



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
CAMPUS TUXTEPEC

“Actividad antiinflamatoria de propóleos colectados
en la Cuenca del Papaloapan (Oaxaca)”.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Ingeniera en Biotecnología

PRESENTA:

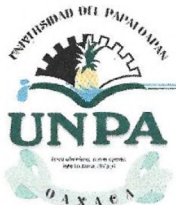
REYNA DE JESÚS ANTONIO SERAPIO

Director: Dr. Oscar Abelardo Ramírez Marroquín

Co-Director: Dra. María Adelina Jiménez Arellanes

SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA DEL 2022.

Copia de Acta de Revisión de Tesis



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 17 de septiembre de 2021 a las 10 hr, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de la Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada "**Actividad antiinflamatoria de propóleos colectados en la Cuenca del Papaloapan (Oaxaca)**" presentada por la alumna **Reyna de Jesús Antonio Serapio**, con número de matrícula 15090004, aspirante al título de **Licenciatura**.


Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron que la tesis **satisface** los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes, otorgando su **aprobación** para que la aspirante pueda proceder con el proceso de titulación.

Tuxtepec, Oaxaca, a 17 de septiembre de 2021

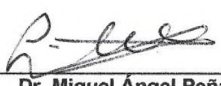
ATENTAMENTE
LA COMISIÓN REVISORA



Dr. Óscar Abelardo Ramírez Marroquín
Universidad del Papaloapan
Director de Tesis



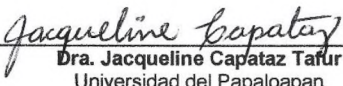
Dr. Lemuel Pérez Picaso
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



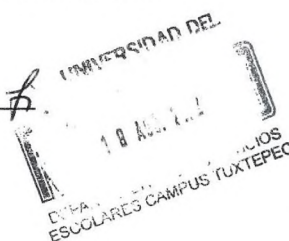
Dr. Miguel Ángel Peña Rico
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



Dra. Jacqueline Capataz Tafur
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



Copia de Oficio de Autorización de Tesis



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

Tuxtepec, Oaxaca, a 19 de agosto de 2022
Oficio No. JCIB/008/09/2022

Lic. Yesenia Barrientos Arenal
Jefe de Servicios Escolares
Universidad del Papaloapan

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis de la alumna **Reyna de Jesús Antonio Serapio** titulado "Actividad antiinflamatoria de propóleos colectados en la Cuenca del Papaloapan (Oaxaca)". Para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en Ingeniería en Biotecnología, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

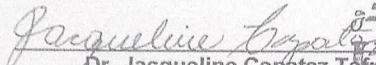
El Jurado de Examen Profesional estará compuesto por los siguientes profesores:

Presidente: Dr. Lemuel Pérez Picaso
Secretario: Dr. Miguel Ángel Peña Rico
Vocal: Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia
Primer Suplente: Dra. Jacqueline Capataz Tafur
Segundo Suplente: Dr. Julián Mario Peña Rico

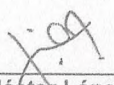
Sin más por el momento le envío un cordial saludo.

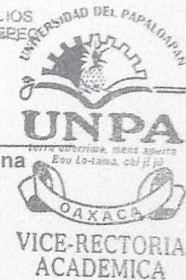
Atentamente

Terra uberrima, mens aperta
Bou lo-tama, chi ji jú


Dr. Jacqueline Capataz Tafur
Jefa de Carrera de Ingeniería en Biotecnología
Universidad del Papaloapan

JEFATURA DE INGENIERIA
EN BIOTECNOLOGIA
CAMPUS TUXTEPEC


Vo.Bo. M.C. Héctor López Arjona
Vice Rector Académico
Universidad del Papaloapan



c.c.p. Dr. Óscar Abelardo Ramírez Marroquín, Director de tesis, Para su conocimiento
c.c.p. Reyna de Jesús Antonio Serapio, Alumno, Para su conocimiento
c.c.p. Archivo

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la Universidad del Papaloapan para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis directores el Dr. Oscar Abelardo Ramírez Marroquín y la Dra. María Adelina Jiménez Arellanes por todo el tiempo y atención brindada, muy agradecida de haber aprendido tanto de ustedes.

Gracias Dr. Oscar por confiar en mí y aceptarme como su tesista. También quiero agradecer a la Dra. Adelina por el recibimiento en su equipo de trabajo, me llevo mucho de ustedes.

A los compañeros y amigos de laboratorio: Carmen, Abimelek, Mariana y Margarita por siempre apoyarme y enseñarme.

A mis amigos Berenice, Pablo y Ossiris por hacer más amena la Universidad. Gracias por su amistad y por los días de apoyo cuando parecía que ya no podía más.

A los profesores que tuve a lo largo de mi carrera, grandes Doctores y modelos a seguir.

A mis revisores de tesis, por tomarse el tiempo de corregir y mejorar mi tesis con sus sugerencias.

Por último, pero no menos importante quiero agradecer a mis padres por siempre luchar, confiar y estar para mí.

Gracias a todos.

DEDICATORIA

A mis padres, por hacer posible esto.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	16
2. MARCO TEÓRICO	18
2.1. Bioquímica de la inflamación.....	18
2.2. Modelos experimentales para la evaluación de la actividad antiinflamatoria.	20
2.2.1. Edema plantar inducido por carragenina.....	20
2.2.2. Edema auricular en ratón inducido con TPA.....	22
2.3. Tratamientos para la inflamación.....	23
2.3.1. Antiinflamatorios esteroideos:	23
2.3.2. Antiinflamatorios no esteroideos (AINES):	24
2.3.3. Terapia biológica:.....	25
2.4. Importancia de los productos naturales como agentes antiinflamatorios.	26
2.4.1. Fármacos y compuestos bioactivos obtenidos a partir de productos naturales.	27
2.5. Importancia farmacológica de los propóleos.	29
2.6. Vegetación presente en la Cuenca del Papaloapan.	35
3. JUSTIFICACIÓN	37
4. HIPÓTESIS	38
5. OBJETIVO PRINCIPAL	39
6. OBJETIVOS SECUNDARIOS	39
7. MATERIALES Y MÉTODOS	40
7.1. Recolección de las muestras de propóleos.	40
7.2. Preparación de muestras de propóleos.....	40
7.3. Análisis de las muestras mediante Cromatografía en Capa Fina (CCF).	41
7.4. Evaluación de la actividad antiinflamatoria aguda.....	41
7.5. Inducción del proceso inflamatorio agudo por medio de carragenina.	41
7.6. Edema auricular inducido con TPA.....	42

7.7. Análisis estadístico	43
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
8.1. Rendimientos de las muestras de propóleos.....	44
8.2. Análisis de Cromatografía en Capa Fina (CCF).	44
8.3. Determinación de la actividad antiinflamatoria mediante el método de carragenina de los propóleos EPP1, EPP2 y EPP3.	56
8.4. Determinación de actividad antiinflamatoria mediante el método de TPA de los propóleos EPP1, EPP2 y EPP3.....	63
9. CONCLUSIONES	67
10. PERSPECTIVAS	68
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
12. ANEXOS	99
12.1. Formación de edema subplantar (mm) de los tratamientos EPP1, EPP2 y EPP3 en ratones hembra y macho <i>Balb/C</i> a las horas 1, 3, 5,7 y 24 h.....	99

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Bioquímica de la inflamación. a) Reconocimiento de la infección, b) transmisión de una señal al núcleo de la célula y transcripción de proteínas proinflamatorias, c) migración de células efectoras hacia el sitio de daño, d) vasodilatación e incremento de la permeabilidad vascular, e) creación de ambiente citotóxico hacia el agente infeccioso o el tejido dañado y f) polarización y resolución de la inflamación. Modificada de Ashley y colaboradores, 2012.....	19
Figura 2. Estructura química de tres tipos de Carragenina: kappa (a), iota (b) y lambda (c).	21
Figura 3. Estructura química del TPA.....	23
Figura 4. Estructura química del CAPE.	31
Figura 5. Estructura de flavonoides (1: genina, 2: menina, 3: flavanona, 4: crisina, 5: 3,4-dihidroxi-4-metoxi-dalbergiona, 6: 4-metoxi-dalbergiona, 7: ceairina, 8: medicarpina) extraídos del propóleo nepalés (Funakoshi-Tago et al., 2015).....	32
Figura 6. Perfil cromatográfico de las muestras EPP1 y EPP2 en un sistema de elución hexano:AcOEt (95:05), usando como referencias C= β -amirina; P= β -sitosterol y HPLL= fracción primaria rica en terpenos de <i>Cnidocolus chayamansa</i>	45
Figura 7. Perfil cromatográfico de las muestras EPP1, EPP2 y EPP3 en un sistema de elución CHCl ₃ , usando como referencias HPLL= fracción primaria rica en terpenos de <i>Cnidocolus chayamansa</i> y HPT= hesperidina.....	46
Figura 8. Perfil cromatográfico de las muestras EPP1 y EPP2 en un sistema de elución CHCl ₃ :MeOH (99:0.1), usando como referencias C= β -amirina y 29= fracción primaria rica en terpenos de <i>Cnidocolus chayamansa</i>	47
Figura 9. Perfil cromatográfico de las muestras EPP1 y EPP2 en un sistema de elución CHCl ₃ :MeOH (80:20), usando como referencias C= β -amirina, P= β -sitosterol y 29= fracción primaria rica en terpenos de <i>Cnidocolus chayamansa</i>	49

Figura 10. Perfil cromatográfico de las muestras EPP1, EPP2 y EPP3 en un sistema de elución CHCl ₃ :MeOH (90:10), usando como referencias K=kaempferol, Q=quercetina, HPT= hesperidina, TLS= tilirosido y R= rutina.	52
Figura 11. Perfil cromatográfico de las muestras EPP1 y EPP2 en un sistema de elución CHCl ₃ :MeOH (90:10), usando como referencia C= β -amirina.	53
Figura 12. Perfil cromatográfico de las muestras EPP1, EPP2 y EPP3 en un sistema de elución CHCl ₃ :MeOH (90:10), usando como referencias AU/AO= ácido ursólico-ácido oleanólico, E2= escopoletina y E= esculetina.	54
Figura 13. Perfil cromatográfico de las muestras EPP1 y EPP2 en un sistema de elución CH ₂ Cl ₂ :MeOH (96:04), usando como referencia AU/AO= ácido ursólico-ácido oleanólico.	55
Figura 14. Estructura química de β -sitosterol (A) y hesperidina (B).	56
Figura 15. Actividad antiinflamatoria de los tratamientos EPP1, EPP2 y EPP3 en el edema subplantar de ratones hembra Balb/C inducido por carragenina hasta las 24 horas.	57
Figura 16. Actividad antiinflamatoria de las muestras EPP1, EPP2 y EPP3 en el edema subplantar de ratones macho Balb/C inducido por carragenina durante las 24 horas.	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especificaciones de las muestras de propóleos obtenidos por extracción con acetona.....	44
Tabla 2. Actividad antiinflamatoria de los tratamientos EPP1, EPP2 y EPP3 en inflamación aguda inducida por carragenina en ratones hembra Balb/C a la quinta hora del tratamiento	58
Tabla 3. Actividad antiinflamatoria de las muestras EPP1, EPP2 y EPP3 en ratones machos Balb/C a la quinta hora sobre el modelo de carragenina.....	60
Tabla 4. Comparación del porcentaje de inhibición a la 5ta hora de los tratamientos EPP1, EPP2 y EPP3 en inflamación aguda inducida por carragenina entre ratones hembra y macho Balb/C.	61
Tabla 5. Comparación del porcentaje de inhibición a la 6ta hora de los tratamientos EPP1, EPP2 y EPP3 en inflamación aguda inducida por TPA en ratones hembra y macho Balb/C.	63
Tabla 6. Actividad antiinflamatoria de los tratamientos EPP1, EPP2 y EPP3 en inflamación aguda inducida por carragenina en ratones hembra Balb/C.	99
Tabla 7. Actividad antiinflamatoria de los tratamientos EPP1, EPP2 y EPP3 en inflamación aguda inducida por carragenina en ratones macho Balb/C.	99

ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
AcOEt	Acetato de etilo
AINES	Antiinflamatorios no esteroides
ANOVA	Análisis de varianza
AR	Artritis Reumatoide
CAPE	Éster fenético del ácido cafeico (por sus siglas en inglés)
CCF	Cromatografía en capa fina
CG/EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CH ₂ Cl ₂	Cloruro de metileno
CMB	Concentración mínima bactericida
COX-2	Ciclooxigenasa-2
CHCl ₃	Cloroformo
CTLA-4	Antígeno 4 asociado a los linfocitos T citotóxicos
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daños (por sus siglas en inglés)
EROs	Especies reactivas de oxígeno
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (por sus siglas en inglés)
GC	Glucocorticoides
HPLC/EM	Cromatografía de líquido de alta resolución acoplado a espectrometría de masas
IKK	IκB cinasa (por sus siglas en inglés)
IL	Interleucina
LOX	Lipoxigenasas
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
MeOH	Metanol
MIC	Concentración inhibitoria mínima (por sus siglas en inglés)
MPO	Mieloperoxidasa

NF- κ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
O ²⁻	Anión superóxido
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos (por sus siglas en inglés)
PG	Prostaglandinas
RMN	Resonancia magnética nuclear
SNK	Student Newman Keuls
SSI	Solución salina isotónica
STAT1	Transductor de señales y activador de la transcripción 1
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (por sus siglas en inglés)
TLR	Receptores de reconocimiento de patrones (por sus siglas en inglés)
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa (por sus siglas en inglés)
TPA	13-acetato-12- <i>O</i> -tetradecanoilforbol (por sus siglas en inglés)
TX-A2	Tromboxano A2

RESUMEN

El propóleo es un producto resinoso químicamente complejo producido por abejas a partir de diversas fuentes vegetales. Esta sustancia ha demostrado tener diferentes actividades farmacológicas para la prevención y el tratamiento de numerosas enfermedades inflamatorias, bacterianas, virales, entre otras.

En el estado de Oaxaca, en particular en la Cuenca del Papaloapan, se utiliza el propóleo como una opción terapéutica para el tratamiento de procesos inflamatorios, sin embargo, se cuenta con poca o nula información a la fecha. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antiinflamatoria de tres muestras de propóleo colectados en la Cuenca del Papaloapan (Oaxaca). Para ello, se colectaron muestras en diferentes localidades: San Lucas Ojitlán, San Bartolo, Tuxtepec y la última en Huautla de Jiménez, las cuales se extrajeron con acetona. La determinación de la actividad antiinflamatoria se llevó a cabo en dos modelos de inflamación aguda *in vivo* (vía sistémica en un modelo de edema subplantar inducido con carragenina y por vía tópica con 13-acetato-12-O-tetradecanoilforbol inducido en edema de oreja) en ratones machos y hembras *Balb/C*.

Las tres muestras de propóleo demostraron tener actividad antiinflamatoria significativa en los dos modelos de inflamación aguda *in vivo* en ratones *Balb/C*. En el caso de la administración vía oral, se obtuvo un efecto comparable al fármaco de referencia indometacina, mientras que mediante administración vía tópica superaron a este fármaco. Por último, un estudio fitoquímico reveló la presencia de β -sitosterol en las muestras provenientes de San Lucas Ojitlán y San Bartolo, Tuxtepec; así como de hesperidina en las muestras de San Lucas Ojitlán y Huautla de Jiménez.

Por todo lo anterior, se ha demostrado el potencial antiinflamatorio de los propóleos colectados en la Cuenca del Papaloapan, Oaxaca.

Finalmente, es de resaltar que somos el primer grupo de investigación en todo el país en estudiar la actividad antiinflamatoria de propóleos del estado de Oaxaca y el segundo en propóleos mexicanos.

ABSTRACT

Propolis is a resinous substance with varying metabolites, collected by *Apis mellifera* bees from several vegetal sources. It has anti-inflammatory, antibacterial and antiviral properties and may have a wide range of other beneficial biological activities for the protection of health and prevention of diseases.

In the Papaloapan Basin (Oaxaca State, Mexico), propolis is used in alternative medicine for treating inflammation, however, the chemical data and biological properties of propolis are scant. Therefore, the aim of this study was to determine the anti-inflammatory activity of three samples of propolis collected in the Papaloapan Basin (Oaxaca State, Mexico).

The samples were collected San Lucas Ojitlán, San Bartolo, Tuxtepec and Huautla de Jiménez, and acetone extract of propolis were tested by two models of acute inflammation for a local (TPA) and systemic (carrageenan) murine model. The three propolis samples generated moderate local and systemic anti-inflammatory activity. By oral administration (systemic anti-inflammatory activity), the three samples had a similar anti-inflammatory activity in comparison with indomethacin. As topical anti-inflammatory agents, the propolis samples were more active than the indomethacin. Finally, a phytochemical study shows the presence of β -sitosterol in propolis from San Lucas Ojitlán and San Bartolo, Tuxtepec; while, hesperidin was identified in propolis from San Lucas Ojitlán and Huautla de Jiménez.

In conclusion, propolis collected in the Papaloapan Basin, Oaxaca, possess good anti-inflammatory activity, also, it is noteworthy that we are the first research group in Mexico to study the anti-inflammatory activity of propolis from the state of Oaxaca and the second in Mexican propolis.

1. INTRODUCCIÓN

La inflamación es una respuesta del sistema inmunológico ante una infección o lesión tisular, esencial para la protección contra agentes infecciosos y en la reparación de tejidos afectados. Sin embargo, las respuestas inflamatorias excesivas, prolongadas y no controladas causan daño tisular y contribuyen a la patogénesis de las enfermedades inflamatorias crónicas (Pasparakis y Vandenabeele, 2015). Dentro de este tipo se encuentran la artritis reumatoide (AR), cáncer, diabetes mellitus, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, prostatitis, sarcoidosis, asma, sarcopenia, así como enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer y Parkinson) entre otras (Fogel *et al.*, 2017; González *et al.*, 2015; Krishnan *et al.*, 2014; van Walsem *et al.*, 2015).

Los fármacos antiinflamatorios como el ibuprofeno (Advil®, Motrin®, o Nuprin®), la indometacina (Indocin®) y la prednisona, por mencionar algunos, son los más utilizados a nivel mundial (Laveti *et al.*, 2013; Miguel-Álvarez *et al.*, 2015; Ohlsson *et al.*, 2015; Ungprasert *et al.*, 2015; Valeyre *et al.*, 2014). A pesar de su eficacia innegable, se ha descrito que causan efectos secundarios de forma recurrente, incluidos efectos neuropsiquiátricos, daño en los tejidos gástricos, osteoporosis, diabetes *mellitus*, miopatía, hipertensión, entre otros (Al-Saeed, 2011; Díaz-González y Sánchez-Madrid, 2015; Oray *et al.*, 2016; Süleyman *et al.*, 2007).

