± 3.7	19.63 ± 2.2	42.15 ± 4.9^a	27.57 ± 2.9^b
4-HNE riñón (nM/mg prot)	12.5 ± 2.7	11.7 ± 1.9	74.4 ± 9.8^a	44.5 ± 12.5
MDA hígado (nmol/mg prot)	11.7 ± 2.1	9.4 ± 1.5	22.0 ± 5.8	21.5 ± 1.4
4-HNE hígado (nmol/mg prot)	34.4 ± 6.1	21.9 ± 3.3	22.6 ± 3.6	25.9 ± 6.8

MDA=malondialdehído, 4-HNE=4-hidroxiacetaldehído; prot=proteína. Los valores mostrados son el promedio \pm SEM, ^a $p < 0.01$ vs. Control; ^b $p < 0.01$ vs. Diabéticas.



En el esquema correctivo, la administración de pinocebrina a animales diabéticos incrementó la excreción urinaria de H₂O₂ en orina y no evitó el incremento de MDA en plasma (**Cuadro 18**). Sin embargo, hubo una disminución significativa en el MDA en tejido renal. No se encontraron diferencias significativas en el contenido de MDA y 4-HNE entre los grupos de estudio.

Cuadro 18. Parámetros de estrés oxidante en riñón e hígado en el esquema correctivo.

	Control	Pinocebrina	Diabéticas	Diabéticas + Pinocebrina
H₂O₂ en orina (μM/24h)	0.09 ± 0.04	0.03 ± 0.03	3.7 ± 0.8 ^a	5.9 ± 1.3 ^{a,b}
MDA plasma (μM)	0.92 ± 0.25	1.2 ± 0.3	2.4 ± 0.4 ^a	1.9 ± 0.2 ^a
MDA riñón (nM/mg prot)	18.8 ± 3.1	39.1 ± 2.7 ^a	34.2 ± 2.74 ^a	22.4 ± 3.3 ^b
4-HNE riñón (nM/mg prot)	12.1 ± 2.0	28.3 ± 2.8	28.3 ± 6.8	47.1 ± 7.0
MDA hígado (nmol/mg prot)	8.2 ± 2.7	12.7 ± 2.6	27.9 ± 4.7 ^a	20.7 ± 3.5
4-HNE hígado (nmol/mg prot)	32.6 ± 5.6	27.9 ± 2.4	36.3 ± 3.6	22.2 ± 2.8

MDA=malondialdehído, 4-HNE=4-hidroxinonal; prot=proteína. Los valores mostrados son el promedio ± SEM, ^a *p* < 0.01 vs. Control; ^b *p* < 0.01 vs. Diabéticas.

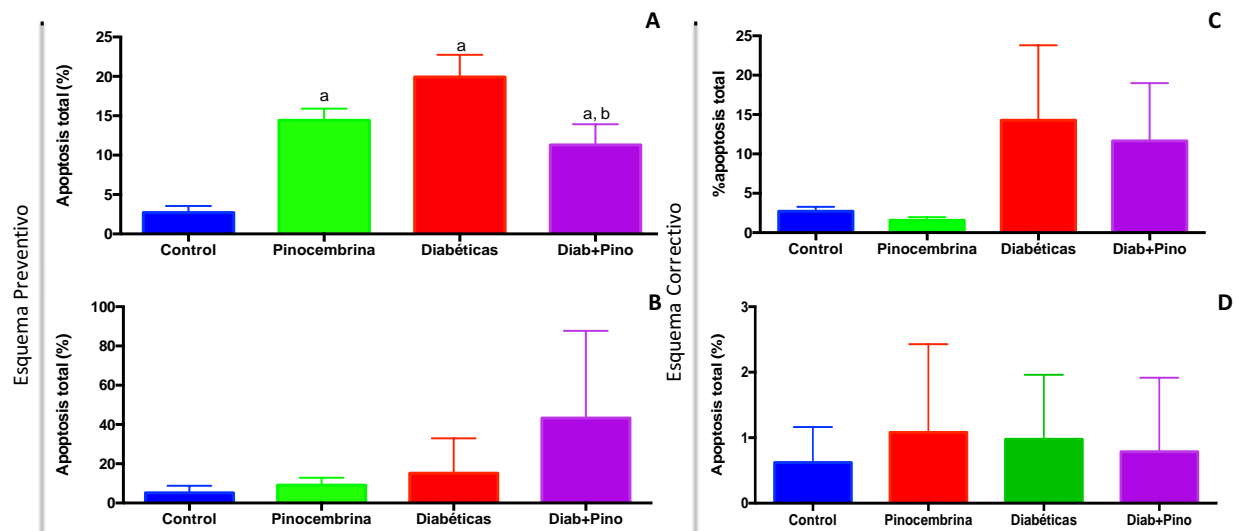


Figura 17. Porcentaje de apoptosis total en los esquemas de tratamiento **A)** Apoptosis en riñón del esquema preventivo, **B)** Apoptosis en hígado del esquema preventivo, **C)** Apoptosis en riñón del esquema correctivo, **D)** Apoptosis en hígado del esquema correctivo. Los valores mostrados son el promedio ± SEM. ^a *p* < 0.05 vs. Control.



5.6.4. Efecto de pinocembrina sobre la apoptosis en células de riñón

En el esquema preventivo, se encontró un aumento en el porcentaje de apoptosis total dentro del grupo de ratas diabéticas ($2.72\% \pm 0.83$ vs $19.93\% \pm 2.8\%$). De forma paradójica, las ratas control tratadas con pinocembrina mostraron un aumento significativo en el porcentaje de apoptosis en comparación con el grupo control ($14.42\% \pm 1.5\%$) y el grupo diabético tratado con pinocembrina muestra una reducción en este parámetro ($11.30\% \pm 2.6\%$) (**Figura 17**).

Dentro del esquema correctivo, en el tejido renal se no se encontraron diferencias entre los grupos control y pinocembrina ($2.72\% \pm 0.56\%$ vs $1.57\% \pm 0.39\%$), mientras que para el grupo diabético, se observó un incremento en los niveles de apoptosis ($14.28\% \pm 9.5\%$) y pinocembrina no abatió este daño ($11.66\% \pm 7.3\%$) (**Figura 17**).

5.6.5. Efecto de pinocembrina sobre la apoptosis en células de hígado

En el esquema preventivo, se obtuvieron porcentajes de apoptosis totales de $5.23\% \pm 3.5\%$ para las ratas control, $12.46\% \pm 17.45\%$ para las ratas diabéticas, $9.13\% \pm 3.76\%$ para las ratas de pinocembrina y $42.30\% \pm 45.61\%$ para las ratas diabéticas tratadas con pinocembrina y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (**Figura 17**).

En tanto que en el esquema correctivo no se observaron cambios en ninguno de los grupos estudiados ($0.62\% \pm 0.54\%$, $0.97\% \pm 0.98\%$, $1.08\% \pm 1.35\%$, $0.79\% \pm 1.13\%$) (**Figura 17**).



6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En los últimos años se ha registrado un incremento dramático de la obesidad en la población, lo que a su vez ha producido un incremento en la población diabética a edades más tempranas (IDF, 2017). Estos pacientes con el tiempo desarrollarán complicaciones macrovasculares y microvasculares, entre estas últimas se encuentra la ND. La ND tiene el mayor impacto sobre la calidad de vida y el costo económico en la vida de los pacientes. Es por esta razón que la población busca en la Medicina Alternativa y en los remedios herbolarios una manera de atender sus necesidades de salud. La OMS estima que en los países industrializados más del 50% de la población ha utilizado la medicina complementaria o alternativa al menos una vez en su vida, mientras que en África y Latinoamérica el uso de plantas medicinales y materiales vegetales, como el propóleo, se ha incrementado notablemente en los últimos años en la Medicina Tradicional como el principal medio para procurar sus necesidades primarias de salud (OMS, 2008, Boisard *et al.*, 2014).

En el presente trabajo de investigación se estudiaron cuatro muestras de propóleo mexicano recolectadas en Durango, Zacatecas, Chihuahua y Ciudad de México. En primera instancia se analizaron cualitativamente los componentes volátiles mediante la técnica de microextracción fase sólida en el espacio de cabeza seguida de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (HS-SPME/GC-TOF-MS). La técnica de extracción de volátiles usada fue microextracción en fase sólida en espacio de cabeza (HS-SPME). Otra técnica usada para extraer volátiles es la destilación por arrastre de vapor; aunque ésta presenta varias desventajas como pérdida de los compuestos volátiles, baja eficiencia de extracción, largos tiempos de extracción, una posible degradación o modificación de los volátiles, debido a la alta temperatura y al agua (Mukherjee, 2005). La HS-SPME permite determinar los compuestos volátiles de las muestras mediante el análisis de la fase de vapor que está en equilibrio termodinámico con la muestra en un sistema cerrado (Freiría *et al.*, 1998). Los analitos se extraen con una fibra de sílice fundida recubierta de algún polímero, cuya naturaleza depende del tipo de compuestos requeridos. Previamente se estableció que la fibra que extraía con más eficiencia los compuestos de muestras de propóleo es la fibra de DVB/CAR/PDMS (fibra gris). También previamente, se estandarizaron la cantidad de muestra, fuerza iónica, tiempo y temperatura de extracción, así como las condiciones del análisis cromatográfico y de adquisición de datos (Torres-González, 2016). En los estudios previos de propóleos mexicanos, no se analizaron los compuestos



volátiles, lo cual resulta una omisión importante ya que muchos de estos presentan actividades biológicas como la actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas, bacterias Gram-negativas y hongos (Petri *et al.*, 1988; Bankova *et al.*, 1999; Silici y Katluca, 2005; Melliou *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2009).

Cabe mencionar que la técnica acoplada HS-SPME/GC-MS-TOF ha sido usada anteriormente para estudiar la fracción volátil de miel, de jalea real y de propóleo de diversas partes del mundo. En estos estudios se encontró que los componentes volátiles del propóleo incluyen alcohol bencílico, acetato de bencilo, alcohol cinámico, vainillina, eudesmol, benzoato de ciclohexilo, benzoato de bencilo, entre otros (Xu *et al.*, 2009, Pellati *et al.*, 2013).

Los exudados de árboles usados por las abejas para fabricar el propóleo, son preferentemente los álamos, dentro de estos árboles hay especies y clonas que tienen composiciones características, por lo que la composición de los volátiles del propóleo depende la fuente botánica (Greenaway *et al.*, 1989). De acuerdo a Petri y cols. (1988), el propóleo de las zonas templadas puede dividirse en dos tipos, basado en la presencia de cantidades representativas de β -eudesmol (40–60%) o benzoato de bencilo (20–40%) en el aceite esencial. Sin embargo, en la muestras analizadas en este trabajo no se encontraron estos compuestos.

6.1. Volátiles del propóleo de Zacatecas

Los compuestos mayoritarios identificados en la muestra de Zacatecas son terpenos (71.8%), entre los que se encuentran en mayor proporción es el mirceno (14.3%) y el α -pineno (9.4%). El mirceno es un compuesto que se ha identificado en el aceite esencial de árboles de la especie *Juniperus oxycedrus subsp. oxycedrus L* (Hayta y Bagci, 2014). Se reporta que los *Juniperus* llegan a encontrarse en sitios intermedios entre los bosques de pino y encino y los pastizales y matorrales (Fonseca, 2006), una vegetación encontrada en Fresnillo. Además, ha sido identificado en muestras de propóleo de Brasil (Simionatto *et al.*, 2012), Turquía (Celekli *et al.*, 2013), Grecia (Celekli *et al.*, 2013), China (Cheng *et al.*, 2012) y Uruguay (Kaskoniene *et al.*, 2014), así como en geopropóleo de Yucatán (Pino *et al.*, 2006). El α -pineno se encuentra en los aceites de varias especies de coníferas, particularmente de pino. Se ha identificado en los propóleos brasileños (Simionatto *et al.*, 2012), italianos, uruguayos (Kaskoniene *et al.*, 2014), mexicanos (Torres-González, 2016) y griegos (Celekli *et al.*, 2013). Esta muestra de propóleo de Zacatecas tiene un alto contenido de monoterpenos (64.4%), como el propóleo estudiado previamente por Agüero y cols. (2011), no obstante, el tipo y proporción de éstos es diferente.



Los monoterpenos poseen varias propiedades farmacológicas entre las que se encuentran antifúngica, antibacteriana, antioxidante, anti-inflamatoria y antiespasmódica (Koziol *et al.*, 2014).

6.2. Volátiles del propóleo de Durango

En la muestra de Durango, los ésteres fueron los compuestos en mayor proporción (53.8%) y de éstos, el acetato de hexilo es el compuesto mayoritario (9.8%) (**Figura 16**). Los ésteres son sustancias fragantes y responsables de varios sabores en los alimentos, en particular, el acetato de hexilo posee un olor a pera. El *cis*-ocimeno fue el compuesto mayoritario en la muestra (12.7%), el cual tiene actividades antibacteriana y antifúngica, además que se ha encontrado que el ocimeno es una feromona relacionada con la regulación social en la colonia de abejas (*Apis mellifera* L.) (Zvieli y Li, 2013). Los ésteres de ácidos alifáticos de cadena larga no se encuentran presentes en brotes de los álamos y su origen está en la cera de la abeja (Greenaway *et al.*, 1990); por otra parte, los ésteres de ácidos alifáticos de cadena corta provienen de árboles del tipo de los álamos (Greenaway *et al.*, 1989). El alto contenido de ésteres alifáticos en esta muestra es diferente a la composición de volátiles previamente reportados para los propóleos mexicanos (Pino *et al.*, 2006; Torres-González *et al.*, 2016).

6.3. Volátiles del propóleo de CDMX

En la muestra recolectada en la CDMX el compuesto en mayor abundancia fue nonanal (9.5%) y los monoterpenos como el α -pineno (5.7%). Los aldehídos han sido reportados previamente en muestras de propóleo, algunos ejemplos son aldehído benzoico, vainillina, aldehído caproico, hexanal y *p*-hidroxialdehído benzoico (Greenaway, 1990). Estos compuestos provienen de los brotes de las plantas y no del metabolismo de la abeja como los hidrocarburos (Huang *et al.*, 2014).

6.4. Contenido de fenoles y flavonoides totales

Después del análisis de los compuestos volátiles, se prepararon EEP de cada una de las muestras. Como primer indicativo de la capacidad antioxidante, se realizó la cuantificación de fenoles totales y flavonoides totales en los EEP. El contenido de fenoles totales es usado como método de rutina y de tamizaje de productos naturales para medir la capacidad reductora de la muestra (Huang *et al.*, 2005). Las muestras estudiadas tuvieron contenidos de fenoles totales entre 109 y 139 mg eq. AG/g EEP, lo cual contrasta con los 314 mg eq. AG/g EEP encontrados por Rivera-Yáñez y cols. (2018). Entre los compuestos fenólicos, los flavonoides son los compuestos en



mayor medida responsables de la actividad biológica, por lo cual se cuantificaron los flavonoides totales siguiendo las metodologías utilizadas en las normas mexicana y las internacionales. El contenido de flavonoides totales fue de 70 a 90 mg eq. Q/g EEP. Estos resultados son comparables con los obtenidos previamente para propóleos recolectados en el Altiplano mexicano (Zarco, 2012; Granados-Pineda 2014) y cumplen con las especificaciones de control de calidad establecidas por las normas de calidad elaboradas por competencias nacionales, NOM-003-SAG/GAN-2017, “Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento”, así como internacionales, Instituto Argentino de Normalización-Subcomité de Productos agroalimentarios del NOA (Norma 15935-1 Esquema 1, 2004) y el Ministerio de Agricultura de Brasil-Apacame (Reglamento técnico para fijar la identidad y calidad de propóleos, 1999), a los cuales se establece que el contenido mínimo de fenoles totales y flavonoides totales debe ser mayor a 40 mg de eq. AG/g EEP y mayor a 5 mg de eq. Q/g EEP, respectivamente.

6.5. Actividad antioxidante de los EEP

El contenido de fenoles y flavonoides totales correlaciona con la actividad antioxidante de una muestra (Piluzza y Bullitta, 2011). Cuando se evalúa la actividad antioxidante *in vitro*, se recomienda ampliamente usar más de un ensayo de actividad antioxidante y que dentro de éstos se encuentren un ensayo que involucre el mecanismo de transferencia de un electrón y otro que denote el mecanismo de transferencia de un átomo de hidrógeno (Tan y Lim, 2015). Los ensayos antioxidantes empleados fueron neutralización del radical DPPH, FRAP y blanqueamiento de β -caroteno. La capacidad antioxidante encontrada en los EEP es similar a la encontrada para otras muestras de propóleo poplar de zonas templadas como Croacia (Orsolich *et al.*, 2012), Francia (Boisard *et al.*, 2014) y Argentina (Lima *et al.*, 2009).

Posteriormente, los EEP fueron individualmente fraccionados para obtener compuestos puros.

6.6. Estudio fitoquímico de los EEP

La composición química del propóleo depende de la localización geográfica, de la fuente botánica y de la especie de abeja (Huang *et al.*, 2014). Las muestras recolectadas provienen de las zonas melíferas de México, sin embargo, son de diferentes regiones en donde las fuentes vegetales varían.

Los compuestos aislados son flavonoides sin sustitución en el anillo B (pinocembrina, crisina, pinobanksina) característicos de los propóleos tipo I, según la clasificación realizada por Salatino y cols. (2011), cuya principal fuente vegetal propuesta son los álamos. De acuerdo a la revisión



de la vegetación circundante a las zonas de recolección en la zona norte son predominantemente pastizales y matorrales, pero en cada una de ellas se encuentran, a pocos kilómetros de distancia, zonas boscosas a las cuales las abejas pueden recurrir para recolectar las resinas, como lo señala König B (1985) que incluso en áreas desérticas los árboles poplares son la fuente principal de propóleo.

El perfil de flavonoides encontrado en las muestras estudiadas es parecido al reportado en el propóleo de otras regiones templadas como Europa, Asia occidental, Sudamérica y Canadá (Bankova *et al.*, 1983; Markham *et al.*, 1996; Volpi y Bergonzini, 2006; Christov *et al.*, 2006; Falçao *et al.*, 2013; Kumazawa *et al.*, 2014).

Del propóleo de Chihuahua se aisló la 2',4',6'-trihidroxicalcona o calcona de pinocembrina que se ha reportado en propóleo de Canadá (Christov *et al.*, 2006). Las chalconas son considerados metabolitos característicos en los exudados de árboles de la sección Tacamahaca (English *et al.*, 1991; Christov *et al.*, 2006). Este hallazgo permite sugerir que las abejas utilizan como fuente vegetal para la producción de propóleo árboles de la sección Tacamahaca como la *Betula* (abedules), *Alnus* (aliso) y *Aesculus* (castaña de Indias)

Además de los flavonoides sin sustitución en el anillo B, se aislaron flavonoides con sustitución en este anillo (isoramnetina, acetina, kaempferida 4',7-*O*-dimetilnaringenina, 4',7-*O*-dimetilkaempferol). La isoramnetina ha sido aislada previamente de propóleo de Bulgaria (Bankova *et al.*, 1983) y de propóleo de Guanajuato (Granados-Pineda, 2014). Mientras que la 4',7-*O*-dimetilnaringenina es un constituyente bien conocido de brotes de especies *Betula* (Wollenweber, 1975), lo cual podría confirmar este árbol como una fuente vegetal de resina ocupada por las abejas para producir propóleo.

Es importante señalar que en la literatura se menciona ampliamente que el éster fenetílico del ácido cafeico (CAPE) es el compuesto mayoritario del propóleo poplar. Este ha sido aislado de propóleo de Sonora, México (Valencia *et al.*, 2012), pero no se encontró como tal en ninguna de las muestras estudiadas de otros propóleos mexicanos ni de los propóleos de este estudio. En cambio, en los EEP estudiados, el compuesto mayoritario fue pinocembrina y con un alto rendimiento (Zacatecas, 2%; Durango, 5.6% y Chihuahua 3.5%). Asimismo, la pinocembrina ha sido detectada en propóleos mexicanos recolectados Sonora, Chiapas y Chihuahua (Valencia *et al.*, 2012; Guzmán-Gutiérrez *et al.*, 2018).



6.7. Evaluación biológica de la pinocembrina

Los extractos etanólicos de propóleo son ampliamente utilizados en la Medicina Alternativa, sin embargo, su composición varía enormemente dependiendo de la zona de recolección, tal como se demostró con las cuatro muestras de propóleo analizadas en este trabajo. Por esta razón, se propuso el estudio para conocer los efectos del compuesto más abundante en las muestras estudiadas. El compuesto común en las muestras de Durango, Chihuahua, Zacatecas y CDMX fue pinocembrina. Esta flavanona fue elegida para investigar su efecto sobre la nefropatía diabética en un modelo *in vivo*.

La nefropatía diabética se desarrolla en un 40% de los pacientes diabéticos cuando los niveles de glucosa se han mantenido elevados por largos periodos de tiempo. Durante la diabetes, múltiples mecanismos interactúan y contribuyen al desarrollo de esta enfermedad degenerativa.

En el presente estudio se planteó la administración de pinocembrina en dos esquemas de tratamiento que atacan diferentes estadios de la enfermedad. El primer esquema es el preventivo, donde los animales son diabéticos y no presentan daño renal; por lo que con la administración del flavonoide se esperaba encontrar una aparición tardía de los signos clínicos de daño renal o evitar que éste aparezca. El segundo esquema es el correctivo, donde los animales han presentado una glicemia crónica (40 días) sin tratamiento y ya presentan los signos clínicos clásicos de la nefropatía diabética, en este caso se administró la pinocembrina para evitar el empeoramiento del deterioro renal.

La STZ fue utilizada como agente diabetogénico, este modelo es ampliamente aceptado y muy usado debido a los resultados robustos en las manifestaciones del metabolismo diabético y de nefropatía diabética (Rüster y Wolf, 2010).

Dentro del esquema preventivo se demostró que la pinocembrina previene parcialmente la pérdida de peso corporal y el aumento de la glucosa sanguínea (**Figura 10**). Estos resultados están en concordancia con reportes previos para flavonoides en modelos animales de hiperglicemia. Rauter y cols (2010) estudiaron el efecto de ocho flavonoides (apigenina 7-*O*-glucósido, luteolina 7-*O*-glucósido, genisteína 7-*O*-glucósido, luteolina 7,3'-di-*O*-glucósido, genisteína, crisoeriol, apigenina y rutina) en ratones con hiperglicemia por STZ. En esta investigación se encontró que los flavonoides estudiados evitan la pérdida de peso corporal de los animales diabéticos después de siete días de administración con una dosis de flavonoide de 4 mg/kg, ip. Otro estudio describe que la administración de naringenina al 2%, en un suplemento



por vía oral a ratones diabéticos, les permitió mantener su peso corporal y se observó una diferencia significativa en el peso con respecto a los animales diabéticos sin tratamiento con el suplemento (Tsai *et al.*, 2011). La quercetina (50 mg/kg, po), administrada a ratas diabetizadas con STZ, no produjo cambios en el peso corporal después de tratar a los animales por 12 semanas (Lai *et al.*, 2012). La crisina, un componente común el propóleo, normaliza el peso corporal después de 16 semanas de tratamiento (Ahad *et al.*, 2014).

La sobrevida observada en el grupo tratado con pinocembrina en el esquema preventivo, puede estar relacionada con la menor pérdida de peso y la ligera disminución de la glucosa. En la **Figura 10** se muestra la sobrevida obtenida para los ratas diabéticas tratadas con pinocembrina. En un estudio previo realizado por Juárez-Reyes y cols. (2015), se encontró que el extracto de *Anoda cristata* y los flavonoides acetina y diosmetina poseen un efecto hipoglicémico en ratones diabetizados con nicotinamida y STZ. Estos resultados contrastan con otros estudios en los que se encontró que los flavonoides genisteína 7-O-glucósido (Rauter *et al.*, 2010), quercetina (Lai *et al.*, 2012) y crisina (Ahad *et al.*, 2014) no disminuyen las glicemia en animales diabéticos. Otro estudio realizado por Tai y cols. (2011) describe que la naringenina disminuye levemente la glicemia en ratones por medio del aumento en los niveles de insulina. Por otra parte, la crisina no tiene efecto sobre la glucosa sérica en animales con DM2 (Ahad *et al.*, 2014). En contraste con los resultados descritos para el esquema preventivo, la pinocembrina administrada a los ratas diabéticas en el esquema correctivo, no mostró efecto en el peso corporal, la glucosa y la sobrevida de los animales (**Figura 10**).

En este estudio se encontró que la pinocembrina mejoró la función renal (**Cuadro 15**) en el esquema preventivo. Este resultado está en concordancia con el efecto de otros flavonoides como la crisina, quercetina y naringenina, que mejoran la función renal (Ahad *et al.*, 2014; Lai *et al.*, 2012; Tsai *et al.*, 2011). En contraste, en el esquema correctivo no se observó una mejoría en estos parámetros.

En el grupo de animales diabéticos hubo un aumento en el volumen de orina, este hallazgo es consistente con uno de los signos característicos de la diabetes: la poliuria. La deficiencia de insulina provoca un estado catabólico que afecta el metabolismo de las grasas y de las proteínas. La asimilación de glucosa está abolida y se agotan las reservas de glucosa debido a glucogenólisis. La hiperglicemia resultante supera el umbral renal de reabsorción y se produce poliuria, que a su vez induce diuresis osmótica y por tanto, poliuria. La poliuria puede conducir a



una depleción grave de volumen provocando un compromiso del sistema nervioso central que finalmente ocasiona coma o la muerte (Kumar *et al.*, 2013). En los animales diabéticos tratados con pinocembrina, hubo una reducción significativa del volumen de orina en 24 h en comparación con los diabéticos sin tratamiento.

La proteinuria es un signo de daño glomerular que pronostica la pérdida de la función renal. En los animales diabéticos se observó un aumento significativo de la proteinuria respecto a los animales control (**Figura 12**). En el esquema preventivo, la pinocembrina disminuye la proteinuria de manera significativa en comparación con los animales diabéticos no tratados. En contraste, en el esquema correctivo hay un aumento de la proteinuria con la administración de pinocembrina a animales diabéticos, sugiriendo que el flavonoide ocasiona un mayor daño al glomérulo en lugar de protegerlo. La sobrecarga de proteínas plasmáticas en las células tubulares renales causa la producción de mediadores inflamatorios y pro-fibróticos que llevan al daño renal (Abbate *et al.*, 2006). Los principales biomarcadores de daño tubular renal que se cuantifican con mayor frecuencia son la Kim-1, NAG y NGAL. Se ha reportado el aumento de estos biomarcadores en pacientes diabéticos (Aslan *et al.*, 2016; Mahfouz *et al.*, 2016; Patel y Kalia, 2015). La disminución de daño glomerular correlaciona con la disminución de daño tubular por pinocembrina en el esquema preventivo, en contraste con el esquema correctivo donde se observa el caso contrario, sugiriendo una vez más que pinocembrina aumenta el daño renal cuando este ya existe.

Debido a que pinocembrina mostró una mejoría en la función renal entonces debería haber protección en la ultraestructura renal de los animales diabéticos tratados con pinocembrina en el esquema preventivo. Por lo que se midió el grosor de la MBG, el cual es el primer cambio estructural medible en la diabetes (Papadopoulou-Marketou *et al.*, 2017). El tratamiento con pinocembrina mostró una tendencia a evitar el incremento del grosor de la MBG, al compararse con el grupo diabético sin tratamiento (**Figura 16**). Resultados similares se encontraron en un estudio donde se utilizó un propóleo iraní, donde el tratamiento por 12 semanas no evitó el engrosamiento de la MBG (Sameni *et al.*, 2016).

La diabetes es una alteración metabólica del metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas, por lo que en la nefropatía diabética estas alteraciones van a tener influencia sobre el daño en el tejido renal, por lo que se estudiaron el perfil lipídico y hepático. El perfil lipídico se encontraba alterado en los animales diabéticos, tanto en el esquema preventivo como en el



correctivo (**Cuadro 11 y 12**). Pinocembrina fue capaz de evitar el aumento de los niveles de los lípidos en ambos esquemas de tratamiento. Estos resultados son similares a los reportados por Ankita y cols. (2015) en ratas Wistar administradas con STZ, las cuales tenían elevados los niveles de colesterol, triglicéridos, LDL y VLDL. Estos autores atribuyeron el efecto de pinocembrina a la mejora del funcionamiento del endotelio vascular, debido a la acción antioxidante de la flavanona. Algunos mecanismos que explican el efecto hipolipemiante de los flavonoides son la acción que tienen sobre la β -hidroxi- β -metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa (Havsteen, 2002), incremento de la oxidación beta los ácidos grasos y reducción de la expresión del receptor PPAR γ (Salvamani *et al.*, 2014). Se encuentra reportado que la reducción en la hipertrigliceridemia en ratas Zucker obesas llevó a la reducción de daño glomerular (Kasiske *et al.*, 1988). Se sabe que la dislipidemia contribuye a la aterosclerosis en la microcirculación renal y a la deposición de lipoproteínas en estructuras renales, con la consiguiente estimulación de citocinas y factores de crecimiento involucrados en procesos de inflamación y fibrogénesis. En modelos animales se ha demostrado que un aumento en el colesterol total acelera la rapidez de la progresión de la enfermedad renal, infiltración de macrófagos y formación de célula espumosas (Chen *et al.*, 2013). Por lo que la mejoría de los parámetros lipídicos por pinocembrina puede también resultar en la mejoría de la función renal. Por el contrario, en el esquema correctivo, a pesar de los niveles bajos de triglicéridos y LDL, no hubo mejoría en la función renal. Este fenómeno se ha reportado en la clínica, donde el control de la dislipidemia con estatinas si bien reduce la LDL, no se refleja en un efecto sustancial sobre la mejora de la enfermedad renal (Baigent *et al.*, 2011).

El daño hepático ha sido documentado en animales diabetizados con STZ y en pacientes con DM1 (Rauter *et al.*, 2010). Además correlaciona con lo reportado por Messeri y cols. (2012), quienes reportan elevaciones de las enzimas ALT y AST hasta seis veces del valor de referencia y hasta 3 veces la concentración normal de ALP en pacientes diabéticos tipo 1.

En este estudio el grupo de ratas diabéticas mostró elevación en los niveles de las enzimas ALT, AST y ALP lo que indica daño hepatocelular (**Cuadro 13 y 14**). En el grupo de diabéticos administrados con pinocembrina no se observó una disminución de estos valores comparados con el grupo de ratas diabéticas sin tratamiento. Este resultado contrasta con lo reportado para el propóleo, donde la administración de EEP evitó el aumento de las transaminasas (Hu *et al.*,



2004). También difiere con los resultados de Rauter y cols. (2010), quienes encontraron que los flavonoides de estudio disminuyeron los niveles de las enzimas en ratas diabéticas.

La hiperglicemia es responsable de la producción de estrés oxidante por múltiples vías de señalización. El estrés oxidativo produce daño en las membranas lipídicas conduciendo a peroxidación lipídica y generando especies reactivas que han sido implicadas en complicaciones diabéticas (Pan *et al.*, 2010). El MDA es un producto final de la peroxidación lipídica que ha sido ampliamente usado como marcador de estrés oxidante. En varios estudios de ND en modelos animales se cuantifican los niveles de MDA como indicador de daño renal, con el método del ácido tiobarbitúrico. Los autores encuentran una mayor concentración de MDA en los animales diabéticos sin tratamiento, respecto a los animales sanos (Sefi *et al.*, 2012; Ankita *et al.* 2015; Xu *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016). En este estudio, la administración de pinocembrina redujo significativamente los niveles de MDA en plasma y en tejido renal, en el esquema preventivo. Los resultados obtenidos están en concordancia con reportes previos donde pinocembrina inhibe la formación de sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico en mitocondrias del hipocampo de ratas con isquemia/reperfusión (Smith *et al.*, 1985). Adicionalmente pinocembrina ejerce su efecto antioxidante capturando EROs y restableciendo los niveles de glutatión (Saad *et al.*, 2015). El 4-HNE es otro producto de la peroxidación lipídica que se cuantificó en el riñón e hígado de ambos esquemas de tratamiento pero no se encontraron diferencias significativas entre los grupos estudiados; probablemente por que el 4-HNE libre se metaboliza rápidamente (Grintzkalis *et al.*, 2013).

Debido a que se encontró un aumento de enzimas hepáticas, se cuantificaron los dos marcadores de estrés oxidante de lípidos en el hígado. No se encontraron diferencias significativas de MDA y 4-HNE en el hígado de los grupos de estudio, en ninguno de los dos esquemas de tratamiento.

El peróxido de hidrógeno es una ERO que se ha propuesto como biomarcador de estrés oxidante global. En el esquema preventivo, la pinocembrina no evitó el aumento de H₂O₂ en orina (**Cuadro 17**). En la ND, la oxidasa 4 de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (Nox4) contribuye enormemente a la producción de superóxido en la corteza renal y este es dismutado a H₂O₂. Sin embargo, no hay reportes del atrapamiento de superóxido por parte de pinocembrina, por lo que probablemente el flavonoide no es capaz de atraparlo, lo cual da como resultado altos niveles de H₂O₂. En el esquema correctivo, la concentración de H₂O₂ es significativamente mayor en el grupo diabético tratado con pinocembrina en comparación con el grupo diabético sin



tratamiento (**Cuadro 18**). Este resultado refuerza los resultados anteriores que indican el aumento de daño renal con la administración de pinocembrina de manera tardía. El efecto perjudicial observado por pinocembrina en el esquema correctivo puede deberse a la acción prooxidante que llegan a mostrar los flavonoides, los mecanismos propuestos son el aumento de la reacción de Fenton, la inhibición de la respiración mitocondrial, la auto-oxidación y la oxidación de moléculas antioxidantes de bajo peso molecular (Procházková *et al.*, 2011).