En los últimos años, se han realizado grandes esfuerzos en la búsqueda e investigación de nuevas terapias antiinflamatorias más efectivas y con menos efectos secundarios (Peres *et al.*, 2016). Una fuente de búsqueda es la medicina tradicional, dado la diversidad de estructuras químicas que biosintetizan las plantas (Buenz *et al.*, 2018). En este sentido, los propóleos, mezcla de productos vegetales resinosos, han llamado la atención de los investigadores debido a su amplia gama de actividades farmacológicas para la prevención y el tratamiento de numerosas enfermedades inflamatorias, bacterianas, cardiovasculares, entre otras (Batista *et al.*, 2018; Guzmán-Gutiérrez *et al.*, 2018; Inui *et al.*, 2014; Soltani *et al.*, 2017).

Por todo lo anterior, y en vista de que el propóleo es utilizado como agente antiinflamatorio (Lima *et al.*, 2014; Montpied *et al.*, 2003; Sadhana *et al.*, 2017). En este trabajo se propone determinar la actividad antiinflamatoria de tres muestras de propóleos colectadas en la Cuenca del Papaloapan (Oaxaca), las cuales, representan una opción terapéutica para el tratamiento de procesos inflamatorios y que podrían emplearse como fitomedicamento o nutracéutico. La información e investigación del potencial que ofrecen los propóleos colectados en el estado de Oaxaca cuentan con poca o nula información a la fecha (Dolores-Mijangos *et al.*, 2017).

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Bioquímica de la inflamación.

De manera general, la inflamación es iniciada por agentes tóxicos e infecciosos como respuesta del sistema inmune. Inicia con el reconocimiento de la infección por proteínas transmembranales llamados receptores de reconocimiento de patrones (TLR, por sus siglas en inglés), encontradas en células del sistema inmune, capaces de reconocer agentes biológicos (patrones moleculares asociados a patógenos, PAMPs por sus siglas en inglés) y daños físicos o químicos (patrones moleculares asociados a daños, DAMPs por sus siglas en inglés) (Figura 1-a) (Ashley *et al.*, 2012). Estas interacciones generan un estímulo, el cual resulta en la transmisión de una señal al núcleo de la célula, reflejándose en la activación de genes inflamatorios a través de la transcripción y traducción de proteínas proinflamatorias denominadas citocinas, tales como interleucina (IL) 1, 2, 6, 7, 17 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), entre otros (Newton y Dixit, 2012). La función de las citocinas es marcar el sitio de daño para el reclutamiento de células efectoras como neutrófilos y monocitos (Figura 1-b). El recorrido que realizan las células efectoras hacia el sitio de daño es conocido como trans migración y, es dividido en las siguientes etapas: marginación, rodamiento, adhesión, diapédesis y quimiotaxis.

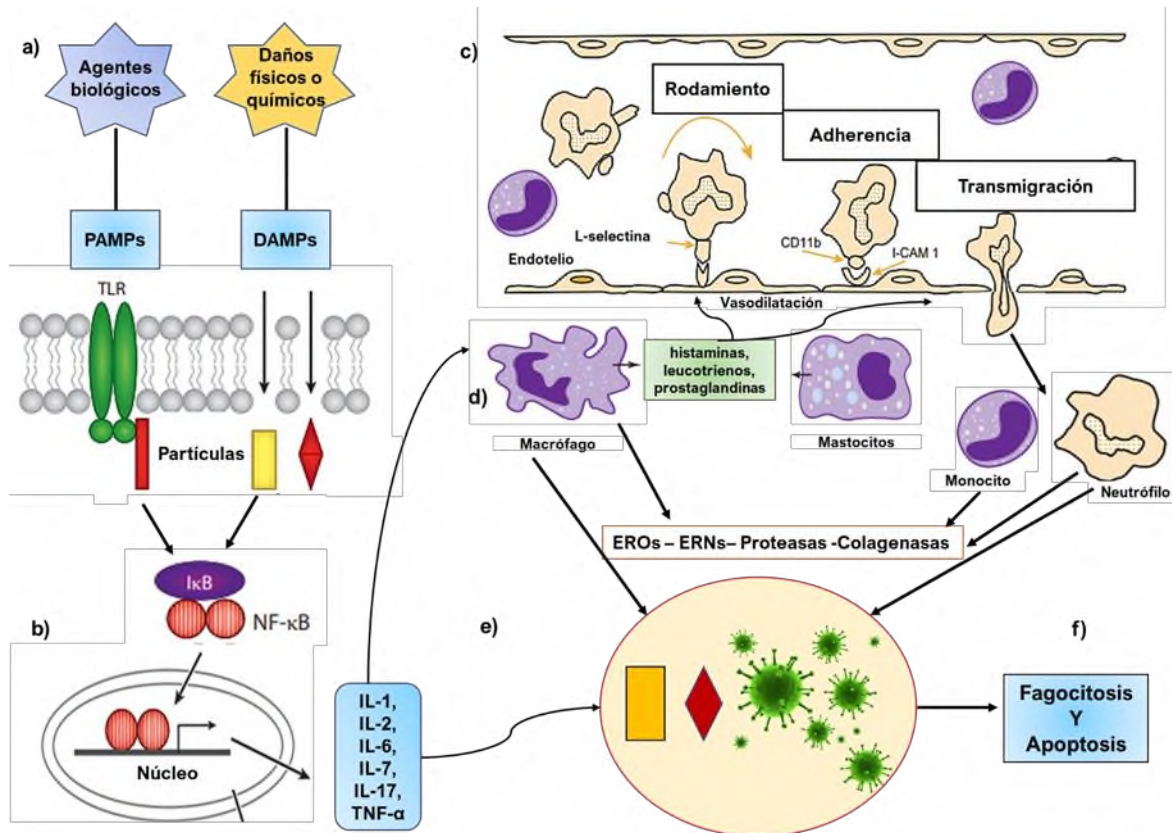


Figura 1. Bioquímica de la inflamación. a) Reconocimiento de la infección, b) transmisión de una señal al núcleo de la célula y transcripción de proteínas proinflamatorias, c) migración de células efectoras hacia el sitio de daño, d) vasodilatación e incremento de la permeabilidad vascular, e) creación de ambiente citotóxico hacia el agente infeccioso o el tejido dañado y f) polarización y resolución de la inflamación. Modificada de Ashley y colaboradores, 2012.

La marginación es el proceso del movimiento de las células efectoras del centro a la periferia de los vasos sanguíneos, siguiendo la exudación de fluido del sitio de daño. Una vez en la periferia, el rodamiento de los neutrófilos permite la adhesión hacia células endoteliales vasculares. El rodamiento y la adhesión es producto de la interacción del neutrófilo con glicoproteínas presentes en la superficie de células endoteliales llamadas selectinas (Figura 1-c). La adhesión es necesaria para que posteriormente ocurra la diapédesis y quimiotaxis. A la par, una vez identificado el sitio de daño, las células residentes del tejido como macrófagos y mastocitos se encargan de la liberación de histaminas, leucotrienos y prostaglandinas, que son sustancias que causan vasodilatación e incrementan la permeabilidad vascular, para así permitir el acceso de células efectoras y fluido rico en proteínas (diapédesis y quimiotaxis) (Figura 1-d). Los neutrófilos y monocitos producen

especies reactivas de oxígeno (EROs), especies nitrogenadas y proteasas como metaloproteinasas de matriz, creando de esta forma un ambiente citotóxico hacia el agente infeccioso o el tejido dañado (Figura 1-e). Por último, en el sitio del daño, células dendríticas, macrófagos y neutrófilos fagocitan partículas extrañas para posteriormente ser sacrificados por apoptosis, en un proceso más extenso denominado polarización y resolución de la inflamación (Figura 1-f) (Ahmed, 2011; Ashley *et al.*, 2012; Robinson *et al.*, 2016; Sherwood y Toliver-Kinsky, 2004).

2.2. Modelos experimentales para la evaluación de la actividad antiinflamatoria.

Dentro de los estudios realizados para medir la actividad antiinflamatoria se encuentran los modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*, los cuales son componentes críticos para identificar el efecto de nuevas moléculas en el proceso inflamatorio (Jain *et al.*, 2015).

Entre los métodos experimentales *in vitro* tenemos: producción de leucotrieno B4 (LTB4) en neutrófilos humanos aislados (Hamilton *et al.*, 2017), inhibición de la producción de óxido nítrico y TNF- α en lipopolisacárido y macrófagos J774A.1 activados con interferón- γ (Diaz *et al.*, 2012; Lampiasi y Montana, 2016), etc. Por otro lado, en los modelos experimentales *in vivo* se encuentran: el edema plantar inducido por carragenina (Abd-Allah *et al.*, 2018), edema auricular en ratón inducido por el 13-acetato-12-O-tetradecanoilforbol (TPA, por sus siglas en inglés) (Romero-Estrada *et al.*, 2016), edema de oreja inducido por aceite de Croton (Oliveira-Tintino *et al.*, 2018), edema de oreja inducido por oxazolona (Jegal *et al.*, 2019), pleuritis inducida por carragenina (da Rosa *et al.*, 2017), etc (Jain *et al.*, 2015).

2.2.1. Edema plantar inducido por carragenina.

Dentro de los modelos de evaluación antiinflamatoria *in vivo* se encuentra el edema subplantar inducido con carragenina, descrita por Winter y Porter en 1957. Este modelo es

sencillo, accesible y reproducible (Annamalai y Thangam, 2017; Necas y Bartosikova, 2013; El-Shitany y Eid, 2019).

La carragenina es un nombre genérico para una familia de polisacáridos gelificantes y viscosos, que se deriva de ciertas algas marinas de la clase *Rhodophyceae* (algas rojas). Existen 3 tipos importantes de carragenina que son: kappa (*k*), iota (*i*) y lambda (*λ*). Como se observa en la Figura 2, la clasificación de las carrageninas obedece al grado de sulfatación de grupos hidroxilo y su posicionamiento en el polisacárido. Este tipo de compuesto es comúnmente utilizado para determinar el efecto antiinflamatorio de nuevos fármacos, así como para elucidar el posible mecanismo de acción implicado en la inflamación (Necas y Bartosikova, 2013; Zia *et al.*, 2017).

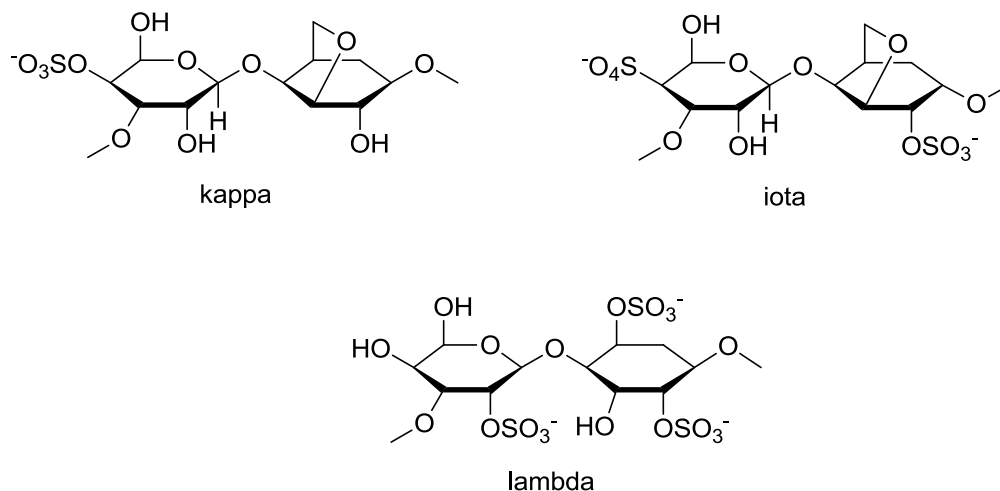


Figura 2. Estructura química de tres tipos de Carragenina: kappa (a), iota (b) y lambda (c).

En este ensayo se utiliza una solución salina de carragenina lambda al 1-3% como inyección intraplantar en un volumen de entre 50 y 150 μ L. El edema subplantar se mide y se compara con los animales del grupo prueba antes y después de la inducción del proceso inflamatorio. El aumento del volumen de la pata después de 3 o 6 h se calcula como porcentaje de inhibición en comparación con el volumen medido inmediatamente después de la inyección del agente flogístico para cada animal (Jain *et al.*, 2015; Necas y Bartosikova, 2013). Las muestras problemas a estudiar se administran por vía oral.

El desarrollo de edema en la pata de la rata después de la inyección de carragenina ha sido descrito como un evento bifásico, dependiente de la edad y el peso; en el cual varios mediadores operan en secuencia para producir la respuesta inflamatoria. Hay varios mediadores involucrados en la inflamación. La histamina, la serotonina y la bradiquinina son los primeros mediadores detectables en la fase temprana de la inflamación inducida por carragenina. Las prostaglandinas (PG) están involucradas en el aumento de la permeabilidad vascular y son detectables en la fase tardía de la inflamación. Esta segunda fase no sólo se ha correlacionado con la elevada producción de PG, sino que más recientemente se ha atribuido a la producción de la ciclooxigenasa inducible (COX-2). La infiltración y activación de neutrófilos locales también contribuyen a esta respuesta inflamatoria produciendo, entre otros mediadores, radicales libres derivados del oxígeno como el anión superóxido (O_2^-) y radical hidroxilo (Necas y Bartosikova, 2013; Annamalai y Thangam, 2017).

2.2.2. Edema auricular en ratón inducido con TPA

Por otro lado, el modelo de inflamación aguda inducida por TPA fue descrito por Young y De Young en 1989. El modelo tiene las ventajas como utilizar pequeñas cantidades de sustancias, proporcionar resultados reproducibles y rápidos (Gábor, 2003).

El TPA pertenece a una clase ésteres de forbol que se extraen del aceite de *Croton tiglium* L. (Figura 3) y es uno de los constituyentes más potentes (Fujiki *et al.*, 2017). Su aplicación tópica induce inflamación en la piel y una respuesta hiperproliferativa en los animales, desencadenando todos los eventos del proceso inflamatorio: vasodilatación, eritema, extravasación y edema (Gábor, 2003; Gómez Estrada *et al.*, 2011). Tras la aplicación tópica de este compuesto en la oreja del ratón, se induce en las primeras dos horas eritema, vasodilatación, edema y agregación plaquetaria; en un periodo de tres a cuatro horas aumenta el grosor por la extravasación de líquido. Entre las cuatro y seis horas aumenta la agregación plaquetaria y la adhesión de los leucocitos a las células endoteliales y migración hacia el tejido y desgranulación de mastocitos a partir de las seis horas, también en este periodo el edema llega a su punto máximo. La acumulación de leucocitos en la dermis se

manifiesta entre las seis y veinticuatro horas después de la aplicación del TPA, es a partir de este tiempo que se incrementa el proceso de la división celular en la epidermis y el eritema persiste hasta las 48 horas (Wu *et al.*, 2015; Young y De Young, 1989).

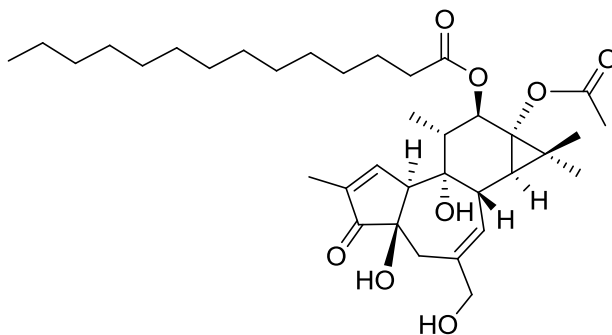


Figura 3. Estructura química del TPA.

Estos modelos de carragenina y TPA fueron elegidos para la determinación de actividad antiinflamatoria de propóleos en este trabajo debido a sus ventajas como la reproducción y el uso amplio para determinar la actividad antiinflamatoria aguda de diferentes compuestos o extractos (Kolesnichenko *et al.*, 2019; Olivera-Castillo *et al.*, 2018; Prokopchuk *et al* 2018; Yeom *et al.*, 2019).

2.3. Tratamientos para la inflamación.

Existen en el mercado fármacos capaces de modular respuestas inflamatorias inducidas por diferentes mediadores, dentro de estos existen tres tipos:

2.3.1. Antiinflamatorios esteroideos: los glucocorticoides (GC) endógenos como cortisol, testosterona o aldosterona que cumplen importantes funciones regulatorias en el organismo, como el metabolismo de carbohidratos, catabolismo de proteínas y regulación de procesos inflamatorios. Por su actividad antiinflamatoria e inmunosupresora, los GC se encuentran entre los fármacos más ampliamente recetados para tratar un amplio espectro de enfermedades inflamatorias y autoinmunes (Boardman *et al.*, 2014). Este grupo de fármacos son los antiinflamatorios más efectivos en el tratamiento de diversas

enfermedades autoinmunes como asma, AR, sepsis, colitis ulcerosa, esclerosis múltiple o enfermedad antiinflamatoria intestinal (Barnes y Adcock, 2009; Boardman *et al.*, 2014).

Por ejemplo, en la actualidad, la dexametasona ha sido utilizada para tratar casos muy graves de pacientes con covid-19, debido a que la enfermedad está asociada con daño pulmonar difuso y los glucocorticoides pueden modular la lesión pulmonar mediada por inflamación y, por lo tanto, reducir la progresión de la insuficiencia respiratoria y muerte. (Johnson y Vinetz, 2020; Recovery Collaborative Group, 2020).

Los GC tienen una alta incidencia en provocar eventos adversos frecuentes y graves; los tratamientos farmacológicos a largo plazo pueden provocar efectos neuropsiquiátricos, diabetes *mellitus*, dislipidemia, aumento de peso, lipodistrofia y miopatía. A nivel cardiovascular, pueden provocar hipertensión e hipotensión arterial, debilidad muscular por catabolismo excesivo del músculo y bloqueo de la liberación de la hormona del crecimiento (Fardet y Fève, 2014; Judd *et al.*, 2014; Oray *et al.*, 2016).

Asimismo, la administración oral por tiempo prolongado de prednisona a dosis >5 mg/día, puede reducir la densidad mineral ósea, incrementando el riesgo de fracturas (osteoporosis). En el sistema nervioso central, pueden ocasionar eventos psiconeurológicos, que van desde euforia, insomnio, ansiedad, depresión hasta reacciones psicóticas. El uso prolongado de los corticoides puede provocar un síndrome de abstinencia, además, cabe mencionar que el organismo deja de producir esteroides endógenos al ser administrado de forma exógena (van der Goes *et al.*, 2014).

2.3.2. Antiinflamatorios no esteroides (AINES): Estos compuestos son antipiréticos y analgésicos, principalmente; aunque comparten características terapéuticas similares, su eficacia relativa puede ser diferente dependiendo de su especificidad, de igual manera, son fármacos paliativos, dado que su función es sólo el alivio de los síntomas sin modificar el origen del padecimiento. Todos los AINES poseen un cociente de inhibición de las COX-1/COX-2, que se ve expresado como la concentración de fármaco capaz de inhibir el 50% de estas enzimas (Al-Saeed, 2011; Oscanoa-Espinoza y Lizaraso-Soto, 2015; Süleyman *et al.*,

2007). La isoforma COX-1, está relacionada con la producción de prostaglandinas (PG), donde los fármacos que inhiben con mayor selectividad esta isoforma (Indometacina, Naproxeno, Ibuprofeno) generan daño severo en los tejidos gástricos al estar COX-1 implicado en la protección de este sistema; mientras que la COX-2 es inducida por la activación de la respuesta inflamatoria propiciando una elevada producción de PG en la inflamación causando mayor dolor (Al-Saeed, 2011; Cisneros Caballero *et al.*, 2017; Díaz-González y Sánchez-Madrid, 2015; Süleyman *et al.*, 2007). La mayoría de los AINES son no selectivos de COX, ya que tienen la capacidad de inhibir ambas enzimas, esto provoca una reducción en la producción plaquetaria del tromboxano A₂ (TX-A₂), lo cual conlleva a la formación de úlceras gástricas, sangrado digestivo y gastroduodenitis. Mientras que los AINES inhibidores selectivos de COX-2 como celecoxib, provocan efectos cardiovasculares como infartos al miocardio, hipertensión arterial e insuficiencia cardíaca; esto debido a que no poseen propiedades antitrombóticas, dos claros ejemplos es el retiro de Valdecoxib y Parecoxib del mercado; los cuales son inhibidores selectivo de COX-2, reduciendo la biosíntesis del componente antitrombótico PGI₂ en vasos sanguíneos, lo cual se correlaciona con incremento de riesgo de eventos cardiovasculares (Díaz-González y Sánchez-Madrid, 2015; Regulski *et al.*, 2016). En general, se deben valorar otras opciones terapéuticas antes de prescribir AINES.

2.3.3. Terapia biológica: Este tipo de tratamiento está dirigido principalmente a la regulación de las moléculas implicadas en la fisiopatología de la enfermedad (Cisneros Caballero *et al.*, 2017). Entre estas terapias, las más utilizadas están el empleo de anticuerpos monoclonales específicos para diversas moléculas; por ejemplo, se ha comprobado que el uso de anticuerpos antagonistas del TNF- α logra disminuir la gravedad de la patología mediante la reducción de la actividad proinflamatoria de las citocinas. Otros fármacos capaces de inhibir el TNF- α que se encuentra actualmente en el mercado son infliximab (1999), adalimumab (2002) y golimumab (2009); sin embargo, una desventaja en el uso de esta terapia biológica, es su elevado costo respecto a las terapias convencionales (Byng-Maddick y Ehrenstein, 2015; Cisneros Caballero *et al.*, 2017). De la misma manera existen anticuerpos monoclonales que actúan mediante la inhibición de interleucinas (IL);

por ejemplo, el fármaco anakinra que inhibe a la IL-1 y tocilizumab que inhibe la producción de IL-6. Existen también fármacos cuya actividad es inhibir el proceso de maduración de linfocitos T y B a nivel de médula ósea como el Rituximab (Cisneros Caballero *et al.*, 2017; Edwards *et al.*, 2005; Jesus y Goldbach-Mansky, 2014). El uso de este tipo de terapias conlleva a una serie de eventos adversos, por ejemplo, Ipilimumab, el cual es un inhibidor del antígeno 4 asociado a los linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), está asociado con tasas altas de toxicidad gastrointestinal, prurito, erupción cutánea e hipofisitis (Kumar *et al.*, 2017).

En relación a costos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, Murphy *et al.*, 2018, realizaron una encuesta del panel de gastos médicos de 2013 en donde describen que entre adultos de la población de los EE. UU ≥ 18 años con enfermedades crónicas tienen gastos totales de \$1,244.6 millones.

2.4. Importancia de los productos naturales como agentes antiinflamatorios.

Históricamente, los humanos han usado plantas medicinales para satisfacer sus necesidades básicas de salud. La medicina tradicional ha formado parte de muchas culturas antiguas y sus conocimientos los han transmitido de generación en generación en forma oral o escrita. Las plantas, han constituido la base de sofisticados sistemas en la medicina tradicional, los primeros registros datan alrededor de 2600 a. C, en donde se documentan los usos de aprox. 1,000 sustancias derivadas de plantas en Mesopotamia. Un ejemplo de estas sustancias son los aceites de las especies *Cedrus* (cedro) y *Cupressus sempervirens* (ciprés), *Glycyrrhiza glabra* (regaliz), *Commiphora* (mirra) y *Papaver somniferum* (jugo de amapola), utilizados en la actualidad para el tratamiento de dolencias que van desde la tos y los resfriados hasta las infecciones parasitarias y la inflamación (Borchardt, 2002; Boufridi y Quinn, 2018). Las plantas medicinales tienen diferentes propiedades biológicas por su amplio perfil químico que biosintetiza, como saponinas, taninos, flavonoides, alcaloides, antraquinonas, glucósidos cardíacos, glucósidos cianogénicos, entre otros. La presencia de estos metabolitos secundarios explica actividades farmacológicas como anticancerígeno, antidiabéticas, psicoterapéuticas y antiarrítmico (Buenz *et al.*, 2018; Cragg y Newman, 2013;

Thatoi y Patra, 2011). Entre los principios activos podemos mencionar a la kelina, galegina, papaverina, trabectedina, halicondrina B, briostatina 1 y variolina B. Por otra parte, algunos principios activos han dado lugar al desarrollado de distintos fármacos, entre los cuales están metformina, etopósido, digoxina, paclitaxel, taxotere, cabazitaxel y camptotecina (Buenz *et al.*, 2018; Cragg y Newman, 2013).

Los productos naturales también han sido ampliamente utilizados en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inflamación como: artemisinina, capsaicina, nicotina, arglabina, colchicina, atropina, galantamina, morfina, cannabidiol, entre otros (Atanasov *et al.*, 2015; Buenz *et al.*, 2018).

Cabe mencionar que en la actualidad los productos naturales han resurgido como una fuente de nuevos compuestos bioactivos debido a sus actividades biológicas y diversidad estructural haciéndolos muy atractivos como fármacos o como sustancias que sirven como puntos de partida para la síntesis de nuevos fármacos (Boufridi y Quinn, 2018; Harvey *et al.*, 2015; Tao *et al.*, 2014).

Newman y Cragg reportaron que de los fármacos aprobados por la FDA entre 1981 a 2014, el 62% son moléculas obtenidas de productos naturales, o derivados de ellas y el 2% de estas moléculas naturales pertenecen a fármacos antiinflamatorios como arglabina, atropina, capsaicina, etc (Newman y Cragg, 2016).

Sin embargo, todavía se desconocen el potencial de la mayoría de los productos naturales, por lo que se necesita una investigación más profunda que podría proporcionar información valiosa para el tratamiento de diferentes enfermedades.

2.4.1. Fármacos y compuestos bioactivos obtenidos a partir de productos naturales.

El resveratrol es un polifenol no flavonoide que se produce de forma natural en uvas y cacahuete, es uno de los metabolitos secundarios de plantas más conocidos debido a sus

propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas. Se ha demostrado que el resveratrol puede revertir la resistencia a múltiples fármacos de las células cancerosas y, cuando se usa en combinación con fármacos puede sensibilizar las células cancerosas a los agentes quimioterapéuticos estándar (Ko *et al.*, 2017; Kurt *et al.*, 2018). Otro ejemplo, es la pinostrobina, un flavonoide dietético natural que se encuentra en plantas medicinales como por ejemplo *Piper nigrum* (pimienta negra). En un estudio se demostró que la pinostrobina induce eficientemente la apoptosis a través de las vías de señalización dependientes extrínsecas e intrínsecas mediadas por EROs, así como el daño mitocondrial mediado por EROs en las células HeLa (Jaudan *et al.*, 2018).

En el 2013 se desarrolló un nuevo fitofármaco antiinflamatorio basado en un extracto de las hojas de *Cordia verbenacea* estandarizado en α -humuleno (Acheflan), este producto se basa en el uso tradicional de la planta medicinal brasileña utilizando un enfoque de fitoterapia basado en evidencia por medio de experimentación (David *et al.*, 2015; Fernandes *et al.*, 2007; Matias *et al.*, 2013). Otra alternativa en la que se han utilizado extractos orgánicos es en la especie *Cynara cardunculus* (alcachofa), la cual es una fuente natural de compuestos terpénicos, siendo la molécula predominante la cinaropicrina, se le han atribuido diferentes actividades como: antihiperlipidémico, insecticida, antipalúdica, antiespasmódica, antitumoral, citotóxica y antiviral, por mencionar algunos (Ferro *et al.*, 2018).

En la actualidad hay varios productos naturales aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) disponibles en el mercado a nivel mundial, incluidos Veregen (catequinas del té) para el tratamiento de verrugas genitales y perianales externas; Fulyzaq (extracto de la savia roja de *Croton lechleri*) para el tratamiento de la diarrea por VIH (US Food and Drug Administration 2013) y Cannabidiol (principal compuesto activo de *Cannabis sativa*), el cual es un antiinflamatorio (aprobado desde 2005 en muchos países como Canadá, Reino Unido, Alemania y Nueva Zelanda), por mencionar algunos (David *et al.*, 2015).

Tomando en cuenta el aumento global en la demanda de medicamentos derivados de plantas, es necesario garantizar la calidad de los mismos utilizando técnicas analíticas, para lograr la eficacia y seguridad terapéuticas (David *et al.*, 2015; Thatoi y Patra, 2011).

2.5. Importancia farmacológica de los propóleos.

El propóleos es una mezcla de productos vegetales resinosos, recolectado desde la yema hasta los exudados de varias plantas y transformados a diferentes metabolitos en presencia de enzimas apícolas. Los humanos, al observar la importancia del propóleos para las abejas, han aprovechado los beneficios de estas resinas desde la antigüedad. Los egipcios usaban propóleos para embalsamar cadáveres; también lo utilizaron como agente curativo los médicos griegos y romanos; y en la segunda guerra mundial se usó como agente antimicrobiano y antiinflamatorio (Ghisalberti, 1979; Sforcin, 2016). Actualmente, este se sigue utilizando al igual que la miel y ceras, por lo que es común practicar la crianza de las abejas (apicultura), brindándoles los cuidados necesarios con el objetivo de obtener y consumir los productos que son capaces de producir. La apicultura en México tiene gran importancia socioeconómica y ecológica (Fideicomiso de Riesgo Compartido, 2016; Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2016); ya que el país ocupa el octavo lugar como productor mundial, consolidándose entre los principales productores y exportadores de miel a nivel mundial, produciendo una clase de miel y propóleos diferente dependiendo la región (Instituto Nacional de Economía Social, 2018; Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2016).

En la actualidad, podemos hablar sobre la diferencia del propóleos, debido a que contiene diferentes compuestos químicos y/o biomarcadores (Huang *et al.*, 2014; Ristivojević *et al.*, 2015). Los diversos compuestos químicos de propóleos, pertenecen a las siguientes familias de metabolitos: flavonoides, fenilpropanoides, terpenoides, estilbenos, lignanos, cumarinas y derivados prenilados, alcaloides e iridoides, entre otros (Huang *et al.*, 2014; Inui *et al.*, 2014; Soltani *et al.*, 2017). Estos compuestos pueden ser útiles en el tratamiento de diversas

afecciones patológicas y enfermedades. Esta diversidad química que depende de la temporada de colecta, las especies de abejas que la producen y la flora que existe alrededor de la colmena determina composición química del propóleo y por ende, la bioactividad (antimicrobiano, antiinflamatorio, antitumoral, inmunomodulador y antioxidante, entre otros) y los usos potenciales (Alday *et al.* 2015; Batista *et al.*, 2018; El-Guendouz *et al.*, 2016; Guzmán-Gutiérrez *et al.*, 2018; Inui *et al.*, 2014; Silva-Carvalho *et al.*, 2015; Soltani *et al.*, 2017). En las últimas décadas, por sus propiedades biológicas el propóleo ha sido objeto de varios estudios químicos a nivel mundial.

Por ejemplo, Naik y colaboradores obtuvieron del propóleo colectado en Maharashtra, India un extracto etanólico, su fracción soluble en hexano, fracción soluble en acetato de etilo, fracción soluble en etanol y aceites volátiles, de los cuales determinaron su actividad antiinflamatoria por vía tópica y sistémica, empleando el modelo de TPA y carragenina. Encontraron que la fracción soluble en acetato de etilo resultó la más activa en el modelo de TPA, mostrando también una actividad antiinflamatoria sistémica significativa, dependiente de la dosis. Los resultados de DE_{50} fueron 1.04 mg/oreja en TPA y 125.15 mg/kg en carragenina (Naik *et al.*, 2013).

Por otro lado, estudios sobre las propiedades antiinflamatorias han demostrado que los propóleos también pueden inhibir la actividad de las enzimas lipoxigenasas (LOX) y COX durante el proceso inflamatorio. Los flavonoides inhiben principalmente la COX-2, mientras que la inhibición de LOX se debe a la alta concentración de quercetina en el propóleo. El componente principal de algunos propóleos es el éster fenético del ácido cafeico (CAPE, por sus siglas en inglés), este es un compuesto biológicamente activo con propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. Debido a su naturaleza lipofílica, CAPE (Figura 4) entra fácilmente a las células, donde actúa inhibiendo las enzimas LOX y COX que están involucradas en las vías del metabolismo del ácido araquidónico (AA); por lo tanto, se detiene el metabolismo del AA, no hay liberación de PG y leucotrienos responsables de la inflamación y el dolor.

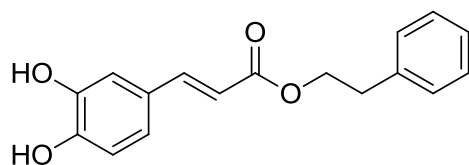


Figura 4. Estructura química del CAPE.

Además, estas investigaciones muestran que el CAPE inhibe la liberación de citocinas proinflamatorias y simultáneamente aumenta la producción de citocinas antiinflamatorias como IL-10 e IL-4. En la misma investigación se ha demostrado que el CAPE disminuye la infiltración de células inflamatorias como neutrófilos y monocitos (Rajoo *et al.*, 2014).

También se ha demostrado que cuatro de ocho flavonoides de propóleos obtenidos del país Nepal (Figura 5): crisina (4), 3,4-dihidroxi-4-metoxi-dalbergiona(5), 4-metoxi-dalbergiona (6) y cearoina (7) inhiben la expresión de RNAm inducido por IL-33 de los genes inflamatorios, incluyendo IL-6, TNF α e IL-13 y mastocitos derivados de la médula ósea. Estos flavonoides también inhibieron la activación inducida por la IL-33 del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B), que fue consistente con sus efectos inhibitorios sobre la expresión de citocinas (Funakoshi-Tago *et al.*, 2015). Los efectos de estos flavonoides se atribuyen a la inhibición de la activación de la κ B cinasa (IKK) inducida por IL-33, que conduce la degradación de la proteína κ B α y la localización nuclear de NF- κ B (Funakoshi-Tago *et al.*, 2015; 2016; Wang *et al.*, 2015).

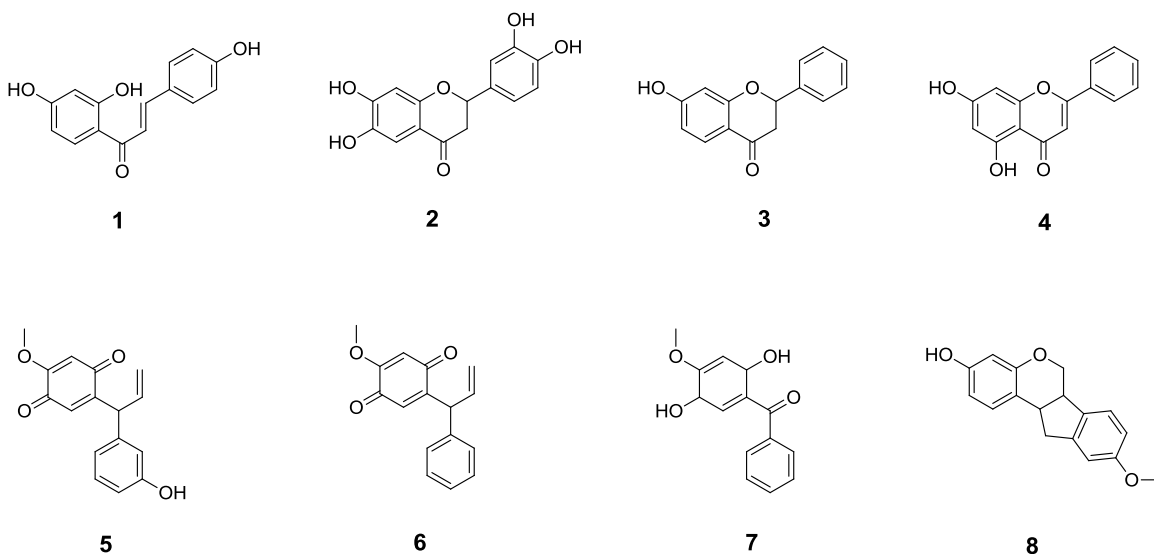


Figura 5. Estructura de flavonoides (1: genina, 2: menina, 3: flavanona, 4: crisina, 5: 3,4-dihidroxi-4-metoxidalbergiona, 6: 4-metoxi-dalbergiona, 7: cearoína, 8: medicarpina) extraídos del propóleo nepalés (Funakoshi-Tago et al., 2015).

Por otro lado, Ngegne y colaboradores (2017) demostraron la actividad antiinflamatoria mediante el modelo edema auricular inducido por xileno de los extractos de acetato de etilo y hexano de propóleos provenientes de Camerún que contienen triterpenos. El extracto de acetato de etilo mostró una inhibición antiinflamatoria dependiente de la dosis de 42.86% y 57.14%; por otro lado, el extracto de hexano exhibió una inhibición de 57.14% y 70.42%, los dos extractos a una dosis de 200 y 400 mg/kg, respectivamente, en comparación con 71.42% del control positivo (dexametasona). Es posible que la DE_{50} del extracto de acetato de etilo se encuentre por debajo de 400 mg/kg, y por debajo de 200 mg/kg para el extracto hexano.