La hiperglicemia es un estado que promueve la apoptosis de las células renales (Brownlee, 2005), dentro del esquema preventivo se encontró que las ratas diabéticas aumentaba la apoptosis y pinocembrina disminuyó este efecto, sin embargo, de forma paradójica, la pinocembrina administrada a ratas sanas aumenta la cantidad de apoptosis en células renales. En reportes previos se encontró que pinocembrina restauró los niveles de Bcl-2 y citocromo C e inactivó la caspasa-3 y la caspasa-9; disminuyó los biomarcadores de apoptosis caspasa-3 y citocromo-C (10 mg/kg, po) en el modelo de isquemia-reperfusión cerebral (Saad *et al.*, 2015); disminuyó la expresión de Bax y caspasa-3 y aumentó la expresión de Bcl-XL (50 mg/kg, po) en el modelo de nefrotoxicidad inducida por gentamicina (1, 3, 10 μ M) en el modelo de toxicidad por el péptido β -amiloide (Promsan *et al.*, 2016).

En resumen, en el esquema preventivo la pinocembrina mejora la sobrevida, la glucosa parcialmente, los lípidos, la función renal y la estructura renal antes de que exista un daño renal severo. Un posible mecanismo de protección es por disminución de estrés oxidante en el riñón, el cual se sabe que es un factor determinante en la iniciación y progresión del deterioro renal.

Cabe mencionar que en la literatura no hay reportes donde se maneje un esquema correctivo como el propuesto en este estudio.



7. CONCLUSIONES

Los terpenos fueron los compuestos volátiles con mayor abundancia en el propóleo crudo de Zacatecas y la CDMX. Mientras que los ésteres alifáticos fueron la clase de compuestos más abundantes en el propóleo crudo de Durango.

Los flavonoides fueron los compuestos más abundantes en la fracción no volátil en las cuatro muestras de propóleo recolectadas en las diferentes zonas melíferas del país. Las muestras de la zona del norte (Durango, Chihuahua y Zacatecas) contienen flavonoides típicos de los propóleos tipo I, también denominados de las zonas templadas y con los álamos como fuente vegetal principal, en tanto que en la muestra del centro del país (CDMX), contiene mayoritariamente flavonoides con sustitución en el anillo B.

Las diferencias encontradas en la fracción volátil y en los EEP confirman la influencia de la vegetación circundante a la colmena en la composición química de los propóleos.

La administración de pinocembrina a animales diabéticos que no tienen daño renal (esquema preventivo), retarda la aparición de los signos clínicos del daño renal; posiblemente por la reducción de la lipidemia, de la glicemia, del estrés oxidante a nivel renal y sistémico y de la apoptosis de las células renales.

Por otra parte, la administración de pinocembrina a animales diabéticos con daño renal severo (esquema correctivo), aumenta el daño renal, probablemente por un aumento en el estrés oxidante.

Pinocembrina podría considerarse como adyuvante en el tratamiento de la nefropatía diabética para evitar la progresión del daño renal.



8. PROSPECTIVAS

Evaluar los EEP utilizando el modelo de rata diabetizada con STZ para conocer su efecto y compararlos con la actividad encontrada para pinocembrina.

Cuantificar la apoptosis en células renales con otra técnica (TUNEL o ensayo cometa) para corroborar los resultados obtenidos por citometría de flujo.

Cuantificar otros marcadores de estrés oxidante, como 8-OHdG o el índice de proteínas carboniladas.

Cuantificar AGEs en suero y tejido renal.

Cuantificar el contenido y actividad de enzimas antioxidantes.

Cuantificar en suero algunos marcadores de inflamación como IL-1 o TNF- α .



9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbate M, Zoja C, Remuzzi G (2006). How Does Proteinuria Cause Progressive Renal Damage? *J Am. Soc. Nephrol.* 17, 2974–2984.

Abo-Salem OM1, El-Edel RH, Harisa GE, El-Halawany N, Ghonaim MM (2009). Experimental diabetic nephropathy can be prevented by propolis: effect on metabolic disturbances and renal oxidative parameters. *Pak. J. Pharm. Sci.* 22, 205–210.

Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography and mass spectrometry. 4th ed. 2007, Allured Publishing Corporation, Chicago, IL.

Agüero MB, Svetaz L, Sánchez M, Luna L, Lima B, López ML, Zacchino S, Palermo J, Wunderlin D, Feresin GE, Tapia A (2011). Argentinean Andean propolis associated with the medicinal plant *Larrea nitida* Cav. (Zygophyllaceae). HPLC–MS and GC–MS characterization and antifungal activity. *Food Chem. Toxicol.* 49 (9), 1970–1978.

Ahad A, Ganai AA, Mujeeb M, Siddiqui WA (2014). Chrysin, an anti-inflammatory molecule, abrogates renal dysfunction in type 2 diabetic rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 279, 1–7.

Ahmad J (2015). Management of diabetic nephropathy: Recent progress and future perspective. *Diabetes Metab. Syndr.* 9(4), 343–358.

American Diabetes Association (2004). Diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 27(1), S79–S83.

Andrade-Cetto A y Heinrich M (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol.* 99(3), 325–348.

Ankita P, Deepti B, Nilam M (2015). Flavonoid rich fraction of *Punica granatum* improves early diabetic nephropathy by ameliorating proteinuria and disturbed glucose homeostasis in experimental animals. *Pharm. Biol.* 53(1), 61–71.



Aslan O, Demir M, Koseoglu M (2016). Kidney Injury Molecule Levels in Type 2 Diabetes Mellitus. *J Clin. Anal.* 00, 1–6.

Asociación Mexicana de Diabetes [AMD]. (s.f.). ¿Qué es la diabetes? http://www.amdiabetes.org/que_es_la_diabetes.php [Consultado el 24 de enero de 2015]

Baigent C, Landray MJ, Reith C, Emberson J, Wheeler DC (2011). The effects of lowering LDL cholesterol with simvastatin plus ezetimibe in patients with chronic kidney disease (study of heart and renal protection): A randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 377, 2181–2192.

Bangalore S, Toklu B, Gianos E, Schwartzbard A, Weintraub H, Ogedegbe G, Messerli FH (2017). Optimal Systolic Blood Pressure Target After SPRINT: Insights from a Network Meta-Analysis of Randomized Trials. *Am. J Med.* 130 (6), 707–719.

Bankova V, Christov R, Popov S, Marcucci MC, Tsvetkova I, Kujumgiev A (1999). Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis, *Fitoterapia* 70, 190–193.

Bankova VS, Popov SS, Marekov NL (1983). A study of flavonoids of propolis. *Journal of Nat. Prod.* 46, 471–474.

Bartosz G (2006). Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species. *Clin. Chim. Acta* 368(1-2), 53–76.

Bertelli D, Papotti G, Bortolotti L, Marcazzan L, Plessi M (2012). ¹H-NMR Simultaneous Identification of Health-Relevant Compounds in Propolis Extracts. *Phytochem. Anal.* 23(3), 260–266.

Boisard S, Le Ray A, Gatto J, Aumond M, Blanchard P, Derbré S, Flurin C, Richomme P (2014). Chemical Composition, Antioxidant and Anti-AGEs Activities of a French Poplar Type Propolis. *J Agric. Food Chem.* 62, 1344–1351.



Borges CM, Papadimitriou A, Duarte DA, Lopes de Faria JM, Lopes de Faria JB (2016). The use of green tea polyphenols for treating residual albuminuria in diabetic nephropathy: A double-blind randomised clinical trial. *Sci. Rep.* 6, 28282.

Brenneman J, Hill J, Pullen S (2016). Emerging therapeutics for the treatment of diabetic nephropathy. *Bioorg Med Chem Lett.* 26(18), 4394–4402.

Brownlee M (2005). The pathology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes.* 54, 1616–1625.

Burdock GA (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem. Toxicol.* 36, 347–363.

Celemlı OG, Hatjina F, Charistos L, Schiesser A, Ozkirim A (2013). More insight into the chemical composition of Greek propolis; differences and similarities with Turkish propolis, *Z. Naturforsch. C, Biosci.* 68(11/12), 429–438.

Chandrashekar K, Juncos LA (2014). Endothelin Antagonists in Diabetic Nephropathy: Back to Basics. *J. Am. Soc. Nephrol.* 25, 869–871.

Chen SC, Hung CC, Kuo MC, Lee JJ, Chiu YW, Chang JM, Chen HC (2013). Association of Dyslipidemia with Renal Outcomes in Chronic Kidney Disease. *PLoS ONE*, 8(2), e55643. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0055643>.

Cheng H, Qin Z, Hu X, Wu J (2012). Analysis of volatile compounds of propolis and poplar tree gum by SPME/DHS-GC-MS, *Shippin Anquan Zhiliang Jiance Xuebao*, 3(1), 1–9.

Christov R, Trusheva B, Popova M, Bankova V, Bertrand M (2006). Chemical composition of propolis from Canada, its antiradical activity and plant origin. *Nat. Prod. Res.* 20, 531–536



Cirasino L, Pisati A, Fasani F (1987). Contact dermatitis from propolis. *Contact Dermatitis*, 16, 110–111.

Cooper ME (2012). Diabetes: Treating diabetic nephropathy-still an unresolved issue. *Nat. Rev. Endocrinol.* 8, 515–516.

Dahal A y Mulukuri S (2015). Flavonoids in kidney protection. *World J Pharm. Pharmaceut. Sci.* 4(3), 362–382.

Deeds MC, Anderson JM, Armstrong AS, Gastineau DA, Hiddinga HJ, Jahangir A, Eberhardt NL, Kudva YC (2011). Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. *Lab. Anim.* 45(3), 131–140.

Durán-Salgado MB y Rubio-Guerra AF (2014). Diabetic nephropathy and inflammation. *World J Diabetes* 5(3), 393–398.

Elmarakby AA, Rafik A, Mozaffari MS (2010). Inflammatory cytokines as predictive markers for early detection and progression of diabetic nephropathy. *EPMA J* 1(1), 117–129.

El-Sayed AM (2018). The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals. <http://www.pherobase.com> [Consultado el 14 octubre de 2015].

English S, Greenaway W, Whatley FR (1991). Analysis of phenolics of *Populus trichocarpa* bud exudates by GC-MS. *Phytochemistry.* 30, 531–533.

ENSANUT. Informe Final de Resultados. http://promocion.salud.gob.mx/dgps/descargas1/doctos_2016/ensanut_mc_2016-310oct.pdf [consultado el 28 Noviembre 2017].

Ertugrul DT, Tatal E, Sezer S (2011). Diabetic Nephropathy; Clinical Characteristics and treatment Approaches, Capítulo 14 de Recent Advances in the Pathogenesis, Prevention and



Management of Type 2 Diabetes and its Complications. Intechopen, United Kingdom. A través de: <https://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-the-pathogenesis-prevention-and-management-of-type-2-diabetes-and-its-complications/diabetic-nephropathy-clinical-characteristics-and-treatment-approaches> [Consultado el 15 enero de 2017].

Escobedo-de la Peña J y Rico-Verdín B (1996). Incidencia y letalidad de las complicaciones agudas y crónicas de la diabetes mellitus en México. *Salud Pública Mex.* 38, 236–242.

Falçao SI, Tomas A, Vale N, Gomes P, Freire C, Vilas-Boas M (2013). Phenolic quantification and botanical origin of Portuguese propolis. *Ind. Crops Prod.* 49, 805–812.

Fallahzadeh MK, Dormanesh B, Sagheb MM, Roozbeh J, Vessal G, Pakfetrat M, Dabeshbod Y, Kamali-Sarvestani E, Lankarani KB (2012). Effect of addition of silymarin to renin-angiotensin system inhibitors on proteinuria in type 2 diabetic patients with overt nephropathy: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Am. J. Kidney Dis.* 60(6), 896–903.

Flores-Aldana (2007). Ficha Informativa de los Humedales de Ramsar (FIR). Secretaría de Recursos Naturales y Medio Ambiente. Gobierno del estado de Durango, México.

Fonseca RM (2006). Juniperus, la ginebra, el incienso, los lápices y los repelentes. *Ciencias* 81, 44–47.

Forbes JM, Fukami K, Cooper ME (2007). Diabetic Nephropathy: Where Hemodynamics Meets Metabolism. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 115(2), 69–84.

Freiría MJ, Alvarez A, Lorenzo RA, Racamonde FF, Rodríguez A (1998). Aplicaciones de la técnica denominada espacio de cabeza, *Revista Cubana de Química*, 10 (1-2), 32–53.

Fuliang HU, Hepburn HR, Xuan H, Chen M, Daya S, Radloff SE (2005). Effects of propolis on blood glucose, blood lipid and free radicals in rats with diabetes mellitus. *Pharmacol Res.* 51(2), 147–152.



Gèrard-Monnier D, Erdelmeier I, Régnard K, Moze-Henry N, Yadan JC, Chaudière J (1998). Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxynonenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 1176–1183.

Granados-Pineda J (2014). Composición química de los extractos etanólicos recolectados en Puebla y Guanajuato. Actividad antioxidante de los compuestos aislados. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, México.

Greenaway W, Scaysbrook T, Whatley FR (1989). Headspace volatiles from propolis. *Flavour Frag J.* 4, 173–175.

Greenaway W, Scaysbrook T, Whatley FR (1990). The composition of propolis: a report of work at Oxford : A Report of Work at Oxford. *Bee World* 71(3), 107–118.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M (2000). NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*, 86, 494–501.

Grintzalis K, Zisimopoulos D, Grune T, Weber D, Georgiou CD (2013). Method for the simultaneous determination of free/protein malondialdehyde and lipid/protein hydroperoxides. *Free Radic Biol. Med.* 59, 27–35.

Guzmán-Gutiérrez SL, Nieto-Camacho A, Castillo-Arellano JI, Huerta-Salazar E, Hernández-Pasteur G, Silva-Miranda M, Argüello-Nájera O, Sepúlveda-Robles O, Espitia CI, Reyes-Chilpa R (2018). Mexican propolis: A source of antioxidants and anti-Inflammatory compounds, and isolation of a novel chalcone and ϵ -caprolactone derivative. *Molecules* 23 (Suppl. 2), 334.

Habsah M, Abas F, Permana D, Lajis NH, Ali AM, Sukari MS, Taufiq YY, Kikuzaki H, Nakatani N (2004). DPPH Free radical scavenger components from the fruits of *Alpinia rafflesiana* Wall. ex. Bak (Zingiberaceae). *J Agric. Food Chem.* 54, 811–815.



Han Q, Zhu H, Chen X, Liu X (2017). Non-genetic mechanisms of diabetic nephropathy. *Front Med.* 11(3), 319–332.

Haneda M, Utsunomiya K, Koya D, Babazono T, Moriya T, Makino H, Kimura K, Suzuki Y, Wada T, Ogawa S (2015). A new classification of diabetic nephropathy 2014: a report from Joint Committee on Diabetic Nephropathy. *J Diabetes Invest.* 6, 242–246.

Havsteen BH (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.* 96, 67–202.

Hayta S y Bagci E (2014). Essential oil constituents of the leaves, bark and cones of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* L. from Turkey, *Acta Bota. Gallica* 161(2), 201–207.

Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship. *J Nutr Biochem.* 13, 572–584.

Hernández J, Goycoolea FM, Quintero J, Acosta A, Castaneda M, Dominguez Z, Robles R, Vazquez-Moreno L, Velazquez EF, Astiazaran H, Lugo E, Velazquez C (2007). Sonoran propolis: chemical composition and antiproliferative activity on cancer cell lines. *Planta Medica* 73, 1469–1474.

Hostetter TH, Rennke HG, Brenner BM (1982). The case of intrarenal hypertension in the initiation and progression of diabetic and other glomerulopathies. *Am. J. Med.* 72(3), 375–380.

Huang W, Gallois Y, Bouby N, Bruneval P, Heudes D, Belair MF, Krege JH, Meneton P, Marre M, Smithies O, Alhenc-Gelas F (2001). Genetically increased angiotensin I-converting enzyme level and renal complications in the diabetic mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98(23), 13330–13334.

Huang D, Ou B, Prior RL (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric. Food Chem.* 53, 1841–1856.



Huang S, Zhang C, Wang K, Li GQ, Hu F (2014). Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules* 19, 19610–19632.

iNaturalist Org. (2015). Observaciones dentro del Centro Ambiental Acuexcomatl. iNaturalist network. A través de: http://www.naturalista.mx/observations?place_id=any&project_id=centro-de-educacion-ambiental-acuexcomatl&subview=table&verifiable=any [Consultado el 11 de julio de 2017]

INEGI (2009). Anuario estadístico del estado de Zacatecas 2009/ Instituto Nacional de Estadística y Geografía, Gobierno del Estado de Zacatecas. México. [Consultado el 20 de agosto de 2017].

International Diabetes Federation: Complications of diabetes. Available from <http://www.idf.org/complications-diabetes>. [Consultado el 13 de junio de 2017].

Juárez-Reyes K, Brindis F1, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J, Bye R, Linares E, Mata R (2015). Hypoglycemic, antihyperglycemic, and antioxidant effects of the edible plant *Anoda cristata*. *J Ethnopharmacol* 161, 36–45.

Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* 2013; 3:1e150.

Kaskoniene V, Kaskonas P, Maruska A, Kubiliene L (2014). Chemometric analysis of volatiles of propolis from different regions using static headspace GC-MS, *Centr Eur J Chem.* 12(6), 736–746.

Khajehdehi P, Pakfetrat M, Javidnia K (2011). Oral supplementation of turmeric attenuates proteinuria, transforming growth factor-beta and interleukin-8 levels in patients with overt type 2



diabetic nephropathy: a randomized, double-blind and placebo-controlled study. *Scand. J Urol. Nephrol.* 45(5), 365–370.

Knowler WC y Kunzelman CL. Population comparisons of the frequency of diabetic nephropathy. In: Mongensen CE. ed. *The Kidney and hypertension in diabetes mellitus*. Boston: Mnjihoff, vol 6. 1988, Springer, Boston; pp 25–32.

Kozioł A, Stryjewska A, Librowski T, Sałat K, Gawel M, Moniczewski A, Lochyński S (2014). An overview of the pharmacological properties and potential applications of natural monoterpenes. *Mini Rev Med Chem* 14(14), 1156–1168.

Krolewski AS, Warram JH, Christlieb AR (1994). Hypercholesterolemia – a determinant of renal function loss and deaths in IDDM patients with nephropathy. *Kidney Int Suppl* 45, S125–131.

Kumar V, Abbas A, Aster JC. *Robbins Patología humana*, 9a edición 2013, ELSEVIER, 910 pp.

Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem.* 84, 329–339.

Lacava V, Pellicanò V, Ferrajolo C, Cernaro V, Visconti L, Conti G, Buemi M, Santoro D (2017). Novel avenues for treating diabetic nephropathy: new investigational drugs. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 26(4), 445–462.

Lai PB, Zhang L, Yang LY (2012). Quercetin Ameliorates Diabetic Nephropathy by Reducing the Expressions of Transforming Growth Factor- β 1 and Connective Tissue Growth Factor in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Ren. Fail.* 34(1), 83–87.

Lee HJ, Lee EO, Ko SG, Bae HS, Kim CH, Ahn KS, Lu J, Kim SH (2008). Mitochondria-cytochrome C-caspase-9 cascade mediates isorhamnetin-induced apoptosis. *Cancer Lett.* 270(2), 342–353.



Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR (2001). Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N Eng. J Med.* 345, 851–60.

Li M, Zhang J, Zhao D, Liu X, Wang H (2005). Theoretical study on 5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavanone. *Huaxue Wuli Xuebao* 18(6), 925–930.

Lim AKH (2014). Diabetic nephropathy-complications and treatment. *Int. J Nephrol. Renovasc. Dis.* 7, 361–381.

Lim AKH y Tesch GH (2012). Inflammation in diabetic nephropathy. *Mediators of Inflammation*, vol. 2012, Article ID 146154, 12 pages.

Lima B, Tapia A, Luna L, Fabani MP, Schmeda-Hirschmann G, Podio NS, Wunderlin DA, Feresin GE (2009). Main flavonoids, DPPH activity, and metal content allow determination of the geographical origin of propolis from the Province of San Juan (Argentina). *J Agric. Food Chem.* 57 (Suppl. 7), 2691– 2698.

Linstrom PJ, Mallard WG. (2011). NIST chemistry WebBook [Internet]. Gaithersburg: NIST Standard Reference Database Number 69, National Institute of Standards and Technology; A través de: [http:// webbook.nist.gov](http://webbook.nist.gov) [Consultado el 8 de octubre de 2014]

Liu R, Wu CX, Zhou D, Yang F, Tian S, Zhang L, Zhang TT, Du GH (2012). Pinocembrin protects against β -amyloid-induced toxicity in neurons through inhibiting receptor for advanced glycation end products (RAGE)-independent signaling pathways and regulating mitochondrion-mediated apoptosis. *BMC Med.* 2012 Sep 18;10:105. doi: 10.1186/1741-7015-10-105.

Locatelli F, Alberti D, Graziani G, Buccianti G, Redaelli B, Giangrande A (1992). Factors affecting chronic renal failure progression: results from a multicentre trial. The Northern Italian Cooperative Study Group. *Miner. Electrolyte Metab.* 18, 295–302.



Lotti C, Campo Fernandez M, Piccinelli AL, Cuesta-Rubio O, Márquez-Hernández I, Rastrelli L (2010). Chemical constituents of red Mexican propolis. *J Agric. Food Chem.* 58(4), 2209–2213.

Mahfouz M, Assiri AM, Mukhtar MH (2016). Assessment of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) and Retinol-Binding Protein 4 (RBP4) in Type 2 Diabetic Patients with Nephropathy. *Biomark. Insights.* 11, 31–40.

Markham KR, Mitchel KA, Wilkins AL, Daldy JA, Lu Y (1996). HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. *Phytochemistry* 42, 205–211.

Mayo Clinic. Diseases and Conditions: Diabetes. A través de: <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/diabetes/basics/complications/con-20033091>.

[Consultado el 13 de junio 2017]

Melliou E, Stratis E, Chinou I (2007). Volatile constituents of propolis from various regions of Greece – antimicrobial activity, *Food Chem.* 103, 375–380.

Messeri S, Messerini L, Vizzutti F, Laffi G, Marra F (2012). Glycogenic hepatopathy associated with type 1 diabetes mellitus as a cause of recurrent liver damage. *Ann. Hepatopathol.* 11 (4), 554–558.

Mogensen CE (1984). Microalbuminuria predicts clinical proteinuria and early mortality in maturity onset diabetes. *N Engl. J Med.* 310, 356–360.

Mukherjee PK (2005). Extraction of herbal drugs. *Quality Control of Herbal Drugs*. 1st Edition, Business Horizons. New Delhi, pp. 379–425.

Muthuppalaniappan VM, Sheaff M, Yaqoob MM (2015). Diabetic Nephropathy. *Medicine* 43(9), 520–525.



Nagy M, Suchy V, Uhrín D, Ubik K, Budesinsky M, Grancai D (1988). Constituents of propolis of Czechoslovak origin V. *Chem. Pap.* 42, 691–696.

Neumann KH, Kellner C, Kühn K, Stolte H, Schurek HJ (2004). Age-dependent thickening of glomerular basement membrane has no major effect on glomerular hydraulic conductivity. *Nephrol. Dial. Transplant.* 19, 805–811.

Ni WJ, Tang LQ, Zhou H, Ding HH, Qiu YY (2016). Renoprotective effect of berberine via regulating the PGE 2-EP1-Gαq-Ca²⁺ signalling pathway in glomerular mesangial cells of diabetic rats. *J Cell. Mol. Med.* 20(8), 1491–1502.

Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010 Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus. A través de: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5168074&fecha=23/11/2010 [Consultado el 17 Febrero de 2014].

Norma Oficial Mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017 Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento. A través de: <https://normateca.sagarpa.gob.mx/tipo/norma-oficial-mexicana-nom> [Consultada el 21 de marzo de 2018].

OMS (1998). Situación reglamentaria de los medicamentos herbarios, Una reseña Mundial. A través de: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jwhozip58s/> [Consultado el 17 Febrero, 2014]

OMS (2013). WHO traditional medicine strategy: 2014–2023. WHO Press, World Health Organization, Geneva.

OMS (2014). A través de: <http://www.who.int/features/factfiles/diabetes/es/index.html> [Consultado el 17 Febrero de 2014]



Orsolíc N, Sirovina D, Končić MZ, Lacković G, Gregorović G (2012). Effect of Croatian propolis on diabetic nephropathy and liver toxicity in mice. *BMC Complement. Altern. Med.* 12(1), 117.

Papadopoulou-Marketou N, Chrousos GP, Kanaka-Gantenbein C (2017). Diabetic nephropathy in type 1 diabetes: a review of early natural history, pathogenesis, and diagnosis. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 33, e2841-n/a.

Patel DN y Kalia K (2015). Efficacy of urinary *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase to evaluate early renal tubular damage as a consequence of type 2 diabetes mellitus: a cross-sectional study. *Int. J Diabetes Dev. Ctries.* 35 (Suppl 3), S449–S457.

Pellati F, Prencipe F, Benvenuti S (2013). Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry characterization of propolis volatile compounds. *J Pharm. Biomed. Anal.* 84, 103–111.

Petri G, Lemberković E, Foldvari F. Examination of differences between propolis (bee glue) produced from different flora environment, in: B.M. Lawrence, B.D. Mookherjee, B.J. Willis (Eds.), *Flavors and Fragrances: A World Perspective*, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1988, pp. 439–446.

Piccinelli AL, De Simone F, Passi S, Rastrelli L (2004). Phenolic constituents and antioxidant activity of *Wendita calysina* Leaves (Burríto), a Folk Paraguayan Tea. *J Agric. Food Chem.* 52(19), 5863–5868.

Pino JA, Marbot R, Delgado A, Zumarraga C, Sauri E (2006). Volatile constituents of propolis from honey bees and stingless bees from Yucatan, *JEOR* 18(1), 53–56.

Promsan S, Jaikumkao K, Pongchaidecha A, Chattipakorn N, Chatsudthipong V, Arjinajarn P, Pompimon W, Lungkaphin A (2016). Pinocembrin attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Can. J Physiol. Pharmacol.* 94(8), 808–818.



Rauter AP, Martins A, Borges C, Mota-Filipe H, Pinto R, Sepodes B, Justino J (2010). Antihyperglycaemic and protective effects of flavonoids on streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytother. Res.* 24, S133–S138.

Raptis AE y Viberti G (2001). Pathogenesis of diabetic nephropathy. *Diabetes* 109 (Suppl 2), S424–S437.

Rivera-Yáñez N, Rodríguez-Canales M, Nieto-Yáñez O, Jiménez-Estrada M, Ibarra-Barajas M, Canales-Martínez MM, Rodríguez-Monroy MA (2018). Hypoglycaemic and antioxidant effects of propolis of Chihuahua in a model of experimental diabetes. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2018, 4360356.

Rosas-Guzmán J, García-Rubí E, Gómez-Pérez FJ, Calles J (2009). Prevención, diagnóstico y tratamiento temprano de la Nefropatía Diabética. *Revista ALAD*, 17(3), 106–114.

Rudberg S, Rasmussen LM, Bangstad HJ, Osterby R (2000). Influence of insertion/deletion polymorphism in the ACE-I gene on the progression of diabetic glomerulopathy in type 1 diabetic patients with microalbuminuria. *Diabetes Care* 23(4), 544–548.

Saad MA, Abdel Salam RM, Kenawy SA, Attia AS (2015). Pinocembrin attenuates hippocampal inflammation, oxidative perturbations and apoptosis in a rat model of global cerebral ischemia reperfusion. *Pharmacol. Rep.* 67(1), 115–122.

SAGARPA (2010). Situación actual y perspectiva de la apicultura en México, *Claridades Agropecuarias*, 199, 33–39.

Salatino A, Fernandes-Silva CC, Righi AA, Salatino MLF (2011). Propolis research and the chemistry of plant products. *Nat. Prod. Rep.* 28, 925–936.



Salvamani S, Gunasekaran B, Shaharuddin NA, Ahmad SA, Shukor MY (2014). Antiatherosclerotic effects of plant flavonoids. *Biomed Res Int.* 2014:480258.

Sameni HR, Ramhormozi P, Bandegi AR, Taherian AA, Mirmohammadkhani M, Safari M (2016). Effects of ethanol extract of propolis on histopathological changes and anti-oxidant defense of kidney in rat model for type 1 diabetes mellitus. *J Diabetes Investig.* 7(4), 506–513.

Satirapoj B y Adler SG (2014). Comprehensive approach to diabetic nephropathy. *Kidney Res Clin. Pract.* 33, 121–131.

Secretaría de Desarrollo Rural del Estado de Chihuahua (2015). Cartografía de Uso de Suelo y Vegetación del Estado de Chihuahua Escala 1:50,000. Secretaría de Desarrollo Rural del Estado de Chihuahua Dirección de Desarrollo Forestal. Gobierno del Estado de Chihuahua. México. A través de: http://www.cnf.gob.mx:8090/snif/seif_chihuahua/cartografia/uso-de-suelo-y-vegetacion [Consultado el 17 Agosto de 2017]

Shin D, Kinoshita K, Koyama K, Takahashi K (2002). Antiemetic principles of *Alpinia officinarum*. *J Nat. Prod.* 65(9), 1315–1318.

Silici S y Katluca S (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region, *J Ethnopharmacol.* 99, 69–73.

Simionatto E, Facco JT, Morel AF, Giacomelli SR, Linares CEB (2012). Chiral analysis of monoterpenes in volatile oils from propolis. *J Chil. Chem. Soc.* 57(3), 1240–1243.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299, 152–178.



Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150(1), 76–85.

Strippoli GF, Craig MC, Schena FP (2006). Role of blood pressure targets and specific antihypertensive agents used to prevent diabetic nephropathy and delay its progression. *J Am. Soc. Nephrol.* 17, S153–155.

Szkudelski T (2001). The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiol. Res.* 50, 536–546.

Tan JB y Lim YY (2015). Critical analysis of current methods for assessing the in vitro antioxidant and antibacterial activity of plant extracts. *Food Chem.* 172, 814–822.

Tang Y, Zhang Y, Yuan J, Na Y (2011). Isolation and identification of chemical constituents from pine pollen. *Shenyang Yaoke Darve Xuebao*, 28(6), 429–432.

Tang ZH, Zeng F, Zhang XZ (2015). Human genetics of diabetic nephropathy. *Ren. Fail.* 37(3), 363–371.

Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Hawkins Byrne D (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Food Compost. Anal.* 19 (Suppl. 6–7), 669–675.

Toreti V, Sato HH, Pastore GM, Park YK (2013). Recent progress in propolis research. *Evidence-Based Complem. Altern. Med.* Vol. 2013, ID de artículo 697390.

Torres-González A, López-Rivera P, Duarte-Lisci G, López-Ramírez A, Correa-Benitez A, Rivero-Cruz JF 2016. Analysis of volatile components from *Melipona beecheii* geopropolis from Southeast Mexico by headspace solid-phase microextraction. *Nat. Prod. Res.* 30(2), 237–240.



Torres-Viloria A y Zacarías-Castillo R (2002). Nefropatía diabética. *Revista del Hospital General Dr. M Gea González*, 5, 24–32.

Torto B, Carroll MJ, Duehl A, Fombong AT, Gozansky KT, Nazzi F, Teal PEA (2013). Standard methods for chemical ecology research in *Apis mellifera*. In V. Dietemann, J. D. Ellis & P. Neumann (Eds.), *The COLOSS BEE-BOOK, Volume I: Standard methods for *Apis mellifera* research*. *J Apic Res.* 52(4), 1–34.

Tsai SJ, Huang CS, Mong MC, Kam WY, Huang HY, Yin MC. (2011) Anti-inflammatory and antifibrotic effects of naringenin in diabetic mice. *Agric.Food Chem.* 60, 514–521.

Tsilibary EC (2003). Microvascular basement membranes in diabetes mellitus. *J Pathol.* 200, 537–546.

Vaidya VS, Ferguson MA, Bonventre JV (2008). Biomarkers of acute kidney injury, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48, 463–493.

Valencia D, Alday E, Robles-Zepeda R, Garibay-Escobar A, Galvez-Ruiz JC, Salas-Reyes M, Jimenez-Estrada M, Velazquez-Contreras E, Henandez J, Velazquez C (2012). Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chem.* 131, 645–651.

Vessal G, Akmalı M, Najafi P, Moein MR, Sagheb MM (2010). Silymarin and milk thistle extract may prevent the progression of diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Ren. Fail.* 32(6), 733–739.

Volpi N y Bergonzini G (2006). Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. *J Pharm. Biomed. Anal.* 42, 354–361.

Wang W, Wu N, Zu YG, Fu YJ (2008). Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food Chem.* 108 (Suppl. 3), 1019–1022.



Welsh GI, Hale LJ, Eremina V, Jeansson M, Maezawa Y, Lennon R, Pons DA, Owen RJ, Satchell SC, Miles MJ, Caunt CJ, McArdle CA, Pavenstädt H, Tavaré JM, Herzenberg AM, Kahn CR, Mathieson PW, Quaggin SE, Saleem MA, Coward RJ (2010). Insulin signaling to the glomerular podocyte is critical for normal kidney function. *Cell. Metab.* 12(4), 329–340.

Wollenweber E (1975). Flavonoidmuster im Knospensexkret der Betulaceen. *Biochem System Ecol.* 3, 47–52.

Wu KK y Huan Y (2008). Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 40, 5.47.1–5.47.14.

Xu Y, Luo L, Chen B, Fu Y (2009). Recent developments of chemical components in propolis, *Front. Biol. China* 4, 385–391.

Zarco-Espinosa GL (2012). Estudio químico y biológico de propóleos de la zona del altiplano. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, México.

Zhao R, Li QW, Li J, Zhang T (2009). Protective effect of Lycium barbarum polysaccharide 4 on kidneys in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Physiol. Pharmacol.* 87, 711–719.

Zheng Z y Zheng F (2016). Immune Cells and Inflammation in Diabetic Nephropathy, *J Diabetes Res.* 2016, Article ID 1841690, 10 pages.