Zaccaria y colaboradores (2017) realizaron caracterización química y determinación de cambios en los niveles de expresión de miRNAs, asociados con respuestas inflamatorias y estrés oxidativo, en dos muestras de propóleos verde y marrón utilizando un extracto hidroglicérico, demostrando que el extracto marrón (rico en flavonoides) fue el más activo sobre todos los miRNAs probados, mientras que el tratamiento con extractos de propóleos verde (abundante en derivados polifenólicos del ácido hidroxicinámico) causó cambios en solo dos de los miRNAs probados. Los resultados mostraron efectos antioxidantes y

antiinflamatorios atribuidos al propóleo verde y marrón, que podría deberse a la diferente modulación de ciertos miRNAs. Esta modulación también podría atribuirse al diferente contenido químico de los extractos, probablemente debido a menor o mayor contenido de flavanonas y flavonas.

En México, estudios realizados sobre extractos metanólicos de propóleos de Sonora, reportaron la presencia de flavonoides como compuestos mayoritarios, principalmente pinocembrina, pinobanksina y crisina; además, reportaron la actividad antiproliferativa sobre las líneas celulares de cáncer humano y murino de los compuestos puros y de los extractos (Hernandez *et al.*, 2007). Existen dos reportes sobre la actividad antimicrobiana de muestras de propóleos colectados en la mesa central de México. Una colecta se realizó en el estado de México, donde los extractos de hexano y etanol fueron activos contra *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Vibrio cholerae* Nr. 01 y *V. cholerae* (caso clínico). El extracto hexánico mostró una concentración inhibitoria mínima (MIC, por sus siglas en inglés) = 0.125 mg/ml para *S. aureus*, *S. epidermidis*, *V. cholerae* Nr. 01 y *V. cholerae*; por otro lado, el extracto etanólico mostró un MIC < 0.125 mg/ml para *S. aureus*, *S. epidermidis*, *V. cholerae* Nr. 01 y *V. cholerae* (Londono Orozco *et al.*, 2010). Otra colecta se realizó en San Luis Potosí, donde se demostró la actividad de los extractos etanólicos y acuosos de propóleos contra cepas de microorganismos gramnegativos: *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Klebsiella pneumoniae*; y microorganismos gram positivos: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus agalactiae*. En general, el extracto etanólico fue más activo que el acuoso. El MIC del extracto etanólico fue 0.93 mg/ml para las gram positivas y 7.5 mg/ml para las gram negativas, mientras que el MIC del extracto acuoso fue de 20 mg/ml para gram positivas y 30 mg/ml para gram negativas (Carrillo *et al.*, 2011). En otros estudios obtuvieron los extractos etanólicos y acuosos de propóleos colectados de varias localidades del estado de Campeche, evaluando la actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus pyogenes*, obteniendo una concentración mínima bactericida (CMB) promedio para los extractos etanólicos inferior (3.33 mg/ml) a la de los acuosos (11.16 mg/ml), indicando que

los primeros son más efectivos. Los autores correlacionan la presencia de la actividad con el disolvente utilizado para la obtención de los extractos, así como el sitio de colecta (Tolosa y Cañizares, 2002). Además, otro trabajo realizado en el estado de Campeche, muestra que el extracto metanólico de propóleos colectado en Campeche, contiene principalmente flavanonas, isoflavonas y pterocarpanos, en este caso no describen actividad biológica (Lotti *et al.*, 2010). Por el contrario, en el estado de Quintana Roo, no se encontró actividad antimicrobiana, antioxidante ni antifúngica, pero sí compuestos mayoritarios como triterpenos pentacíclicos en la muestra (Boisard *et al.*, 2015).

Recientemente, Guzmán-Gutiérrez y colaboradores, investigaron cinco muestras de propóleos de *Apis mellifera* de los Estados de Chiapas y Yucatán, para determinar sus propiedades inhibitoras de peroxidación lipídica (actividad antioxidante), obteniendo como resultado que el extracto de acetato de etilo de un propóleos rojo del estado de Chiapas fue el más activo mediante el ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, por sus siglas en inglés). Por lo que, los autores seleccionaron este extracto para estudios químicos y farmacológicos adicionales para su evaluación de actividad antiinflamatoria, antioxidante y antimicobacteriana del extracto y sus compuestos mayoritarios. Del extracto se aislaron once compuestos (chalcona de epoxipinocebrina, derivado de ϵ -caprolactona, ácido cinámico, pinocebrina, pinostrobrina, ramnetina, ácido cafeico, ácido 3,4-dimetoxicinámico, mezcla de fenilpropanoides prenilados, izalpinina y kaempferol), obteniendo dos nuevos compuestos (chalcona de epoxipinocebrina y un derivado de ϵ -caprolactona), siendo estos dos últimos compuestos los más escasos en el extracto a diferencia de la pinocebrina, el cual es el compuesto más abundante, seguido por pinostrobrina, mezcla de fenilpropanoides prenilados y el flavonol izalpinina. Por otro lado, reportan la evaluación antiinflamatoria por TPA y sobre la actividad de mieloperoxidasa (MPO) mediante prueba de edema en oreja de ratones del extracto de acetato de etilo y la pinocebrina con actividad antiinflamatoria en el modelo de TPA dependiente de la activación de neutrófilos y macrófagos. Obteniendo un $DE_{50}=1.21$ mg/oreja para el extracto y $DE_{50}=0.64$ mg/oreja para pinocebrina (Guzmán-Gutiérrez *et al.*, 2018).

2.6. Vegetación presente en la Cuenca del Papaloapan.

Oaxaca es el estado que registra la mayor biodiversidad en el país, en donde el Papaloapan representa una región de variada flora y exuberante vegetación. El conocimiento de la vegetación presente en cada localidad donde se recolectan las muestras de propóleos, nos puede ayudar a predecir más sobre la composición química de los mismos, debido a que, hasta ahora, se sabe que hay una relación entre las características del propóleos y los residuos vegetales que las abejas recolectan para formarlo. Por lo cual, se esperan propóleos con propiedades antiinflamatorias si provienen de plantas que contienen metabolitos secundarios antiinflamatorios.

Dentro de la región del Papaloapan se encuentra San Lucas Ojitlán, lugar con diversidad de plantas con propiedades antiinflamatorias y además, de fácil acceso para las abejas *Apis mellifera*; algunos ejemplos son *Enterolobium cyclocarpum*, nacastle (Gamal-Eldeen *et al.*, 2020); *Cordia alliodora*, sochicahua (Paniagua-Zambrana *et al.*, 2020); *Morus nigra*, moral (Chen *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2019); *Ligusticum porteri*, pata de cochino (Donkor *et al.*, 2016) y *Crescentia cujete*, jícara (Dawodu *et al.*, 2016); *Spondias mombin*, jobo (Cabral *et al.*, 2016); *Prunus domestica*, ciruelo (Silvan *et al.*, 2020); *Prunus dulcis*, almendro (Qureshi *et al.*, 2016); *Vitis vinifera subsp. Sylvestris*, uva silvestre (Uttra *et al.*, 2018); *Pachira aquatica*, apompo (Rodrigues *et al.*, 2019); *Guazuma ulmifolia*, guasimo (Damor *et al.*, 2019); *Bursera simaruba*, mulato (Marcotullio *et al.*, 2018); *Zea mays*; maíz (Roh *et al.*, 2016); *Cedrela odorata*, cedro rojo (Lee *et al.*, 2019); *Mucuna pruriens*, picapica (Avoseh *et al.*, 2020); *Persea americana*, aguacate (Alkhalaf *et al.*, 2019); *Citrus sinensis*, naranja (Khan *et al.*, 2016); *Citrus aurantium*, toronja (He *et al.*, 2018); *Pouteria sapota*, zapote mamey (Prabhu *et al.*, 2018); *Manilkara zapota*, chicozapote (Leelarungrayub *et al.*, 2019); *Annona muricata*, guanábana (Abdul Wahab *et al.*, 2018); *Theobroma cacao*, cacao (Oyeleke *et al.*, 2018); *Coffea sp*, café (Kiattisin *et al.*, 2019); *Psidium guajaba*, guayaba (Kariawasam *et al.*, 2017); *Tamarindus indica*, tamarindo (Komakech *et al.*, 2019); *Citrus reticulata*, mandarina

(Nasri *et al.*, 2017); *Citrus aurantifolia*, limón mexicano (Narang *et al.*, 2016), y algunas otras especies (Arregui Gallegos, 2013).

Otro lugar con diversidad de plantas con actividad antiinflamatorias y antioxidantes es San Bartolo, Tuxtepec. En el se encuentra *Musa balbisiana*, plátano (Kumari *et al.*, 2020; Oresanya *et al.*, 2020); *Zea mays*, maíz (Roh *et al.*, 2016); *Bursera simaruba*, mulato (Marcotullio *et al.*, 2018); *Saccharum officinarum*, caña de azúcar (Miraj, 2016); *Brosimum alicastrum*, el ramón (Moo-Huchin, 2019; Ozer, 2017) y otras plantas (Thiébaud, 2014; Vargas-Orozco, 2011).

Por último, en Huautla de Jiménez se encuentran plantas con propiedades antiinflamatorias como *Phaseolus vulgaris*, frijol (M Devi *et al.*, 2020); *Zea mays*, maíz (Roh *et al.*, 2016); *Coffea sp.*, café (Kiattisin *et al.*, 2019); *Bursera simaruba*, mulato (Marcotullio *et al.*, 2018); *Liquidambar styraciflua*, liquidámbar (Mancarz, *et al.*, 2019a; Mancarz *et al.*, 2019b); *Orchidaceae sp.*, orquídeas (Wu *et al.*, 2019); *Persea americana Mill.*, aguacate (Athaydes *et al.*, 2019), *Buddleja americana L.*, teposan (Hernández-Pasteur *et al.*, 2019); *Alnus acuminata subsp. arguta (Schltdl.) Furlow*, aile (Aguilar *et al.*, 2011); etc (Lorea y Munn, 2005; Sosa-Ortega, 2010).

Por lo anterior y con base en una busqueda bibliográfica reciente, se identificó que no existen estudios sobre las propiedades farmacológicas de propóleos de la región de la Cuenca del Papaloapan. Por lo tanto, resulta pertinente la validación de actividad antiinflamatoria *in vivo* de propóleos de la Cuenca del Papaloapan en la actividad antiinflamatoria *in vivo* en modelos animales.

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, se ha mencionado al propóleo como una excelente alternativa como tratamiento antiinflamatorio; además de permitir el aprovechamiento de un producto de la colmena que poco ha sido aprovechado en la región (Dolores-Mijangos *et al.*, 2017). Los estudios realizados en extractos de propóleos demuestran que la composición de los mismos está en función de las condiciones medioambientales, particularmente de las especies vegetales presentes en el medio.

Por otro lado, los agentes antiinflamatorios actuales como los AINES y glucocorticoides, están asociados con efectos adversos con el uso prolongado. Por lo cual, todavía existe la necesidad de descubrir nuevos y mejores tratamientos.

En este sentido, combinando las desventajas de la farmacoterapia actual y las propiedades farmacológicas del propóleo que depende de la ubicación geográfica, es de gran importancia estudiar la actividad antiinflamatoria de los propóleos de la Cuenca del Papaloapan debido a que no existen estudios científicos de propóleos en la Cuenca, dándole un valor agregado a este producto natural y logrando así su aprovechamiento racional.

4. HIPÓTESIS

Las muestras de tres propóleos de la Cuenca del Papaloapan, Oaxaca presentan actividad antiinflamatoria en los modelos *in vivo* de carragenina y TPA comparables o más potentes que el fármaco de referencia, indometacina.

5. OBJETIVO PRINCIPAL

Determinar la actividad antiinflamatoria de tres muestras de propóleos colectadas en la Cuenca del Papaloapan a través de dos modelos de inflamación aguda *in vivo* en ratones *Balb/C*.

6. OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Determinar la actividad antiinflamatoria por medio del modelo de inflamación aguda inducido por carragenina de tres muestras de propóleos colectados en la región de la Cuenca del Papaloapan, Oaxaca.
- Determinar la actividad antiinflamatoria por medio del modelo de inflamación aguda inducido por TPA de tres muestras de propóleos colectados en la región de la Cuenca del Papaloapan, Oaxaca.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Recolección de las muestras de propóleos.

La recolección de las muestras de propóleos de México se realizó en tres localidades de la Cuenca del Papaloapan (Edo de Oaxaca): San Lucas Ojitlán (Latitud norte: 17° 46' Longitud oeste: 96° 18'), San Bartolo (latitud: 18.0859, longitud: -96.134 18° 5' 9" Norte, 96° 8' 2"Oeste) y Huautla de Jiménez (Latitud norte: 18° 04' 00" Longitud oeste: 96° 32' 00").

Las muestras fueron obtenidas con el método tradicional de raspado con espátula en la rejilla o malla. Posteriormente, la muestra fue triturada y tamizada para eliminar la madera y residuos de insectos.

7.2. Preparación de muestras de propóleos.

Las muestras de propóleos fueron almacenadas en refrigeración protegidas de la luz, previo al análisis.

La extracción consistió en agregar en vasos de precipitado 25 g de propóleos crudo de cada una de las diferentes localidades añadiendo 70 mL de acetona. Se colocó cada vaso en una parrilla con agitación constante durante un día a temperatura ambiente, cubriendo los vasos de precipitado con papel aluminio para que los compuestos extraídos no estuvieran en contacto con la luz, y de esta forma evitar cualquier tipo de reacción química. Posteriormente, se filtró el sobrenadante y se eliminó el disolvente en un rotaevaporador para llevar la muestra a peso constante.

7.3. Análisis de las muestras mediante Cromatografía en Capa Fina (CCF).

Para la cromatografía en capa fina (CCF) se utilizaron placas comerciales de gel de sílice Merck TLC Sílica gel 60 F₂₅₄ de 175-225 µm de espesor, y como fase móvil se usaron sistemas de elución de diferente polaridad. Para la visualización de las bandas, las placas fueron observadas a luz ultravioleta a 254 nm y 365 nm y se utilizó H₂SO₄ a 10% como revelador. Se utilizaron como referencias β-amirina, β-sitosterol, fracción primaria rica en terpenos de *Cnidoscolus chayamansa*, hesperidina, kaempferol, quercetina, tilirosido, rutina, ácido ursólico-ácido oleanólico, escopoletina y esculetina.

7.4. Evaluación de la actividad antiinflamatoria aguda.

Esta actividad se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Farmacología del Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS-Cd. México). Se utilizaron ratones machos y hembras de la cepa *Balb/C* provenientes del bioterio del CMN siglo XXI, IMSS, los cuales se mantuvieron en un periodo de acondicionamiento de 7 días, con porcentaje de humedad de 40-70%, con agua y alimento RodentChow ad *libitum*. El manejo de los animales de experimentación fue apegado a los estándares del Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) y a la Norma Oficial Mexicana, Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

7.5. Inducción del proceso inflamatorio agudo por medio de carragenina.

En este experimento se realizó una inyección subcutánea (s.c.) de 20 µL de carragenina disuelta en solución salina isotónica (SSI), en el cojinete subplantar de ratones hembras y machos. Los grupos tratados (n=7) fueron administrados vía intragástrica (i.g.) con indometacina Sigma-Aldrich (20 mg/kg), y con las muestras EPP1, EPP2 y EPP3 a la dosis de 25 mg/kg, una hora antes de la inoculación del agente irritante (Gutiérrez-Rebolledo *et al.*, 2016; Núñez-R *et al.*, 2018; Pérez-González *et al.*, 2017). Los tratamientos fueron solubilizados en el vehículo Tween 80:Agua (1:9), y el grupo control de carragenina recibió

sólo el vehículo por vía i.g. El porcentaje de inhibición fue calculado para cada grupo comparando las mediciones del edema subplantar en los distintos tiempos (1, 3, 5, 7 y 24 h) (Et), con respecto de la medición basal al tiempo cero antes de inocular la carragenina (Eo). Los resultados fueron analizados con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = [(Et-Eo) \text{ Carragenina} - (Et-Eo) \text{ Tratamientos} / (Et-Eo) \text{ Carragenina}] \times 100$$

Et = Formación del edema a diferentes tiempos (1, 3, 5 y 7 h).

Eo = Formación del edema al tiempo basal.

7.6. Edema auricular inducido con TPA.

Para este estudio se indujo el edema auricular con la aplicación de 2.5 µg de TPA (García-Rodríguez *et al.*, 2014; Pérez-González *et al.* 2017). Como control positivo se empleó indometacina Sigma-Aldrich para hembras e indometacina Santa Cruz Biotechnology para machos, aplicada por vía tópica disuelta en acetona. Para estos ensayos se formaron cinco grupos de 7 ratones hembras y machos c/u. Todos los grupos fueron administrados en la oreja derecha con 25 µL de TPA (0.05 µg/µL) y después de 30 minutos fue administrado el tratamiento dependiendo del grupo como se describe a continuación: grupo I (control negativo) se aplicó únicamente el vehículo (acetona), al grupo II (control positivo) se le aplicó indometacina a dosis de 2 mg/oreja disuelta en 50 µL de acetona, los grupos III, IV y V (tratados) se les aplicó 50 µL de las muestras problema EPP1, EPP2, y EPP3 a una dosis de 2 mg/oreja disuelta en acetona. Seis horas después de la aplicación del TPA, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y posteriormente, se obtuvo el tejido auricular de ambas orejas realizando cortes de 6 mm de diámetro. El porcentaje de inhibición se calculó mediante la diferencia de peso entre ambas orejas con respecto al grupo control. La inflamación fue comprobada como el incremento en el peso de la oreja en donde se aplicó el TPA (Domínguez-Ortiz *et al.*, 2010; García-Rodríguez *et al.*, 2014); calculando el % de inhibición de inflamación con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \left[\frac{((Ws-Wo) \text{ Control} - (W's - Wo) \text{ Tratamiento})}{((Ws-Wo) \text{ Control})} \right] \times 100$$

Wo = Peso de la oreja derecha tratada únicamente con el vehículo.

W's = Peso de la oreja izquierda tratada únicamente con TPA disuelto en el vehículo (control positivo).

Ws = Peso de la oreja izquierda tratada con TPA y los tratamientos disueltos en el vehículo.