Zvieli M y Li M (2013). Ocimene – a versatile floral ingredient. *Perfumer & Flavorist* 38 (1), 42–44.



ANEXO

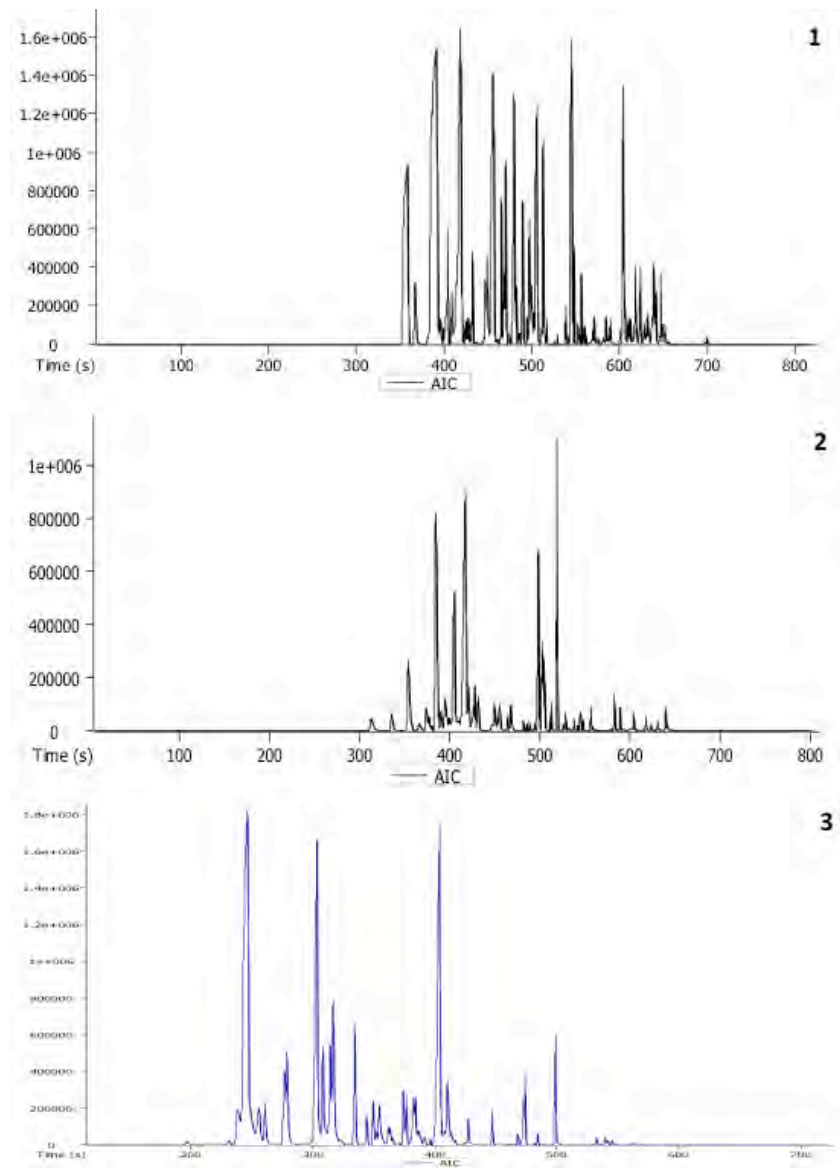


Figura A1. Cromatogramas de la corriente iónica total (TIC) de las muestras de propóleo estudiadas. 1) propóleo recolectado en Zacatecas 2) propóleo recolectado en Durango 3) propóleo recolectado en CDMX.



Cuadro A1. Compuestos volátiles identificados mediante la técnica de HS-SPME/GC-MS-TOF en las muestras de propóleo de Zacatecas.

Pico	Compuesto	TR (s)	IRe ^I	IRt ^I	%Área	Método identificación ^{II}
1	α -pineno	941.51	939	941.51	9.36	a,b,c
2	canfeno	953.47	954	953.47	1.9473	a,b,c
3	mirceneno	989.22	990	989.22	14.316	a,b,c
4	2-metilpropanoato de hexilo	994.24	nd	994.24	0.023832	c
5	mesitileno	995.42	995	995.42	0.1794	a,b,c
6	butanoato de butilo	996.68	994	996.68	0.1794	a,b,c
7	<i>n</i> -octanal	1002.5	998	1002.5	0.17382	a,b,c
8	δ -3-careno	1011.1	1011	1011.1	1.2428	a,b,c
9	α -terpineno	1020	1017	1020	0.43738	a,b,c
10	heptanoato de metilo	1026.7	1025	1026.7	0.10697	a,b,c
11	<i>o</i> -cimeno	1030.8	1026	1030.8	2.075	a,b,c
12	(<i>Z</i>)- β -ocimeno	1039.1	1037	1039.1	7.2286	a,b,c
13	(<i>E</i>)- β -ocimeno	1049.5	1050	1049.5	0.13477	a,b,c
14	1,3-dietilbenceno	1052.7	1055.2	1052.7	0.53326	a,b,c
15	γ -terpineno	1055.6	1059	1064.7	0.84869	a,b,c
16	terpinoleno	1061.9	1088	1093.4	0.57109	a,b,c
17	2-metilundec-10-enal	1064.7	nd	1095.3	1.0736	c
18	6,7-epoximirceneno	1093.4	1092	1097.1	1.0765	a,b,c
19	2,5-dimetilestireno	1095.3	1099	1098.1	1.0802	a,b,c
20	β -citral	1097.1	1103	1105.5	0.49723	a,b,c
21	nonanal	1098.1	1108	1112	0.97138	a,b,c
22	caprilato de metilo	1105.5	1127	1127.7	0.7074	a,b,c
23	pentilciclohexano	1112	1130.2	1128.4	0.7074	a,b,c
24	1-terpineol	1127.7	1133	1132	1.2746	a,b,c
25	<i>cis-p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	1128.4	1137	1137.6	1.4559	a,b,c



Cuadro A1. Compuestos volátiles identificados mediante la técnica de HS-SPME/GC-MS-TOF en las muestras de propóleo de Zacatecas (Continuación).

Pico	Compuesto	TR (s)	IRe ^I	IRt ^{II}	%Área	Método identificación ^{III}
26	aloocimeno	1132	1146	1144	0.092311	a,b,c
27	karahanaenona	1137.6	1155.4	1155	2.3488	a,b,c
28	óxido de nerol	1146	1156.5	1158	2.3488	a,b,c
29	<i>trans</i> -pinocanfona	1155.4	1160.4	1160	0.33287	a,b,c
30	2,4-dimetil-3-hexeno	1156.5	1172	nd	1.6226	c
31	6- <i>cis</i> -nonen-1-ol	1160.4	1172.8	1171	1.6226	a,b,c
32	umbelulona	1172	1174.2	1171	1.6226	a,b,c
33	4-etil-2-hexinal	1172.8	1182.9	nd	0.14243	c
34	<i>neo-iso</i> -verbanol	1174.2	1189.5	1189	1.1375	a,b,c
35	2,6-dimetil-3,7-octadien-2,6-diol	1182.9	1191.4	1191	1.1375	a,b,c
36	mirtenol	1189.5	1194.2	1191	0.57957	a,b,c
37	2-acetoxi-1-[(acetiloxi)metil]etil ester del ácido (Z,Z)-9,12-octadecadienoico	1191.4	1195	nd	0.57604	c
38	butanoato de hexilo	1194.2	1195.5	1192	0.57957	a,b,c
39	<i>trans</i> -4-caranona	1195	1198.3	1196	0.23061	a,b,c
40	shisofurano	1195.5	1203.7	1198	3.8707	a,b,c
41	<i>trans</i> -piperitol	1198.3	1204.4	1205	3.877	a,b,c
42	verbenona	1203.7	1206.1	1205	3.877	a,b,c
43	2-hidroxi-1,8-cineol	1204.4	1222.9	1219	3.1672	a,b,c
44	metiltimol	1206.1	1232.5	1235	0.207107	a,b,c
45	<i>D</i> -carvona	1222.9	1253.3	1254	0.070842	a,b,c
46	2-metil-7-exo-vinilbicyclo[4.2.0]oct-1(2)-eno	1226.9	1260.3	nd	0.11897	c
47	dihidrometilcinamato	1232.5	1281.7	1280	0.33524	a,b,c
48	cuminol	1242.8	1288	1287	0.16144	a,b,c
49	heptanoato de butilo	1253.3	1295.8	1290	3.1563	a,b,c
50	acetato de mentilo	1260.3	1296.7	1295	3.1563	a,b,c
51	anetol	1281.7	1297.5	1284	3.1563	a,b,c



Cuadro A1. Compuestos volátiles identificados mediante la técnica de HS-SPME/GC-MS-TOF en las muestras de propóleo de Zacatecas (Continuación).

Pico	Compuesto	TR (s)	IRe ^I	IRt ^{II}	%Área	Método identificación ^{III}
52	acetato de <i>cis</i> -pinocarveol	1288	1304.7	1305	0.80901	a,b,c
53	acetato de terpenilo	1295.8	1352.9	1349	0.2222	a,b,c
54	α -longipineno	1296.7	1357.2	1352	0.33606	a,b,c
55	tricyclo[4.4.1.0 ^(1,6)]undecano	1297.5	1367.4	nd	0.18647	c
56	β -cubebeno	1304.7	1387.7	1388	0.25032	a,b,c
57	(-)- <i>cis</i> -mirtanol	1314.9	1391.7	nd	0.16617	c
58	metileugenol	1323.8	1399.3	1401	0.47966	a,b,c
59	β -humuleno	1352.9	1438.8	1439	2.606	a,b,c
60	vestitenona	1357.2	1444.3	1443	0.24759	a,b,c
61	1-metil-4-(1-metilpropil)benceno	1367.4	1452.5	nd	0.33568	c
62	α -humuleno	1387.7	1454.1	1454	0.77676	a,b,c
63	γ -gurjuneno	1391.7	1474	1473	0.67619	a,b,c
64	γ -curcumeno	1399.3	1478.6	1479	0.069621	a,b,c
65	α -curcumeno	1438.8	1489.1	1486	0.49207	a,b,c
66	2,2,9,9-tetrametildec-5-en-3,7-diino	1444.3	1501	nd	0.34233	c
67	nd	1452.5	1510.7	nd	0.41792	c
68	tridecanoato de metilo	1454.1	1522.1	nd	0.63836	c
69	3-propiloctahidro-1 <i>H</i> -isocromeno	1459.7	1524.3	nd	0.23202	c
70	δ -cadineno	1474	1530.2	1526	1.4756	a,b,c
71	α -yoneno	1478.6	1535.4	nd	0.52082	c
72	α -agorofurano	1489.1	1550.1	1550	0.42256	a,b,c
73	β -calacoreno	1501	1555.6	1555	0.16611	a,b,c
74	2,6- <i>bis</i> (1,1-dimetiletil)-4-etilfenol	1510.7	1557.3	nd	0.16611	c
75	<i>trans</i> - β -nerolidol	1522.1	1563.3	1563	0.12719	a,b,c
76	pentadecano	1524.3	1699	nd	0.10869	c

nd: compuesto no identificado. I: índice de retención de Kovats experimental en columna DB-5. II: índice de retención de Kovats teórico en columna DB-5. III: Compuesto identificado por: a-tiempo de retención, b-índice de retención, c-espectros de masas.



Cuadro A2. Compuestos volátiles identificados mediante la técnica de HS-SPME/GC-MS-TOF en las muestras de propóleo de Durango.

Pico	Nombre	TR (s)	IRE ^I	IRt ^{II}	%Área	Método identificación ^{III}
1	α -tujeno	354.294	934.34	930	1.9457	a,b,c
2	benzaldehído	377.544	968.69	960	1.2489	a,b,c
3	β -pineno	384.494	978.95	979	3.8033	a,b,c
4	6-metil-5-hepten-2-ona	387.744	983.75	985	0.57752	a,b,c
5	butanoato de butilo	394.444	993.65	994	4.2727	a,b,c
6	hexanoato de etilo	395.944	995.86	998	3.7387	a,b,c
7	acetato de hexilo	405.894	1013.7	1009	9.75066	a,b,c
8	<i>o</i> -cimeno	414.844	1030.8	1026	0.53628	a,b,c
9	<i>cis</i> -ocimeno	417.994	1036.9	1037	12.741	a,b,c
10	acetato de 2-heptilo	421.094	1042.8	1043	1.0039	a,b,c
11	1,3-dietilbenceno	425.944	1052.1	1055.2	2.56532	a,b,c
12	bergamal	428.544	1057.1	1056	1.7525	a,b,c
13	<i>m</i> -xileno	432.044	1063.8	1058.2	1.1191	a,b,c
14	guayacol	446.744	1091.9	1089	0.57332	a,b,c
15	heptanoato de etilo	449.594	1097.4	1098	2.6369	a,b,c
16	2,5-dimetilestireno	449.894	1097.9	1091	2.635	a,b,c
17	propanoato de hexilo	454.994	1107.7	1101	2.3537	a,b,c
18	<i>n</i> -nonanal	456.144	1109.9	1100	2.3537	a,b,c
19	alcohol fenético	462.494	1122.1	1122	0.50492	a,b,c
20	octanoato de metilo	464.644	1126.2	1127	0.33831	a,b,c
21	ocimeno	467.694	1132	1132	4.0513	a,b,c
22	aloocimeno	474.244	1144.6	1144	0.24878	a,b,c
23	2,4-octadienal	476.644	1149.2	1125	0.13842	a,b,c
24	tagetona	478.344	1152.4	1152	0.44228	a,b,c
25	karahanaenona	481.594	1158.6	1159	0.76726	a,b,c



Cuadro A2. Compuestos volátiles identificados mediante la técnica de HS-SPME/GC-MS-TOF en las muestras de propóleo de Durango (Continuación).

Pico	Nombre	TR (s)	IRe ^I	IRt ^{II}	%Área	Método identificación ^{III}
26	umbelulona	488.494	1171.9	1171	0.3345	a,b,c
27	benzoato de etilo	490.344	1175.4	1173	0.36473	a,b,c
28	1,2,3-trimetilciclopenteno	494.194	1182.8	nd	0.5193	c
29	<i>n</i> -hexanoato de butilo	498.544	1191.1	1188	7.1967	a,b,c
30	butanoato de hexilo	499.094	1192.1	1192	7.1967	a,b,c
31	salicilato de metilo	502.894	1199.4	1191	2.9013	a,b,c
32	γ -terpineol	504.744	1203.6	1199	4.07	a,b,c
33	acetato de octilo	512.594	1221.7	1213	0.62038	a,b,c
34	2-metilbutanoato de <i>n</i> -hexilo	518.944	1236.3	1236	3.0781	a,b,c
35	acetato de 2-feniletilo	528.694	1258.8	1258	0.57522	a,b,c
36	perilaldehído	537.594	1279.3	1271	0.41033	a,b,c
37	hexanoato de pentilo	541.744	1288.9	1288	0.21327	a,b,c
38	heptanoato de butilo	544.344	1294.9	1290	3.8463	a,b,c
39	tridecanoato de metilo	556.644	1323.2	nd	0.35017	c
40	hexanoato de hexilo	582.694	1383.3	1383	1.589	a,b,c
41	decanoato de etilo	583.344	1384.8	1381	1.589	a,b,c
42	undecanoato de etilo	585.994	1390.9	nd	0.15309	c
43	hexadecano	588.944	1397.7	nd	0.45754	c
44	α -curcumeno	623.594	1488.1	1486	0.27984	a,b,c
45	α -farneseno	630.394	1506	1505	0.65944	a,b,c
46	5,6,7,8-tetrametil-1,2,3,4-tetrahidro-naftaleno	639.594	1530.1	nd	0.5209	c
47	calameneno	641.244	1534.4	1526	0.14022	a,b,c
48	hexadecano	664.844	1596.2	1600	0.18646	a,b,c
49	α -bisabolol	698.694	1695.3	1685	0.55764	a,b,c

nd: compuesto no identificado. I: índice de retención de Kovats experimental en columna DB-5. II: índice de retención de Kovats teórico en columna DB-5. III: Compuesto identificado por: a-tiempo de retención, b-índice de retención, c-espectros de masas.



Cuadro A3. Compuestos volátiles identificados mediante la técnica de HS-SPME/GC-MS-TOF en las muestras de propóleo de la CDMX.

Pico #	Nombre	TR (s)	IRe ^I	IRt ^{II}	%Área	Método identificación ^{III}
1	ácido acético	51.128	752.6	645	0.14615	a,b,c
2	propanoato de etilo	57.928	759.1	726	1.0327	a,b,c
3	butanoato de etilo	103.328	802.4	801	2.4562	a,b,c
4	heptanal	215.278	910.8	907	0.62833	a,b,c
5	α -tujeno	234.078	931.9	931	1.5595	a,b,c
6	α -pineno	239.328	937.9	939	5.7427	a,b,c
7	benzaldehído	269.478	971.9	971	3.8178	a,b,c
8	verbeneno	272.328	975.1	972	5.6437	a,b,c
9	sabineno	273.378	975.0	976	5.5411	a,b,c
10	hexanoato de etilo	296.828	1004.4	1005	1.6137	a,b,c
11	1-metilpropilbenceno	297.678	1006.0	1006	1.5749	a,b,c
12	3-careno	298.528	1007.5	1007	3.2224	a,b,c
13	octanal	299.678	1009.7	1009	3.1953	a,b,c
14	α -terpineno	305.528	1020.4	1018	1.4389	a,b,c
15	<i>o</i> -cimeno	311.328	1031.1	1027	3.0256	a,b,c
16	1,2-diisopropenilciclobutano	313.428	1035.0	nd	2.3313	c
17	2-etil-1-hexanol	318.028	1043.5	1030	0.14897	a,b,c
18	salicilaldehído	325.628	1057.5	1057	3.5341	a,b,c
19	α -felandreno	331.528	1068.4	1005	1.9317	a,b,c
20	<i>cis</i> - α -terpineol	340.078	1084.2	1183	0.77543	a,b,c
21	terpinoleno	346.778	1096.6	1089	0.29219	a,b,c
22	deshidro- <i>p</i> -cimeno	350.878	1104.1	1095	0.65858	a,b,c
23	heptanoato de etilo	355.328	1112.3	1107	1.4777	a,b,c
24	nonanal	360.678	1122.2	1109	9.5264	a,b,c
25	alcohol feniletílico	367.728	1135.2	1120	0.8731	a,b,c



Cuadro A3. Compuestos volátiles identificados mediante la técnica de HS-SPME/GC-MS-TOF en las muestras de propóleo de CDMX (continuación).

Pico #	Nombre	TR (s)	IRe ^I	IRt ^{II}	%Área	Método identificación ^{III}
27	L- <i>trans</i> -pinocarveol	370.628	1140.6	1139	1.97123	a,b,c
29	borneol	380.778	1159.3	1165	2.3876	a,b,c
30	umbelulona	388.428	1173.4	1171	0.75342	a,b,c
31	(4 <i>E</i>)-2,3-dimetil-1,4-hexadieno	395.478	1186.4	nd	1.0496	c
32	2-metoxi-1-propanol	396.378	1188.1	nd	1.0394	c
33	4-terpinenol	398.928	1192.8	1188	4.3961	a,b,c
34	p-cimen-8-ol	400.778	1196.2	1183	0.18748	a,b,c
35	4-metilguaiacol	403.428	1201.3	1195	0.17383	a,b,c
36	p-cimen-9-ol	403.978	1202.6	1205	2.5133	a,b,c
37	octanonato de etilo	405.078	1205.2	1205	2.5133	a,b,c
38	<i>trans</i> -piperitol	406.878	1209.3	1208	1.0848	a,b,c
39	decanal	410.328	1217.3	1211	3.0678	a,b,c
40	<i>cis</i> -verbenona	412.428	1222.2	1218	0.67144	a,b,c
41	<i>o</i> -metiltimol	423.928	1248.8	1244	0.16031	a,b,c
42	acetato de L-bornilo	443.978	1295.2	1291	0.69847	a,b,c
43	acetato de nonilo	448.828	1306.4	1302	4.2944	a,b,c
44	nd	456.878	1325.0	nd	0.62773	c
45	α -cubebeno	469.728	1354.7	1351	0.78798	a,b,c
46	acetato de terpinilo	470.128	1355.7	1354	0.78798	a,b,c
47	β -burboneno	481.578	1382.1	1380	0.35725	a,b,c
48	decanoato de etilo	489.228	1399.8	1397	0.61916	a,b,c
49	β -cariofileno	495.828	1417.5	1418	1.1662	a,b,c
50	aromadendreno	498.278	1424.1	1420	0.3902	a,b,c
51	L-calameneno	538.328	1531.4	1516	0.20872	a,b,c
52	4-propil-1,6-heptadien-4-ol	560.978	1592.0	nd	0.13266	c



Cuadro A3. Compuestos volátiles identificados mediante la técnica de HS-SPME/GC-MS-TOF en las muestras de propóleo de CDMX (continuación).

Pico #	Nombre	TR (s)	IRe ^I	IRt ^{II}	%Área	Método identificación ^{III}
53	zingiberenol II	571.428	1623.6	1626	0.88382	a,b,c
54	himachalol	578.778	1646.8	1647	0.45465	a,b,c
55	salicilato de <i>n</i> -hexilo	587.628	1674.8	1675	0.94325	a,b,c
56	3,4,15-trimetilheptadecano	663.328	1919.2	1922	0.56192	a,b,c
57	pentadecanoato de etilo	691.278	2012.8	nd	0.21992	c
58	8,13-epoxilabd-14-eno	693.378	2020.4	nd	0.32454	c
59	palmitato de isopropilo	699.728	2043.4	nd	0.4693	c
60	eicosano	721.378	2121.7	nd	0.87289	c

nd: compuesto no identificado. I: índice de retención de Kovats experimental en columna DB-5. II: índice de retención de Kovats teórico en columna DB-5. III: Compuesto identificado por: a-tiempo de retención, b-índice de retención, c-espectros de masas.



Cuadro A4. RMN-¹H de los compuestos aislados de las muestras de propóleo.

¹ H	Pinocembrina (C01) (MeOH- <i>d</i> ₄) ^a	5- <i>O</i> - metilpinobanksina (C02) (DMSO- <i>d</i> ₆)	Alpinetina (C03) (DMSO- <i>d</i> ₆) ^a	Isoramnetina (C04) (DMSO- <i>d</i> ₆) ^a	Pinobanksina (C05) (acetona- <i>d</i> ₆) ^a	Crisina (C06) (DMSO- <i>d</i> ₆) ^a	2',4',6'- trihidroxichalcona (C07) (acetona- <i>d</i> ₆) ^a
α	-	-	-	-	-	-	5.90 (1H, d, <i>J</i> =12.0 Hz)
β	-	-	-	-	-	-	5.55 (1H, d, <i>J</i> =12.0 Hz)
2	5.45 (1H, dd, <i>J</i> =16.0, 4.0)	4.32 (1H, d, <i>J</i> =12.0 Hz)	5.46 (1H, dd, <i>J</i> =16.0, 4.0 Hz)	-	4.68 (1H, d, <i>J</i> =12.0 Hz)	-	-
3	3a 2.76 (1H, dd, <i>J</i> =4.0, 16.0 Hz) 3b 3.09 (1H, dd, <i>J</i> =16.0, 12.0 Hz)	5.28 (1H, d, <i>J</i> =12.0 Hz)	3a 2.60 (1H, dd, <i>J</i> =4.0, 16.0 Hz) 3b 2.97 (1H, dd, <i>J</i> =16.0, 12.0 Hz)	-	5.18 (1H, d, <i>J</i> =12.0 Hz)	6.98 (1H, s)	-
6	5.93 (1H, d, <i>J</i> =4.0 Hz)	5.94 (1H, d, <i>J</i> =2.0 Hz)	5.93 (1H, d, <i>J</i> =2.0 Hz)	6.17 (1H, d, <i>J</i> =2.0 Hz)	5.98 (1H, s, <i>J</i> =2.0 Hz)	6.20 (1H, d, <i>J</i> =2.0 Hz)	-
8	5.90 (1H, d, <i>J</i> =4.0 Hz)	6.05 (1H, d, <i>J</i> =2.0 Hz)	5.98 (1H, d, <i>J</i> =2.0 Hz)	6.45 (1H, d, <i>J</i> =2.0 Hz)	6.01 (1H, s, <i>J</i> =2.0 Hz)	6.52 (1H, d, <i>J</i> =2.0 Hz)	-
2, 6	-	-	-	-	-	-	7.58-7.60 (2H, m)
3 – 5	-	-	-	-	-	-	7.44-7.46 (3H, m)
2', 6'	7.49 (2H, dd, <i>J</i> =8.0, 4.0 Hz)	7.48 (2H, dd, <i>J</i> =8.0, 4.0 Hz)	7.48 (2H, dd, <i>J</i> =8.0, 4.0 Hz)	-	7.59 (2H, dd, <i>J</i> =8.0, 4.0 Hz)	8.1 (2H, dd, <i>J</i> =8.0, 4.0 Hz)	-
3'	-	-	-	-	-	-	6.05 (1H, d, <i>J</i> =4.0 Hz)
5'	-	-	-	-	-	-	6.03 (1H, d, <i>J</i> =4.0 Hz)
3'–5'	7.39 (3H, m)	7.41 (3H, m)	7.41 (3H, m)	-	7.45 (3H, m)	7.55 (3H, m)	-
2'	-	-	-	7.73 (1H, d, <i>J</i> =2.0 Hz)	-	-	-
5'	-	-	-	6.92 (1H, d, <i>J</i> = 8.0 Hz)	-	-	-
3-OH	-	-	-	9.71 (1H, s)	-	-	-
3'-OCH ₃	-	-	-	3.82 (3H, s)	-	-	-
5-OH	-	-	-	12.44 (1H, s)	11.69 (1H, s)	12.80 (1H, s)	-
5-OCH ₃	-	3.75 (3H, s)	3.72 (3H, s)	-	-	-	-
4'-OH	-	-	-	9.39 (1H, s)	-	-	-
7-OH	-	10.58 (1H, s)	10.58 (1H, s)	10.75 (1H, s)	-	-	-



Cuadro A4. RMN-¹H de los compuestos aislados de las muestras de propóleo (continuación).

¹ H	Alpinona (C08) (DMSO- <i>d</i> ₆) ^a	Pinostrobinina (C09) (DMSO- <i>d</i> ₆) ^a	5- <i>O</i> - metilgalangina (C10) (DMSO- <i>d</i> ₆) ^a	Kaempferida (C11) (DMSO- <i>d</i> ₆) ^a	4',7- <i>O</i> - dimetilnaringenina (C12) (CDCl ₃) ^a	4',7- <i>O</i> - dimetilkaempferol (C13) (acetona- <i>d</i> ₆) ^a	Acacetina (C14) (DMSO- <i>d</i> ₆) ^a
2	5.05 (1H, d, <i>J</i> =12.0 Hz)	5.50 (1H, dd, <i>J</i> =10.0, 3.3 Hz)	-	-	5.37 (dd, <i>J</i> =10.30, 3.30 Hz)	-	-
3	4.40 (1H, d, <i>J</i> =12.0 Hz)	3a 2.56 (1H, dd, <i>J</i> =13.0, 3.0 Hz) 3b 3.00 (1H, dd, <i>J</i> =13.0, 10.0 Hz)	-	-	3a 2.79 (1H, dd, <i>J</i> =13.0, 3.0 Hz) 3b 3.15 (dd, <i>J</i> =13.0, 10.30 Hz)	-	6.86 (1H, s)
6	5.98 (1H, d, <i>J</i> =2.0 Hz)	6.00 (1H, d, <i>J</i> =2.0 Hz)	6.31 (1H, d, <i>J</i> =2.0 Hz)	6.27 (1H, d, <i>J</i> =2.0 Hz)	6.05 (1H, d, <i>J</i> =2.0 Hz)	6.64 (1H, d, <i>J</i> =2.0 Hz)	6.17 (1H, d, <i>J</i> =2.0 Hz)
8	6.10 (1H, d, <i>J</i> =2.0 Hz)	6.19 (1H, d, <i>J</i> =2.0 Hz)	6.50 (1H, d, <i>J</i> =2.0 Hz)	6.55 (1H, d, <i>J</i> =2.0 Hz)	6.08 (1H, d, <i>J</i> =2.0 Hz)	6.68 (1H, d, <i>J</i> =2.0 Hz)	6.50 (1H, d, <i>J</i> =2.0 Hz)
2', 6'	7.51 (2H, dd, <i>J</i> =8.0, 4.0 Hz)	7.51 (2H, dd, <i>J</i> =8.0, 4.0 Hz)	8.12 (2H, dd, <i>J</i> =8.0, 4.0 Hz)	8.22 (2H, dd, <i>J</i> =8.0, 4.0 Hz)	7.38 (2H, d, <i>J</i> =8.0 Hz)	7.14 (2H, d, <i>J</i> =8.0 Hz)	8.03 (2H, d, <i>J</i> =8.0 Hz)
3'-5'	7.48 (3H, m)	7.48 (3H, m)	7.48 (3H, m)	7.13 (3H, m)	6.95 (2H, d, <i>J</i> =8.0 Hz)	7.12 (2H, d, <i>J</i> =8.0 Hz)	-
3', 5'	-	-	-	-	-	-	7.11 (2H, d, <i>J</i> =8.0 Hz)
3-OH	-	-	8.91 (1H, s)	-	-	-	-
5-OH	10.05 (1H, s)	-	-	-	12.03 (1H, s)	13.22 (1H, s)	12.90 (1H, s)
5-OCH ₃	-	-	3.57 (3H, s)	-	-	-	-
5-OH	10.58 (1H, s)	10.58 (1H, s)	-	-	-	-	-
7-OH	-	-	10.77 (1H, s)	-	-	-	-
7-OCH ₃	3.82 (3H, s)	3.74 (3H, s)	-	-	3.83 (3H, s)	3.92 (3H, s)	-
4'-OCH ₃	-	-	-	3.90 (3H, s)	3.81 (3H, s)	3.88 (3H, s)	3.84 (3H, s)

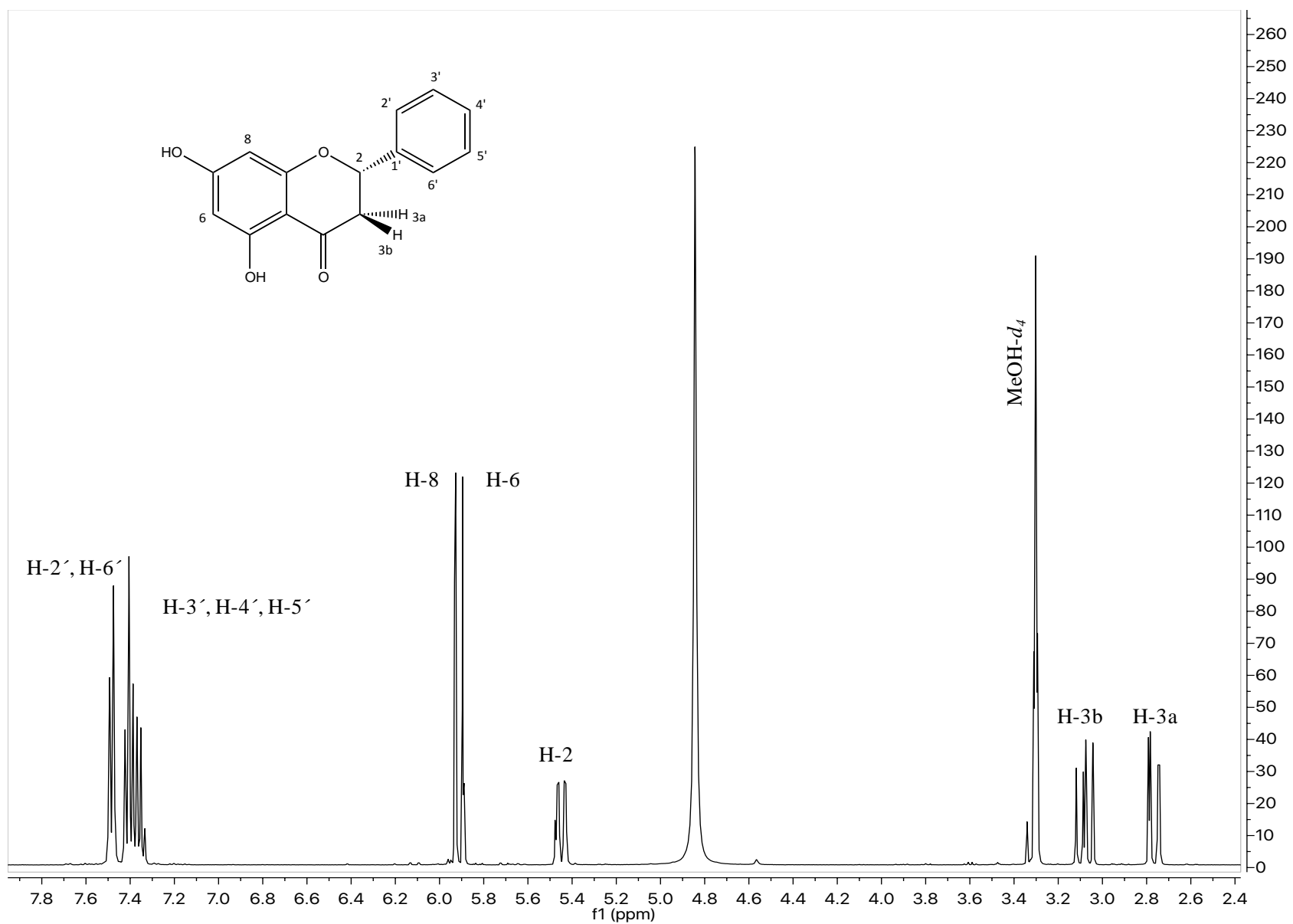


Figura A2. Espectro RMN-¹H de la pinocembrina (C01), MeOH-*d*₄, 400 MHz.

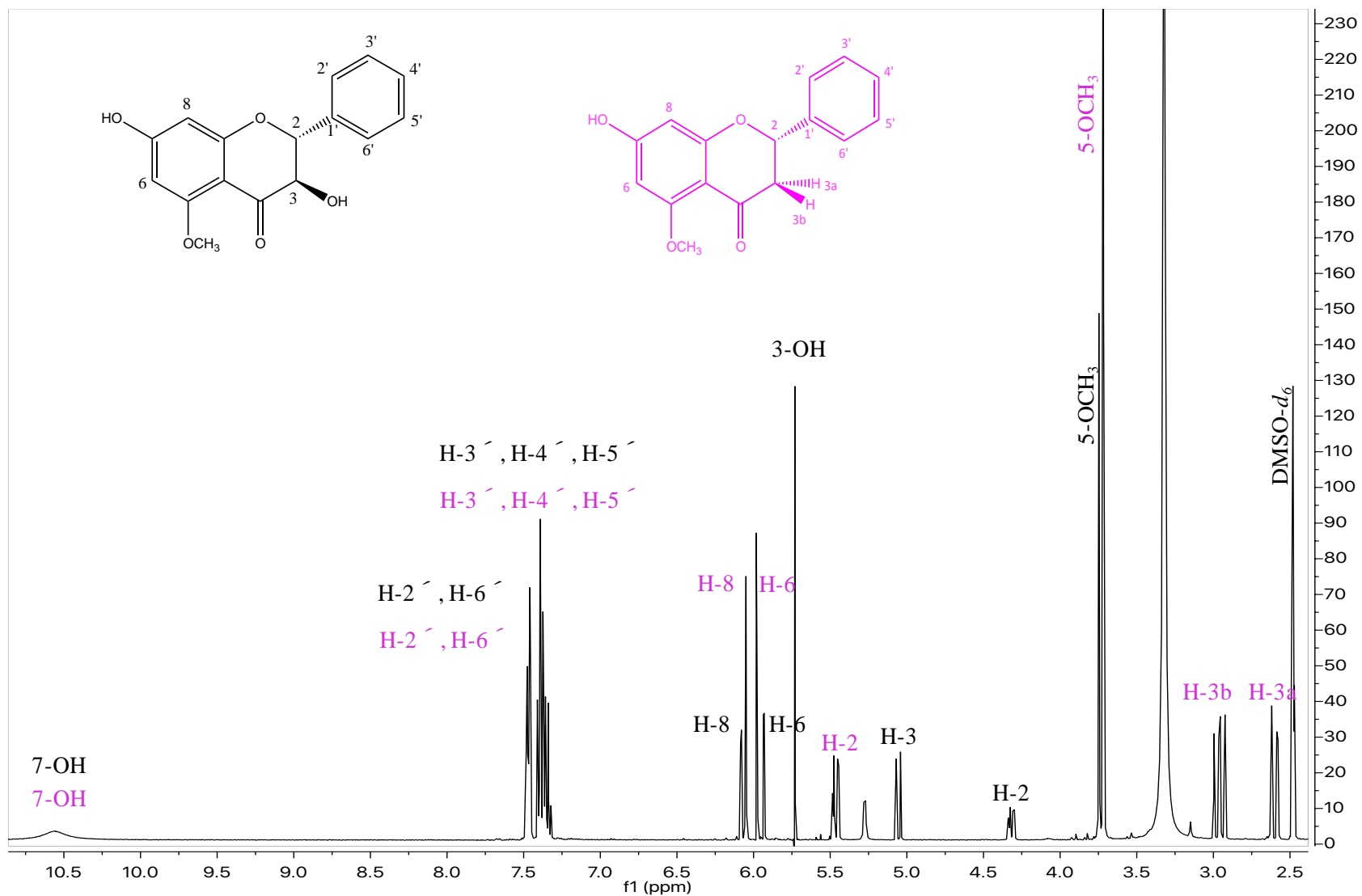


Figura A3. Espectro RMN-¹H de la mezcla 5-O-metilpinobanksina y alpinetina (C02+C03), DMSO-*d*₆, 400 MHz.

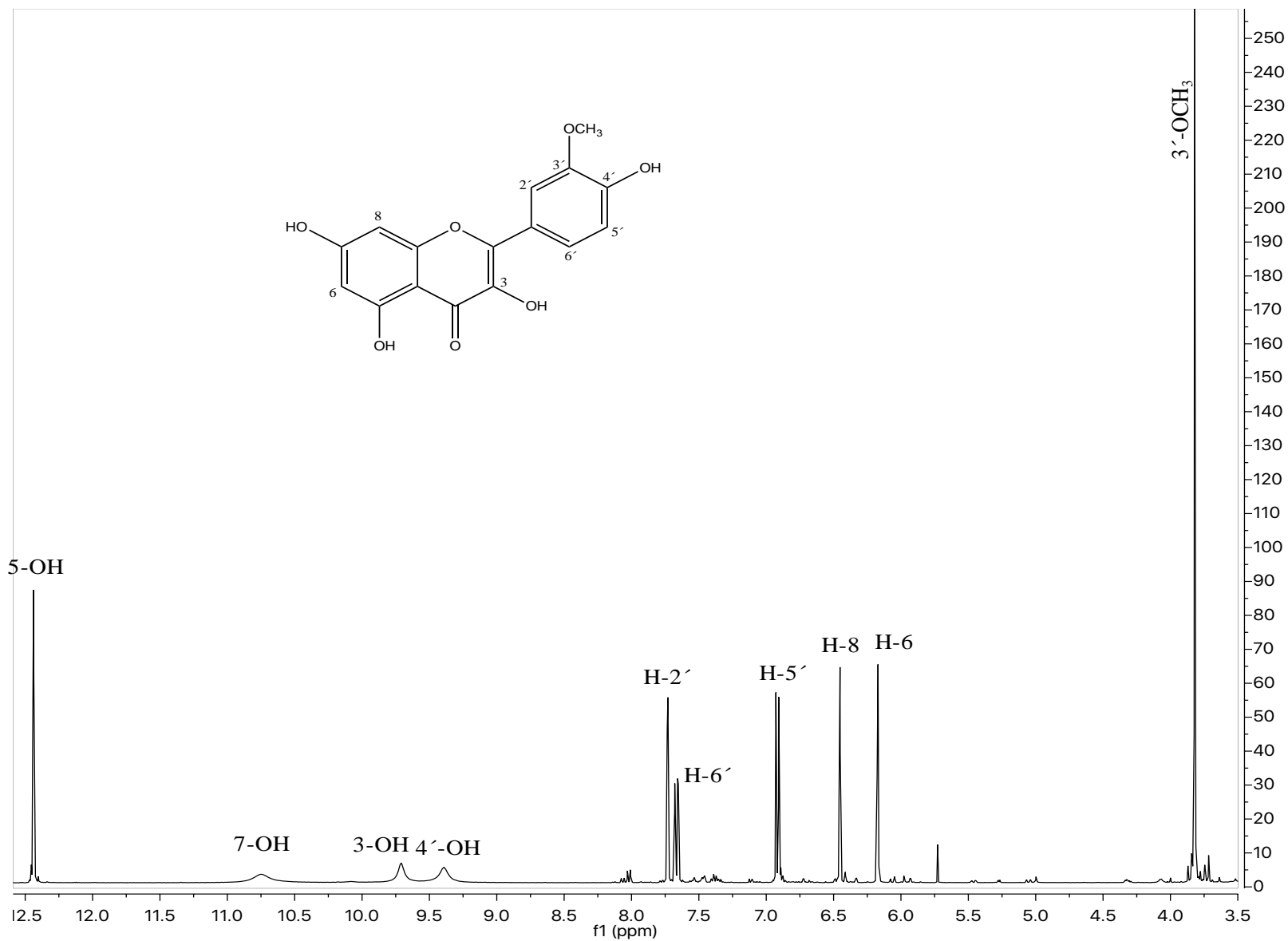


Figura A4. Espectro RMN-¹H de la isoramnetina (C04), DMSO-*d*₆, 400 MHz.

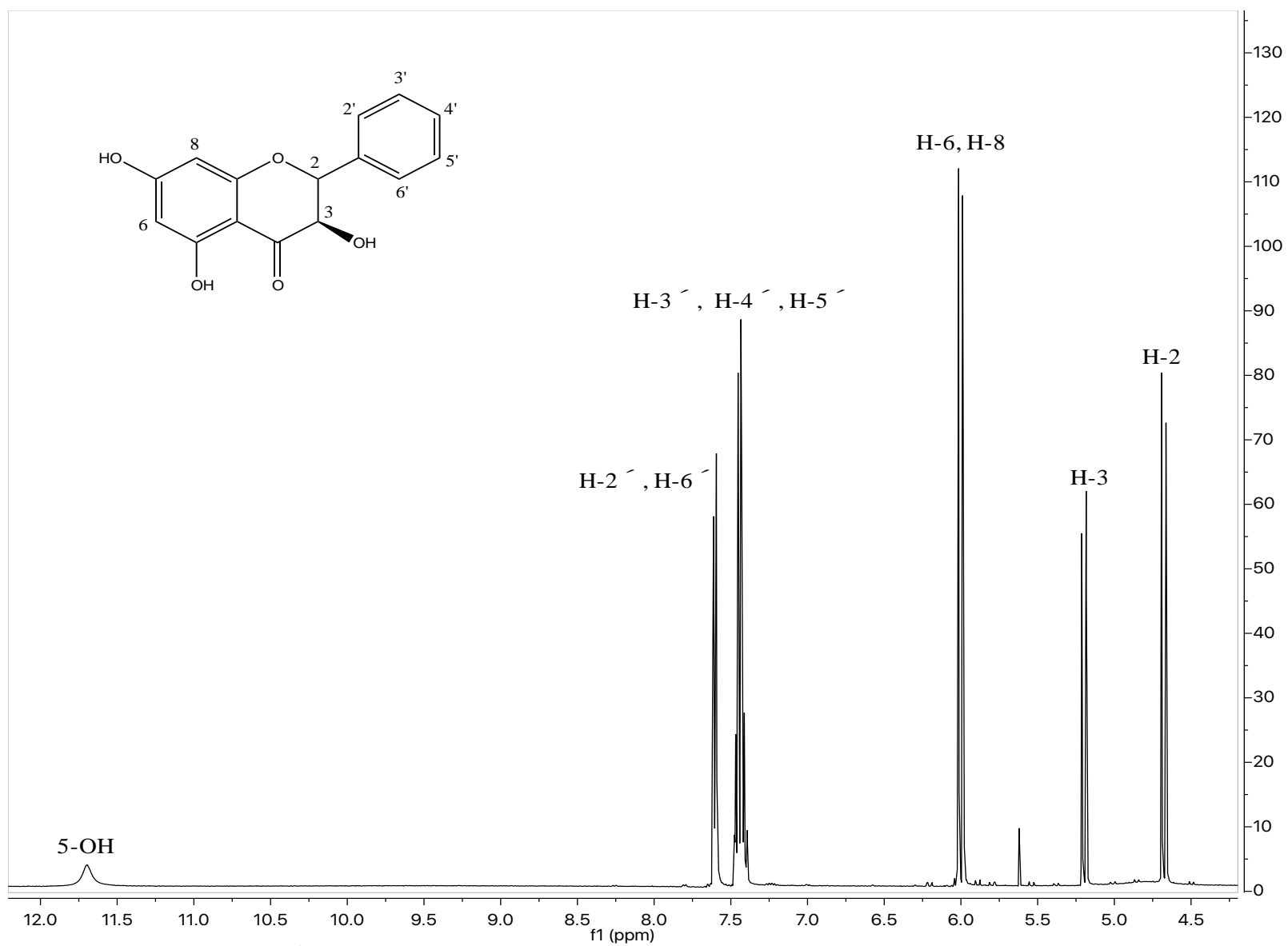


Figura A5. Espectro RMN- ^1H de la pinobanksina (C05), acetona- d_6 , 400 MHz.

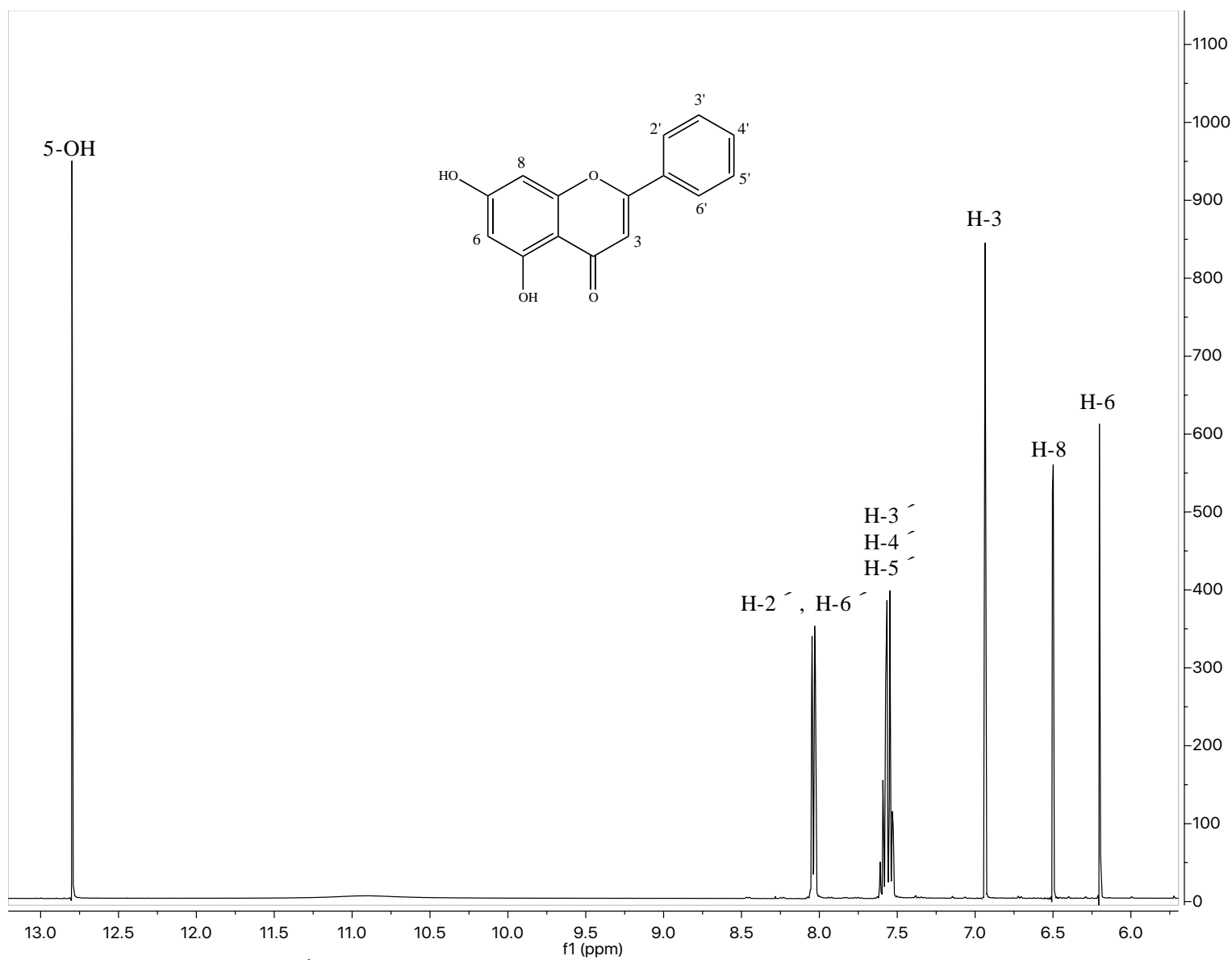


Figura A6. Espectro RMN- ^1H de la crisina (C06), $\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz.

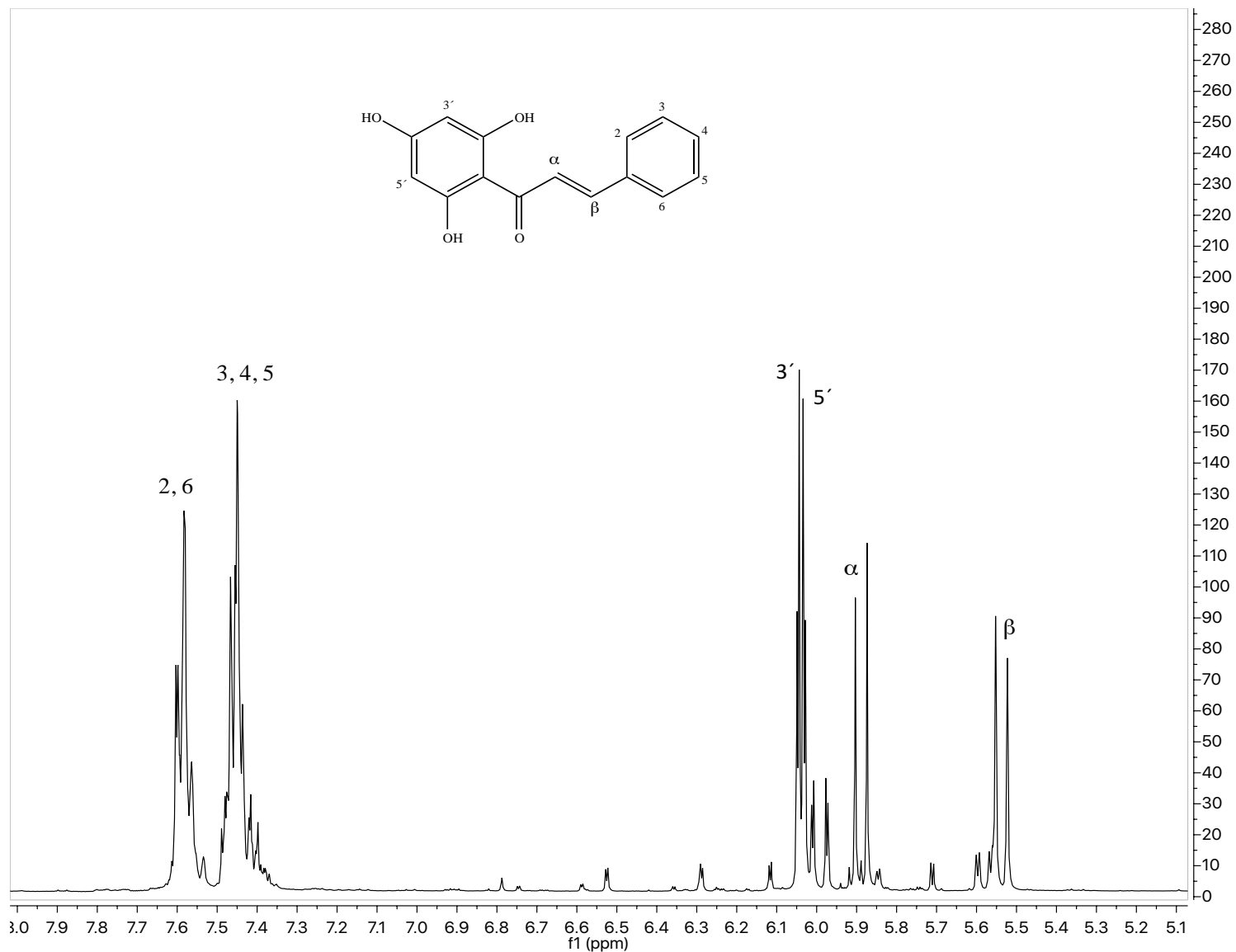


Figura A7. Espectro RMN- ^1H de la 2',4',6'-trihidroxicalcona (C07), acetona- d_6 , 400 MHz.

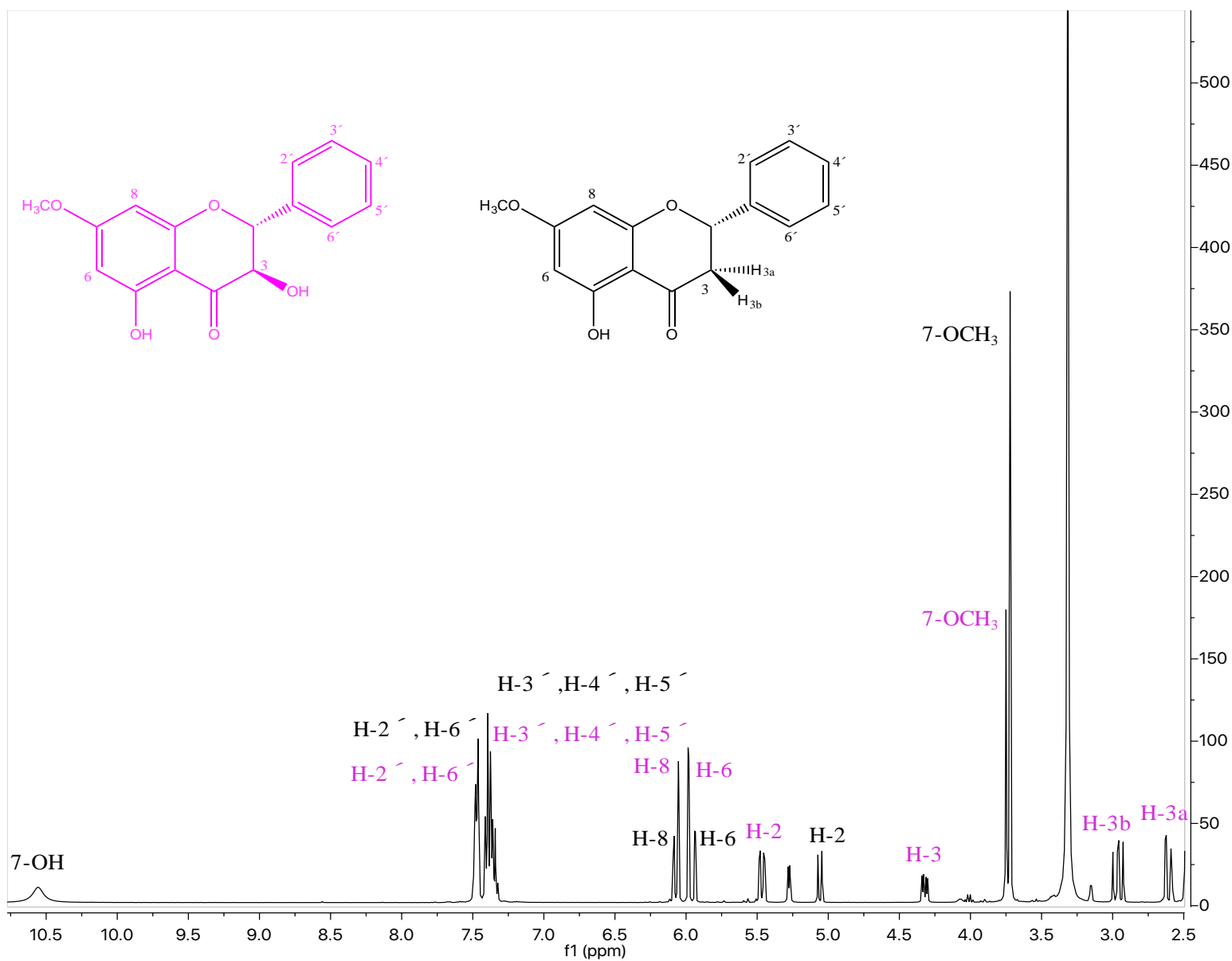


Figura A8. Espectro RMN-¹H de la mezcla alpinona + pinostrobin (C8+C9), DMSO-*d*₆, 400 MHz.

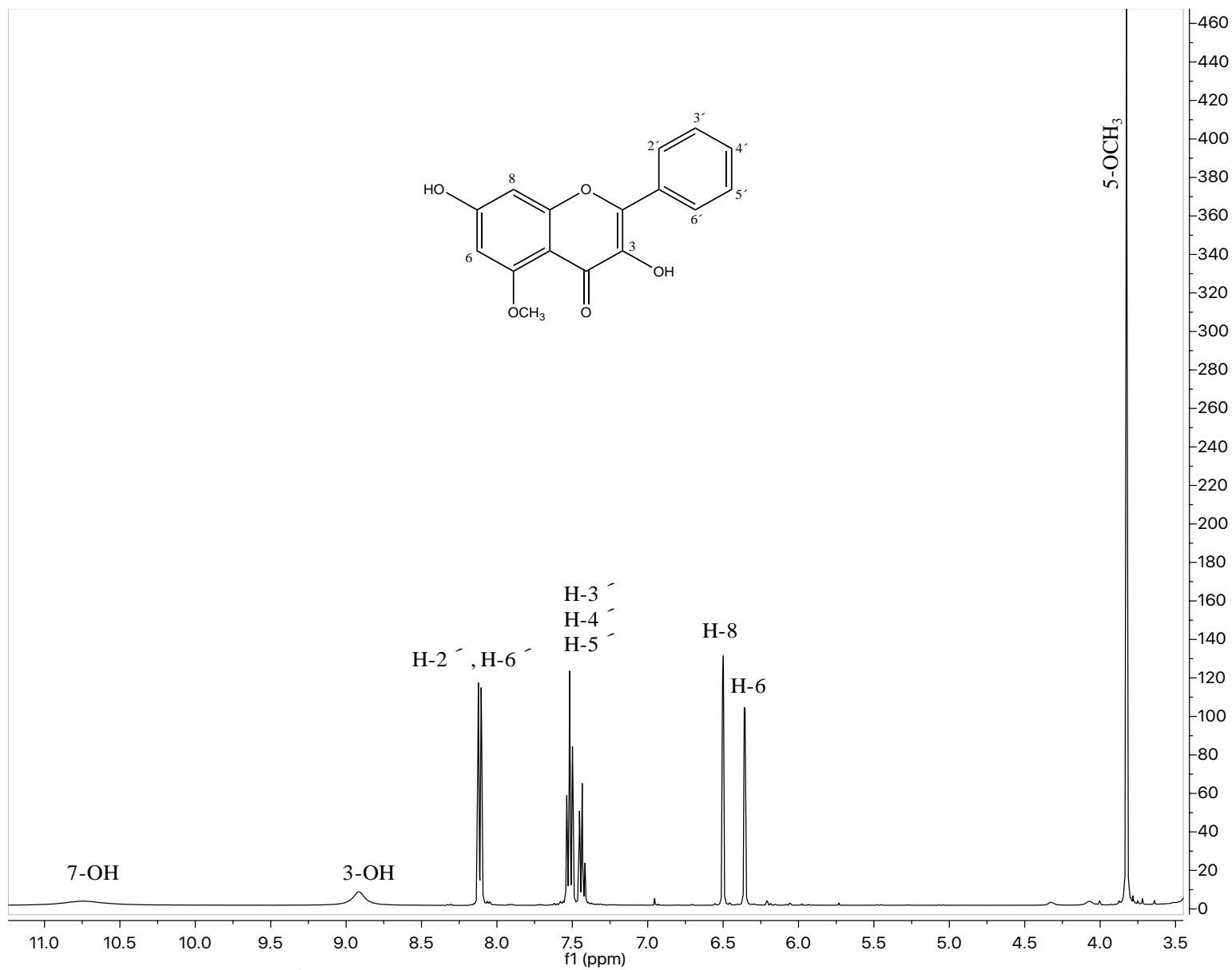


Figura A9. Espectro RMN-¹H de la 5-*O*-metilgalangina (C10) DMSO-*d*₆, 400 MHz.

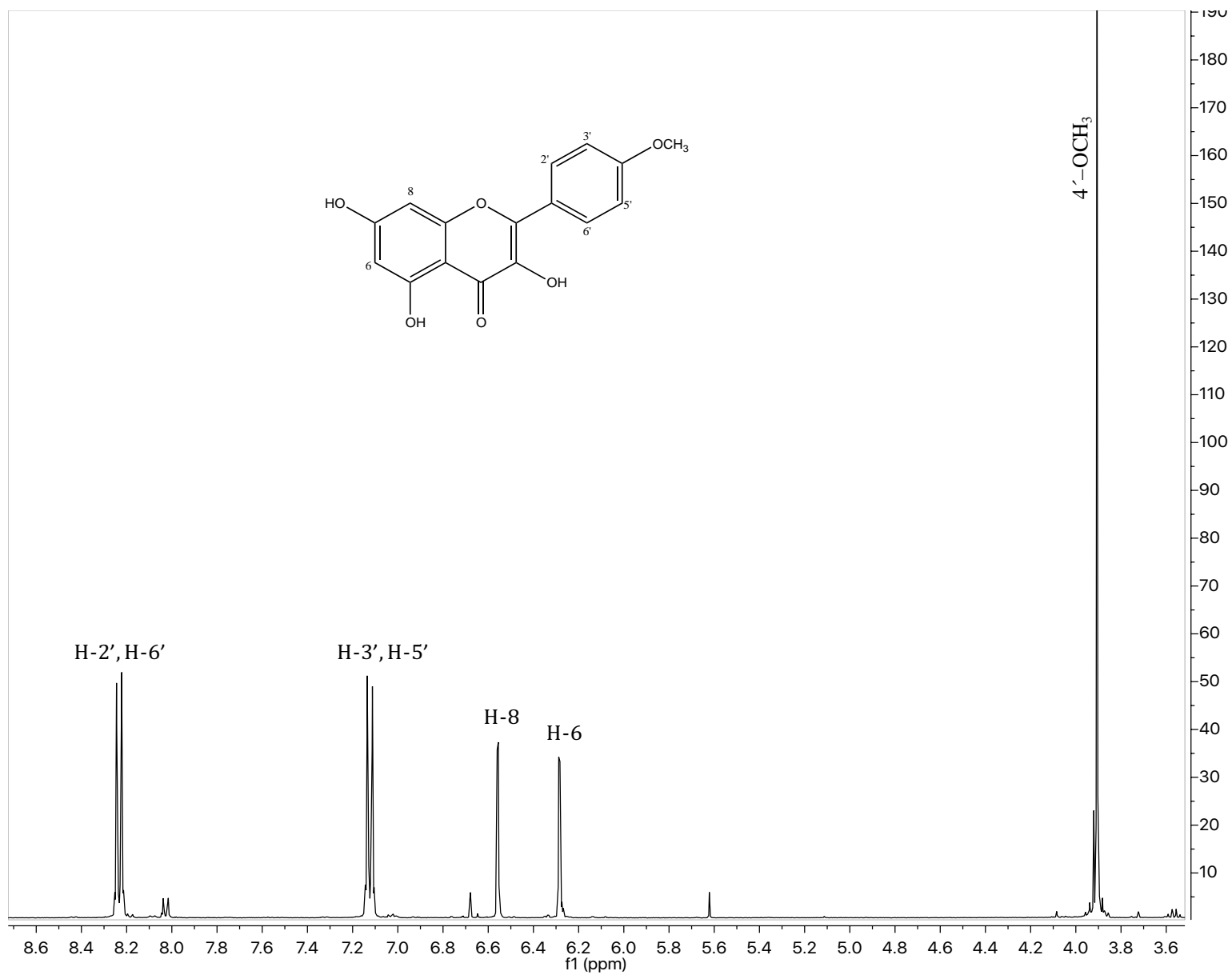


Figura A10. Espectro RMN-¹H de la kaempferida (C11) acetona-*d*₆, 400 MHz.

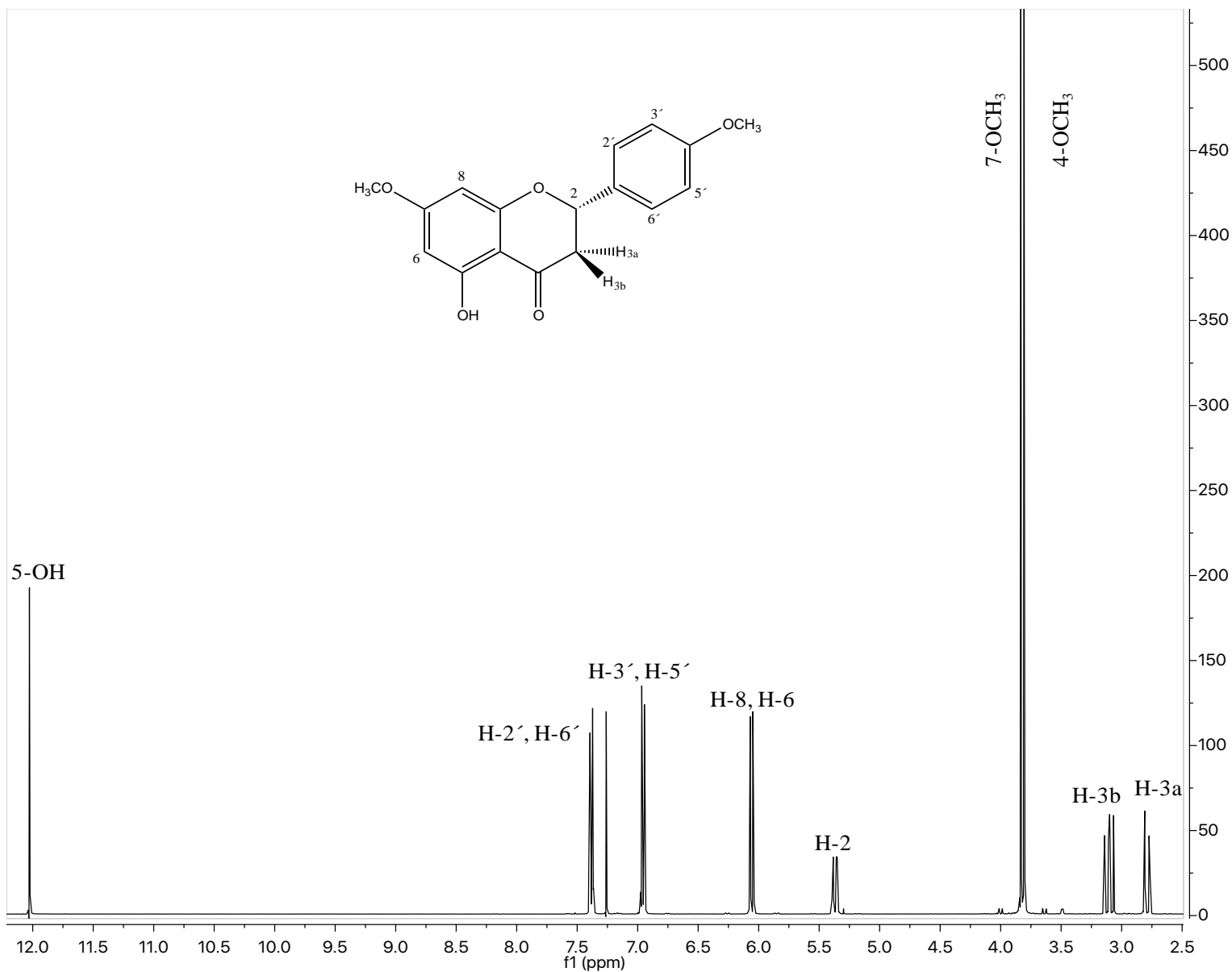


Figura A11. Espectro RMN- ^1H de la 4',7-O-dimetilnaringenina (C12) CDCl_3 , 400 MHz.