7.7. Análisis estadístico

Se empleó el software estadístico Sigma Plot V.12.0. (2011-2012) para el análisis de los resultados y elaboración de gráficos. Para la actividad antiinflamatoria se presentó los resultados como la media \pm error estándar. Se analizaron los valores del desarrollo de edema de la pata en el modelo de carragenina y peso del edema de la oreja en TPA con un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía y con una prueba post hoc Student Newman Keuls (SNK). Resultados de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Se analizó la comparación de la actividad antiinflamatoria entre ratones machos y hembras por medio de carragenina y TPA con un ANOVA de dos vías y una prueba post hoc SNK. Resultados de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Rendimientos de las muestras de propóleos.

Las etapas de procesamiento de los propóleos recolectados, tuvieron diferentes rendimientos. EPP1 tuvo 54.78 %, mientras que EPP2 y EPP3 tuvieron 24.71 y 42.16%, respectivamente (Tabla 1). Esto puede deberse a diferentes factores como el método de extracción, fecha de recolección y ubicación.

Tabla 1. Especificaciones de las muestras de propóleos obtenidos por extracción con acetona.

Clave	Localidades	Rendimiento	Fecha de recolección	Coordenadas Geográficas
EPP1 (muestra de propóleos 1)	San Lucas Ojitlán	54.78 %	Febrero del 2019	Latitud norte: 17° 46' Longitud oeste: 96° 18'
EPP2 (muestra de propóleos 2)	San Bartolo, Tuxtepec	24.71 %	Junio del 2019	Latitud: 18.0859 Longitud: -96.134 18° 5' 9" Norte, 96° 8' 2" Oeste
EPP3 (muestra de propóleos 3)	Huautla de Jiménez	42.16 %	Abril del 2017	Latitud norte: 18° 04' 00" Longitud oeste: 96° 32' 00"

8.2. Análisis de Cromatografía en Capa Fina (CCF).

El análisis a través de CCF se utilizó para detectar los principales metabolitos secundarios presentes en las muestras provenientes de San Lucas Ojitlán, San Bartolo, Tuxtepec y Huautla de Jiménez, EPP1, EPP2 y EPP3, respectivamente. En primer lugar, se buscó la presencia de compuestos que previamente ya habían sido reportados como antioxidantes y/o antiinflamatorios en las muestras de propóleos de la Cuenca del Papaloapan, para explicar su actividad farmacológica.

En la Figura 6 se observa que las muestras EPP1 y EPP2 son semejantes en composición al observarlas al UV a longitudes de onda de 254 nm (A) y 365 nm (B), debido que tienen 5 bandas muy parecidas, observadas mejor con una detección de 365 nm (B). No hay presencia de las referencias β -amirina, β -sitosterol y fracción primaria de terpenos de *Cnidoscolus chayamansa* en la placa, bajo estas condiciones.

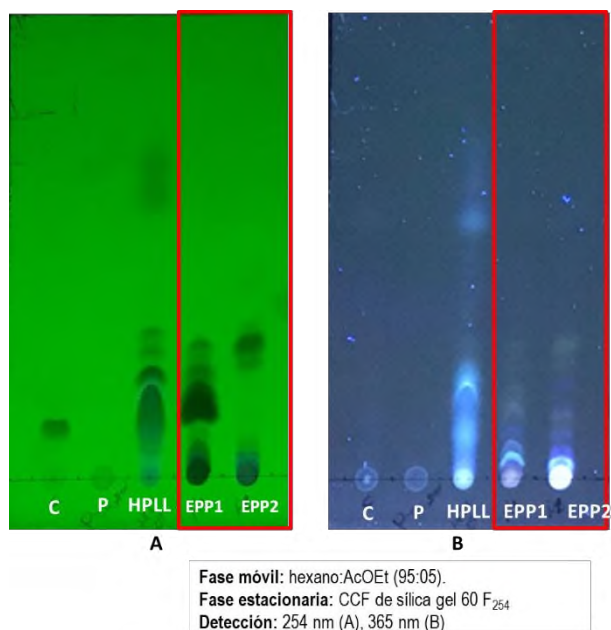


Figura 6. Perfil cromatográfico de las muestras EPP1 y EPP2 en un sistema de elución hexano:AcOEt (95:05), usando como referencias C= β -amirina; P= β -sitosterol y HPLL= fracción primaria rica en terpenos de *Cnidoscolus chayamansa*.

En la Figura 7 se muestra la CCF de las tres muestras en las que se empleó el sistema de CHCl_3 (100%) para la búsqueda de terpenos. La placa reveló que no hay presencia de terpenos en las muestras EPP1, EPP2 y EPP3 al ser comparada con la fracción rica de terpenos obtenido de *Cnidoscolus chayamansa*. Sin embargo, se observó una clara similitud entre las muestras EPP1 y EPP3 (Figura 7A) en el contenido de compuestos de mediana polaridad; por otro lado, en la misma figura (7A y B) se observa que las muestras EPP1 y EPP2 tienen similitud en el contenido de compuestos poco polares.

La búsqueda de terpenos en las muestras se realizó tomando en cuenta los resultados previamente publicados, ya que se han identificado triterpenos, diterpenos y sesquiterpenos como compuestos bioactivos, algunos de los cuales, según se informa, poseen propiedades antiinflamatorias, antifúngicas, antivirales y citotóxicas (Cioffi *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2019; Muir *et al.*, 1982; Nguyen *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2014).

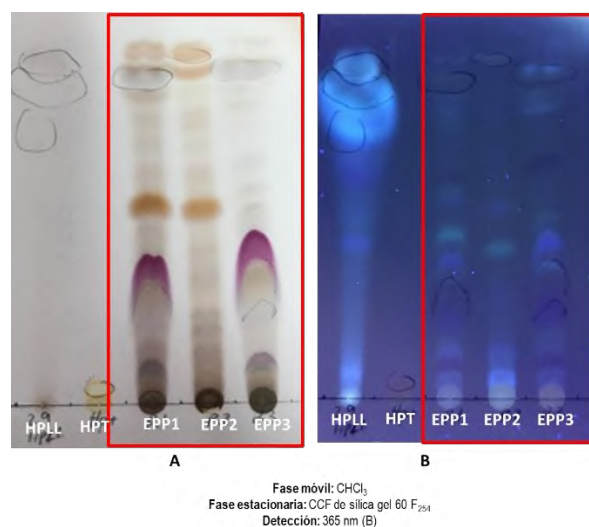


Figura 7. Perfil cromatográfico de las muestras EPP1, EPP2 y EPP3 en un sistema de elución CHCl₃, usando como referencias HPLL= fracción primaria rica en terpenos de *Cnidoscolus chayamansa* y HPT= hesperidina.

En otro ensayo, se decidió eluir las muestras EPP1 y EPP2 con un sistema más polar (Figura 8). En este caso se empleó β -amirina y la fracción rica en terpenos de *Cnidoscolus chayamansa*, observándose la placa a luz visible (A) y bajo la luz UV (B). En ambas muestras no se detectó ninguna de las referencias empleadas, no obstante, se logra observar la clara diferencia de metabolitos secundarios entre las muestras EPP1 y EPP2.

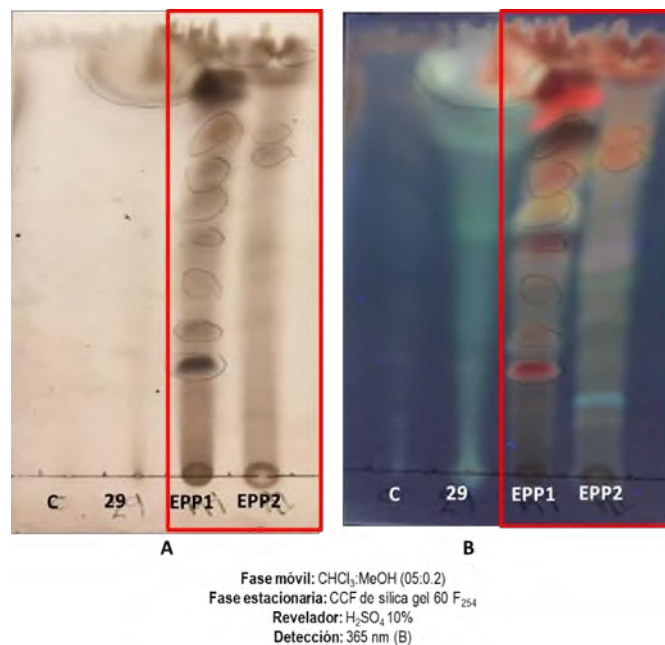


Figura 8. Perfil cromatográfico de las muestras EPP1 y EPP2 en un sistema de elución CHCl₃:MeOH (99:0.1), usando como referencias C=β-amirina y 29= fracción primaria rica en terpenos de *Cnidoscolus chayamansa*.

Se realizó la búsqueda de β-amirina en las muestras de propóleos debido a que se ha descrito que este compuesto es un metabolito secundario que biosintetizan las plantas y que muestra importante actividad antiinflamatorias (Simão da Silva *et al.*, 2011; LIMA, 2018).

Investigaciones realizadas en las tres localidades de la Cuenca del Papaloapan donde fueron colectadas las muestras de propóleos, han permitido demostrar que existen especies vegetales con actividad antiinflamatoria. Por ejemplo, *Bursera simaruba* biosintetiza β-amirina, α-amirina, yateína, β-peltatina-O-β-D-glucopiranosido hinokinín y bursehernín (Maldini *et al.*, 2009; Peraza-Sánchez, 1995). Además, se ha descrito que *Bursera simaruba* es una especie muy frecuente en la región de Quintana Roo, México, de donde han colectado propóleos (Boisard *et al.*, 2015).

Otros investigadores han reportado la presencia de diferentes metabolitos secundarios en el propóleos mexicano. Por ejemplo, en Quintana Roo, México, se encontró como principales componentes del extracto etanólico la presencia de triterpenoides pentacíclicos

tales como derivados de α y β -amirina y esteroides (Boisard *et al.*, 2015). Por otro lado, en los extractos etanólicos de propóleos colectados en diferentes zonas de Sinaloa (Norte, Centro y Sur) identificaron principalmente α -amirina, lupeol, germanicol, morfina y tetrahidrocanabiol, sobre todo en las muestras de la zona centro y sur. Así como, α -tocoferol y fitoesteroides en la zona norte (Garay-Renteria, 2018). En las muestras colectadas de Yucatán, México también reportan la presencia de triterpenoides como ácido mangiferólico, ácido isomangiferólico y dammarenediol II (Herrera-López *et al.*, 2019).

No obstante, las placas de CCF que se muestran en las Figuras 6, 8, 9 y 11, no revelaron la presencia del triterpenoide β -amirina en las muestras EPP1, EPP2 y EPP3. Esto indica la necesidad de realizar un estudio químico de los propóleos de la región mediante el empleo de otras técnicas de análisis como la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM) o bien la cromatografía de líquido de alta resolución acoplado a espectrometría de masas (HPLC/EM), debido a su mayor capacidad de separación de metabolitos de muestras complejas (Lucero-Gómez *et al.*, 2014).

Por otra parte, en la Figura 9 se muestra la la CCF de las muestras EEP1 y EPP2 empleando como fase móvil CHCl_3 :MeOH (80:20). Con este análisis se detectó la presencia de β -sistosterol en las muestras EPP1 y EPP2, observándose con más claridad en la CCF observada con luz visible (Figura 9A), este compuesto esta en mayor cantidad en la muestra EPP1. La CCF observada a la luz UV a 365 nm (Figura 9B) muestra la presencia de fluorescencias de baja polaridad en ambas muestras, algunas de ellas tienen cierta similitud.

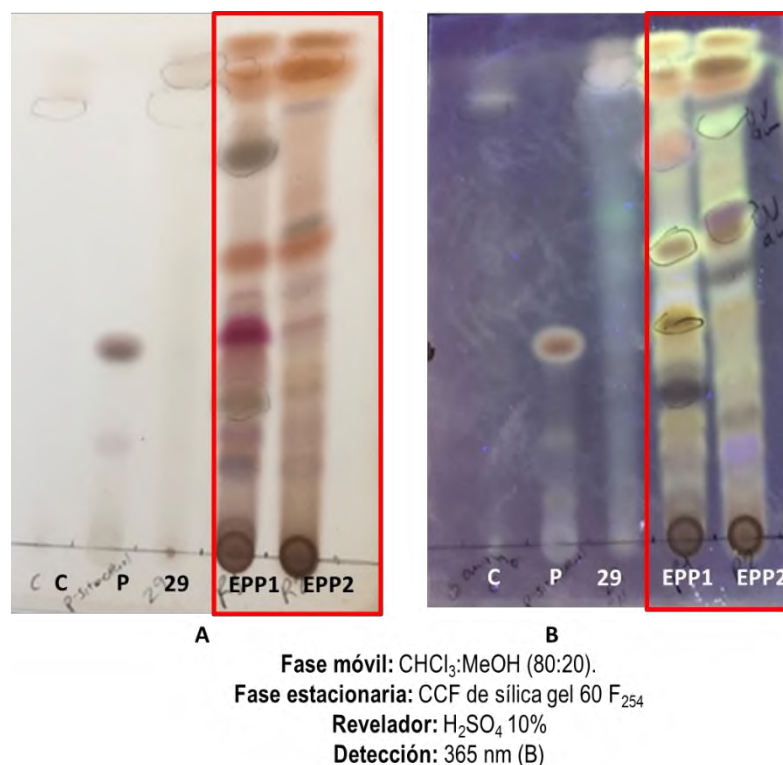


Figura 9. Perfil cromatográfico de las muestras EPP1 y EPP2 en un sistema de elución CHCl₃:MeOH (80:20), usando como referencias C= β -amirina, P= β -sitosterol y 29= fracción primaria rica en terpenos de *Cnidocolus chayamansa*.

Se ha de destacar que el β -sitosterol detectado en las muestras EPP1 y EPP2 es un fitoesterol que ha sido probado por muchos investigadores en estudios *in vitro* e *in vivo* como analgésico (Dighe *et al.*, 2016), inmunomodulador (Fraile *et al.*, 2012), anticancerígeno (Sharmila y Sindhu, 2017), hepatoprotector (Abdou *et al.*, 2019), antioxidante (Ponnulakshmi *et al.*, 2019), antidiabético (Babu *et al.*, 2020), antiinflamatorio (Kurano *et al.*, 2018; Paniagua-Pérez *et al.*, 2016; Valerio y Awad, 2011), etc (Babu y Jayaraman, 2020; Paniagua-Pérez *et al.* 2005). Así mismo, dentro de los estudios antiinflamatorios del β -sitosterol se encuentra la inhibición del edema plantar en rata, inhibiendo entre el 50 y 70%, de igual manera inhibió el 75% en la prueba de edema auricular en ratón. Además, en el ensayo de pleuresía, el efecto del β -sitosterol sobre el derrame pleural exudativo inducido con la reacción antígeno/anticuerpo en ratas, redujo el 46% del volumen de exudado pleural, así como una cantidad 20% más baja de neutrófilos en comparación con el nivel del grupo control (Paniagua-Pérez *et al.*, 2016). Por otro lado, también se ha investigado la

participación de β -sitosterol en las vías NF- κ B y STAT1 (transductor de señales y activador de la transcripción 1) y su efecto sobre la actividad de la fosfatasa SHP-1 como modulador negativo de estas vías, empleando modelos *in vitro* (empleando macrófagos murinos J774A.1). Los resultados indicaron que el β -sitosterol a la dosis de 1 y 16 μ M aumentó la actividad de SHP-1 en un 300% y 200%, respectivamente. Además, reportaron que este compuesto redujo la liberación de algunas citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias y aumentó los niveles de IL-10. También describen que el β -sitosterol inhibió la translocación de NF- κ B al núcleo y STAT1. Lo anterior demostró el efecto antiinflamatorio de β -sitosterol en los macrófagos al inactivar STAT1 y NF- κ B, que podría ser mediado por la activación de SHP-1 (Valerio y Awad, 2011).

Los fitoesteroles como el β -sitosterol se encuentran abundantemente en vegetales, frutas y nueces. Se ha descrito la presencia de este compuesto en las ortigas (*Common Nettle*), centeno (*Secale cereale*), palmito salvaje (*Serenoa repens*) y ciruelo africano (*Pygeum africanum*), encontrándose en varias partes de las plantas (hojas, frutos y/o rizomas). Además, el aceite de cacahuete y aguacate, el salvado de arroz, el germen de trigo, los aceites de maíz, los aceites vegetales y los productos elaborados a partir de ellos, las frutas y la soya también se han clasificado como fuentes significativamente ricas en β -sitosterol (Awad *et al.*, 2000; Duester, 2001; Rakel MD, 2017). El maíz es una planta muy común en la Cuenca del Papaloapan (Coordinación General del Comité Estatal de Planeación para el Desarrollo, 2016; Luna Ruiz, 2007; Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2015), dado que el cultivo de maíz es muy común en San Lucas Ojitlán y San Bartolo, era de esperarse la presencia de β -sitosterol en las muestras EPP1 y EPP2 (Arregui Gallegos, 2013; Mariscal Torroella, 2011). Por otro lado, investigaciones previas han reportado que *Zea mays* es una planta con actividad antiinflamatoria que contiene otros metabolitos secundarios como éster de ácido hidroxicinámico, maysina y ácido 3-O-cafeoilquínico (Mihaličová Malčovská *et al.*, 2014; Žilić *et al.*, 2016).

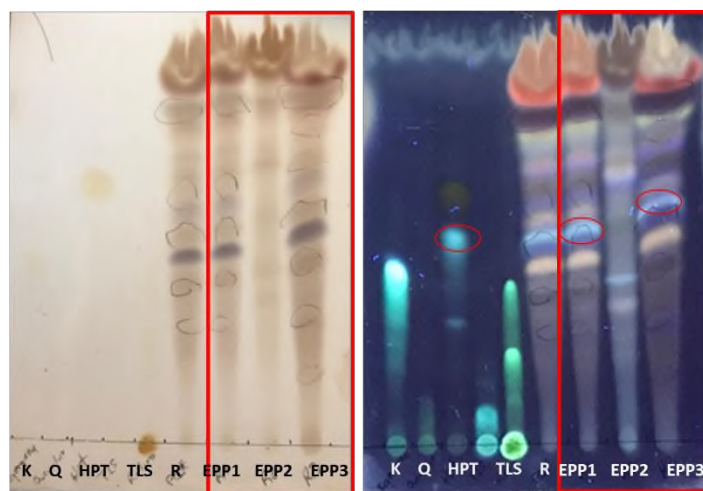
En la Figura 10 se observa que la placa con exposición a luz UV (B) tiene presencia del glucósido de hesperidina en EPP1 y EPP3. Los glucósidos de flavanona se encuentran presentes principalmente en los frutos y hojas de los cítricos. La hesperidina es el glucósido más importante de los cítricos como limones y naranjas (Patel *et al.*, 2018; Salas *et al.*, 2011).