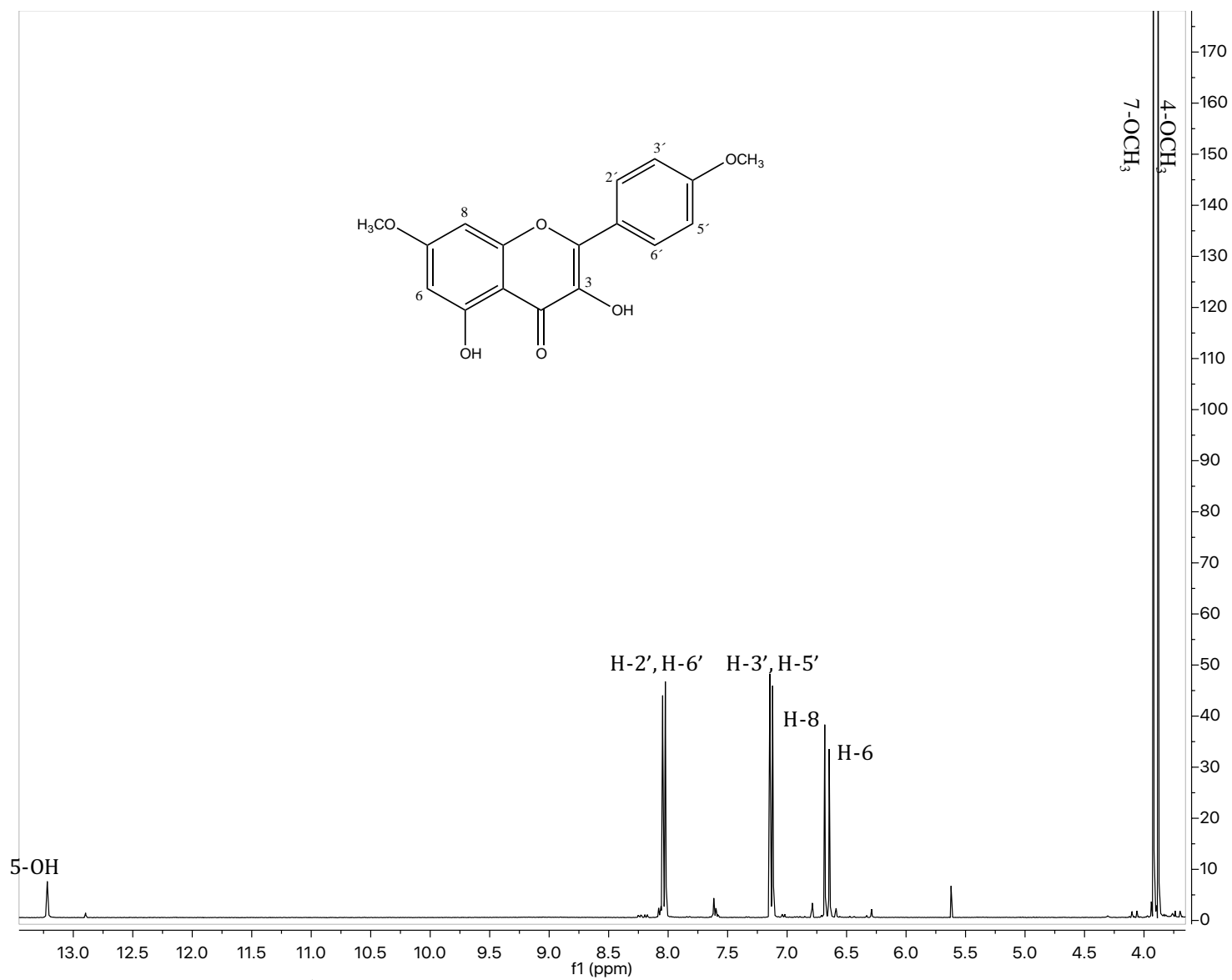


Figura A12. Espectro RMN- ^1H del 4',7-*O*-dimetilkaempferol (C13) DMSO- d_6 , 400 MHz.

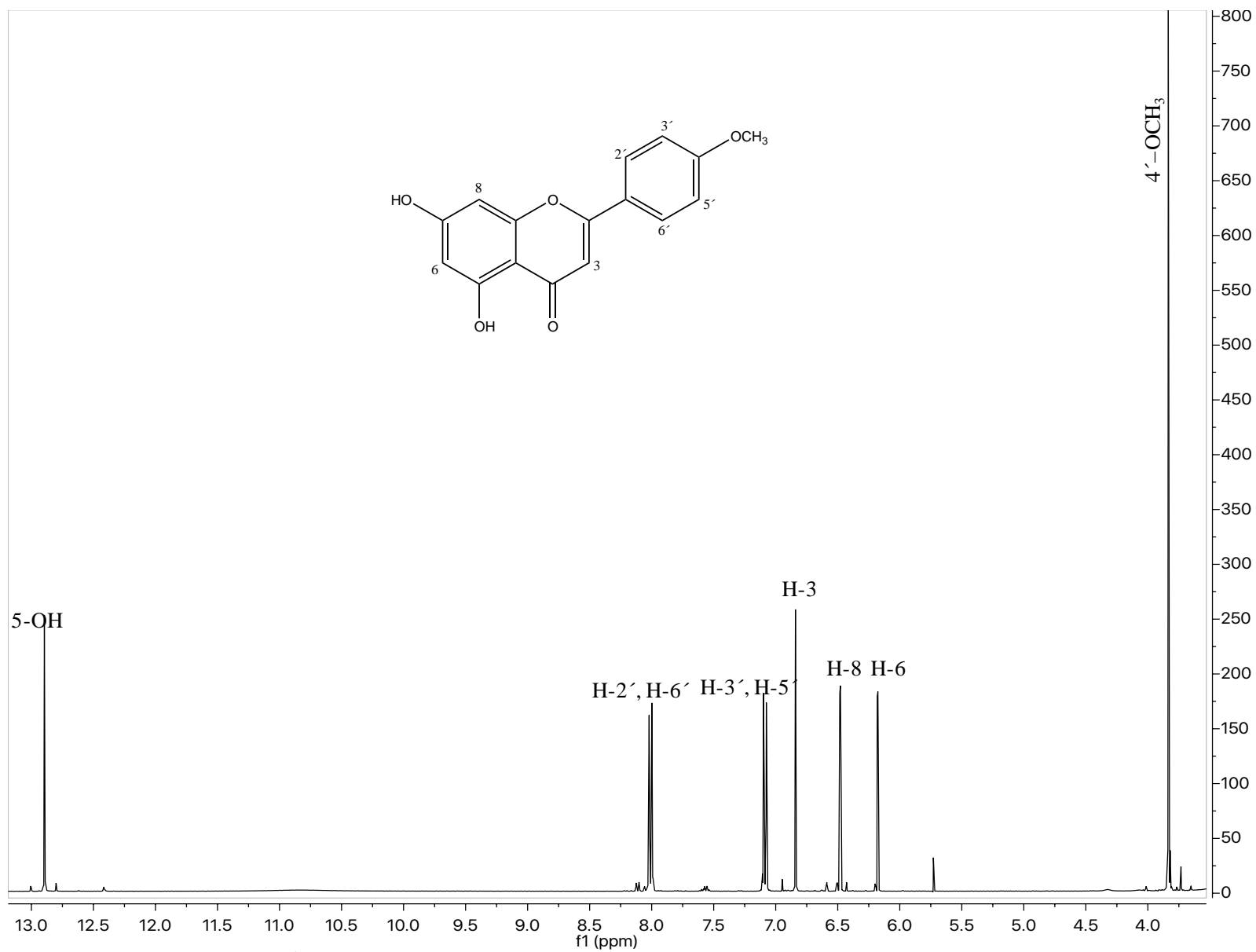


Figura A13. Espectro RMN- ^1H de la acetina (C14) $\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz.



ARTÍCULOS PUBLICADOS



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jphotobiol

Mexican propolis flavonoids affect photosynthesis and seedling growth

Beatriz King-Díaz^a, Jessica Granados-Pineda^{b,1}, Mustapha Bah^c, J. Fausto Rivero-Cruz^b,
Blas Lotina-Hennsen^{a,*}^a Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, 04510 México, DF, Mexico^b Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, 04510 México, DF, Mexico^c Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Centro Universitario, Cerro de las Campanas, Querétaro 76010, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 March 2015

Received in revised form 28 July 2015

Accepted 10 August 2015

Available online xxxxx

Keywords:

Acacetin

Chrysin

4',7-dimethylnarangenin

Photosynthesis

Propolis

Seedling growth

ABSTRACT

As a continuous effort to find new natural products with potential herbicide activity, flavonoids acacetin (1), chrysin (2) and 4',7-dimethylnarangenin (3) were isolated from a propolis sample collected in the rural area of Mexico City and their effects on the photosynthesis light reactions and on the growth of *Lolium perenne*, *Echinochloa crus-galli* and *Physalis ixocarpa* seedlings were investigated. Acacetin (1) acted as an uncoupler by enhancing the electron transport under basal and phosphorylating conditions and the Mg²⁺-ATPase. Chrysin (2) at low concentrations behaved as an uncoupler and at concentrations up to 100 μM its behavior was as a Hill reaction inhibitor. Finally, 4',7-dimethylnarangenin (3) in a concentration-dependent manner behaved as a Hill reaction inhibitor. Flavonoids 2 and 3 inhibited the uncoupled photosystem II reaction measured from water to 2,5-dichloro-1,4-benzoquinone (DCBQ), and they did not inhibit the uncoupled partial reactions measured from water to sodium silicomolybdate (SiMo) and from diphenylcarbazide (DPC) to diclorophenol indophenol (DCPIP). These results indicated that chrysin and 4',7-dimethylnarangenin inhibited the acceptor side of PS II. The results were corroborated with fluorescence of chlorophyll a measurements. Flavonoids also showed activity on the growth of seedlings of *Lolium perenne* and *Echinochloa crus-galli*.

© 2015 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Propolis, a natural substance collected by honeybees from buds and exudated by certain trees and plants is used in the beehives as a protective barrier against their enemies [1,2], and it has been reported to possess biological activities such as antibacterial [3,4], antiviral [4,5], anti-inflammatory [6,7], anticancer [8–12] and antifungal [13,14]. Moreover, several reports have referred to the phytoinhibitory and phytotoxic activities of propolis extracts. Aqueous extract of propolis has shown to be responsible for inhibiting germination and growth of lettuce seedling and rice grains [15,16]. Alcoholic extracts of propolis obtained from Russia inhibited the germination of *Cannabis sativa* seeds [17,18]. Recently, the composition and phytotoxic activity of the volatile fraction of Brazilian green propolis have been reported [19]. Despite the wide spectrum of biological activity of propolis, to our knowledge no studies have so far been carried out about phytotoxic properties of Mexican propolis and its constituents.

Propolis contains a variety of chemical compounds such as polyphenols (flavonoids, phenolic acids and their esters), terpenoids, steroids, and amino acids. However, the major constituents of propolis from most sources are flavones, flavonols and flavanones [13,20–23].

In previous works flavones as tephroleocarpin, glabranin and methylglabranin isolated from the *Tephrosia* species showed inhibition of different photosynthetic activities [24]. Pachypodol, isolated from the *Croton ciliatoglanduliferus*, behaves as a Hill reaction inhibitor of photosynthesis of isolated chloroplasts from spinach leaves [25]. Some flavonoids possess various clinically relevant properties such as anti-tumor, anti-platelet, anti-inflammatory, antimicrobial, and antioxidant activity [26–29]. In this work, we report the phytotoxic effect of the flavonoids acacetin (1), chrysin (2) and 4',7-dimethylnarangenin (3) isolated from the ethanolic extract propolis collected in the rural area of Mexico City. The effects of the isolated compounds (1–3) were assayed on the photosynthesis light reactions of fresh lysed chloroplasts isolated from spinach leaves, and on the germination and growth of seedling of *Physalis ixocarpa*, *Lolium perenne* and *Echinochloa crus-galli*.

* Corresponding author.

E-mail address: blas@unam.mx (B. Lotina-Hennsen).¹ Taken in part from the PhD thesis of J. Granados-Pineda.

2

B. King-Díaz et al. / Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology xxx (2015) xxx–xxx

2. Materials and methods

2.1. Propolis material

Raw propolis (54 g) was collected in November 2012 from beehives located in the “Acuexcomatl Environmental Education Center”, San Luis Tlaxiátemalco, Xochimilco, Mexico, and was stored at -40°C .

2.2. Isolation of flavonoids

The air-dried and powdered propolis (50 g) was extracted with ethanol by maceration, for one week. The resultant extract was concentrated *in vacuo*. A portion of ethanol-soluble extract (21.8 g) was subjected to silica gel vacuum column chromatography (VLC) and eluted with a gradient mixture of dichloromethane–acetone (1:0 \rightarrow 0:1) to provide eight pooled fractions (F1–F8). Fraction F1 was chromatographed over a silica gel (100 g) column and eluted with dichloromethane–methanol (1:0 \rightarrow 0:1) to yield **1** (980 mg). Fraction F4, eluted with dichloromethane–acetone (9:1), was chromatographed over silica gel column, using dichloromethane–acetone (1:0 \rightarrow 0:1) as eluent, to give six fractions. Subfraction F4-3 (540 mg) was recrystallized to give **2** (315 mg). Fraction F8 was re-chromatographed on a silica gel column using dichloromethane–acetone (1:0 \rightarrow 0:1) as a solvent to produce six sub-fractions. Sub-fraction F8-3 yielded crystals of **3** (980 mg).

Acacetin (**1**). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 12.89 (s, 1H, OH-5); 10.57 (s, 1H, OH-7); 7.99 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, H-2', and H-6'); 7.09 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, H-3', and H-5'); 6.83 (s, 1H, H-3); 6.48 (s, 1H, H-8); 6.17 (s, 1H, H-6); 3.82 (s, 3H, MeO-4'). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 182.2 (C-4), 164.6 (C-2), 163.7 (C-7), 162.7 (C-5), 161.9 (C-4'), 157.8 (C-9), 128.7 (C-2' and C-6'), 123.2 (C-1'), 115.0 (C-3' and C-5'), 104.2 (C-10), 103.9 (C-3), 99.3 (C-6), 94.5 (C-8), 56.0 (MeO-4').

Chrysin (**2**). ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz): δ 7.60 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, H-2', and H-6'); 7.56–7.57 (m, 2H, H-3' and H-5'); 6.83 (s, 1H, H-3); 6.52 (1H, d, 4.0, H-8); 6.22 (1H, d, 4.0, H-6). ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz): δ 181.2 (C-4), 163.7 (C-7), 163.4 (C-2), 162.4 (C-4'), 161.7 (C-5), 157.5 (C-9), 128.2 (C-2' and C-6'), 122.9 (C-1'), 114.5 (C-3' and C-5'), 104.1 (C-10), 103.6 (C-3), 99.2 (C-6), 94.2 (C-8).

4',7-dimethyl naringenin (**3**). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 12.0 (brs, 1H, OH-5); 7.38 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, H-2', and H-6'); 6.96 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, H-3', and H-5'); 6.06 (s, 1H, H-8); 6.03 (s, 1H, H-6); 5.35 (dd, 1H, $J = 9.0$, 4.0 Hz, H-2); 3.82 (s, 3H, MeO-4'); 3.79 (s, 3H, MeO-7); 3.09 (dd, 1H, $J = 16.0$, 9.0 Hz, H-3a); 2.78 (dd, 1H, $J = 16.0$, 9.0 Hz, H-3b). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 196.0 (C-4), 167.9 (C-7), 164.2 (C-5), 162.9 (C-9), 160.0 (C-4'), 130.3 (C-1'), 127.7 (C-2' and C-6'); 123.57 (C-1'), 114.2 (C-3' and C-5'), 103.1 (C-10), 95.0 (C-6), 94.2 (C-8), 79.0 (C-2), 55.7 (MeO-4'), 55.3 (MeO-7).

2.3. Chloroplast isolation and chlorophyll determination

Intact chloroplasts obtained from spinach leaves (*Spinacia oleracea* L.) purchased from the local market as previously described [30,31] were suspended in a small volume of the following solution: 400 mM sucrose, 5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, and 30 mM of the buffer tricine–KOH (pH 8.0). They were stored as a concentrated suspension in the dark at 4°C before used. The chlorophyll (Chl) concentration was measured according to Strain et al. [32].

2.4. ATP synthesis and electron flow determinations

ATP synthesis was determined titrimetrically as the pH rose from 8.0 to 8.1 during illumination of chloroplasts, using a

microelectrode (Orion model 8103; Ross, Beverly, MA) connected to a potentiometer (Corning Medical, Acton, MA, model 12) with expanded scale and a Gilson recorder (Kipp & Zonen, Bohemia, NY) as previously reported [30,33]. Intact chloroplasts (20 μg of Chl/mL) were broken before each assay by osmotic rupture in 3 mL of the non-buffered solution containing: 100 mM sorbitol, 10 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 0.5 mM KCN, and 1 mM tricine–KOH at pH 8.0 in the presence of 50 μM methylviologen (MV) and 1 mM adenosine diphosphate (ADP). The synthesized ATP was calculated as micromoles of ATP per milligram of Chl per hour. The reaction was calibrated by back titration with saturated HCl.

2.5. Measurements of noncyclic electron transport rate

Light induced non-cyclic electron transport activity from water to MV was performed using a Clark type electrode. Chloroplasts were efficiently lysed to yield free thylakoids prior to each experiment by incubating them in the following basal electron transport medium: 100 mM sorbitol, 10 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 0.5 mM KCN, and 30 mM tricine (*N*-tris[hydroxymethyl]methylglycine) buffer (pH 8 with the addition of KOH). Twenty micrograms of chlorophyll per milliliter of medium were illuminated during 1 min. Phosphorylating non-cyclic electron transport was measured with the basal electron transport medium plus 1 mM ADP and 3 mM KH_2PO_4 . Uncoupled electron transport was tested in the basal transport medium by adding 6 mM NH_4Cl as an uncoupler agent [30,34].

2.6. Uncoupled photosystem II (PS II) and uncoupled photosystem I (PS I) electron flow measurements

These experiments were performed in an uncoupled non-cyclic electron transport assay. The activities were monitored with an YSI (Yellow Spring Instrument) oxygen monitor, model 5300A, using a Clark-type electrode. Uncoupled PS II from water to DCBQ [30,35] was monitored using the basal electron transport medium, and 1 μM 2,5-dibromo-6-isopropyl-3-methyl-1,4-benzoquinone (DBMIB), 100 μM DCBQ, and 6 mM NH_4Cl were added. MV was omitted. DCBQ accepts electrons at the D1 protein.

Partial reaction of PS II electron transport from water to SiMo was determined using the same basal electron transport medium without MV as in PS II, 50 μM SiMo and 10 μM DCMU were added [36].

Uncoupled PS I electron transport was determined using the basal electron transport medium with MV, plus 10 μM 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU, which inhibits PS II at Q_B level), 100 μM of DCPIP reduced with 300 μM ascorbate and 6 mM NH_4Cl [37]. I_{50} value is the concentration producing 50% inhibition of the activity. The I_{50} value for each activity was calculated by linear regression analysis using SigmaStat 3.5 program and confidence intervals were calculated with a 95% confidence level using *t*-test.

2.7. Mg^{2+} -ATPase activity assays

Chloroplasts were isolated from 30 to 40 g of spinach leaves, which were ground in 160 mL of medium containing 350 mM sorbitol, 5 mM ascorbic acid and 20 mM 2-(*N*-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) at pH 6.5. Chloroplasts were centrifuged at 3000 g for 60 s, washed once in 40 mL of grinding medium, and resuspended in 35 mM *N*-[2-hydroxyethyl]piperazine-*N'*-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES) buffer (pH 7.6). The light-triggered Mg^{2+} -ATPase activity associated to thylakoid membranes was measured as previously described by Mills and collaborators, 1980 [31], and released inorganic phosphate was measured as reported by Sumner [38].

2.8. Chlorophyll *a* fluorescence measurements

To monitor Chl *a* fluorescence transients, induction aliquots of chloroplasts containing 20 µg of chlorophyll were transferred to filter paper by gravity with a dot-blot apparatus (Bio-Rad, United States) to ensure a homogeneous and reproducible distribution, and immediately were dipped in 3 mL of different concentrations of the tested compounds. Samples were incubated for 5 min in the dark. Chl *a* fluorescence induction curves were measured at room temperature by a portable shutter less apparatus (Plant Efficiency Analyzer, Hansatech, U.K.) [30,39] of three light emitting diodes delivering 3000 µmol m⁻² s⁻¹ (broadband 650 nm), the pulse duration was 2 s. The reaction medium employed was the basal electron transport medium without MV. Different photosynthetic parameters associated with PS II were obtained according to the equations of the O-J-I-P test, using the Bioanalyser program [30,40]. *F*₀, fluorescence intensity level at 20 µs when plastoquinone electron acceptor pool (QA) is fully oxidized; *F*_M, fluorescence level when QA is transiently fully reduced; *F*_V, variable component of fluorescence is obtained by subtraction of *F*₀ from the *F*_M value; *F*_K (or *F*₃₀₀ µs); *F*_J (2 ms); *F*_I (30 ms) [40].

2.9. Plant material

The seeds of three species *Physalis ixocarpa* (dicotyledonous), *L. perenne* and *E. crus-galli* (monocotyledonous) were sown in 12 cm diameter pots containing a mixture of 2/1 v/v soil/sand. All pots were watered daily to maintain them close to field capacity in the greenhouse at a temperature between 24 and 28 °C with a normal day (12/12 h light/dark). Plant species were selected after 18 days of emergence for uniformity. Plants of similar size were divided into the control and the experimental groups. The latter was sprayed manually with 25 mL of 150 and 300 µM of flavonoid solutions. Each flavonoid was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) to 20 mM. An aliquot of this solution was taken in order to obtain the desired concentration in an aqueous suspension containing 0.05% v/v Tween 20 (added to reduce the surface tension of the suspension). The control group was sprayed with 25 mL of distilled water containing the same amount of DMSO and Tween 20 used for the treatments. The plants were arranged in a completely randomized design, and biomass production was determined [41].

2.10. Dry biomass

After 15 days of treatment with the derivatives, all plants harvested at ground level were dried in an oven at 65 °C for at least 72 h (or until constant weight). Then the dry mass was determined [41].

2.11. Chlorophyll *a* fluorescence determination in intact leaves in vivo

Chlorophyll *a* fluorescence was performed at room temperature with a portable Handy PEA apparatus [41] on the leaves of dark adapted-plants for 15 min, on the control and on the treated plants after 24, 40 and 72 h of being sprayed with the compounds.

2.12. Seed germination bioassays

Seeds were purchased from Semillas Berentsen, S.A. de C.V. (Celaya, Guanajuato, Mexico). Germination tests were made in triplicate with 40 seeds for *L. perenne*, *E. crus-galli* and *P. ixocarpa* for each concentration of sample, for five days (three days for germination and two days more for root and shoot growth). The seeds used for each experiment were selected from the stock that shows an appreciable change in O₂ uptake that could be detected by the

oxygraph (Yellow Spring Instrument) Model 5300A. The test seeds were held in the dark at 28 °C in 9.0-cm Petri dishes containing an 8.5-cm sheet of Whatman No. 1 filter paper and 10.0 mL of test or control solution. The number of germinated seeds was determined according to the criterion of 1 mm extrusion of the radicle. Compounds 1–3 were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). The maximum final concentration of DMSO was less than 0.1% and this concentration was used in the control solution [24]. Germination and elongation of root and shoot data in each experiment were analyzed by Bonferroni *t*-test calculated with the program SigmaStat 3.5.

3. Results and discussion

3.1. Flavonoids isolation and ATP synthesis determination

In the screening bioassay (ATP synthesis), it was found that the ethanol extract of propolis obtained from San Luis Tlaxiátemalco, Xochimilco, Mexico, inhibited ATP synthesis with *I*₅₀ value of 45.26 ± 4.5 µg/mL (Fig. 1), indicating that it might contain secondary metabolites with inhibitory activity on photosynthesis. In order to isolate the active compounds, the ethanolic extract of propolis (EEP) was subjected to successive chromatographic columns and as result acacetin (1), chrysin (2) and 4',7-dimethylnaringenin (3) were isolated as major compounds (Fig. 2). The known compounds were identified by ¹H and ¹³C NMR [42,43].

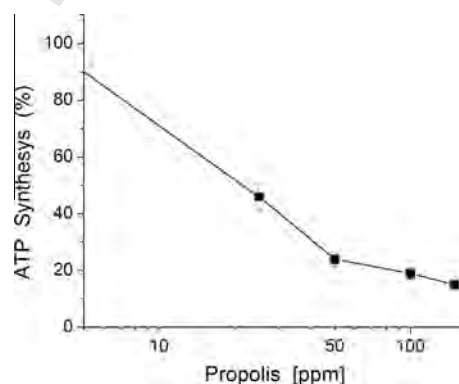


Fig. 1. Inhibitory effect of increasing concentrations of ethanolic extract of propolis (EEP) on ATP synthesis rate of spinach thylakoids. Control value was 971 ± 140 µM ATP/mg Chl × h. The data are results of three replicates.

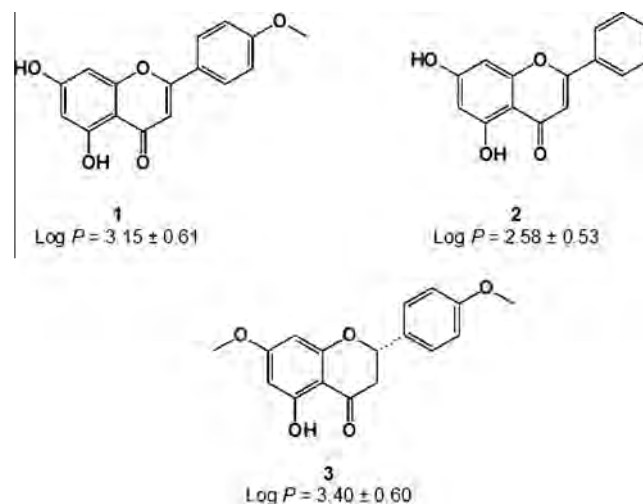


Fig. 2. Structures of flavonoids acacetin (1), chrysin (2) and 4',7-dimethylnaringenin (3).

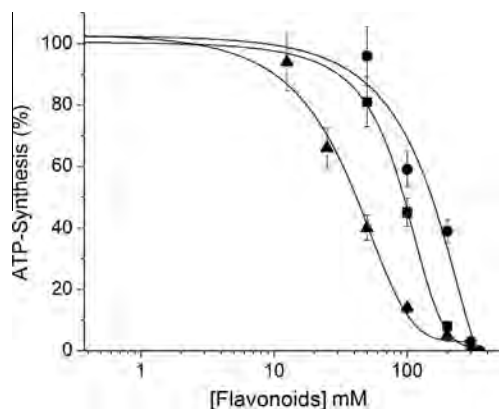


Fig. 3. Effect of flavonoids **1** (■), **2** (●) and **3** (▲) on ATP synthesis. Control rate value was $1167 \pm 80 \mu\text{M ATP h}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Chl}$. Data are average of three replicates. Other conditions are indicated in Materials and Methods.

and the values for **1–3** were 3.15, 2.58 and 3.40, respectively, indicating that **2** is more hydrophilic than **1** and **3** (Fig. 2).

In order to investigate the activity of compounds **1–3** as photosynthetic inhibitors, their effects on non-cyclic electron transport from water to MV were evaluated under basal, phosphorylating, and uncoupled conditions. Acacetin (**1**) increased the rate of electron transport in basal and phosphorylating conditions without affecting the uncoupled condition, suggesting that this compound behaves as an uncoupler (Fig. 4A). Chrysin (**2**) enhanced the electron flow in basal and phosphorylating conditions, and partially inhibited the uncoupled electron flow (Fig. 4B) suggesting that this compound is an uncoupler at low concentrations and a Hill reaction inhibitor at higher concentrations. Finally, 4', 7-dimethylnaringenin (**3**) inhibited the electron transport under all the assayed conditions in a concentration dependent manner (Fig. 4C) indicating in this way that it is a Hill reaction inhibitor.

3.2. Effect of flavonoids on photophosphorylation

Compounds **1–3** were monitored by the inhibition of photophosphorylation from water to MV in freshly lysed chloroplasts. Acacetin (**1**) and chrysin (**2**) were identified as the most bioactive compounds in a concentration dependent manner, with I_{50} values of 121 ± 18 and $84 \pm 22 \mu\text{M}$, respectively. Both compounds are less active than the extract; and probably other minor compounds present in the ethanolic extract as caffeic acid phenetyl ester (CAPE), pinocembrin, caffeic acid and ferulic acid play an important role as synergists [43]. Moreover, **3** was less active, its I_{50} value was $167 \pm 11 \mu\text{M}$ (Fig. 3). According to the I_{50} value of **2**, it was 2-fold times more potent than **1** and 3-fold times more potent than **3** as ATP synthesis inhibitor. The $\text{Log}P$ values were calculated from the Program Chem Sketch from ACDLabs 12.0 (www.acdlabs.com)

3.3. Localization of furoquinoline alkaloids interaction sites on the light reaction of photosystem PS II and photosystem PS I and partial reactions

To localize the inhibition site of the flavonoids **2** and **3** on the thylakoid electron transport chain, their effects on PS II, PS I and photosystem partial reactions were tested using artificial electron donors and acceptors, as well as appropriate inhibitors [37]. Compounds **2** and **3** inhibited the uncoupled partial reactions of electron flow of photosystem II from water to 2,5-dichloro-1, 4-benzoquinone (DCBQ) 100% at 100 and 300 μM respectively, being **2** the most active. However, the uncoupled partial reactions from water to sodium silicomolybdate (SiMo accepts electrons from pheophytin located in the PS II complex, therefore, the electron flow measurement is from the water splitting enzyme to pheophytin) and from DPC to DCPIP were not inhibited by them (Table 1). These results indicate that flavonoids **2** and **3** inhibited

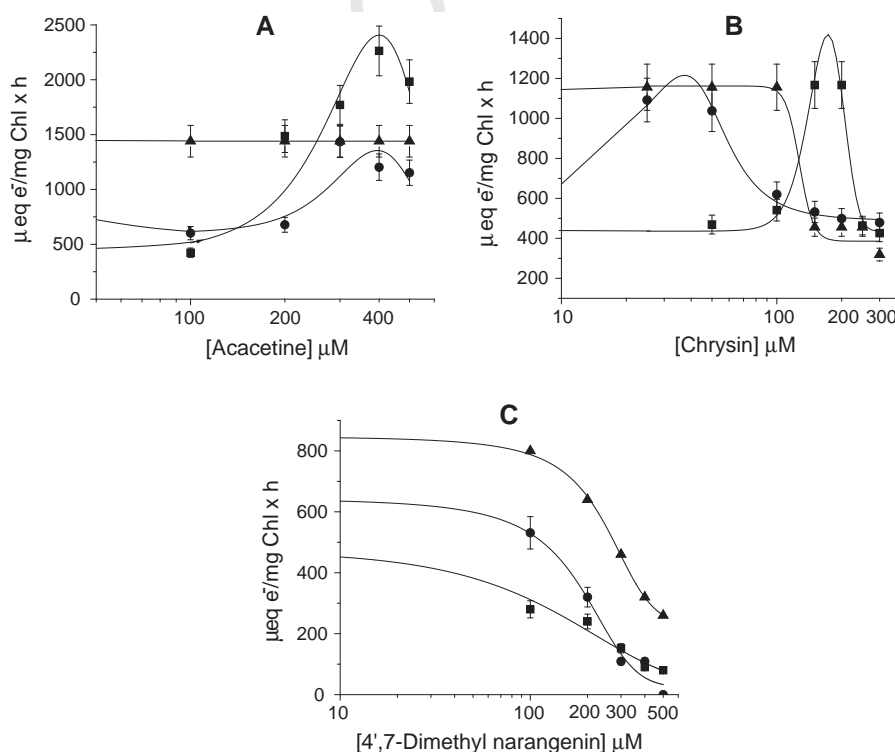


Fig. 4. Effect of **1** (Panel A), **2** (Panel B) and **3** (Panel C) on the electron flow measured from water to MV in spinach chloroplasts on basal (■), phosphorylating (●), and uncoupled (●) conditions. Other conditions as specified in Materials and Methods. Data are averages of three replicates.

Table 1

Effect of flavonoids **2** and **3** on uncoupled PS II electron transport rate measured from water to DCBQ and from water to SiMo, and on uncoupled PS I measured from DCPIP reduced to MV. Determinations were done on freshly lysed spinach chloroplasts. The data are results of three replicates \pm standard deviation.

Conc. (μM)	PS II H ₂ O to DCBQ				PS II H ₂ O to SiMo		PS I DCPIPred to MV	
	2		3		2 and 3		2 and 3	
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>
0	334 \pm 10	100	334 \pm 10	100	233 \pm 12	100	1467 \pm 318	100
12.5	133 \pm 4	40	–	–	–	–	–	–
25	67 \pm 2	20	78 \pm 26	78	–	–	–	–
50	20 \pm 0.6	6	55 \pm 18	55	233 \pm 12	100	1467 \pm 318	100
100	0	0	23 \pm 8	23	–	–	–	–
200	–	–	10 \pm 3	10	–	–	–	–
300	–	–	0	0	233 \pm 12	100	1467 \pm 318	100

a – Values are in $\mu\text{equiv e}^- \text{mg}^{-1} \text{Chl}$.

b – Values are in percentage.

the electron transport chain beyond the pheophytin site [37], between Q_A and Q_B of PS II, at the D1 protein by displacing Q_B , similar to how DCMU herbicide acts. The mechanism of action of **2** and **3** is similar to other natural products like trachyloban-19-oic acid [44] and flindersine [45].

Uncoupled PS I electron transport rate was measured by polarography from reduced DCPIP to MV using increasing concentrations of the flavonoids **2** and **3**, in order to find if they affect this photosystem. The results showed that the rate for control and treated samples were similar, therefore the flavonoids do not interact with PS I electron transport chain (Table 1).

To corroborate the behavior of **1** and **2** as uncouplers, their effects at increasing concentrations (100, 200 and 300 μM) on the light-activated Mg^{2+} -ATPase bound to thylakoid membranes was determined; and using ammonium chloride as positive control, both compounds enhanced this activity (Table 2), indicating that they affect the ΔpH and thus avoiding the ATP formation as uncouplers done. However, with concentrations of **2** at 200 and 300 μM the phosphorylating and uncoupled electron flows were inhibited, thus **2** at low concentrations behaved as an uncoupler and at higher concentrations as an inhibitor of the Hill reaction (Fig. 4B).

3.4. Chlorophyll *a* fluorescence measurements

To corroborate the inhibition site of **2** and **3** on the photosynthetic electron flow, their effects on Chl *a* fluorescence were measured on freshly lysed chloroplasts. Typical Chl *a* polyphasic fluorescence rise O-J-I-P obtained from the control sample similar to those previously described for plants, green algae, and cyanobacteria [39] were plotted on a logarithmic time-scale (Fig. 5A and C) and were compared with those exhibited with different concentrations of flavonoids **2** and **3** (Fig. 5A and C). The F_0 value was increased with all treatments, with the exception of 50 μM of **3** (Table 3) and the F_M levels of the chloroplasts treated with **2** and **3** decreased compared with the control. Furthermore, the maximal quantum yield of PS II primary photochemistry is given by $F_V/F_M = 1 - F_0/F_M$, an important and easily measurable parameter of the physiological state of the photosynthetic apparatus; when the PS II efficiency is affected this values decreased [46,47] as is shown in Table 3.

Chlorophyll *a* fluorescence transients obtained with **2** and **3**, were normalized using the equation $V_t = (F_t - F_0)/F_M - F_0$. The difference between the ones treated with **2** minus the control normalized transients plotted versus time showed an increase in intensity between 2 and 30 ms, called J-band (Fig. 5B). This band also appears in the presence of compound **3** (Fig. 5D) indicating that

Table 2

Effect of flavonoids **1** and **2**, and NH_4Cl on Mg^{2+} -ATPase bound to thylakoids membranes.

Compound	$\mu\text{M Pi} \times \text{mg}^{-1} \text{Chl} \times \text{h}^{-1}$	Activity (%)
1 (μM)		
0	106 \pm 5.03	100
100	179 \pm 1.53	169
200	188 \pm 7.50	177
300	221 \pm 9.50	208
2 (μM)		
0	106 \pm 5.03	100
100	187 \pm 7.54	176
200	164 \pm 6.03	155
300	114 \pm 5.57	108
NH_4Cl (mM)		
0	111 \pm 7.09	100
1	196 \pm 5.13	178
2	218 \pm 15.87	196
3	305 \pm 27.83	275

these flavonoids affected the acceptor side of PS II in a similar manner as DCMU does [40].

3.5. Chlorophyll *a* fluorescence determination in intact leaves in vivo

The effects of the flavonoids **1**, **2** and **3** on the chlorophyll *a* fluorescence were measured on leaves of plants treated 24, 48 and 72 h after the aspersion and compared with the control. The chlorophyll *a* fluorescence transients obtained from the treated leaves were similar to those obtained from the control (data not shown). These results indicated that the compounds probably did not penetrate the plant leaves, or they did not affect the photosynthesis apparatus of the assayed plants, this inactivity was reflected in the dry biomass measurements, which were unaffected by any flavonoid in any plant studied (data not shown).

3.6. Pre-emergence bio-assays. Effect on seed germination and seedling growth

To investigate if compounds **1–3** behave as potential pre-emergent herbicides they were evaluated on seed germination and growth (root and shoot lengths) of the dicotyledonous *P. ixocarpa* and monocotyledonous *L. perenne* and *E. crus-galli* seedling. Flavonoids **1–3** at concentrations of 100, 200 and 300 μM did not affect the germination of *P. ixocarpa* seeds, since the significance *p* values were ≥ 0.5 (Fig. 6A). Root length of *P. ixocarpa* seedlings increased by 48%, 24% and 4% with **3** at 100, 200 and 300 μM respectively; **1** at 200 and 300 μM enhanced root length by 21%

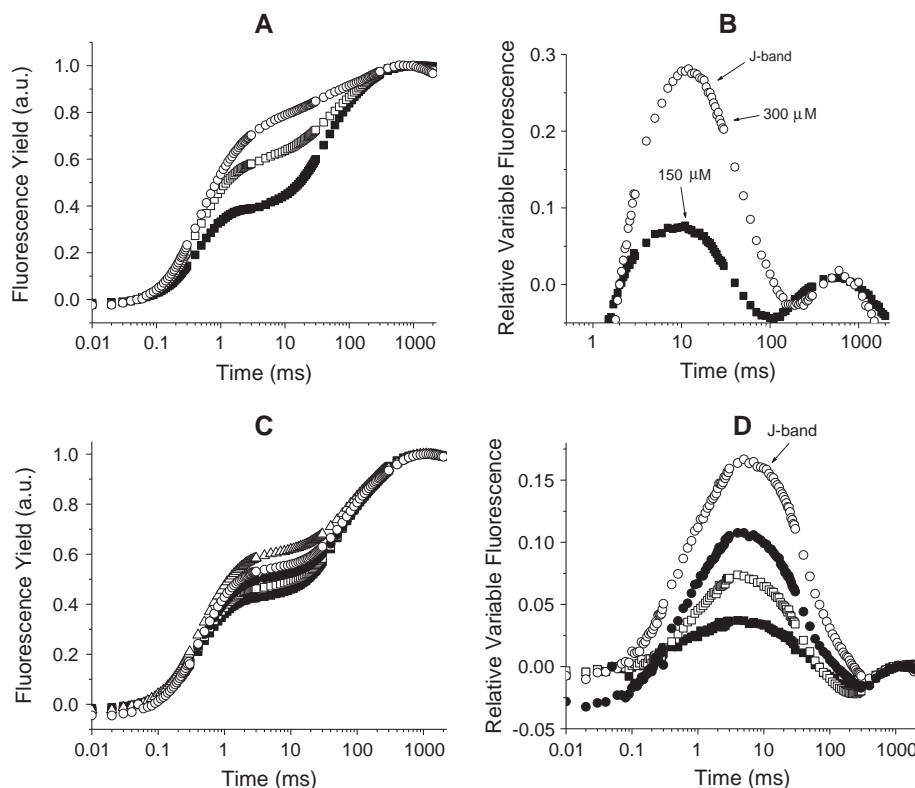


Fig. 5. (A) Effect of 150 (□) and 300 μM (○) of **2** compared on OJIP transients doubled normalized in F_1 and F_M compared with the control (■), and with **3** at 50 (□), 100 (●), 250 (○) and 500 μM (△) of compared with the control (■) (Panel C). Appearance of the J-band with thylakoids infiltrated with **2** at 150 (■) and 300 μM (○) (Panel B) and with **3** at 50 (■), 100 (□), 250 (●) and 500 μM (○) (Panel D). Each curve is the average of four replicates.

Table 3
Experimental average of chlorophyll *a* fluorescence transients obtained for the control and treated chloroplasts with flavones **2** and **3**. The data are the result of four replicates ± standard deviation.

Comp (μM)	F_0	F_M	$F_K = F_{(0.3ms)}$	$F_J = F_{(2ms)}$	$F_I = F_{(30ms)}$	F_V/F_M
Control	382 ± 4.8	1740 ± 9.1	456 ± 8.8	608 ± 14.2	1007 ± 11.4	0.78
2						
150	485 ± 3.0	1780 ± 47.5	789 ± 9.0	1228 ± 20.5	1436 ± 37.5	0.729
300	479 ± 39.3	1488 ± 48.4	748 ± 60.6	1156 ± 57.6	1338 ± 52.0	0.677
Control	462 ± 21.5	1948 ± 16.1	735 ± 33.2	1106 ± 28.6	1324 ± 15.9	0.763
3						
50	459 ± 8.6	1811 ± 22.1	725 ± 15.1	1091 ± 19.7	1265 ± 20.1	0.746
100	500 ± 17.8	1850 ± 40.5	772 ± 40.7	1168 ± 45.0	1332 ± 49.3	0.73
250	515 ± 27.1	1842 ± 82.7	785 ± 54.6	1223 ± 39.7	1374 ± 55.1	0.72
500	576 ± 8.9	1917 ± 47.0	909 ± 16.2	1362 ± 23.5	1513 ± 20.0	0.699

and 28%, respectively. These stimulatory effects on the root length produced by **1** and **3** can be hormesis; compounds such as pesticides normally used as toxicants, at higher doses, can be stimulatory or even beneficial at low doses [48]. Furthermore, **1** and **3** at 300 μM inhibited the shoot length by 24% and 28%, respectively, with *p* values < 0.05.

In Fig. 6B the effects of **1–3** on *L. perenne* seeds are shown, only flavonoids **1** and **2** inhibited germination 43% and 40% at 300 μM respectively. Root elongation was inhibited 32% and 24% by **2** and **3** at 200 μM; and the three compounds inhibited this activity at 300 μM, acacetin being the most active with 43% of inhibition. While flavonoid **1** inhibited shoot length of *L. perenne* by 32% and 39% at 200 and 300 μM. Because flavones inhibited in a higher degree the germination and growth of *L. perenne* seedlings, they were assayed on *E. crus-galli* seeds. These flavones did not inhibit the germination of *E. crus-galli* (Fig. 6C), however **1** at 200 and 300 μM inhibited the root elongation in 29% and 30% respectively;

3 was the most active inhibitor of root and shoot elongation, 57% and 44% at 300 μM.

4. Conclusions

Acacetin (**1**), chrysin (**2**) and 4',7-dimethylnarangenin (**3**) were isolated From the ethanolic extract of propolis collected in the rural zone of Mexico City.

Previous works have demonstrated that the different biological activities from ethanolic propolis extracts are due to their chemical composition, which is mainly due to the local flora [49]. The presence of acacetin (**1**), chrysin (**2**) and 4',7-dimethylnarangenin (**3**) suggest that their main botanical sources are pines as *Pinus montezumae*, shrubs as *Buddleja cordata* and *Populus* (*Populus mexicana* Wesmael, *Populus guzmanantlensis* Vazques & Cuevas, *Populus simaroa* Rzedowski) [50]. Although flavonoids without B ring

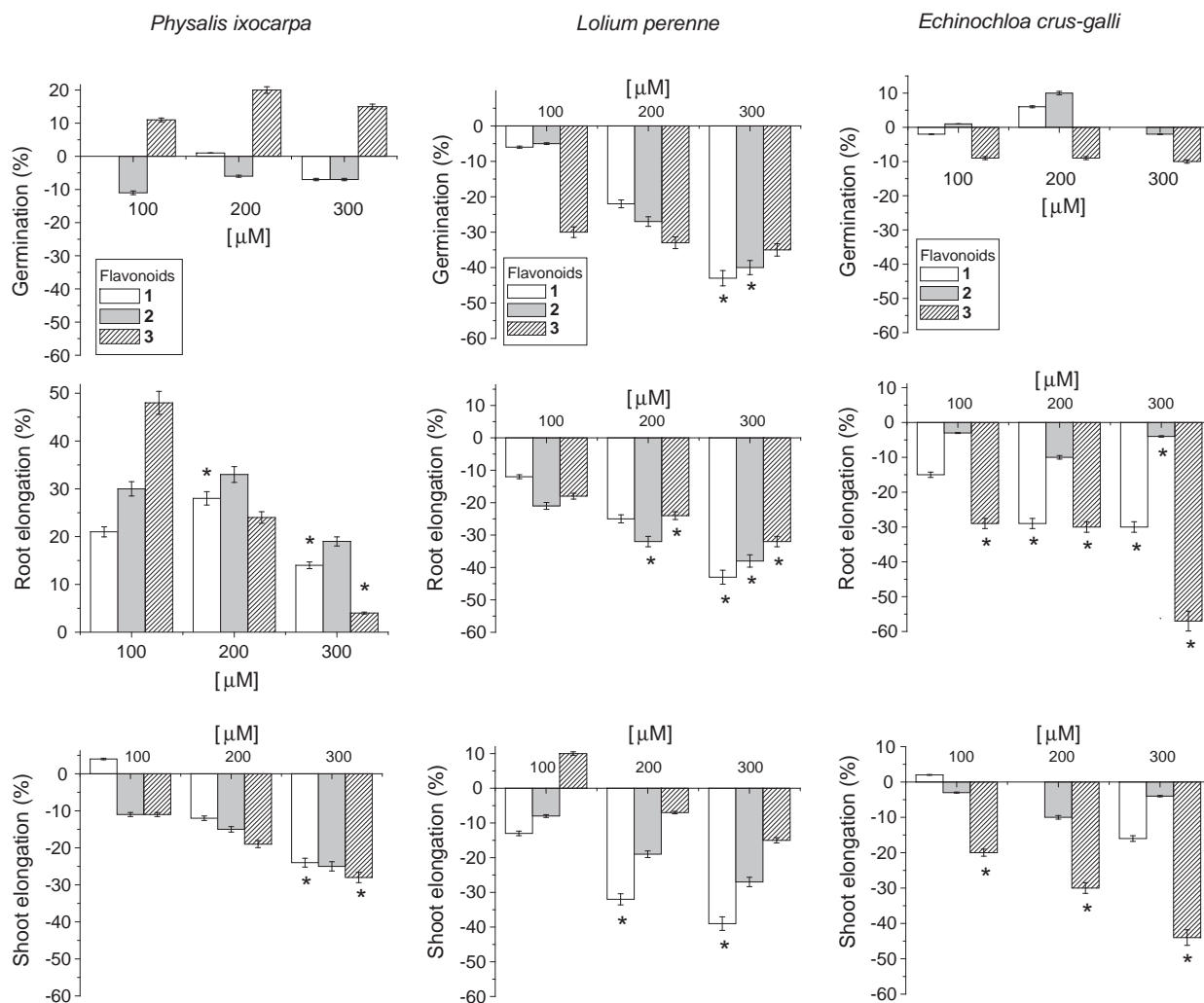


Fig. 6. Effect of flavonoids **1**, **2** and **3** at 100, 200 and 300 μM on germination and growth (root and shoot lengths) of *P. ixocarpa* (Panel A), *L. perenne* (Panel B) and *E. crus-galli* (Panel C). Average values are presented as percentage and their control value is 0% and is equal in average to 34 germinated seeds for *P. ixocarpa*, 31 for *L. perenne* and 35 for *E. crus-galli*. Positive values means that the seedling or germination increased more than control (e.g., +11% is 11% additional compared with the control = 100%). Negative values indicate inhibition (e.g., -11% is 89% of growth inhibited compared with the control = 100%). Asterisk on and under the columns means that the significance p values are <0.05 , values obtained with Bonferroni correction and means that are significantly different vs. control. Data are average of three replicates.

substituents appear as common in temperate propolis from both the northern and southern hemispheres, in this study we concluded the presence of acacetin (**1**) and 4',7-dimethylnarangenin (**3**) with B-ring substitution as a constituents of Mexican poplar propolis.

The results *in vitro* indicated that **1–3** inhibited the photophosphorylation in fresh lysed chloroplasts, being **2** the most potent inhibitor. Assays on electron flow showed that flavonoid **1** behaved as an uncoupler and **2** at low concentrations also behaved as an uncoupler, however **2** at concentrations up to 100 μM behaved as a Hill reaction inhibitor. On the other hand, compound **3** inhibited the electron transport in all conditions assayed at concentration dependent manner. The inhibition site of flavonoids **2** and **3** was localized on the acceptor side of PS II; in a similar manner as DCMU does. These results were corroborated with Chl *a* fluorescence measurements on isolated freshly lysed chloroplasts.

Compounds **1–3** did neither affect the chlorophyll *a* fluorescence *in vivo* assays nor the dry biomass of plants, indicating that these compounds probably did not penetrate the plants leaves or not reached their action target, so further experiments must be

carried out searching for suitable adjuvant that will allow the flavonoids to penetrate the plant and reach their action target.

In germination assays acacetin (**1**), chrysin (**2**) and 4',7-dimethylnarangenin (**3**) did not affect the germination of *P. ixocarpa*, however **1** and **3** inhibited partially the shoot length of this plant (24% and 28% respectively) at 300 μM . On monocotyledonous seeds, the flavonoids **1** and **2** inhibited the germination of *L. perenne* seeds at 300 μM but not the *E. crus-galli* germination. The root and shoot elongation of *L. perenne* and *E. crus-galli* were inhibited with **1** and **3** respectively, being **3** the most active.

These results show that flavonoids interfere with the photosynthetic electron flow and with the plant growth process (root and shoot development). The mechanism, by which the compounds affect the root and shoot elongation with specificity on monocotyledonous seedlings, is unknown, so thus therefore future experiments will be needed to clarify this point. These flavonoids are one more example of natural products that inhibit several physiological processes and enzymes in plants, like sorgoleone (an allelochemical exuded from the roots of *sorghum*) which inhibits the growth of large crabgrass seedlings (*Digitariasanguinalis* (L.) Scop.) and the root growth of velvetleaf (*Abutilon theophrasti*

Medikus) as well as the photosynthetic electron transport in thylakoids by competing for the plastoquinone binding site on photosystem II [51].

This is the first work describing the phytotoxic activity of Mexican propolis.

Acknowledgments




The authors are grateful for the financial support from DGAPA–UNAM Grants, PAPIIT number IT102012-3 and PAIP number 4290-03 and 5000-9138 from the UNAM Faculty of Chemistry.

References

- [1] S. Castaldo, F. Capasso, Propolis, an old remedy used in modern medicine, *Fitoterapia* 73 (2002) S1–S6.
- [2] V.S. Bankova, S.L. de Castro, M.C. Marcucci, Propolis: recent advances in chemistry and plant origin, *Apidologie* 31 (2000) 3–15.
- [3] M. Kartal, S. Yildiz, S. Kaya, S. Kurucu, G. Topcu, Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia, *J. Ethnopharmacol.* 86 (2003) 69–73.
- [4] A. Kujumgiev, I. Tsvetkova, Y. Serkedjieva, V. Bankova, R. Christov, S. Popov, Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin, *J. Ethnopharmacol.* 64 (1999) 235–240.
- [5] M. Amoros, E. Lurton, J. Boustie, L. Girre, F. Sauvager, M. Cormier, Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methylbut-2-enyl caffeate, *J. Nat. Prod.* 57 (1994) 644–647.
- [6] L. Wang, S. Mineshita, I. Ga, T. Shigematsu, T. Matsuno, Antiinflammatory effect of propolis, *Jpn. J. Pharmacol.* 74 (1993) 223–224.
- [7] E. Strehl, R. Volpert, E.F. Elstner, Biochemical activities of propolis extracts. III. Inhibition of dihydrofolate reductase, *Z. Naturforsch.* 49c (1994) 39–43.
- [8] Y. Ozkul, S. Silici, E. Eroglu, The anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes culture, *Phytomedicine* 12 (2005) 742–747.
- [9] T. Matsuno, A new clerodane diterpenoid isolated from propolis, *Z. Naturforsch.* 50c (1995) 93–97.
- [10] N. Oršolic, S. Terzic, Z. Mihaljevic, L. Šver, I. Bašić, Effects of local administration of propolis and its polyphenolic compounds on tumor formation and growth, *Biol. Pharm. Bull.* 28 (2005) 1928–1933.
- [11] S. Scheller, W. Krol, J. Swiacik, S. Owczarek, J. Gabris, J. Shani, Antitumor property of ethanolic extract of propolis in mice-bearing Ehrlich carcinoma, as compared to bleomycin, *Z. Naturforsch.* 44c (1989) 1063–1065.
- [12] C. Chen, M. Weng, C. Wu, J. Lin, Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 1 (2004) 175–178.
- [13] M.I. Nieva Moreno, M.I. Isla, A.R. Sampietro, M.A. Vattuone, Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina, *J. Ethnopharmacol.* 71 (2000) 109–114.
- [14] J.M. Murad, S.A. Calvi, A.M.V.C. Soares, V. Bankova, J.M. Sforcin, Effect of propolis from Brazil and Bulgaria in fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*, *J. Ethnopharmacol.* 79 (2002) 331–334.
- [15] M. Gonnet, P. Lavie, Action antigermative des produits de la ruche d'abeilles (*Apis mellifica* L.) sur les graines et les tubercules, *C. r. hebdom. Séanc. Acad. Sci. Paris* 250 (1960) 612–614.
- [16] M. Gonnet, Propriétés phytoinhibitrices de quelques substances extraites de la colonie d'abeilles (*Apis mellifica* L.). I. Action sur la croissance de *Lactuca sativa*, *Annls. Abeille* 11 (1968) 41–47.
- [17] A. Derevici, A. Popesco, N. Popesco, Recherches sur certaines propriétés biologiques de la propolis, *Annls. Abeille* 7 (1964) 191–200.
- [18] A. Derevici, A. Popesco, N. Popesco, Biological properties of propolis, *Rev. Pathol. Comp.* 2 (1965) 21–24.
- [19] C.C. Fernandes-Silva, C.A. Lima, G. Negri, M.L.F. Salatino, A. Salatino, M.A.S. Mayworm, Composition of the volatile fraction of a sample of Brazilian green propolis and its phytotoxic activity, *J. Sci. Food Agric.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.7045>.
- [20] J.S. Bonvehí, F.V. Coll, R.E. Jorda, The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71 (1994) 529–532.
- [21] S. Kumazawa, T. Hamasaka, T. Nakayama, Antioxidant activity of propolis of various geographic origins, *Food Chem.* 84 (2004) 329–339.
- [22] M.-R. Ahn, S. Kumazawa, T. Hamasaka, K.-S. Bang, T. Nakayama, Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 7286–7292.
- [23] M.-R. Ahn, S. Kumazawa, Y. Usui, J. Nakamura, M. Matsuka, F. Zhu, T. Nakayama, Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China, *Food Chem.* 101 (2007) 1383–1392.
- [24] C.L. Céspedes, L. Achñine, B. Lotina-Hennsen, J.R. Salazar, F. Gómez-Garibay, J.S. Calderón, Inhibition of photophosphorylation and electron transport by flavonoids and biflavonoids from endemic *Tephrosia* spp. of Mexico, *Pesticide Biochem. Physiol.* 69 (2001) 63–76.
- [25] R. González-Vázquez, B. King-Díaz, M.I. Aguilar, N. Diego, B. Lotina-Hennsen, Pachypodol from *Croton ciliatoglanduliferus* Ort. as water-splitting enzyme inhibitor on thylakoids, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 1217–1221.
- [26] N.C. Cook, S. Samman, Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *Nutr. Biochem.* 7 (1996) 66–76.
- [27] J. Peterson, J. Dwyer, Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity, *Nutr. Res.* 12 (1998) 1995–2018.
- [28] D. Patel, S. Shukla, S. Gupta, Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise (review), *Int. J. Oncol.* 30 (2007) 233–245.
- [29] E. Szliszka, W. Król, The role of dietary polyphenols in tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis for cancer prevention, *Eur. J. Cancer Prev.* 20 (2011) 63–69.
- [30] T.A.M. Veiga, B. King-Díaz, A.S.F. Marques, O.M. Sampaio, P.C. Vieira, M.F.G.F. da Silva, B. Lotina-Hennsen, Furoquinoline alkaloids isolated from *Balfourodendron riedelianum* photosynthetic inhibitors in spinach chloroplasts, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* (2013).
- [31] J.D. Mills, P. Mitchell, P. Schurrmann, Modulation of coupling ATPase activity in intact chloroplasts, *FEBS Lett.* 91 (1980) 144–148.
- [32] H.H. Strain, B.T. Cope, W.A. Svec, Analytical procedures for the isolation, identification, estimation and investigation of the chlorophylls, *Methods Enzymol.* 23 (1971) 452–266.
- [33] R.A. Dille, Ion transport (H^+ , K^+ , Mg^{2+} exchange phenomena), *Methods Enzymol.* 24 (1972) 68–74.
- [34] M.I. Aguilar, M.G. Romero, M.I. Chávez, B. King-Díaz, B. Lotina-Hennsen, Biflavonoids isolated from *Selaginella lepidophylla* inhibit photosynthesis in spinach chloroplasts, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 6994–7000.
- [35] I. Yruela, G. Montoya, P.J. Alonso, R. Picorel, Identification of the pheophytin-QA-Fe domain of the reducing side of the photosystem II as the Cu(II)-inhibitory binding site, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 22847–22850.
- [36] R.T. Guaiquinta, R.A. Dille, A partial reaction in photosystem II: reduction of 224 silicomolybdate prior to the site of dichlorophenyldimethyl-urea inhibition, *Biochim. Biophys. Acta* 387 (1975) 288–305.
- [37] J.F. Allen, N.G. Holmes, Electron transport partial reactions, in: M.F. Hipkinns, N.R. Baker (Eds.), *Photosynthesis, Energy Transduction. A Practical Approach*, I. R.L. Press, Oxford, United Kingdom, 1986, pp. 103–141 (Chapter 5).
- [38] J.B. Sumner, Scientific apparatus and laboratory methods. A method for the colorimetric determination of phosphorus, *Science* 100 (1944) 413–418.
- [39] R.J. Strasser, A. Srivastava, Govindjee, Polyphasic chlorophyll a fluorescence transients in plants and cyanobacteria, *Photochem. Photobiol.* 61 (1995) 32–42.
- [40] R.J. Strasser, M. Tsimilli-Michael, A. Srivastava, Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient, in: G.C. Papageorgiou, Govindjee (Eds.), *Chlorophyll Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 2004, pp. 321–362 (Chapter 12).
- [41] M. González-Ibarra, N. Farfán, C. Trejo, S. Uribe, B. Lotina-Hennsen, Selective herbicide activity of 2,5-di(benzylamine)-p-benzoquinone against the monocot weed *Echinochloa crus-galli*. An *in vivo* analysis of photosynthesis and growth, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 3415–3420.
- [42] Y. Komoda, Isolation of flavonoids from *Populus nigra* Δ4-3-ketosteroid (5α) reductase inhibitors, *Chem. Pharm. Bull.* 37 (1989) 3128–3130.
- [43] B. Rivero-Cruz, A. Martínez-Chávez, Development and validation of a RP-HPLC method for the simultaneous quantification of flavonoids markers in Mexican propolis, *Food Anal. Methods* 8 (2015) 413–419.
- [44] M.G. Hernández-Terrones, M.I. Aguilar, B. King-Díaz, B. Lotina-Hennsen, Inhibition of photosystem II in spinach chloroplasts by trachyloban-19-oic acid, *Pesticide Biochem. Physiol.* 77 (2003) 12–17.
- [45] T.A.M. Veiga, R. González-Vázquez, P.A.C. Braga, M.F.G.F. Silva, B. King-Díaz, B. Lotina-Hennsen, Alkaloids isolated from *Hortia superba*, (Rutaceae) interact with spinach thylakoids inhibiting the electron transport chain, *Allelopathy J.* 21 (2008) 133–144.
- [46] C. Neubauer, U. Schreiber, The polyphasic rise of chlorophyll fluorescence upon onset of strong continuous illumination: I. Saturation characteristics and partial control by the photosystem II acceptor side, *Z. Naturforsch.* 42c (1987) 1246–1254.
- [47] M. Kitajima, W.L. Butler, Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone, *Biochim. Biophys. Acta* 376 (1975) 105–115.
- [48] S.O. Duke, N. Cedergreen, E.D. Velini, R.G. Belz, Hormesis: is it an important factor in herbicide use and allelopathy, *Outlooks Pest Manage.* 17 (2006) 29–33.
- [49] J.M. Sforcin, A. Fernandes Jr., C.A.M. Lopes, V. Bankova, S.R.C. Funari, Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity, *J. Ethnopharmacol.* 73 (2000) 243–249.
- [50] G.T. Slavov, P. Zhelev, Salient biological features, systematics, and genetic variation of *Populus*, in: G.T. Slavov, P. Zhelev (Eds.), *Genetics and Genomics of Populus: Crops and Model*, vol. 8, Springer-Verlag, New York, 2010, pp. 15–38.
- [51] F.E. Dayan, C.L. Cantrell, S.O. Duke, Natural products in crop protection, *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 4022–4034.

Article

Effect of Pinocembrin Isolated from Mexican Brown Propolis on Diabetic Nephropathy

Jessica Granados-Pineda ^{1,†} , Norma Uribe-Urbe ², Patricia García-López ³,
María del Pilar Ramos-Godínez ⁴, J. Fausto Rivero-Cruz ^{1,*}  and
Jazmin Marlen Pérez-Rojas ^{3,*} 

¹ Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 Ciudad de México, Mexico; jessygp@hotmail.com

² Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán S.S., 14080 Ciudad de México, Mexico; nofelauribe@yahoo.com.mx

³ Subdirección de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología, 14080 Ciudad de México, Mexico; pgracia_lopez@yahoo.com.mx

⁴ Departamento de Patología Quirúrgica, Instituto Nacional de Cancerología, 14080 Ciudad de México, Mexico; pilyrg@gmail.com

* Correspondence: jazminmarlen@gmail.com (J.F.R.-C.); joserc@unam.mx (J.M.P.-R.);

Tel.: +52-55-5628-0400 (ext. 32085) (J.F.R.-C.); +52-55-5622-5281 (J.M.P.-R.); Fax: +52-55-5622-5283 (J.F.R.-C.)

† Taken in part from the PhD thesis of J. Granados-Pineda.

Received: 5 March 2018; Accepted: 27 March 2018; Published: 9 April 2018



Abstract: Propolis is a resinous beehive product that has been used worldwide in traditional medicine to prevent and treat colds, wounds, rheumatism, heart disease and diabetes. Diabetic nephropathy is the final stage of renal complications caused by diabetes and for its treatment there are few alternatives. The present study aimed to determine the chemical composition of three propolis samples collected in Chihuahua, Durango and Zacatecas and to evaluate the effect of pinocembrin in a model of diabetic nephropathy in vivo. Previous research demonstrated that propolis of Chihuahua possesses hypoglycemic and antioxidant activities. Two different schemes were assessed, preventive (before renal damage) and corrective (once renal damage is established). In the preventive scheme, pinocembrin treatment avoids death of the rats, improves lipid profile, glomerular filtration rate, urinary protein, avoid increases in urinary biomarkers, oxidative stress and glomerular basement membrane thickness. Whereas, in the corrective scheme, pinocembrin only improves lipid profile without showing improvement in any other parameters, even pinocembrin exacerbated the damage. In conclusion, pinocembrin ameliorates diabetic nephropathy when there is no kidney damage but when it is already present, pinocembrin accelerates kidney damage.

Keywords: pinocembrin; propolis; diabetic nephropathy; renal failure; diabetes

1. Introduction

Around the world there are 425 million people that have diabetes mellitus [1]. According to Chronic Disease Survey of 2016, there was a 9.4% prevalence rate of diabetes in Mexicans from 20–65 years of age [2]. Diabetes is second cause of death in Mexico and has shown an increasing tendency over the past half century [3].

Diabetic nephropathy (DN) is the most important vascular long-term complication of diabetes and it is the leading cause of end stage renal disease in the western societies [4]. In Mexico, retinopathy is the most frequent complication, nevertheless DN represent the major expenditure in health care systems because of the costs of peritoneal dialysis and hemodialysis [5]. The main features of DN are persistent urinary protein, hypertension and progressive renal function loss [6].

The main treatment for DN is glycemic, hypertension and dyslipidemia control and/or the use of renin-angiotensin-aldosterone blockers, mainly for the prevention of microalbuminuria and reduction of cardiovascular mortality [7]. Unfortunately, the drugs cause undesirable side effects and the patients still reach end stage renal disease [8]. For this reason, it is necessary to find alternatives to prevent the early appearance of DN and to stop its progression.

Traditional Medicine continues to be the most used alternative by the population, such as propolis. Propolis (bee glue), a sticky dark-colored hive product collected by bees from living plant sources, is well known to possess pharmacological activities such as antibacterial, antifungal, antioxidant, antitumoral and anti-inflammatory [9]. It has been used in folk medicine as early as 300 B. C. Egyptians used it as an ingredient in the formula employed to embalm cadavers. Greek, Roman and Arab physicians also used it as an antiseptic and to treat wounds. Incas employed it as anti-pyretic agent and in seventeenth century this natural product was listed as an official drug in London pharmacopoeias [9–11]. In recent years, it has gained popularity as a health drink and is used extensively in food and beverages in various parts of the world where is claimed to improve human health and to prevent diseases such as diabetes and cancer [12].

To date, at least 300 compounds have been identified in different propolis samples [11]. This complex mixture contains a variety of chemical compounds such as flavonoid aglycones, phenolic acids and their esters, phenolic aldehydes, alcohols, ketones, sesquiterpenes, coumarins, steroids, amino acids and inorganic compounds [13]. The results revealed that the propolis composition depends on the geographical variations and is strongly related with the flora surrounding the hive [11]. In general, propolis composition is related to that of the bud exudates collected by honeybees from poplar, birch, beech, horse chestnut, alder and conifer trees [14]. The main constituents of propolis in North America are flavonoids and phenolic acid esters [15].