Los cítricos como naranjas y limones son plantas comunes en la Cuenca del Papaloapan (Coordinación General del Comité Estatal de Planeación para el Desarrollo, 2016; López-Hernández *et al.*, 2019; Luna Ruiz, 2007; Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2015), por tal razón, es lógico que el propóleos de San Lucas Ojitlán (EPP1) y Huautla de Jiménez (EPP3) tengan la presencia de hesperidina.

Con esta polaridad (CHCl₃:MeOH 90:10), las muestras EPP1 y EPP3 son casi iguales debido a que cuentan con el mismo número de manchas, observándose así un perfil cromatográfico casi igual. Al observar la CCF a luz visible (Fig. 10A) y expuesta a exposición UV (B) se encontró que las muestras EPP1 y EPP3 son muy similares y se observó que entre estas muestras (EPP1 y EPP3) existe diferencias en el perfil de EPP2 en cuanto a su composición química. Lo anterior nos muestra que existen similitudes y diferencias entre las muestras de propóleos de las diferentes localidades de la Cuenca del Papaloapan, pudiendo atribuir estas diferencias a las características climáticas y florísticas específicas de cada zona.

La literatura ha descrito diferentes metabolitos secundarios presentes en los propóleos mexicanos. Por ejemplo, en los propóleos rojos de Chiapas, México identificaron diferentes metabolitos secundarios como flavonoides, fenilpropanoides y una lactona de ácido graso, resaltando izalpinina y pinocembrina como potentes antiinflamatorios (Guzmán-Gutiérrez *et al.*, 2018). Otros compuestos antiinflamatorios reportados en los propóleos de México son: tectocrisina (Cuautitlán Izcalli, Estado de México y El Oro, Estado de México), taraxasterol (Villa del Carbón, Estado de México), sakuranetina (El Oro, Estado de México), lupenona (Tlalpujahuá-Senguio, Michoacán y Tianguismanalco 2012, Puebla), geranilgeraniol (Tianguismanalco 2012, Puebla) lupeol (Tianguismanalco 2012, Puebla) y

hesperidina (Teocelo-Xalapa, Veracruz) (Morales-Muñoz, 2015; Rodríguez Pérez *et al.*, 2020). Todos estos compuestos pueden estar presentes en los propóleos EPP1, EP2 y EPP3, compuestos que le confieren actividad antiinflamatoria en los ensayos biológicos.



Fase móvil: CHCl₃:MeOH (90:10).
Fase estacionaria: CCF de sílica gel 60 F₂₅₄
Revelador: H₂SO₄ 10%
Detección: 365 nm (B)

Figura 10. Perfil cromatográfico de las muestras EPP1, EPP2 y EPP3 en un sistema de elución CHCl₃:MeOH (90:10), usando como referencias K=kaempferol, Q=quercetina, HPT= hesperidina, TLS= tilirosido y R= rutina.

A pesar de la presencia de hesperidina en las muestras, no se observaron manchas similares a los flavonoides antiinflamatorios campferol, quercetina, tilirósido y rutina en la placa (Kauss *et al.*, 2008; Qiao *et al.*, 2011; Tian *et al.*, 2021; Rangel-Velázquez, 2016).

Por todo lo anterior, es importante reafirmar que nuestro estudio de CCF, demostró presencia de hesperidina en las muestras EPP1 Y EPP3. Esto es relevante debido a que se ha reportado la hesperidina como antiinflamatorio, reduciendo las metaloproteinasas en la artritis reumatoide, así como el grado de polarización de los macrófagos M1 (Qi *et al.*, 2019), exhibiendo efectos renoprotectores contra lesión renal aguda (Park *et al.*, 2019), actividad cicatrizante gástrica en la mucosa ulcerada (da Silva *et al.*, 2019) y función protectora contra la pancreatitis (Aja *et al.*, 2020; Hanchang *et al.*, 2019). Además, se ha mencionado este

metabolito como un prometedor candidato a fármaco para la prevención y el tratamiento de COVID-19 (Haggag *et al.*, 2020).

Cuando se eluyeron las CCF en una fase móvil de CHCl₃:MeOH (90:10) (Figura 11) no se observó la presencia de β-amirina a simple vista (A) y bajo la luz UV (B) en las muestras EPP1 y EPP2, pero se observan manchas diferentes entre las muestras, especialmente en EPP1, en esta polaridad.

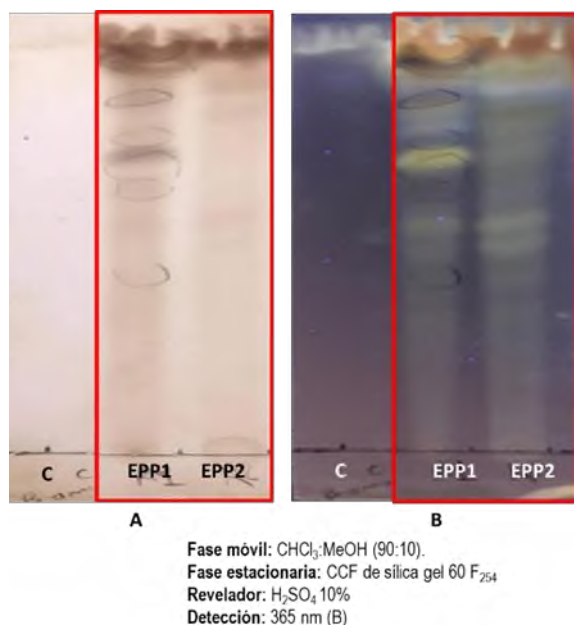


Figura 11. Perfil cromatográfico de las muestras EPP1 y EPP2 en un sistema de elución CHCl₃:MeOH (90:10), usando como referencia C=β-amirina.

Posteriormente, se buscó la presencia de ácido ursólico/oleanólico, escopoletina y esculetina en las muestras EPP1-EPP3 (Figura 12). El ácido ursólico y el ácido oleanólico son dos triterpenos ampliamente distribuidos en frutos, estos isómeros triterpénicos son de gran interés farmacológico por sus múltiples propiedades bioactivas. Estudios muestran que estos triterpenos tienen actividad antiinflamatoria no selectiva *in vitro* para las isoformas de ciclooxigenasa (Ludeña-Huaman y Ramos-Inquiltupa, 2019; Magalhães *et al.*, 2012). Por otro lado, esculetina, es un inhibidor de las enzimas LOX-5 y COX-2, vías de metabolismo del ácido araquidónico (Corrêa *et al.*, 2008; Hout y Payá, 1996). Al igual que

esculetina, la escopoletina es una cumarina que tiene actividad antiinflamatoria (Chagas, 2010).

Como se observa en la Figura 12, no hubo presencia de los metabolitos ácido ursólico-ácido oleanólico, escopoletina y esculetina. Sin embargo, se observó fluorescencia azul en EPP2 diferente a escopoletina y esculetina.



Fase móvil: CHCl_3 :MeOH (90:10).
Fase estacionaria: CCF de sílica gel 60 F₂₅₄
Revelador: H_2SO_4 10%
Detección: 365 nm

Figura 12. Perfil cromatográfico de las muestras EPP1, EPP2 y EPP3 en un sistema de elución CHCl_3 :MeOH (90:10), usando como referencias AU/AO= ácido ursólico-ácido oleanólico, E2= escopoletina y E= esculetina.

Finalmente, en la Figura 13 se presenta una placa de CCF de fase móvil CH_2Cl_2 :MeOH (96:04) que no muestra presencia de AU/AO observándola en luz UV (B) y luz visible (A). Una vez más se puede ver la diferencia de manchas entre EPP1 y EPP2.

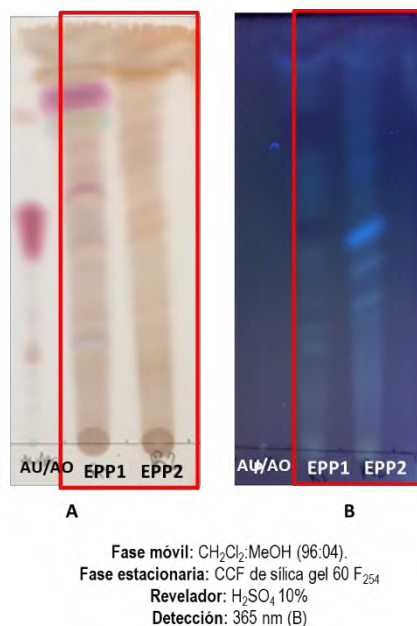


Figura 13. Perfil cromatográfico de las muestras EPP1 y EPP2 en un sistema de elución CH₂Cl₂:MeOH (96:04), usando como referencia AU/AO= ácido ursólico-ácido oleanólico.

En conclusión, las muestras EPP1, EPP2 y EPP3 no mostraron la presencia de la mayoría de las referencias de flavonoides utilizadas, sin embargo, no podemos afirmar que estas muestras tienen un contenido bajo o no contienen flavonoides y triterpenoides. Para esto se requiere de una cuantificación de fenoles totales y flavonoides de acuerdo con los métodos ya establecidos (Chaa *et al.*, 2019; Escriche y Juan-Borrás, 2018; Mohtar *et al.*, 2020). Además, se propone la presencia de β -sitosterol de forma preliminar en las muestras EPP1 y EPP2; así como de hesperidina en las muestras EPP1 y EPP3 (Figura 14).

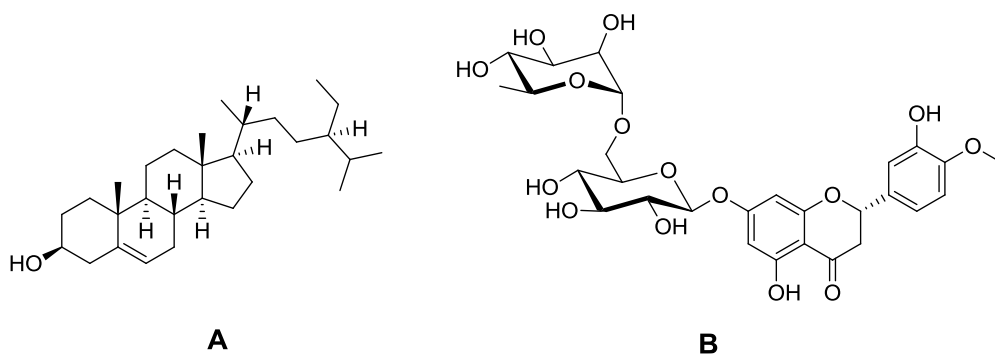


Figura 14. Estructura química de β -sitosterol (A) y hesperidina (B).

Sin embargo, se requieren otras técnicas de análisis como CG/EM, HPLC/EM o resonancia magnética nuclear (RMN) para confirmar esta información (Al-Rubaye *et al.*, 2017; Borges *et al.*, 2017; Brkljača y Urban, 2015).

8.3. Determinación de la actividad antiinflamatoria mediante el método de carragenina de los propóleos EPP1, EPP2 y EPP3.

Estos ensayos se realizaron en ratones hembras y machos *Balb/C*, debido a que es importante tomar en cuenta el sexo como variable, para identificar los factores precisos que median las diferencias sexuales en las respuestas inflamatorias, y así tener un estudio amplio de la fisiopatología y la farmacoterapia de las enfermedades inflamatorias (Pace *et al.*, 2017; Klein y Flanagan, 2016).

En la Figura 15 se muestran los resultados de la actividad antiinflamatoria de los propóleos a diferentes tiempos. Los tratamientos EPP1 y EPP2 tienen un compartamiento similar, el único que cambia ligeramente es el tratamiento EPP3 a las 24 horas, debido a que el edema subplantar no disminuye mucho en comparación con los otros dos tratamientos.

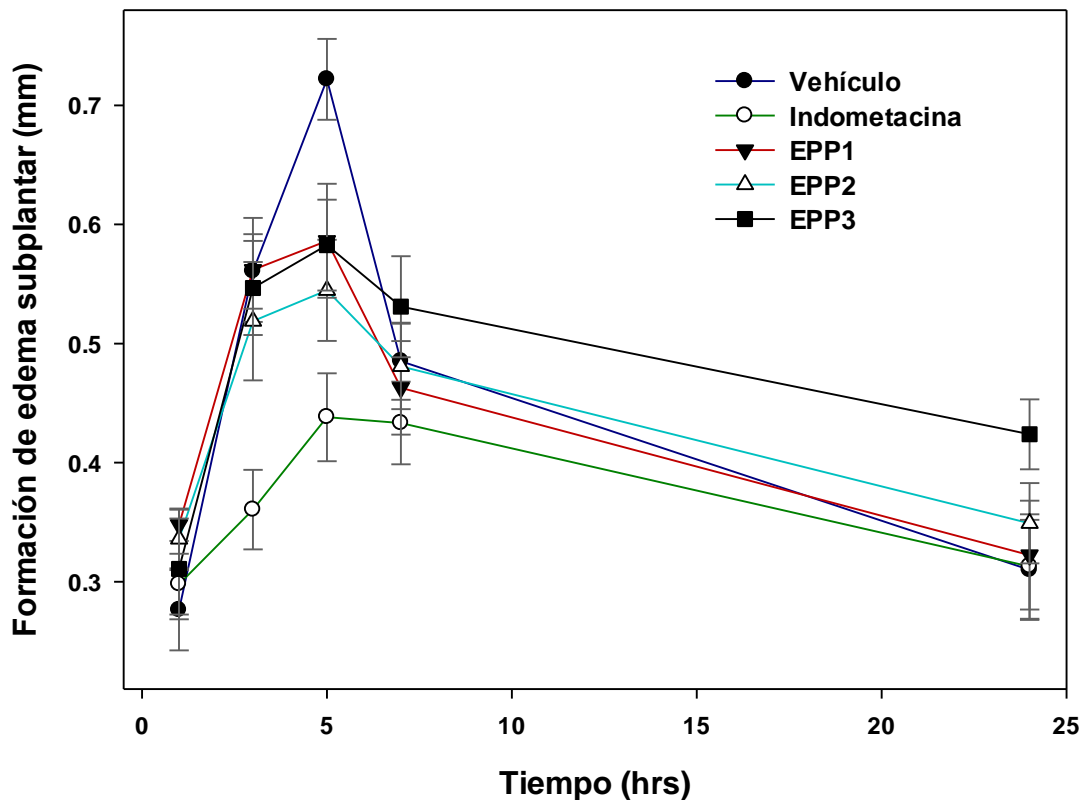


Figura 15. Actividad antiinflamatoria de los tratamientos EPP1, EPP2 y EPP3 en el edema subplantar de ratones hembra *Balb/C* inducido por carragenina hasta las 24 horas.

Es fundamental hacer énfasis en la hora 5, debido a que se ha descrito que la fase temprana de inflamación de este modelo (1-3 horas) no es inhibida por los AINES (como indometacina) por su incapacidad de bloquear la liberación de histaminas y bradiquininas. Mientras que, en la segunda fase, relacionada con la producción de prostaglandinas y COX, son bloqueadas por los AINES (Necas y Bartosikova, 2013).

Por tal motivo, se hace énfasis en la hora 5. Dentro de los resultados, el porcentaje de inhibición de las tres muestras de propóleos a dosis de 25 mg/kg fue menor al del fármaco de referencia, indometacina (20 mg/kg). La muestra EPP2 fue la más activa de las tres, mostrando un 24.5% de inhibición; por su parte, las muestras EPP1 Y EPP3, mostraron el 18.8% y 19.3%, respectivamente (Tabla 2).

A pesar de que hubo diferencias en las medias de los tratamientos, no hay diferencias estadísticas significativas entre indometacina y EPP2, pero sí entre indometacina-EPP1 e indometacina-EPP3, además todos los tratamientos tuvieron actividad antiinflamatoria al ser comparadas con el grupo control (Tabla 2).

Tabla 2. Actividad antiinflamatoria de los tratamientos EPP1, EPP2 y EPP3 en inflamación aguda inducida por carragenina en ratones hembra Balb/C a la quinta hora del tratamiento

Tratamientos	Dosis (mg/kg)	Formación de edema subplantar a las 5h (mm)	% de inhibición
Vehículo	---	0.72±0.03	---
Indometacina	20	0.43±0.03 ^a	39.30
EPP1	25	0.58±0.05 ^{a,b}	18.78
EPP2	25	0.54±0.04 ^a	24.53
EPP3	25	0.58±0.04 ^{a,b}	19.27

Cada grupo representa la media ± error estándar de la media (ESM), Análisis de varianza (ANOVA) de una vía, post-hoc Student Newman Keuls ($p \leq 0.05$); n=7 para cada grupo. ^avs Vehículo; ^bvs Indometacina.

De ello podemos concluir que los tratamientos EPP1, EPP2 y EPP3 tuvieron un moderado efecto antiinflamatorio en el estudio realizado en ratones hembra *Balb/C*. Tal actividad puede deberse a un mecanismo de acción, donde los propóleos suprimen a las enzimas LOX y COX durante el proceso inflamatorio como bien se ha descrito en la literatura (Rajoo *et al.*, 2014).

Investigaciones previas realizadas en ratones y humanos muestran que los propóleos, así como sus componentes son generalmente bien tolerados y no tóxicos a menos que se administre en cantidades muy elevadas (Bazmandegan *et al.*, 2017; Braakhuis, 2019; Cao *et al.*, 2015; Cornara *et al.*, 2017). Por el momento no existen estudios que reporten actividad proinflamatoria de propóleos, pero investigadores han descrito que algunos propóleos ocasionan hipersensibilidad en ciertas personas (Callejo *et al.*, 2001; Hausen *et al.*, 1987). También, se sabe que una pequeña parte de la población es alérgica al propóleos y a los

demás productos apícolas como polen, miel o jalea (Crespo, 2010; Galdo Fernández, 2005). Sin embargo, cabe señalar que los efectos adversos y la toxicidad del propóleo rara vez se incluyen como medida de resultado en los ensayos con seres humanos. Considerado un producto natural, los consumidores rara vez tienen en cuenta los posibles efectos secundarios adversos de los propóleos. Por tal motivo, es importante hacer pruebas de toxicidad para cada tipo de propóleos.

Por otro lado, también se determinó la actividad antiinflamatoria de los propóleos en ratones machos *Balb/C*. Los resultados en un lapso de 24 horas se muestran en la Figura 17. Las muestras EPP1 y EPP2 resultaron poco activas a la hora 7 y 24. La muestra EPP3 fue más activa que indometacina a partir de la hora 5 hasta las 24, presentando 39.2, 32.6 y 38.3 % de inhibición a la hora 5, 7, y 24, respectivamente.