In Mexico propolis is prepared in several forms, including syrups, tinctures and creams as alternative to improve health and prevent diseases, however data about the chemical composition and biological activity of Mexican propolis are limited [15–20]. There are reports of the chemical composition of propolis from Sonora [15,16], Yucatán [17,19], Quintana Roo [18,19], Chiapas [19] and Chihuahua [20], in which flavonoids, terpenoids, phenolic acids and their esters have been isolated and identified. The reported biological activity for Mexican propolis is antibacterial [15,18], anticancer [16], antifungal [18], antioxidant [18,19], anti-inflammatory [19] and hypoglycemic [20]. Nevertheless, Mexico has a wide range of weather and flora, which have an impact on propolis composition.

In the last decade, it has been proposed that propolis has an antihyperglycemic effect and might prevent biochemical and structural alterations in animal models and in diabetic patients [21–24]. The main reported flavonoids in temperate propolis are pinocembrin, galangin and chrysin [11]. The flavonoids quercetin and chrysin have been demonstrated to diminish the severity of renal injury by decreasing the expression of inflammatory cytokines involved in the progression of DN [8,25]. Pinocembrin is found in plants and in propolis, where is considered the marker compound of poplar type propolis [11]. It has neuroprotective, anti-inflammatory, hepatoprotective, antihyperlipidemic and vasorelaxant properties [26].

To our knowledge, this is the first study on the chemical composition of propolis collected in the North of Mexico and on the effect of pinocembrin on renal function in streptozotocin-induced diabetic rats.

2. Results

2.1. Isolation of Flavonoids from EEP Samples of Propolis

The studied propolis samples were collected in the North of Mexico (Durango, Chihuahua, Zacatecas).

Durango's EEP yielded pinocembrin (1), pinobanksin (2) and chrysin (3); Zacatecas' EEP gave pinocembrin (1), isorhamnetin (4), pinobanksin-5-methylether (5) alpinetin (6). Chihuahua's

EEP yielded pinocembrin (1), alpinone (7), pinostrobin (8), galangin-5-methylether (9) and kaempferide (10).

2.2. Total Phenolics and Total Flavonoids of the EEP Samples

The content of total phenolics in EEP samples ranged between 109 ± 2 and 139 ± 1 mg eq. GA/g extract. While the content of total flavonoids was between 70 ± 1 and 90 ± 2 mg eq. Q/g extract (Table 1).

Table 1. Antioxidant Capacity of EEP Samples.

EEP Sample	Total Phenolics mg eq. GA/g Extract	Total Flavonoids mg eq. Q/g Extract	DPPH TE/g Extract	FRAP TE/g Extract	β -Carotene Bleaching Assay %AA
Durango	139 ± 1	90 ± 2	1145 ± 10	20 ± 1	46 ± 13
Zacatecas	109 ± 2	70 ± 1	1098 ± 22	13 ± 1	49 ± 5
Chihuahua	126 ± 3	71 ± 2	975 ± 33	21 ± 1	39 ± 8

2.3. Antioxidant Capacity of the EEP Samples

The antioxidant capacity of the extracts is expressed in reference to the antioxidant Trolox. The values obtained for the samples, in the DPPH bleaching assay, ranged between 975 ± 33 and 1145 ± 10 TE/g extract. The total antioxidant given by the FRAP assay ranged between 13 ± 1 and 21 ± 1 TE/g extract. For the β -carotene bleaching assay the values obtained were between 39.1 ± 7.7 and $45.9 \pm 12.5\%$ (Table 1).

Total phenolics content expressed as milligrams of equivalents of gallic acid per gram of extract (mg eq. GA/g extract). Total flavonoid content expressed as milligrams of equivalents of quercetin per gram of extract (mg eq. Q/g extract). The antiradical efficiency was calculated with DPPH bleaching assay and expressed as Trolox equivalents per gram of extract (TE/g extract). The total antioxidant capacity in the FRAP assay is given as Trolox equivalents per gram of extract (TE/g extract). The percentage of Antioxidant Activity (%AA) was measured with the β -carotene bleaching assay. Values are expressed as means \pm standard error, $n = 3$.

2.4. Effect of Pinocembrin on Body Weight, Survival and Blood Glucose

Preventive scheme represents a beginning and/or maintenance of diabetes before developing diabetic nephropathy. Figure 1A,C show body weight and glucose level in the four groups of study. Diabetic group shows significant decrease in body weight in compared to the control group. Pinocembrin treatment did not show significant effect on these parameters, despite observing slight improvements; pinocembrin partially avoided the increases of glucose levels in compared to the diabetic group. These effects are reflected in an increase of percentage of survival (Figure 1E). Corrective scheme depicts an uncontrolled diabetes or/and advanced stage of the disease, where there is already damage in renal structure. In this treatment of scheme, pinocembrin did not have effect on body weight neither in blood glucose level (Figure 1B,D). Moreover, the glycaemia increased more in the rats, which was reflected in a decrease in their survival (Figure 1F).

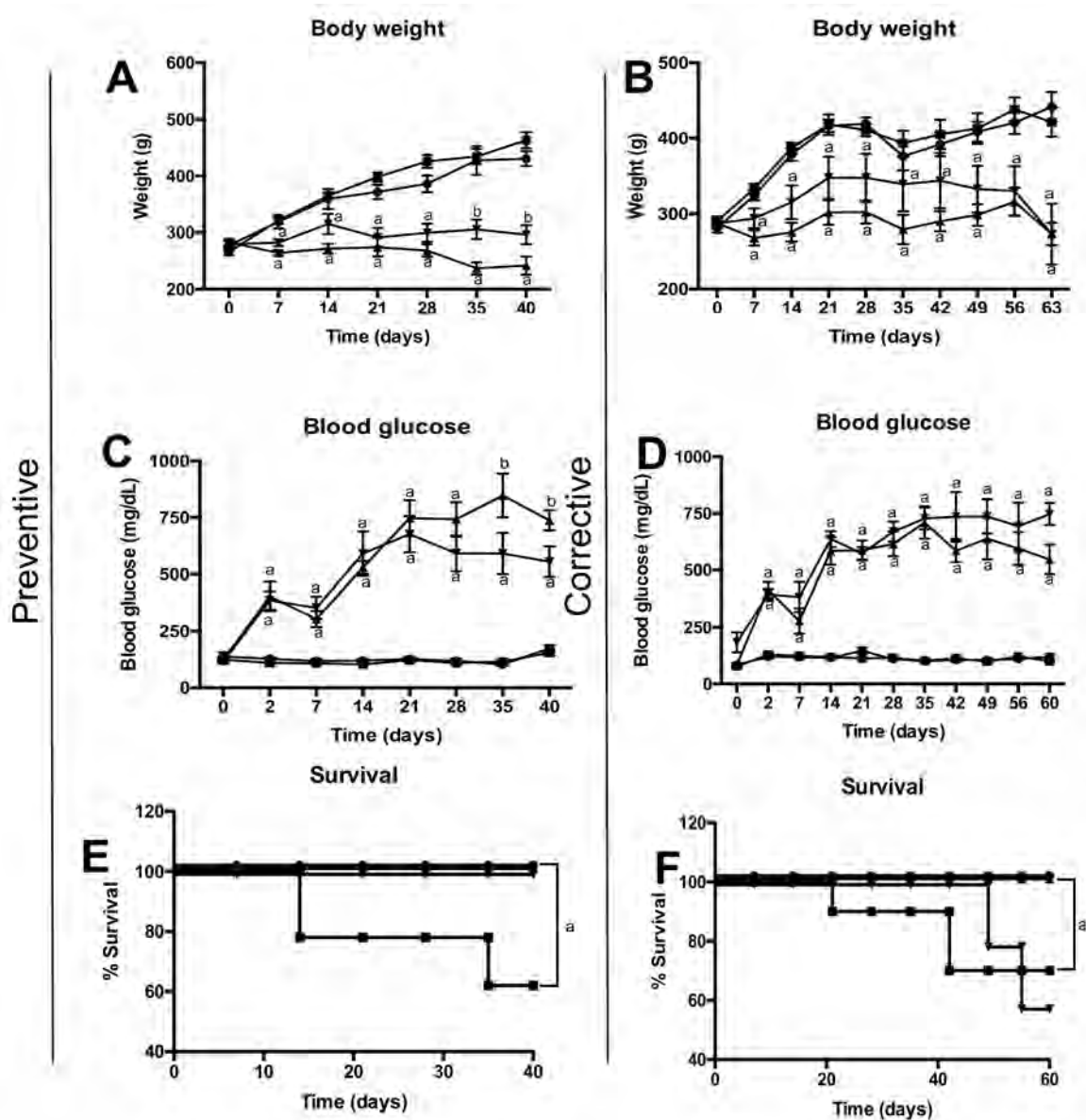
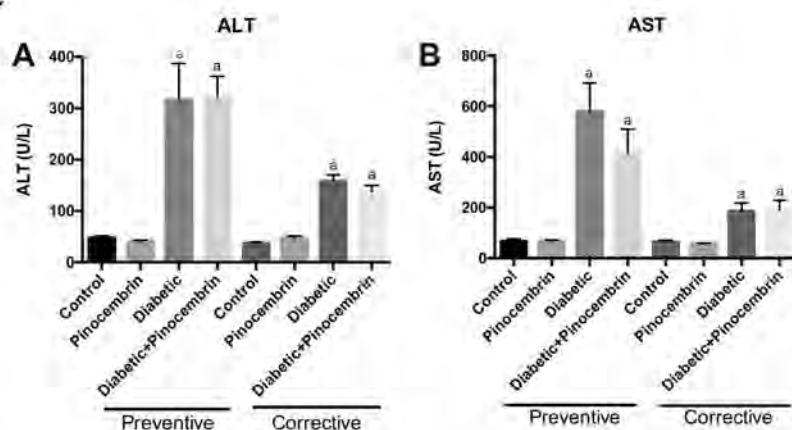


Figure 1. Metabolic parameters in preventive scheme and corrective scheme. (A) Weekly body weight monitoring in the preventive scheme; (B) Weekly body weight monitoring in the corrective scheme. (C) Weekly blood glucose monitoring in the preventive scheme; (D) Weekly blood glucose monitoring in the corrective scheme; (E) Overall survival throughout preventive scheme; (F) Overall survival throughout corrective scheme. (●) Control, (■) Pinocembrin, (▲) Diabetic, (▼) Diabetic + Pinocembrin, ^a $p < 0.05$ vs. Control, ^b $p < 0.05$ vs. Diabetic, $n = 6-10$.

2.5. Effect of Pinocembrin on the Liver

Figure 2A,B show the values of hepatic enzymes measured in both schemes. AST and ALT were quantified in serum of all groups. In both schemes, the rats administrated with streptozotocin showed an increase of these parameters in comparison with the control group. Pinocembrin could not avoid this increase.

Liver profile



Lipid profile

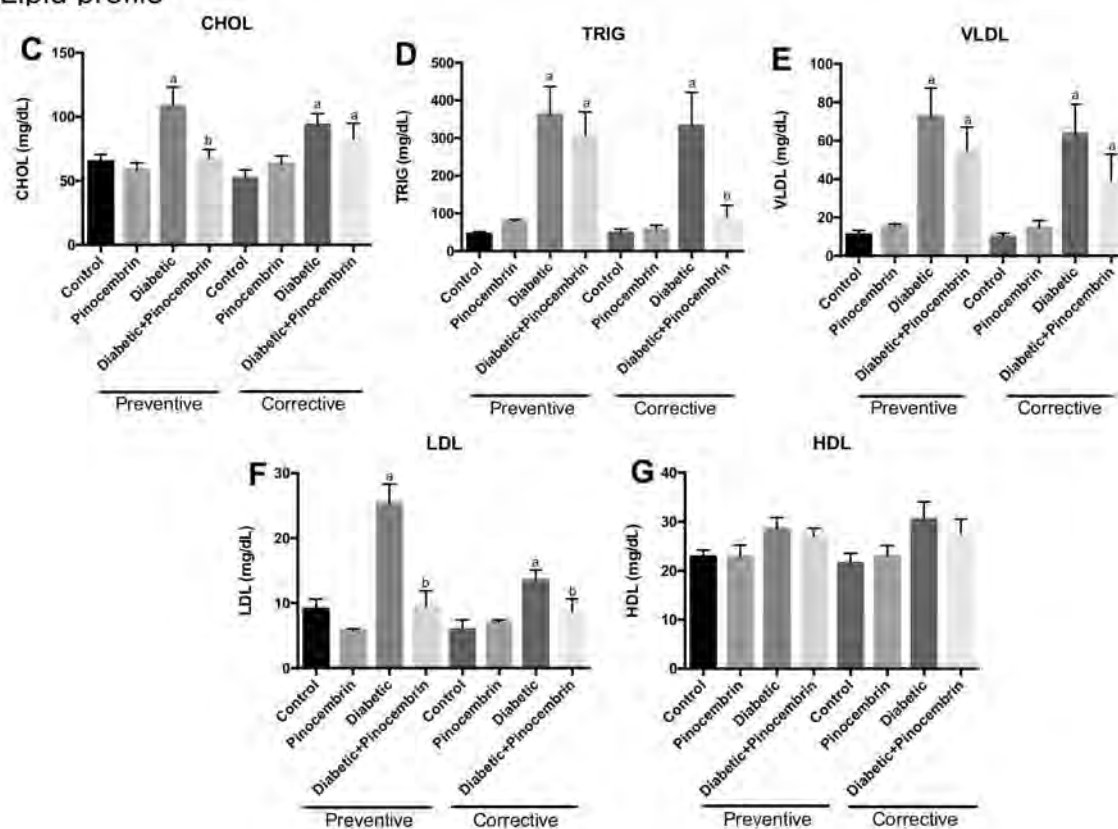


Figure 2. Hepatic profile in the schemes of treatment with pinocembrin, 40th day in the preventive scheme and 60th day in the corrective scheme. (A) Levels of ALT in preventive and corrective scheme (B) Levels of AST in preventive and corrective schemes. Lipid profile in the schemes of treatment with pinocembrin, 40th day in the preventive scheme and 60th day in the corrective scheme; (C) Cholesterol (CHOL) levels in preventive and corrective schemes; (D) Triglycerides (TRIG) levels in preventive and corrective schemes (E) Very Low Density Lipoprotein (VLDL) levels in preventive and corrective schemes (F) Low Density Lipoprotein (LDL) levels in preventive and corrective schemes (G) High Density Lipoprotein (HDL) levels in preventive and corrective schemes. ^a $p < 0.02$ vs. Control; ^b $p < 0.01$ vs. Diabetic, $n = 6-9$.

2.6. Effect of Pinocembrin on Lipids

Figure 2C–E depict the values of lipids in preventive and corrective schemes. Cholesterol, triglycerides, VLDL and LDL concentrations were significantly greater in the diabetic group in compared with the control group in both schemes; but there was no significant change in HDL. Pinocembrin administered in control group did not affect any lipid values. Administration of this compound to diabetic rats avoided the increase in most of the parameters studied in the preventive scheme. While in the corrective scheme, pinocembrin showed a significant reduction of triglycerides and LDL levels in compared to the diabetic group (Figure 2D,F).

2.7. Effect of Pinocembrin on Renal Function

Figure 3A–D show the parameters of renal function in the preventive and corrective scheme, respectively. In the preventive scheme, BUN and eGFR were significantly elevated in diabetic animals compared to the control group. This is an indication of hyperfiltration, an early sign of renal injury. Pinocembrin administered to diabetic animals was able to maintain normal eGFR, meaning that pinocembrin avoided hyperfiltration. Both urinary volume and urinary protein were significantly higher in diabetic group in compared to the control group; administration of pinocembrin to diabetic rats partially avoids that increase.

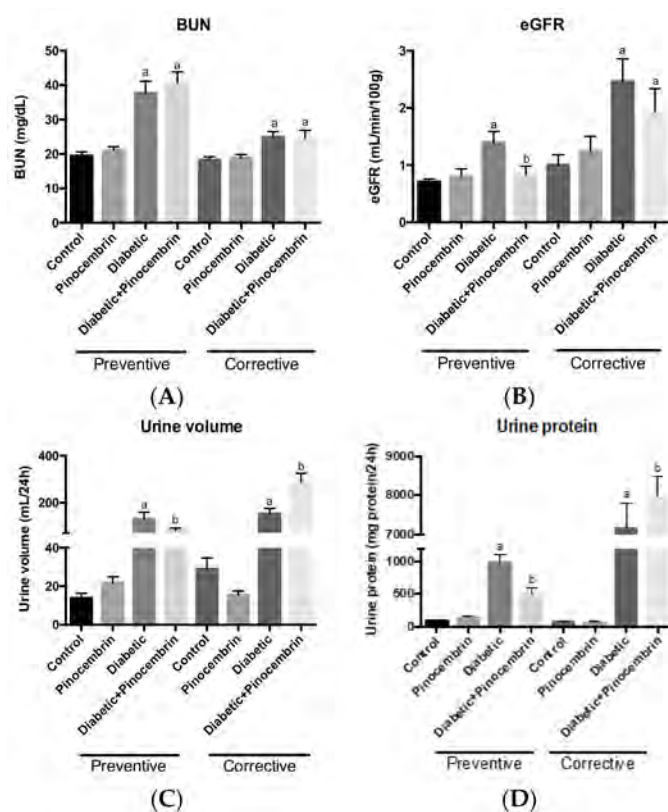


Figure 3. Kidney profile in the schemes of treatment with pinocembrin, 40th day in the preventive scheme and 60th day in the corrective scheme. (A) Blood Urea Nitrogen (BUN) levels in the preventive and the corrective schemes; (B) Estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR) in the preventive and the corrective schemes; (C) Urine volume measured in the preventive and the corrective schemes. (D) Urine protein levels in the preventive and the corrective schemes. ^a $p < 0.02$ vs. Control, ^b $p < 0.002$ vs. Diabetic, $n = 6-9$.

In the corrective scheme, a rise in BUN was observed in diabetic rats as compared to control rats. Pinocembrin could not avoid the increase in BUN in diabetic animals. There were no significant

differences in eGFR among the groups. Urinary volume and urine protein were significantly greater in the diabetic group in compared to the control group (Figure 3A–D). Pinocebrin administrated to diabetic animals seems to heighten both parameters, which suggests that pinocebrin augments renal injury.

2.8. Histopathological Analysis

In the preventive scheme, observation of PAS stain showed no histological alterations in the kidneys of control and pinocebrin group. In diabetic rats, there is a marked lobulation of the glomeruli, mesangial expansion, occlusion and vacuolization of tubules, as shown in Figure 4. In diabetic animals treated with pinocebrin, histological injury was prevented and renal morphology was similar to that in control group.

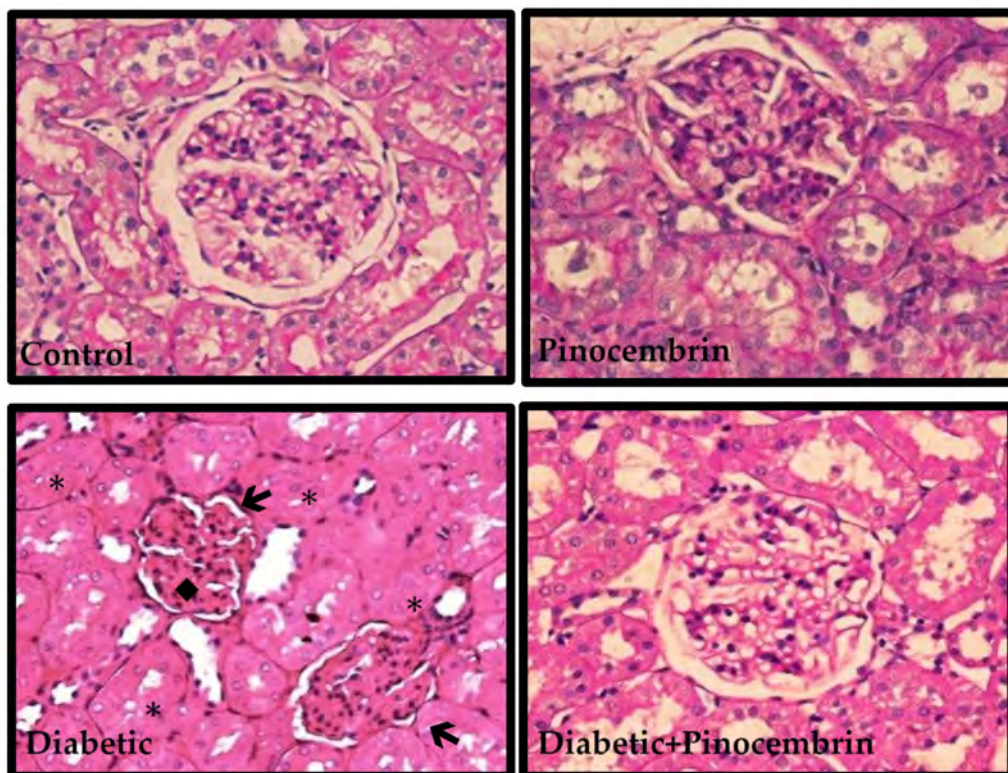


Figure 4. Representative photomicrographs of glomerulus structure in the preventive scheme. Renal structure stained with PAS. Symbols (←) Marked lobulation of the glomerulus, (◆) extracellular matrix accumulation, (*) occluded tubules.

In the corrective scheme, control and pinocebrin group showed normal renal structure (Figure 5). While in diabetic group, there was vacuolization in tubules cytoplasm, mesangial expansion and fibrosis. In diabetic rats treated with pinocebrin the damage was not prevented.

Figure 6A shows the representative micrographs under electron microscopy of experimental groups. Control group exhibits the filtration barriers. Diabetic group show segmental foot process fusion and significant glomerular basement membrane thickening in compared to the control group (Figure 6B).

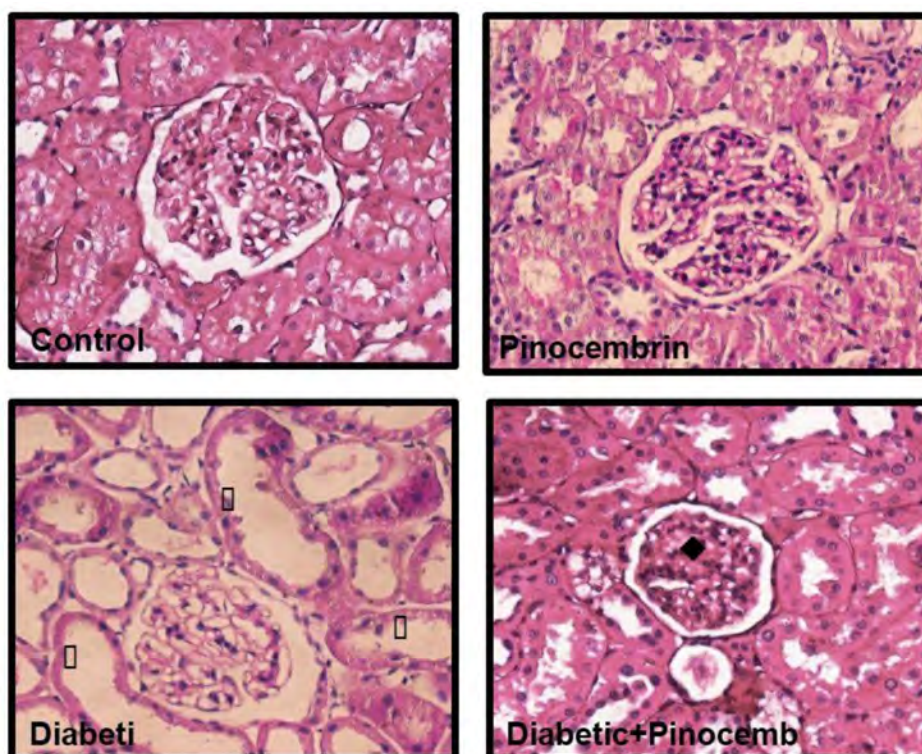


Figure 5. Representative photomicrographs of glomerulus structure in the corrective scheme. Renal structure stained with PAS. Symbols (◆) extracellular matrix accumulation, (□) loss of brush border.

2.9. Biomarkers of Renal Damage

Figure 7 depicts the values of biomarkers of renal damage in urine within preventive scheme. There was no significant difference between control group and pinocembrin group. Diabetic group has significant increases in the levels of Kim-1, NAG and NGAL in compared to the control group. Whereas, pinocembrin avoids the elevation of all the biomarkers.

Figure 7 shows the values of biomarkers of renal damage in urine within the corrective scheme. As in the preventive scheme, in this scheme there was no significant difference between control and pinocembrin group; whereas the diabetic group has significant increases in the levels of the biomarkers. While pinocembrin does not diminish any of the biomarkers, conversely it increases them even more; this indicates that pinocembrin increases renal damage instead of avoiding it.

2.10. Oxidative Stress

Since pinocembrin is an antioxidant compound, oxidative stress was evaluated in both schemes. In Table 2 are shown the oxidative stress parameters for preventive scheme: urinary hydrogen peroxide excretion, MDA content in plasma and kidney were measured. We found that the administration of pinocembrin did not modify any of the parameters studied. While on the contrary in the untreated diabetic group there was a significant increase of all of them in compared to the control group. Pinocembrin lead to a significant diminution in MDA content in plasma and kidney, without showing changes in urinary hydrogen peroxide excretion.

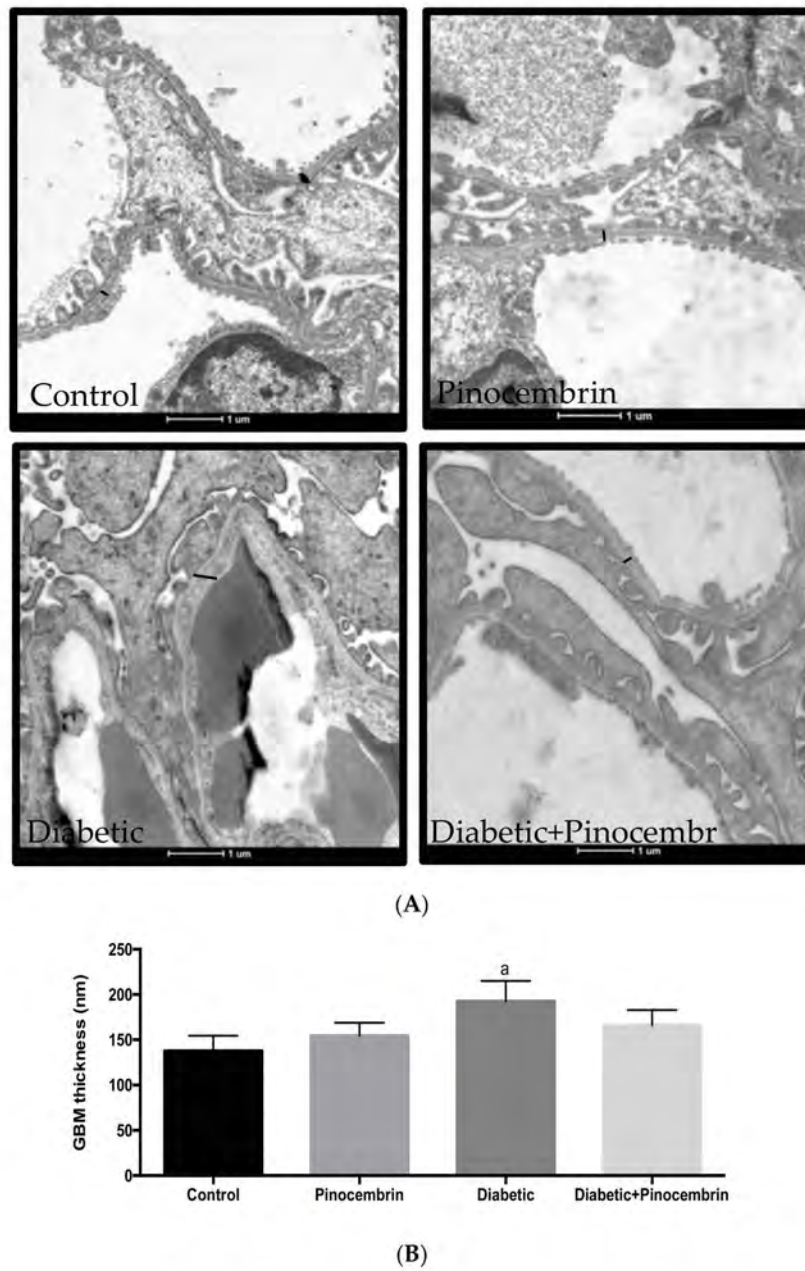


Figure 6. Representative photomicrographs of glomerulus ultrastructure in the preventive scheme. (A) Representative images of electron microscopy of preventive model, where measurements of GBM are expressed in nm. Scale bar = 1 μ m; (B) Means \pm SEM. ^a $p < 0.01$ vs. Control, $n = 3-5$.

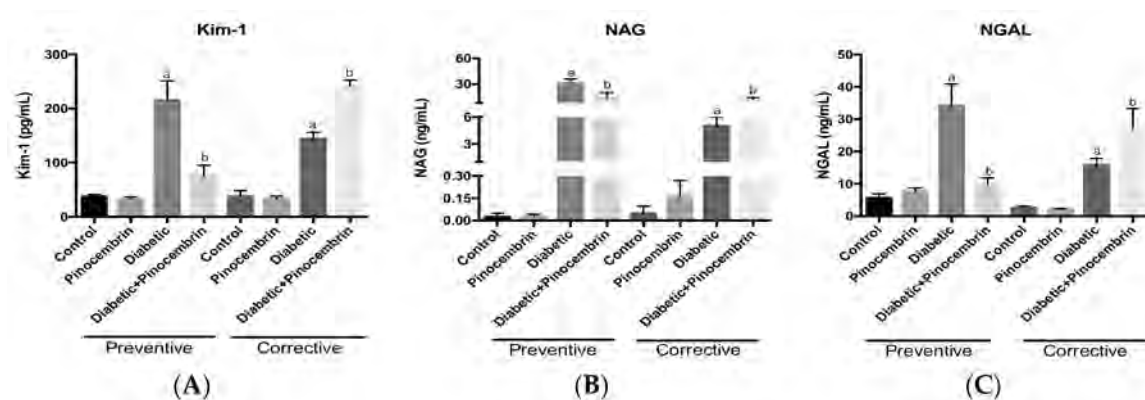


Figure 7. Biomarkers of renal damage in the schemes of treatment with pinocembrin, 40th day in the preventive scheme and 60th day in the corrective scheme. (A) Kidney injury molecule-1 (Kim-1) levels in the preventive and the corrective schemes; (B) *N*-acetyl- β -glucosaminidase (NAG) levels in the preventive and the corrective schemes; (C) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) levels in the preventive and the corrective schemes. ^a $p < 0.02$ vs. Control, ^b $p < 0.005$ vs. Diabetic, $n = 5$.

Table 2. Oxidative Stress Parameters in Preventive Model.

	Control	Pinocembrin	Diabetic	Diabetic + Pinocembrin
MDA Plasma (μM)	0.93 ± 0.19	1.0 ± 0.14	2.2 ± 0.3^a	1.3 ± 0.2^b
MDA Kidney (nM/mg Protein)	21.8 ± 3.7	19.6 ± 2.2	42.2 ± 4.9^a	27.6 ± 2.9^b
Urinary H_2O_2 ($\mu\text{M}/24 \text{ h}$)	0.04 ± 0.04	0.14 ± 0.09	2.7 ± 0.7^a	2.6 ± 0.7^a

Values are Expressed as Means \pm SEM. ^a $p < 0.01$ vs. Control; ^b $p < 0.01$ vs. Diabetic, $n = 7-8$.

Instead in the corrective scheme (Table 3), like the other parameters, pinocembrin administration exacerbates the damage.

Table 3. Oxidative stress parameters in corrective model.

	Control	Pinocembrin	Diabetic	Diabetic + Pinocembrin
MDA Plasma	0.92 ± 0.25	1.2 ± 0.3	2.4 ± 0.4^a	1.9 ± 0.2^a
MDA Kidney	18.8 ± 3.1	39.1 ± 2.7^a	34.2 ± 2.74^a	22.4 ± 3.3^b
Urinary H_2O_2 ($\mu\text{M}/24 \text{ h}$)	0.09 ± 0.04	0.03 ± 0.03	3.7 ± 0.8^a	$5.9 \pm 1.3^{a,b}$

Values are Expressed as Means \pm SEM. ^a $p < 0.01$ vs. Control, ^b $p < 0.0001$ vs. Diabetic, $n = 6-8$.

3. Discussion

In the latest years there has been a dramatic increase in obese population, which in turn has produced an increase in diabetic population in earlier ages [1]. These patients develop macrovascular and microvascular complications; among the later complications DN has greater impact on the quality of life and economic cost in patients. In consequence, population looks up to traditional medicine and herbal remedies to attend health care. The World Health Organization estimates that in industrialized regions over 50% of the population have used complementary or alternative medicine at least once. While countries like Africa and Latin America use traditional medicine to meet their primary health needs [27]. Propolis has gained popularity in recent years because of its wide range of biological and pharmacological activities such as antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial agent [28].

The composition of propolis is highly variable but unsubstituted-B ring flavonoids, such as pinocembrin, are characteristic of poplar type propolis from temperate regions [11].