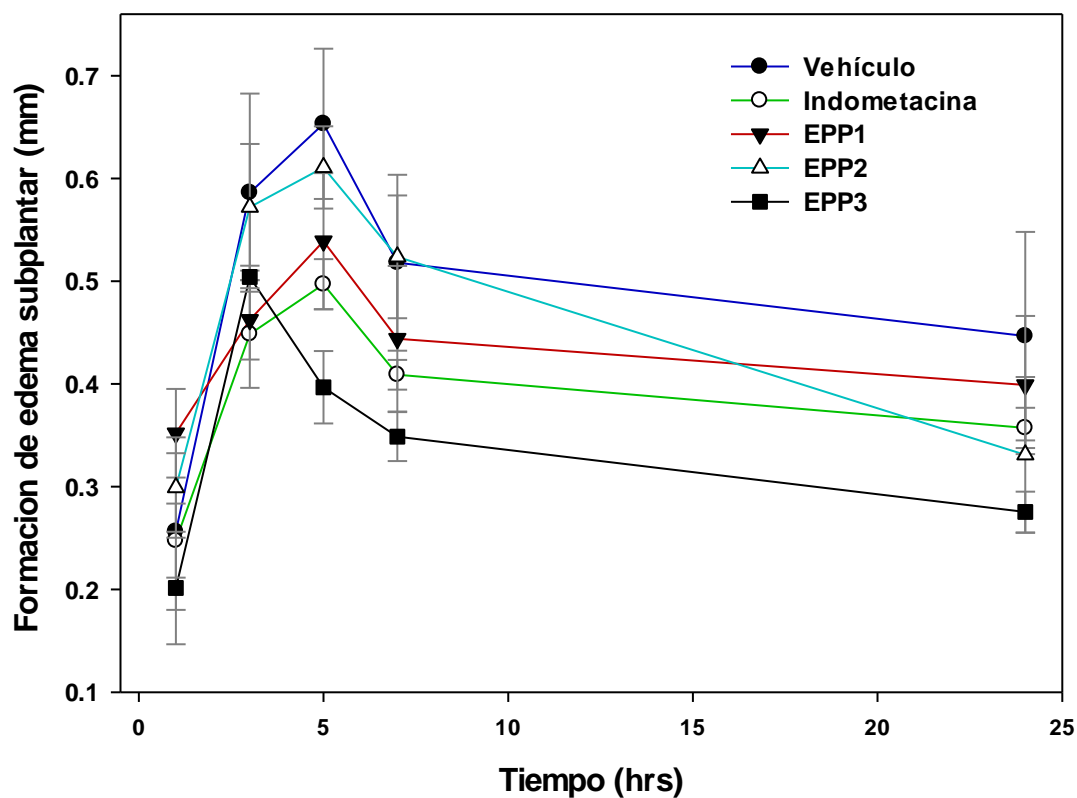


Figura 16. Actividad antiinflamatoria de las muestras EPP1, EPP2 y EPP3 en el edema subplantar de ratones macho *Balb/C* inducido por carragenina durante las 24 horas.

Respecto a la hora 5, la muestra EPP3 fue la única que resultó más activa que el control positivo (indometacina), en este caso el porcentaje de inhibición fue de 39.2% vs 23.9%. Las muestras EPP1 y EPP2 mostraron moderada y pobre actividad antiinflamatoria con un 17.5 y 6.5 % de inhibición, respectivamente (Tabla 3).

Estadísticamente, a la hora 5 hay diferencias significativas entre indometacina y EPP3, confirmando así que la actividad antiinflamatoria de EPP3 es mayor al fármaco de referencia.

Tabla 3. Actividad antiinflamatoria de las muestras EPP1, EPP2 y EPP3 en ratones machos *Balb/C* a la quinta hora sobre el modelo de carragenina.

Tratamientos	Dosis (mg/kg)	Formación de edema subplantar a las 5h (mm)	% de inhibición
Vehículo	---	0.65±0.07	---
Indometacina	20	0.49±0.02	23.91
EPP1	25	0.53±0.06	17.48
EPP2	25	0.61±0.04 ^{b,c}	6.49
EPP3	25	0.39±0.03 ^{a,b}	39.25

Cada grupo representa la media ± error estándar de la media (ESM), Análisis de varianza (ANOVA) de una vía, post-hoc Student Newman Keuls ($p \leq 0.05$); n=5 para cada grupo. ^a vs. Vehículo; ^b vs. Indometacina; ^c vs. EPP3.

Finalmente, en la Tabla 4 se presenta la comparación de los porcentajes de inhibición entre hembras y machos a la quinta hora. Estadísticamente hay diferencias significativas entre el tratamiento EPP3 de hembras y EPP3 de machos. Estas diferencias se deben a que, comparando con ratones hembra, se obtuvieron porcentajes de inhibición más altos en el tratamiento EPP3 evaluado en ratones machos.

Los tratamientos EPP1 y EPP2 no muestran diferencias significativas entre machos y hembras a la hora 5. Tanto en hembras y machos se observó el mayor porcentaje de inhibición de edema a la 5ta h, siendo la muestra EPP3 la de mayor actividad antiinflamatoria (39.25%) en machos y EPP2 en hembras (24.54%). Cabe mencionar que en ratones machos la muestra EPP3 mantuvo su actividad a hasta las 24 h, siendo esta

inhibición de 38.3%, este porcentaje de inhibición fue mayor que el mostrado por el fármaco de referencia indometacina (20 %).

Tabla 4. Comparación del porcentaje de inhibición a la 5ta hora de los tratamientos EPP1, EPP2 y EPP3 en inflamación aguda inducida por carragenina entre ratones hembra y macho *Balb/C*.

Tratamientos	Hembras		Machos	
	Edema (mm)	% de inhibición	Edema (mm)	% de inhibición
Vehículo	0.72±0.03	---	0.65±0.07	---
Indometacina	0.43±0.03 ^{a,f}	39.30	0.49±0.02 ^{a,f}	23.91
EPP1	0.58±0.05 ^{f,g}	18.78	0.53±0.06 ^{b,f,j}	17.48
EPP2	0.54±0.04 ^{f,e}	24.53	0.61±0.02 ^{e,f,g}	06.49
EPP3	0.58±0.04 ^e	19.27	0.39±0.03 ^{a,d,f,j,i}	39.25

Análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, post-hoc Student Newman Keuls ($p \leq 0.05$); n=7 para cada grupo. ^avs. Vehículo-machos; ^bvs. Indometacina-machos; ^cvs. EPP1-machos; ^dvs. EPP2-machos; ^evs EPP3-machos; ^fvs. Vehículo-hembras; ^gvs. Indometacina- hembras; ^hvs. EPP1- hembras; ⁱvs. EPP2- hembras; ^jvs EPP3- hembras.

Nuestros resultados están en concordancia con los datos de otros estudios que han descrito la actividad antiinflamatoria de propóleos. Por ejemplo, la evaluación en el mismo modelo de carragenina de propóleos rojo de Brejo Grande, Sergipe, Brasil, en donde evaluaron dosis de 3, 10 y 30 mg/kg. Observaron que la dosis de 3 mg/kg no afectó la inducción de edema subplantar por carragenina, por el contrario, las dosis 10 y 30 mg/kg mostraron porcentajes de inhibición de 23.4 y 46.7%, respectivamente (Lima Cavendish *et al.*, 2015). Estos investigadores obtuvieron resultados comparables a los de este estudio, identificando un comportamiento dosis-dependiente (a mayor dosis, mayor efecto), por lo cual, sería interesante evaluar los propóleos de la Cuenca del Papaloapan a dosis más altas.

Además, se han reportado el efecto antiinflamatorio de algunos propóleos colectados en otros países, como la India; en donde estudiaron una fracción de acetato de etilo de propóleos a diferentes dosis (50, 100 y 200 mg/kg). Los investigadores encontraron que en el modelo de carragenina, la actividad antiinflamatoria fue dosis-dependiente, obteniendo porcentajes de inhibición de 40.82% (50 mg/kg), 50.53% (100 mg/kg) y 56.2% (200 mg/kg) a las 4 h, siendo la dosis de 200 mg/kg la más alta, con un porcentaje mayor a la

indometacina, la cual obtuvo 52.9 % de inhibición a la hora 4 con una dosis de 10 mg/kg (Naik *et al.*, 2013).

Comparando estos resultados con los obtenidos en este estudio, se puede deducir que los propóleos del Papaloapan tienen actividad comparable (EPP3 mostró 39.25%) por la dosis utilizada (25 mg/kg). Nuevamente, este estudio abre la pauta para evaluar los propóleos colectados en la Cuenca del Papaloapan a dosis más altas en busca de aumentar su actividad.

Por otra parte, se sabe que uno de los factores por los cuales puede variar la actividad biológica de los propóleos es la vegetación y, por ende, la ubicación geográfica. En este sentido, los estudios realizados en Brasil e India concuerdan con la actividad antiinflamatoria de otros propóleos de países como Corea (Park y Kahng, 1999), China (Borrelli *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2005), Egipto (Khayyal *et al.*, 1993) y Australia (Massaro *et al.*, 2011), etc.

Tomando como referencia a Corea del Sur, Talca y Chile, se ha demostrado clínicamente los beneficios de la administración oral de propóleos tanto en personas sanas como en pacientes después de cirugías bucales (amigdalectomía) reportando a los pacientes con una curación más rápida de la herida, menor dolor y una hemorragia más pequeña tras la administración oral de propóleos (Moon *et al.*, 2018; Mujica *et al.*, 2017).

En conclusión, la actividad de los propóleos depende de su composición química producto a su vez de diversos factores (flora del entorno, ciclos evolutivos de la planta, factores climatológicos, factores geográficos, entre otros). He aquí la importancia de nuestro estudio antiinflamatorio en los propóleos de la Cuenca del Papaloapan y en futuros estudios de México.

8.4. Determinación de actividad antiinflamatoria mediante el método de TPA de los propóleos EPP1, EPP2 y EPP3.

La actividad antiinflamatoria de los propóleos EPP1, EPP2 y EPP3 en el modelo de TPA en ratones hembra *Balb/C* son mostrados en la Tabla 5. Se observa que la muestras EPP2 mostró el mayor porcentaje de inhibición de edema auricular (83.4 %), seguido de EPP3 (68.1%) y EPP1 (62.7%), los tres con mayor actividad que la indometacina (21.55 %), que fue el fármaco de referencia.

Estadísticamente en ratones hembra (Tabla 5) la indometacina comparada con los tratamientos es diferente. La diferencia es evidente, debido a que todos los tratamientos tuvieron mayor actividad antiinflamatoria que la indometacina.

Tabla 5. Comparación del porcentaje de inhibición a la 6ta hora de los tratamientos EPP1, EPP2 y EPP3 en inflamación aguda inducida por TPA en ratones hembra y macho *Balb/C*.

Tratamientos	Dosis (mg/oreja)	Hembras		Machos	
		Edema (mm)	% de inhibición	Edema (mm)	% de inhibición
Vehículo	--	6.629±0.14	---	8.800±0.46	---
Indometacina	2	5.200±0.38 ^{a,f}	21.55	3.920±0.38 ^{a,f}	55.45
EPP1	2	2.471±0.70 ^{a,b,c,e,g}	62.71	5.150±0.53 ^{a,b,d,e,f}	41.47
EPP2	2	1.100±0.27 ^{a,b,c,d,e,g}	83.40	3.200±0.45 ^{a,c,e,f,g}	63.63
EPP3	2	2.114±0.32 ^{a,b,c,e,g}	68.10	4.360±0.25 ^{a,c,d,f}	50.45

Análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, post-hoc Student Newman Keuls ($p \leq 0.05$); n=7 para cada grupo. ^avs. Vehículo-machos; ^bvs. Indometacina-machos; ^cvs. EPP1-machos; ^dvs. EPP2-machos; ^evs EPP3-machos; ^fvs. Vehículo-hembras; ^gvs. Indometacina- hembras; ^hvs. EPP1- hembras; ⁱvs. EPP2- hembras; ^jvs EPP3- hembras.

Por otro lado, respecto a los resultados en ratones macho la mayor inhibición del edema auricular fue mostrado por el tratamiento EPP2 con 63.6 %, seguido de EPP3 (50.5%) y EPP1 (41.5%), siendo más eficaz EPP2 que la indometacina (55.45%) (Tabla 5).

Estadísticamente, la indometacina comparada con los tratamientos no es diferente, pero a diferencia del ensayo en hembras, aquí la indometacina exhibió mejor porcentaje de inhibición (Tabla 5). Esto se puede atribuir a que en este experimento se empleó

indometacina marca Santa Cruz Biotechnology, por el contrario de los demás experimentos que se utilizó Indometacina marca Sigma-Aldrich. De acuerdo a estos resultados, las tres muestras de propóleos colectados en la cuenca del Papaloapan son muy activos en el modelo de inflamación tópica, por lo que los tratamientos EPP1, EPP2 y EPP3 son prometedores antiinflamatorios por vía tópica (Tabla 5).

Finalmente, haciendo una comparación de resultados entre ratones hembras y machos, se observó que existen diferencias estadísticamente significativas entre machos y hembras por el método de TPA para todos los tratamientos. Observándose mejores porcentajes de inhibición en ratones hembra, pero teniendo una misma tendencia en ambos sexos, empezando EPP2 con el porcentaje más alto, siguiéndole EPP3 y EPP1 (Tabla 5).

Los resultados demostraron que la muestra EPP2 es el que presenta mayor efecto antiinflamatorio por vía tópica, tanto en hembras como en machos. La actividad de EPP2 se podría atribuir a la presencia de β -sitosterol en la muestra (Figura 8), así como la vegetación. Es importante recordar que la muestra EPP2 (San Bartolo, Tuxtepec) tiene diferente vegetación comparando con San Lucas Ojitlán (EPP1) y Huautla de Jiménez (EPP3). Vegetación diferente como *Musa balbisiana* (plátano), *Saccharum officinarum* (caña de azúcar), *Cedrus* (cedro), *Vochysia guatemalensis* (chilacayote), *Andira galeottiana* (macayo), *Brosimum alicastrum* (el ramón) y *Sweetia panamensis* (bálsamo amarillo). Además, las pruebas de CCF muestran una notable diferencia en la composición química de EPP2 comparándola con EPP1 y EPP3 (Arregui Gallegos, 2013; Thiébaud, 2014).

También, la actividad mostrada en los tratamientos (Tabla 5) puede ser atribuida a la cepa, edad y sexo de los ratones, así como la vía de administración y vegetación de cada región (Dalu *et al.*, 2000; Delano *et al.*, 2005; Nandakumar *et al.*, 2003).

En comparación con otros estudios realizados en el país, esta misma actividad antiinflamatoria se reportó para propóleos rojos del estado de Chiapas, México, en donde

utilizaron dosis de 0.56, 1 y 1.71 mg/oreja usando igualmente indometacina como control positivo, obteniendo una $DE_{50} = 1.21$ mg/oreja y observando una actividad dependiente de la dosis (Guzmán-Gutiérrez *et al.*, 2018). Este es el único estudio antiinflamatorio de propóleos reportado en México, por lo que, nuestros resultados son los primeros que reportan el efecto antiinflamatorio por vía tópica y oral de propoleos oaxaqueños, obteniendo porcentajes de inhibición de la inflamación de hasta 83.4 % al ser administrados vía tópica a una dosis de 2 mg/oreja en ratones hembra.

El porque se observó una mayor actividad via tópica puede deberse a dos factores principales, el primero consiste en evitar el metabolismo de xenobióticos y, segundo, a una mayor absorción del propóleos al sitio de daño. Por ejemplo, investigadores compararon las vías de administración oral y tópica, observando concentraciones comparables en todos los tejidos excepto en la piel donde la cantidad del compuesto administrado después de la aplicación tópica fue aproximadamente 100 veces mayor que la observada después de la administración oral (Carlson y Weaver, 1985). Además, estudios sobre AINES tópicos, específicamente el diclofenaco tópico, han demostrado que los medicamentos administrados directamente a la articulación afectada dan lugar a una mayor concentración del fármaco en los tejidos sinoviales que en la sangre (Banning, 2008). Nuestros resultados demostraron claras diferencias de actividad antiinflamatoria entre vías de administración, teniendo porcentajes de inhibición más altos por vía tópica. Cabe señalar que los propóleos del Papaloapan fueron más activos por vía tópica debido al alto contenido de metabolitos secundarios de tipo lipofílico. Los cuales, tienen la capacidad de atravesar con mayor facilidad la dermis generando una mayor concentración en el sitio de daño por esta vía de administración.

Por otro lado, nuestro estudio demuestra diferencias en la actividad dependiendo del sexo por el método de carragenina y TPA, esto debido a que existen diferencias entre los sexos en cuanto al dolor y la inflamación (Berkley *et al.*, 2006; Fischer *et al.*, 2015). Por ejemplo, se ha descrito que las hembras muestran una respuesta inflamatoria atenuada y sufren

menos lesiones tisulares a una amplia gama de estímulos nocivos (Fish, 2008; Scotland *et al.*, 2011). En nuestro estudio se observó una potente actividad antiinflamatoria en ratones hembra por el método de TPA, por el contrario de carragenina, donde se obtuvo una mejor actividad en ratones macho.

En general, los tratamientos EPP1, EPP2 y EPP3 obtuvieron mayor porcentaje de inhibición que indometacina en hembras y machos en el modelo de TPA.

Es conveniente mencionar que ya existen productos de propóleos en el mercado local como por ejemplo “Ajolotius”, utilizado para las molestias de la tos y del resfriado, así como extractos de propóleos “Triny Terrazas” y “Osako”, usados para elevar las defensas del organismo y como auxiliares contra la tos e infección de garganta. Por otra parte, también existe la venta de propóleos como crema, un ejemplo es la comercialización por “Triny Terrazas” y como suplemento, un ejemplo es propóleos de “Soria Natural”. Sin embargo, ninguno de estos productos está validado en su actividad farmacológica, y esa es la principal aportación del presente trabajo, validar la actividad antiinflamatoria de los propóleos que la población local ya utiliza en la medicina tradicional.