There are only five reports of chemical composition of Mexican propolis. Li and coworkers [16] isolated pinocembrin, pinobanksin 3-acetate, tectochrysin, galangin and chrysin, aromatic acids and their esters from propolis collected in Sonora. Lotti and coworkers [17] isolated pinocembrin along with isoflavans and pterocarpans from propolis collected in Yucatán. Boisard and coworkers [18] studied a sample from Quintana Roo and they identified by HPLC-DAD pentacyclic triterpenoids such as α -amyrenone I, α -amyrin IV, fucosterol and β -sitosterol. Guzmán-Gutiérrez and coworkers [19] isolated epoxy-pinocembrin, pinostrobin, izalpinin, pinocembrin, kaempferol, rhamnetin and aromatic acids from Chiapas and Yucatán. Rivera-Yáñez and coworkers [20] analyzed a sample from Chihuahua by HPLC-DAD—they identified naringin, narigenin, kaempferol, quercetin, acacetin, luteolin, chrysin and pinocembrin. In contrast to Rivera-Yáñez and coworkers [20], we found only pinocembrin, this probably occurred because of the site of collection and the different weathers present along Chihuahua province. The samples from Quintana Roo and Yucatán may be considered apart from the other provinces of Mexico since the botanical sources are not poplar trees but *Busera simaruba*, *Lysiloma latisiliquum* and *Dalbergia sp* [17,18]. Pinocembrin (1) appears to be the common compound among the reports of Mexican propolis. The isolation process of the three samples collected in different provinces of the North of Mexico yielded mainly flavonoids. We found again that pinocembrin (1) was the common compound in the three samples and moreover, it was obtained in the highest yield (Chihuahua, 1.76 g, Durango, 2.44 g and Zacatecas, 1.53 g). Other nine flavonoids (2–10) were isolated from the samples studied. These compounds were identified as pinobanksin (2) and chrysin (3) isorhamnetin (4), pinobanksin-5-methylether (5) alpinetin (6), alpinone (7), pinostrobin (8), galangin-5-methylether (9) and kaempferide (10). All these isolated compounds 1–10 (Figure S2) were identified through a comparison with the NMR data in the literature (Figure S1, Table S1). The common compound among the propolis samples was pinocembrin (1) and it was obtained in the highest yield of all the compounds isolated.

The total phenolic content is used in routine screening of natural products and measures the sample's reducing capacity [29]. The samples tested range between 109 and 139 mg eq. GA/g extract, in contrast to the 314 mg eq. GA/g extract found by Rivera-Yáñez and coworkers [20]. Among the phenolics, flavonoids are suggested to be responsible for biological activities, therefore we assessed the flavonoid content of the samples. The samples ranged between 70 ± 1 and 90 ± 2 mg eq. Q/g extract. These results are higher compared with the report of Rivera-Yáñez and coworkers [20] (6.25 mg eq. Q/g extract). In addition, the content of total phenolics and total flavonoids of the three samples meet the requirements of the Mexican legislation NOM-003-SAG/GAN-2017 "Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento" [30].

The total phenolic and flavonoid content correlate with the antioxidant capacity assay [31]. When assessing in vitro antioxidant activity, it is recommended to use more than one assay and to include single electron transfer (SET) and hydrogen atom transfer (HAT)- based mechanisms [32]. We performed the DPPH bleaching assay, FRAP assay and β -carotene bleaching assay. The antioxidant capacity found in the EEP samples of Chihuahua, Durango and Zacatecas is in agreement with previous reports for temperate poplar propolis Croatian propolis [23], French propolis [28] and Argentinean propolis [33].

Propolis is used as a whole in Traditional Medicine, however its composition greatly varies with the site of collection as we demonstrated with our study of three samples of the same type of propolis (temperate propolis) and the same country. For that reason, we proposed to study the effects of a single compound that is present in all samples. In the present study, pinocembrin was isolated from Mexican propolis collected in three different locations and evaluated in a model of DN in rats. There are two approaches to combat DN, the first is to try to avoid or delay its early appearance and the second is to reverse and/or slow down its progression once it has been diagnosed. For that reason, in this study we explored both stages using the most abundant compound of propolis; in order to determine if this compound is responsible for the beneficial effects reported.

We demonstrated that pinocembrin shows, in a preventive scheme, little effect upon body weight and blood glucose (Figure 1A) and avoids death (Figure 1E). These results are the opposite of those reported for the ethanolic extract of propolis (EEP). EEPs increase body weight nearly to normal values and reduce blood glucose, in a scheme similar to our preventive scheme [21,23]. Chrysin, another flavonoid isolated from propolis, does not lower blood glucose but stops weight loss [8]. This data suggest that is the mixture of all compounds of propolis, which make up the anti-hyperglycemic effect and in turn prevent body weight loss.

Diabetes is a metabolic alteration of carbohydrates, lipids and proteins; therefore, diabetic nephropathy will reflect all these biochemical alterations and mainly those related to renal tissue. In this study, we measured renal, lipid and hepatic profiles. We found that pinocembrin ameliorated renal function (Figure 3B–D). This result is in accordance with previously reports of flavonoids ameliorate renal function in DN [8,25].

The overload of plasmatic proteins in renal tubular cells causes the production of pro-inflammatory and pro-fibrotic mediators leading to renal damage [34]. Thus, the levels of renal biomarkers: Kim-1, NAG and NGAL, were quantified as indicative of tubular damage. It has been already reported that Kim-1, NAG and NGAL are elevated in diabetic patients [35,36]. Herein, diabetic group increases all of them and pinocembrin avoid the rise (Figure 7). So, pinocembrin could be proposed as a renoprotector agent.

Since albuminuria is correlated with the structural changes in the glomerulus and pinocembrin reduced the observed albuminuria, there must have been amelioration in the glomerular filtration barrier. So, we assessed the GBM, which is the first measurable change at the early onset of diabetes [6]. The treatment with pinocembrin leads to the reduction of GBM thickness, although it did not reach statistical significance (Figure 6B).

The onset of renal disease is multifactorial; it involves several factors as hypertension, oxidative stress and hyperlipidemia. Dyslipidemia was observed in the diabetic group and pinocembrin normalized the levels (Figure 2C–G). Those results correlate with a report in which the reduction in hypertriglyceridemia in obese Zucker rats was related to the reduction of glomerular injury [37]. These results suggest that the hypolipidemic effect of pinocembrin contributed to stopping renal damage in the preventive scheme.

Hepatic damage was found in animal models of STZ and in DM1 patients [38]. Pinocembrin did not show effect on the liver enzymes studied (Figure 2A,B). These result contrast with the findings in propolis, where administration of EEP avoided the rise of transaminases [22]. It also differs from the results found by Rauter [38], in which the flavonoids tested lowered the levels of those enzymes in hyperglycemic rats. So, these results anew support our findings that it is the mixture of compounds of propolis, which have the effect.

Hyperglycemia is responsible for the production of oxidative stress by multiple pathways. Oxidative stress attacks lipid membranes leading to lipid peroxidation and generating reactive products that have been implicated in diabetic complications [39]. MDA is a final product of lipid peroxidation widely employed as oxidative stress marker. In this study, pinocembrin significantly reduced MDA in both plasma and kidney tissue (Table 2). This agrees with previous reports in which pinocembrin inhibited the formation of thiobarbituric acid reactive substances in isolated mitochondria and in the hippocampus of ischemia/reperfused rats [40]. Additionally, pinocembrin exerts its antioxidant activity by capturing reactive oxygen species (ROS) and restoring glutathione levels [41]. H_2O_2 is a ROS that has been proposed as a biomarker of global oxidative stress given that MDA is only a marker of lipid oxidative stress. In this study, pinocembrin did not attenuate its rise (Table 2). In DN, Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate oxidase 4 (Nox4) greatly contributes to superoxide production in the renal cortex and is later dismutated to O_2^- [42]. There are no reports of pinocembrin superoxide scavenging activity. Our results show that pinocembrin might not scavenge the superoxide produced, which in turn gives high levels of H_2O_2 .

In summary, in the preventive scheme pinocembrin was able to improve survival, partially decrease blood glucose, lipids as well as renal function and renal structure before renal damage. A possible mechanism of protection is through diminution of oxidative stress, which is known to be a main cause of initiation and progression of renal injury.

Once we showed that pinocembrin ameliorates renal damage in preventive scheme, we proposed to assess whether pinocembrin can reverse and/or stop the damage once the structural damage is established.

Pinocembrin given to diabetic rats reduced triglycerides and LDL nearly back to normal levels (Figure 2D,F). Nevertheless, there were not improvements in renal parameters, even it seems that pinocembrin worsens damage because of the significant higher levels of urinary protein, urinary volume, Kim-1, NAG and NGAL in compare to untreated diabetic rats. The harmful observed effect of pinocembrin in this model could be explained by the prooxidant effect of antioxidants, which happens under certain circumstances. The possible mechanisms of the prooxidant effects of flavonoids are the enhancement of the Fenton reaction, the inhibition of mitochondrial respiration, autoxidation and the oxidation of low molecular antioxidants [43]. The increased levels of urine H₂O₂ excretion indicate that pinocembrin increases oxidative stress and consequently exacerbates the damage.

In the literature, there are no reports of propolis or pure flavonoids administrated after structural damage. Hence this is the first report aimed to investigate late alterations in STZ induced DN. We found that pinocembrin aggravates the damage; produced for this reason it must not be given to patients in the late stage of this illness.

Further investigations relating to in vivo activity, toxicity and chemical composition of EEP of Chihuahua, Durango and Zacatecas are currently underway.

4. Materials and Methods

4.1. Chemicals and Reagents

Streptozotocin, bovine serum albumin, bicinchoninic acid, CuSO₄, trimethoxypropane, methanesulfonic acid, HCl, FeCl₃, 1-methyl-2-phenyl indole, acetonitrile, methanol, acetone, dichloromethane were obtained from Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). All other reagents were obtained from commercial sources.

4.2. Propolis Samples

Propolis produced by *Apis mellifera* was collected in experimental apiaries located in Gomez-Palacio, Durango in November 2014; Fresnillo, Zacatecas in November 2013 and Parral, Chihuahua in November 2015; Mexico.

4.3. Extraction and Isolation

The samples were extracted independently by maceration with ethanol 96%, filtered and concentrated under vacuum. Each ethanolic extract of propolis (EEP) (Durango, 43.8 g; Zacatecas, 80.0 g and Chihuahua, 52.1 g) was individually subjected to vacuum liquid chromatography (VLC) over 350 g of silica gel (Merck) and eluted with a gradient mixture of dichloromethane–acetone (1:0 → 0:1). The particular isolation procedure for each EEP is described as follows.

EEP of Durango. The VLC gave 30 fractions that were gathered according to its TLC similarity into ten combined fractions (I–X). Fraction II and III eluted with 95–5% dichloromethane–acetone, from which a white solid spontaneously precipitated, then it was recrystallized from dichloromethane to give 1 (2.44 g). The mother liquor was subjected to VLC over 350 g of silica gel and eluted with a gradient mixture of dichloromethane–acetone (1:0→0:1) to obtain 23 fractions that were gathered according to its TLC similarity into ten pooled fractions (FIII-1–FIII-10). Fraction FIII-6 was rechromatographed over polyamide 6 and eluted with a gradient of ethanol–water (1:0→0.5:0.5) to give twenty fractions (FIII-6-1–FIII-6-20), fraction FIII-6-2 afforded 2 (6.0 mg) and FIII-6-10 3 (30.0 mg).

EEP of Zacatecas. The EEP was subjected to a VLC column chromatography gave 52 fractions that were gathered according to its TLC similarity into eight combined fractions (FI-FVIII). From fraction IV, which was eluted with dichloromethane–acetone 95:5, a white solid spontaneously precipitated; then it was recrystallized from dichloromethane to give 1 (1.53 g). From fraction VI a white powder precipitated (30.0 mg), it was filtered and washed with methanol to give a mixture, that was separated by a polyamide 6 column eluted with ethanol that gave 5 (5.0 mg) and 6 (10.0 mg). The mother liquor was rechromatographed on Sephadex LH-20 with methanol to give five pooled fractions (FVI-1–FVI-5), fraction FVI-5 gave 4 (50.0 mg).

EEP of Chihuahua. The VLC gave 19 fractions that were gathered according to its TLC similarity into six combined fractions (FI-FVI). A white solid spontaneously precipitated from Fraction IV. The solid was filtered and recrystallized from dichloromethane to give 1 (1.51 g). Mother liquor of Fraction IV was rechromatographed on Sephadex LH-20 and eluted with methanol to give 32 fractions that were gathered according to its TLC similarity into eight pooled fractions FIV-1–FIV-8. Fraction FIV-3 was subjected to column chromatography over polyamide 6 and eluted with ethanol, fraction FIV-3-1 gave 7 (190.4 mg), FIV-3-3 8 (47.6), fraction IV-3-7 gave 9 (9.2 mg) and FIV-3-8 gave 10 (10.0 mg).

4.4. Total Phenolic Content

The total phenolic content of propolis was determined as described by Singleton and Rossi [44]. Briefly, 20 μ L of the extract (1 mg/mL) and 100 μ L of Folin-Ciocalteu reagent 0.2 N were mixed well for 5 min and 80 μ L of 7.5% sodium carbonate solution was added. The plate was covered and incubated in the dark (at room temperature) during 30 min. The absorbance was measured at 760 nm with a spectrophotometric microplate reader. Distilled water was used as a blank. All the determinations were performed in triplicates. The obtained absorbances were interpolated in a calibration curve ($y = 0.0036 + 0.0331x$, $R^2 = 0.9972$) of gallic acid. The results were expressed as mg equivalents of gallic acid/g of dry extract of propolis (EEP).

4.5. Total Flavonoid Content

The concentration of flavonoids was achieved using the method described by Marquele et al. [45] using the aluminum chloride reagent. A volume of 100 μ L of extract was mixed with 100 μ L of aluminum chloride solution (2% in methanol). After incubation for 30 min at room temperature, the absorbance was read at 415 nm and concentrations of flavonoids were determined from a calibration curve obtained with quercetin. The obtained absorbances were interpolated in a calibration curve ($y = 0.017 + 0.0293x$, $R^2 = 0.9985$) of quercetin. The results were expressed as mg equivalents of quercetin/g of dry extract of propolis (EEP).

4.6. Antioxidant Capacity

4.6.1. DPPH Bleaching Assay

The antioxidant DPPH radical scavenging activity was investigated according to the method described in the literature [46]. Briefly, an ethanolic solution of 0.208 mM was mixed with 0.1 mL of different concentrations of extracts or pure compounds. The 96 well plate was incubated in the dark at room temperature for 20 min and the absorbance was recorded at 540 nm. The percentage inhibition of the DPPH by each sample was calculated considering the percentage of steady DPPH in solution after the reaction [% inhibition = $100(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})/A_{\text{control}}$]. All the determinations were performed in triplicates. The IC_{50} values were calculated from the relationship curve of scavenging activities (%) versus concentrations of respective sample curve.

4.6.2. FRAP Assay

The FRAP assay was performed according to literature [47]. Briefly, the working solution was prepared by mixing acetate buffer 300 Mm pH 3.6, 2,4,6-tris(2-pyridil)-s-triazine 10 mM and aqueous

solution of FeCl₃ 20 mM, in a proportion of 10:1: respectively. 180 µL of the working solution and 20 µL of the EEP (0.5 mg/mL) were mixed and incubated for 30 min in the dark. The reading was made at 595 nm.

4.6.3. β-Carotene Bleaching Assay

The assay was performed according to the literature [48]. Briefly, a β-carotene solution (10 mg/mL, CHCl₃) was added to a boiling flask with 20 mg of linoleic acid and 200 mg of Tween 40. The CHCl₃ was removed under vacuum and the residue was mixed with 50 mL distilled water to obtain an emulsion. The EEP samples (10 mg/mL, 0.1 mL) were added to a tube with the emulsion and the absorbance of the mixture was immediately recorded at 470 nm. The mixture was subjected to a water bath at 50 °C for 1 h and the absorbance was recorded again. The control consisted on 0.1 mL of distilled water. The antioxidant activity (%AA) was calculated $\%AA = 100 (DR_c - DR_s) / DR_c$, where DR_c is the degradation rate of the control [$\ln(a/b)/60$], DR_s is the degradation rate of the sample, *a* is the absorbance at *t* = 0 and *b* is the absorbance at *t* = 1 h.

4.7. In Vivo Experiments

4.7.1. Animals

All procedures of animal handling were conducted in accordance to the Official Mexican Guide for Animal Experimentation and Care (NOM-062-ZOO-1999) and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011) [49]. Biological hazardous residues were discarded according to the corresponding guide (NOM-087-ECOL-SSA1-2001). Male Wistar rats (250–280 g of body weight) were purchased from Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán.” The animals were housed at 25 °C, 70% humidity and a 12 h light–12 h dark cycle and they had free access to water. They were fed with standard laboratory chow (Harlan, Hong Kong, China).

4.7.2. Experimental Design

Rats were administrated with streptozotocin (STZ) in citrate buffer (60 mg/kg, single dose, i.p.) to produce diabetes. Forty-eight hours after STZ injection, blood glucose was measured with a commercial glucometer (ACCU-CHEK, Switzerland) after twelve hours of fasting. The rats with a glycaemia ≥ 126 mg/dL (NOM-015-SSA2-2010) were randomly divided into two groups: Diabetic group and Diabetic + Pinocembrin group. Two schemes were assessed; preventive and corrective scheme and the groups were formed as follows:

I. Preventive scheme: (a) Control (*n* = 7), orally administrated with carboxymethylcellulose (CMC) 0.5%; (b) Pinocembrin (*n* = 7), treated orally with pinocembrin 10 mg/kg (suspended in CMC 0.5%); (c) Diabetic group (*n* = 8), orally administrated with CMC 0.5%; (d) Diabetic + Pinocembrin group (*n* = 8) treated orally with pinocembrin 10 mg/kg (suspended in CMC 0.5%).

Daily pinocembrin administration started once the rats were already diabetic and for forty days. At the 0, 20 and 40 days the rats were placed into metabolic cages for 24 h. Pinocembrin dose used in the present study was chosen according to literature [26].

II. Corrective scheme

(a) Control (*n* = 6); (b) Pinocembrin (*n* = 6); (c) Diabetic group (*n* = 9); (d) Diabetic + Pinocembrin (*n* = 9) all the groups were treated as above.

Pinocembrin was administrated for twenty days after forty days of untreated hyperglycemia. At the time 0, 20, 40, 50 and 60 days the rats were placed into metabolic cages for 24 h.

At the end of the experiments, the animals were anesthetized with a mixture of isoflurane/oxygen (3%). Blood, urine and kidney were collected. One kidney was frozen in liquid nitrogen and kept at –80 °C until use. The other kidney was perfused with phosphate buffer and 10% formaldehyde and glutaraldehyde for histological studies.

The pinocembrin used in this assay was the pool of pinocembrin isolated from the three samples of propolis.

4.8. Biochemical Analyses

Glucose, creatinine, blood urea nitrogen (BUN), total cholesterol, triglycerides, low density lipoprotein (LDL), very low density lipoprotein (VLDL), high density lipoprotein (HDL), alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were quantified in serum. Creatinine was quantified in urine samples. The quantifications were performed in Beckman Coulter laboratory analyzer AU680 Chemistry System. The concentration of protein was measured in tissue homogenates and in urine, employing the bicinchoninic acid assay [50]. Bovine serum albumin was used as standard.

4.9. Biomarkers of Renal Damage

Kidney injury molecule-1 (Kim-1), neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) were measured by immunoassays (Cloud-Clone Corporation, TX, USA).

4.10. Oxidative Stress Markers

The lipid peroxidation was determined through the content of malondialdehyde (MDA) in the kidney according to the methodology previously reported [51]. Tetramethoxypropane was used as standard.

Content of H₂O₂ in urine was measured with the commercial kit Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA).

4.11. Histopathological Analysis

The kidneys were kept in formaldehyde and embedded in paraffin. Sections of 3 μ m were stained with periodic acid-Schiff (PAS).

Sections of kidney in glutaraldehyde were embedded in Epon resin and contrasted with Reynold's lead. Ultrafine sections (70 nm) were observed under transmission electron microscope (FEI Company, Hillsboro, OR, USA) and photographs were taken in order to measure glomerular basement membrane (GBM) thickness with a Transmission Electron Microscopy Imaging and Analysis digitizer, version 4.7 SP3 (FEI Company, Hillsboro, OR, USA). The width of GBM was estimated as the perpendicular distance from endothelial cell boundary to the epithelial cell boundary of the peripheral basement membrane [52].

4.12. Statistical Analysis

Data were analyzed by one-way ANOVA and Newman Keuls Test for multiple comparisons. Overall survival was calculated with Kaplan Meier analysis. All values are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). The statistical analyses were performed using GraphPad Prism v.4 software (San Diego, CA, USA) and SPSS v.21.0.0 (Chicago, IL, USA). *p* values < 0.05 were considered significant.

5. Conclusions

Flavonoids are the main compounds in northern Mexican propolis and pinocembrin is the major compound.

Pinocembrin had opposite effects depending on the stage of DN. At an early stage, pinocembrin could prevent the progression of damage mainly in the kidneys and dyslipidemias. But at advanced stages, pinocembrin accelerates the progression of the disease. In both effects, oxidative stress plays an important role.

Supplementary Materials: Supplementary materials are available online. Figure S1: $^1\text{H-NMR}$ of pinocembrin (1), Figure S2: Flavonoids isolated from Mexican propolis. Table S1: $^1\text{H-RMN}$ data of the flavonoids isolated from Mexican propolis.

Acknowledgments: This work was supported by grants ICyTDF (PICSA 10-27) and CONACyT CB-252006. We are in debt to MVZ. Ángel López-Ramírez and Adriana Correa-Benítez for technical assistance in propolis recollection. Jessica Granados Pineda is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Químicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Facultad de Química and received a CONACyT fellowship # 273461.

Author Contributions: Jessica Granados-Pineda performed the phytochemical study, in vivo experiments and wrote the paper; Norma Uribe-Uribe performed the pathologic assessment and measurement of GBM by electron microscopy; Patricia García-López reviewed the manuscript and contributed with reagents, materials and analysis tools; María del Pilar Ramos-Godínez contributed with the preparation of tissue for electron microscopy; J. Fausto Rivero-Cruz conceived and designed the phytochemical experiments; Jazmin Pérez-Rojas conceived and designed the in vivo experiments.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript and in the decision to publish the results.

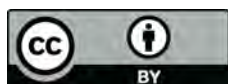
References

1. *IDF Diabetes Atlas*, 8th ed.; International Diabetes Federation: Brussels, Belgium, 2017; Available online: <http://www.diabetesatlas.org> (accessed on 11 November 2017).
2. Informe Final de Resultados. Available online: http://promocion.salud.gob.mx/dgps/descargas1/doctos_2016/ensanut_mc_2016-310oct.pdf (accessed on 28 November 2017).
3. Nacionales, D. Estadísticas a propósito del día de muertos (2 de noviembre). Available online: http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2017/muertos2017_Nal.pdf (accessed on 15 November 2017).
4. American Diabetes Association. Nephropathy in diabetes (Position Statement). *Diabetes Care* **2004**, *27* (Suppl. 1), 79–83.
5. Asumiendo el control de la diabetes. Available online: http://oment.uanl.mx/wp-content/uploads/2016/11/FMidete_Asumiendo-Control-Diabetes-2016.pdf (accessed on 29 November 2017).
6. Papadopoulou-Marketou, N.; Chrousos, G.P.; Kanaka-Gantenbein, C. Diabetic nephropathy in type 1 diabetes: A review of early natural history, pathogenesis, and diagnosis. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **2017**, *33*, e2841-n/a. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Ahmad, J. Management of diabetic nephropathy: Recent progress and future perspective. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* **2015**, *9*, 343–358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Ahad, A.; Ganai, A.A.; Mujeeb, M.; Siddiqui, W.A. Chrysin, an anti-inflammatory molecule, abrogates renal dysfunction in type 2 diabetic rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2014**, *279*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Bankova, V.; Bertelli, D.; Borba, R.; Conti, B.J.; da Silva Cunha, I.B.; Danert, C.; Eberlin, M.N.; I Falcão, S.; Isla, M.I.; Moreno, M.I.N.; et al. Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. *J. Api. Res.* **2016**, 1–49. [[CrossRef](#)]
10. Kuropatnický, A.K.; Szliszka, E.; Krol, W. Historical aspects of propolis research in modern times. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2013**, *2013*, 964149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Salatino, A.; Fernandes-Silva, C.C.; Righi, A.A.; Salatino, M.L. Propolis research and the chemistry of plant products. *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 925–936. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Toreti, V.C.; Sato, H.H.; Pastore, G.M.; Park, Y.K. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2013**, *2013*, 697390.
13. Papotti, G.; Bertelli, D.; Bortolotti, L.; Plessi, M. Chemical and Functional Characterization of Italian Propolis Obtained by Different Harvesting Methods. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 2852–2862. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Christov, R.; Trusheva, B.; Popova, M.; Bankova, V.; Bertrand, M. Chemical composition of propolis from Canada, its antiradical activity and plant origin. *Nat. Prod. Res.* **2006**, *20*, 531–536. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Navarro-Navarro, M.; Ruiz-Bustos, P.; Valencia, D.; Robles-Zepeda, R.; Ruiz-Bustos, E.; Virues, C.; Hernandez, J.; Dominguez, Z.; Velazquez, C. Antibacterial activity of Sonoran propolis and some of its constituents against clinically significant *Vibrio* species. *Foodborne Pathog. Dis.* **2013**, *10*, 150–158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

16. Li, F.; Awale, S.; Tezuka, Y.; Esumi, H.; Kadota, S. Study of the constituents of mexican propolis and their cytotoxic activity against PANC-1 human pancreatic cancer cells. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 623–627. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Lotti, C.; Campo Fernandez, M.; Piccinelli, A.L.; Cuesta-Rubio, O.; Márquez-Hernández, I.; Rastrelli, L. Chemical constituents of red Mexican propolis. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58* (Suppl. 4), 2209–2213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Boisard, S.; Tho Huyn, T.H.; Escalante-Erosa, F.; Hernández-Chávez, L.I.; Peña-Rodríguez, L.M.; Richomme, P. Unusual chemical composition of a Mexican propolis collected in Quintana Roo, Mexico. *J. Api. Res.* **2015**, *54* (Suppl. 4), 350–357. [[CrossRef](#)]
19. Guzmán-Gutiérrez, S.L.; Nieto-Camacho, A.; Castillo-Arellano, J.I.; Huerta-Salazar, E.; Hernández-Pasteur, G.; Silva-Miranda, M.; Argüello-Nájera, O.; Sepúlveda-Robles, O.; Espitia, C.I.; Reyes-Chilpa, R. Mexican propolis: A source of antioxidants and anti-inflammatory compounds, and isolation of a novel chalcone and ϵ -caprolactone derivative. *Molecules* **2018**, *23* (Suppl. 2), 334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Rivera-Yáñez, N.; Rodríguez-Canales, M.; Nieto-Yáñez, O.; Jiménez-Estrada, M.; Ibarra-Barajas, M.; Canales-Martínez, M.M.; Rodríguez-Monroy, M.A. Hypoglycaemic and antioxidant effects of propolis of Chihuahua in a model of experimental diabetes. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2018**, *2018*, 4360356. [[CrossRef](#)]
21. El-Sayed el, S.M.; Abo-Salem, O.M.; Aly, H.A.; Mansour, A.M. Potential antidiabetic and hypolipidemic effects of propolis extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pak. J. Pharm. Sci.* **2009**, *22*, 168–174.
22. Hu, F.; Zhan, Y.; Chen, M.; Ying, H.; Zhu, W. Effects of propolis on blood lipid and liver of hyperlipidemic SD rats. *J. Zhejiang Univ.* **2004**, *30*, 510–514.
23. Orsolíc, N.; Sirovina, D.; Končić, M.Z.; Lacković, G.; Gregorović, G. Effect of Croatian propolis on diabetic nephropathy and liver toxicity in mice. *BMC Complement. Altern. Med.* **2012**, *12*, 117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Sameni, H.R.; Ramhormozi, P.; Bandegi, A.R.; Taherian, A.A.; Mirmohammadkhani, M.; Safari, M. Effects of ethanol extract of propolis on histopathological changes and anti-oxidant defense of kidney in a rat model for type 1 diabetes mellitus. *J. Diabetes Investig.* **2016**, *7*, 506–513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Lai, P.-B.; Zhang, L.; Yang, L.-Y. Quercetin Ameliorates Diabetic Nephropathy by Reducing the Expressions of Transforming Growth Factor- β 1 and Connective Tissue Growth Factor in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Ren. Fail.* **2012**, *34*, 83–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Rasul, A.; Millimouno, F.M.; Ali Eltayb, W.; Ali, M.; Li, J.; Li, X. Pinoembrin: A Novel Natural Compound with Versatile Pharmacological and Biological Activities. *Biomed. Res. Int.* **2013**, *2013*, 9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Traditional Medicine. Fact sheet N° 134. Available online: http://www.siaav-itvas.org/images/stories/doc/agopuntura_scientifica/WHO_Traditional_medicine_2008.pdf (accessed on 25 July 2017).
28. Boisard, S.; Le Ray, A.M.; Gatto, J.; Aumond, M.C.; Blanchard, P.; Derbré, S.; Flurin, C.; Richomme, P. Chemical composition, antioxidant and anti-AGEs activities of a French poplar type propolis. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62* (Suppl. 2), 1344–1351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1841–1856. [[CrossRef](#)]
30. Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento. Available online: <https://normateca.sagarpa.gob.mx/tipo/norma-oficial-mexicana-nom> (accessed on 21 March 2018).
31. Piluzza, G.; Bullitta, S. Correlations between phenolic content and antioxidant properties in twenty-four plant species of traditional ethnoveterinary use in the Mediterranean area. *Pharm. Biol.* **2011**, *49* (Suppl. 3), 240–247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Tan, J.B.; Lim, Y.Y. Critical analysis of current methods for assessing the in vitro antioxidant and antibacterial activity of plant extracts. *Food Chem.* **2015**, *172*, 814–822. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Lima, B.; Tapia, A.; Luna, L.; Fabiani, M.P.; Schmeda-Hirschmann, G.; Podio, N.S.; Wunderlin, D.A.; Feresin, G.E. Main flavonoids, DPPH activity, and metal content allow determination of the geographical origin of propolis from the Province of San Juan (Argentina). *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57* (Suppl. 7), 2691–2698. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Abbate, M.; Zoja, C.; Remuzzi, G. How does proteinuria cause progressive renal damage? *J. Am. Soc. Nephrol.* **2006**, *17* (Suppl. 11), 2974–2984. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

35. Aslan, O.; Demir, M.; Koseoglu, M. Kidney Injury Molecule Levels in Type 2 Diabetes Mellitus. *J. Clin. Lab. Anal.* **2016**, *30* (Suppl. 6), 1–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Mahfouz, M.; Assiri, A.M.; Mukhtar, M.H. Assessment of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) and Retinol-Binding Protein 4 (RBP4) in Type 2 Diabetic Patients with Nephropathy. *Biomark. Insights.* **2016**, *11*, 31–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Kasiske, B.L.; O'Donnell, M.D.; Cleary, M.P.; Keane, W.F. Treatment of hyperlipidemia reduces glomerular injury in obese Zucker rats. *Kidney Int.* **1988**, *33*, 667–672. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Rauter, A.P.; Martins, A.; Borges, C.; Mota-Filipe, H.; Pinto, R.; Sepodes, B.; Justino, J. Antihyperglycaemic and protective effects of flavonoids on streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytother. Res.* **2010**, *24*, 133–138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Pan, H.; Zhang, L.; Guo, M.; Sui, H.; Li, H.; Wu, W.; Qu, N.; Liang, M.; Chang, D. The oxidative stress status in diabetes mellitus and diabetic nephropathy. *Acta Diabetol.* **2010**, *47* (Suppl. 1), 71–76. [[CrossRef](#)]
40. Santos, A.C.; Uyemura, S.A.; Lopes, J.L.C.; Bazon, J.N.; Mingatto, F.E.; Curti, C. Effect of Naturally Occurring Flavonoids on Lipid Peroxidation and Membrane Permeability Transition in Mitochondria. *Free Radic. Biol.* **1998**, *24*, 1455–1461. [[CrossRef](#)]
41. Saad, M.A.; Abdel Salam, R.M.; Kenawy, S.A.; Attia, A.S. Pinocembrin attenuates hippocampal inflammation, oxidative perturbations and apoptosis in a rat model of global cerebral ischemia reperfusion. *Pharmacol. Rep.* **2015**, *67*, 115–122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Brownlee, M. The Pathobiology of Diabetic Complications, A Unifying Mechanism. *Diabetes* **2005**, *54*, 1615–1625. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Procházková, D.; Boušová, I.; Wilhelmová, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* **2011**, *82*, 513–523. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, *16*, 144–158.
45. Marquete, F.D.; Di Mambro, V.M.; Georgetti, S.R.; Casagrande, R.; Valim, Y.M.L.; Fonseca, M.J.V. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *39*, 455–462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Cheng, Z.; Moore, J.; Yu, L. High-Throughput Relative DPPH Radical Scavenging Capacity Assay. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7429–7436. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Thaipong, K.; Boonprakob, U.; Crosby, K.; Cisneros-Zevallos, L.; Hawkins Byrne, D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Compos. Anal.* **2006**, *19* (Suppl. 6–7), 669–675. [[CrossRef](#)]
48. Wang, W.; Wu, N.; Zu, Y.G.; Fu, Y.J. Antioxidative activity of Rosmarinus officinales L. essential oil compared to its main components. *Food Chem.* **2008**, *108* (Suppl. 3), 1019–1022. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 8th ed.; National Academies Press: Washington, DC, USA, 2011.
50. Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J.; Klenk, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76–85. [[CrossRef](#)]
51. Gérard-Monnier, D.; Erdelmeier, I.; Régnard, K.; Moze-Henry, N.; Yadan, J.-C.; Chaudière, J. Reactions of 1-Methyl-2-phenylindole with Malondialdehyde and 4-Hydroxyalkenals. Analytical Applications to a Colorimetric Assay of Lipid Peroxidation. *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11*, 1176–1183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Neumann, K.H.; Kellner, C.; Kühn, K.; Stolte, H.; Schurek, H.-J. Age-dependent thickening of glomerular basement membrane has no major effect on glomerular hydraulic conductivity. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2004**, *19*, 805–811. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Sample Availability: Samples of the compounds are available from the authors.



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).