9. CONCLUSIONES

La actividad antiinflamatoria por carragenina obtuvo como mayor porcentaje de inhibición de edema a la 5ta h la muestra EPP3 en machos con 39.25% y EPP2 en hembras con 24.54%. En ratones machos la muestra EPP3 mantuvo su actividad hasta las 24 h. Tales actividades pueden deberse a un mecanismo de acción, en donde los propóleos suprimen a las enzimas LOX y COX durante el proceso inflamatorio como bien se ha descrito en la literatura. Por otra parte, la actividad antiinflamatoria por el método de TPA demostró que la muestra EPP2 presenta mayor efecto antiinflamatorio por vía tópica, tanto en hembras (83.4 % inhibición) como en machos (63.6 % inhibición). La actividad de EPP2 se podría atribuir a su ubicación-vegetación, así como de la presencia de β -sitosterol en la muestra. En conclusión, se obtuvieron mejores resultados por el método de TPA. El porque se observó una mayor actividad vía tópica puede deberse a dos factores principales, el primero consiste en evitar el metabolismo de xenobióticos y, segundo, a una mayor absorción del propóleos al sitio de daño. También se puede atribuir esta actividad al alto contenido de metabolitos secundarios de tipo lipofílico presentes en los propóleos.

Con base en los resultados que se han descrito, se puede concluir que las muestras EPP1, EPP2 y EPP3 de la Cuenca del Papaloapan tienen actividad antiinflamatoria significativa en los dos modelos de inflamación aguda *in vivo* en ratones *Balb/C*. Además, hasta donde sabemos, somos el primer grupo de investigación en todo el país en estudiar la actividad antiinflamatoria de propóleos del estado de Oaxaca y el segundo en propóleos mexicanos. Por otra parte, se propone la presencia de β -sitosterol en las muestras EPP1 y EPP2; así como de hesperidina en las muestras EPP1 y EPP3.

Por todo lo anterior, el propóleos de la Cuenca del Papaloapan es un potencial agente de protección contra los daños inflamatorios y así mismo una fuente de nuevos compuestos con propiedades farmacológicas.

10. PERSPECTIVAS

- Realizar pruebas analíticas como HPLC/MS para así obtener más conocimiento sobre los compuestos presentes en las mezclas complejas que presentan los propóleos.
- Realizar estudios de toxicidad para poder aprovechar de forma racional y segura al propóleos de Oaxaca como tratamiento antiinflamatorio.
- La eficaz actividad antiinflamatoria de la muestra EPP2 de San Bartolo, Tuxtepec nos lleva a proponer el estudio de esta muestra como un ungüento o crema, logrando con esto un valor agregado al propóleos de la región del Papaloapan.
- La excelente actividad tópica de los propóleos del Papaloapan despierta el interés de estudiar su actividad cicatrizante en heridas.
- El comportamiento bioquímico antiinflamatorio de los propóleos de Oaxaca y México es desconocido, así que es importante confirmar por medio de una inhibición enzimática si los propóleos de la Cuenca del Papaloapan inhiben COX al igual que indometacina. Asimismo, es fundamental hacer estudios para conocer los mecanismos moleculares de acción.
- El poco conocimiento químico de los propóleos de la Cuenca propone futuros estudios analíticos para conocer los compuestos químicos presentes en las muestras que pueden estar relacionados con su actividad biológica, además, se pueden evaluar los compuestos químicos puros presentes en los propóleos como antiinflamatorios.
- Finalmente, se requiere determinar la letalidad de los propóleos de la cuenca del Papaloapan por la vía oral y su posible inocuidad al aplicarse sobre la piel (para descartar reacciones alérgicas).

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd-Allah, A., El-Deen, N., Mohamed, W., y Naguib, F. M. (2018). Mast cells and pro-inflammatory cytokines roles in assessment of grape seeds extract anti-inflammatory activity in rat model of carrageenan-induced paw edema. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 21(1), 97–107.
- Abdou, E. M., Fayed, M., Helal, D., y Ahmed, K. A. (2019). Assessment of the hepatoprotective effect of developed lipid-polymer hybrid nanoparticles (LPHNPs) encapsulating naturally extracted β -Sitosterol against CCl_4 induced hepatotoxicity in rats. *Scientific Reports*, 9(1), 19779.
- Abdul Wahab, S. M., Jantan, I., Haque, M. A., y Arshad, L. (2018). Exploring the Leaves of *Annona muricata* L. as a Source of Potential Anti-inflammatory and Anticancer Agents. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 661.
- Abu-Seida A. M. (2015). Effect of Propolis on Experimental Cutaneous Wound Healing in Dogs. *Veterinary Medicine International*, 2015, 672643.
- Afkhamizadeh, M., Aboutorabi, R., Ravari, H., Fathi Najafi, M., Ataei Azimi, S., Javadian Langaroodi, A., Yaghoubi, M. A., y Sahebkar, A. (2018). Topical propolis improves wound healing in patients with diabetic foot ulcer: a randomized controlled trial. *Natural Product Research*, 32(17), 2096–2099.
- Aguilar, M. I., Rovelo, R., Verjan, J. G., Illescas, O., Baeza, A. E., De La Fuente, M., Avila, I., y Navarrete, A. (2011). Anti-inflammatory activities, triterpenoids, and diarylheptanoids of *Alnus acuminata* ssp. *arguta*. *Pharmaceutical Biology*, 49(10), 1052-1057.
- Ahmed, A. (2011). An overview of inflammation: Mechanism and consequences. *Frontiers in Biology*, 6(4), 274 - 281.
- Aja, P. M., Izekwe, F. I., Famurewa, A. C., Ekpono, E. U., Nwite, F. E., Igwenyi, I. O., Awoke, J. N., Ani, O. G., Aloke, C., Obasi, N. A., Udeh, K. U., y Ale, B. A. (2020). Hesperidin protects against cadmium-induced pancreatitis by modulating insulin secretion, redox imbalance and iNOS/NF- κ B signaling in rats. *Life Sciences*, 259, 118268.
- Alday, E., Valencia, D., Carreño, A. L., Picerno, P., Piccinelli, A. L., Rastrelli, L., Robles-Zepeda, R., Hernandez, J., y Velazquez, C. (2015). Apoptotic induction by pinobanksin and some of

its ester derivatives from Sonoran propolis in a B-cell lymphoma cell line. *Chemico-Biological Interactions*, 242, 35-44.

Alkhalaf, M. I., Alansari, W. S., Ibrahim, E. A., y ELhalwagy, M. E. A. (2019). Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-cancer activities of avocado (*Persea americana*) fruit and seed extract. *Journal of King Saud University Science*, 31(4), 1358-1362.

Al-Rubaye, A. F., Hameed, I. H., y Kadhim, M. J. (2017). A Review: Uses of Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Technique for Analysis of Bioactive Natural Compounds of Some Plants. *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research*, 9(1), 81-85.

Al-Saeed, A. (2011). Gastrointestinal and Cardiovascular Risk of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. *Oman Medical Journal*, 26(6), 385-391.

Annamalai, P., y Thangam, E. B. (2017). Local and Systemic Profiles of Inflammatory Cytokines in Carrageenan-induced Paw Inflammation in Rats. *Immunological Investigations*, 46(3), 274–283.

Arafa, M. G., Ghalwash, D., El-Kersh, D. M., y Elmazar, M. M. (2018). Propolis-based niosomes as oromuco-adhesive films: A randomized clinical trial of a therapeutic drug delivery platform for the treatment of oral recurrent aphthous ulcers. *Scientific Reports*, 8(1), 1-14.

Arregui Gallegos, Ó. (2013). *Plan Municipal de Desarrollo, San Lucas Ojitlán, Oaxaca*. https://www.finanzasoxaca.gob.mx/pdf/inversion_publica/pmds/11_13/232.pdf

Ashley, N. T., Weil, Z. M., y Nelson, R. J. (2012). Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43(1), 385-406.

Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E. H., Rollinger, J. M., Schuster, D., Breuss, J. M., Bochkov, V., Mihovilovic, M. D., Kopp, B., Bauer, R., Dirsch, V. M., y Stuppner, H. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*, 33(8), 1582–1614.

Athaydes, B. R., Alves, G. M., Assis, A., Gomes, J., Rodrigues, R. P., Campagnaro, B. P., Nogueira, B. V., Silveira, D., Kuster, R. M., Pereira, T., Kitagawa, R. R., y Gonçalves, R. (2019).

Avocado seeds (*Persea americana* Mill.) prevents indomethacin-induced gastric ulcer in mice. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 119, 751–760.

Avoseh, O. N., Ogunwande, I. A., Ojenike, G. O., y Mtunzi, F. M. (2020). Volatile Composition, Toxicity, Analgesic, and Anti-Inflammatory Activities of *Mucuna pruriens*. *Natural Product Communications*, 15(7), 1934578X2093232.

Awad, A. B., Chan, K. C., Downie, A. C., y Fink, C. S. (2000). Peanuts as a Source of β -Sitosterol, a Sterol With Anticancer Properties. *Nutrition and Cancer*, 36(2), 238-241.

Babu, S., y Jayaraman, S. (2020). An update on β -sitosterol: A potential herbal nutraceutical for diabetic management. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 131, 110702.

Babu, S., Krishnan, M., Rajagopal, P., Periyasamy, V., Veeraraghavan, V., Govindan, R., y Jayaraman, S. (2020). Beta-sitosterol attenuates insulin resistance in adipose tissue via IRS-1/Akt mediated insulin signaling in high fat diet and sucrose induced type-2 diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*, 873, 173004.

Banning, M. (2008). Topical diclofenac: clinical effectiveness and current uses in osteoarthritis of the knee and soft tissue injuries. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 9(16), 2921-2929.

Barnes, P. J., y Adcock, I. M. (2009). Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *The Lancet*, 373(9678), 1905-1917.

Batista, C. M., Alves, A. V. F., Queiroz, L. A., Lima, B. S., Filho, R. N. P., Araújo, A. A. S., de Albuquerque Júnior, R. L. C., y Cardoso, J. C. (2018). The photoprotective and anti-inflammatory activity of red propolis extract in rats. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 180, 198-207.

Bazmandegan, G., Boroushaki, M. T., Shamsizadeh, A., Ayoobi, F., Hakimizadeh, E., y Allahtavakoli, M. (2017). Brown propolis attenuates cerebral ischemia-induced oxidative damage via affecting antioxidant enzyme system in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 85, 503-510.

Berkley, K. J., Zalcmán, S. S., y Simon, V. R. (2006). Sex and gender differences in pain and inflammation: a rapidly maturing field. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 291(2), R241-R244.

Boardman, C., Chachi, L., Gavrila, A., Keenan, C. R., Perry, M. M., Xia, Y. C., Meurs, H., y Sharma, P. (2014). Mechanisms of glucocorticoid action and insensitivity in airways disease. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 29(2), 129-143.

Boisard, S., Huynh, T. H. T., Escalante-Erosa, F., Hernández-Chavez, L. I., Peña-Rodríguez, L. M., y Richomme, P. (2015). Unusual chemical composition of a Mexican propolis collected in Quintana Roo, Mexico. *Journal of Apicultural Research*, 54(4), 350-357.

Borchardt, J. K. (2002). The beginnings of drug therapy: Ancient mesopotamian medicine. *Drug News & Perspectives*, 15(3), 187-192.

Borges, C. V., Minatel, I. O., Gomez-Gomez, H. A., y Lima, G. P. P. (2017). Medicinal Plants: Influence of Environmental Factors on the Content of Secondary Metabolites. *Medicinal Plants and Environmental Challenges*, 259-277.

Borrelli, F., Maffia, P., Pinto, L., Ianaro, A., Russo, A., Capasso, F., y Ialenti, A. (2002). Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia*, 73, S53-S63.

Boufridi, A., y Quinn, R. J. (2018). Harnessing the Properties of Natural Products. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 58(1), 451-470.

Braakhuis, A. (2019). Evidence on the Health Benefits of Supplemental Propolis. *Nutrients*, 11(11), 2705.

Bretz, W. A., Chiego, D. J., Marcucci, M. C., Cunha, I., Custódio, A., y Schneider, L. G. (1998). Preliminary Report on the Effects of Propolis on Wound Healing in the Dental Pulp. *Zeitschrift für Naturforschung C, Journal of Biosciences*, 53(11-12), 1045-1048.

Brkljača, R., y Urban, S. (2015). HPLC-NMR and HPLC-MS Profiling and Bioassay-Guided Identification of Secondary Metabolites from the Australian Plant *Haemodorum spicatum*. *Journal of Natural Products*, 78(7), 1486-1494.

Buenz, E. J., Verpoorte, R., y Bauer, B. A. (2018). The Ethnopharmacologic Contribution to Bioprospecting Natural Products. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 58(1), 509-530.

Byng-Maddick, R., y Ehrenstein, M. R. (2015). The impact of biological therapy on regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 54(5), 768-775.

Cabral, B., Siqueira, E. M. S., Bitencourt, M. A. O., Lima, M. C. J. S., Lima, A. K., Ortmann, C. F., Chaves, V. C., Fernandes-Pedrosa, M. F., Rocha, H. A. O., Scortecci, K. C., Reginatto, F. H., Giordani, R. B., y Zucolotto, S. M. (2016). Phytochemical study and anti-inflammatory and antioxidant potential of *Spondias mombin* leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26(3), 304-311.

Callejo, A., Armentia, A., y Lombarderoa, M. (2001). Hipersensibilidad a propóleos. *Alergol. Immunol. Clin., Barcelona*, 16, 113-117.

Cao, G., Ying, P., Yan, B., Xue, W., Li, K., Shi, A., Sun, T., Yan, J., y Hu, X. (2015). Pharmacokinetics, safety, and tolerability of single and multiple-doses of pinocembrin injection administered intravenously in healthy subjects. *Journal of Ethnopharmacology*, 168, 31-36.

Carlson, G. P., y Weaver, P. M. (1985). Distribution and binding of [14C] acrylamide to macromolecules in *SENCAR* and *BALBc* mice following oral and topical administration. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 79(2), 307-313.

Carrillo, M. L., Castillo, L. N., y Mauricio, R. (2011). Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de Extractos de Propóleos de la Huasteca Potosina (México). *Información tecnológica*, 22(5), 21-28.

Chaa, S., Boufadi, M. Y., Keddari, S., Benchaib, A. H., Soubhye, J., Van Antwerpen, P., y Riazi, A. (2019). Chemical composition of propolis extract and its effects on epirubicin-induced hepatotoxicity in rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29(3), 294-300.

Chagas, A. D. S. (2010). *Atividade antiinflamatória intestinal da escopoletina e fraxetina nas fases aguda e crônica do processo inflamatório induzido por TNBS em ratos* (Bacharel em Ciências Biomédicas). Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Brasil.

Chen, H., Pu, J., Liu, D., Yu, W., Shao, Y., Yang, G., Xiang, Z., y He, N. (2016). Anti-Inflammatory and Antinociceptive Properties of Flavonoids from the Fruits of Black Mulberry (*Morus nigra* L.). *PLOS ONE*, 11(4), e0153080.

Cioffi, G., Braca, A., Autore, G., Morelli, I., Pinto, A., Venturella, F., y De Tommasi, N. (2003). Cytotoxic Saponins from *Schefflera faguetti*. *Planta medica*, 69(08), 750-756.

Cisneros Caballero, A. F., Felgueres Planells, M. J., Vela Jarquín, E., y Gómez Martín, D. (2017). Estrategias terapéuticas para la artritis reumatoide: hacia las terapias biotecnológicas. *Investigación en Discapacidad*, 6(2), 69-87.

Coordinación General del Comité Estatal de Planeación para el Desarrollo. (2016). *Planes Regionales de Desarrollo de Oaxaca 2011-2016: Región Papaloapan*.
https://www.finanzasooaxaca.gob.mx/pdf/planes/planes_regionales/Papaloapan/Papalaoapan.pdf

Cornara, L., Biagi, M., Xiao, J., y Burlando, B. (2017). Therapeutic Properties of Bioactive Compounds from Different Honeybee Products. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 412.

Corrêa, M. F. P., Melo, G. O., y Costa, S. S. (2008). Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da asma. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18, 785-797.

Cragg, G. M., y Newman, D. J. (2013). Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(6), 3670-3695.

Crespo, A. B. (2010). Recursos Genéticos y Conocimiento Etnofarmacológico Cubanos. Su protección mediante patentes. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9(3), 153-165.

da Rosa, J. S., de Mello, S. V. G. V., Vicente, G., Moon, Y. J. K., Daltoé, F. P., Lima, T. C., de Jesus Souza, R., Biavatti, M. W., y Fröde, T. S. (2017). *Calea uniflora* Less. attenuates the inflammatory response to carrageenan-induced pleurisy in mice. *International Immunopharmacology*, 42, 139-149.

da Silva, L. M., Pezzini, B. C., Somensi, L. B., Bolda Mariano, L. N., Mariott, M., Boeing, T., dos Santos, A. C., Longo, B., Cechinel-Filho, V., de Souza, P., y de Andrade, S. F. (2019). Hesperidin, a citrus flavanone glycoside, accelerates the gastric healing process of acetic acid-induced ulcer in rats. *Chemico-Biological Interactions*, 308, 45-50.

Dalu, A., Blaydes, B. S., Lomax, L. G., y Delclos, K. B. (2000). A comparison of the inflammatory response to a polydimethylsiloxane implant in male and female *Balb/c* mice. *Biomaterials*, 21(19), 1947-1957.

Damor, B., Gaur, K., Dashora, A., y Parra, S. A. (2018). Evaluation of Analgesic and Anti-inflammatory Activity of Methanolic Extract of *Guazuma Ulmifolia*. *Journal of Applied Pharmaceutical Sciences and Research*, (1), (4), 23-29.

David, B., Wolfender, J.-L., y Dias, D. A. (2014). The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. *Phytochemistry Reviews*, 14(2), 299-315.

Dawodu, O. A., Lawal, O. A., Ogunwande, I. A., y Giwa, A. A. (2016). Volatile constituents of *Crescentia cujete* L. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 4(4), 1-3.

de Almeida, E. B., Cordeiro Cardoso, J., Karla de Lima, A., de Oliveira, N. L., de Pontes-Filho, N. T., Oliveira Lima, S., Leal Souza, I. C., y de Albuquerque-Júnior, R. L. C. (2013). The incorporation of Brazilian propolis into collagen-based dressing films improves dermal burn healing. *Journal of Ethnopharmacology*, 147(2), 419-425.

de Moura, S. A. L., Negri, G., Salatino, A., Lima, L. D. C., Dourado, L. P. A., Mendes, J. B., Andrade, S. P., Ferreira, M. A. N. D., y Cara, D. C. (2011). Aqueous Extract of Brazilian Green Propolis: Primary Components, Evaluation of Inflammation and Wound Healing by Using Subcutaneous Implanted Sponges. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 1-8.

Delano, D. L., Montesinos, M. C., D'Eustachio, P., Wiltshire, T., y Cronstein, B. N. (2005). An Interaction Between Genetic Factors and Gender Determines the Magnitude of the Inflammatory Response in the Mouse Air Pouch Model of Acute Inflammation. *Inflammation*, 29(1), 1-7.

Diaz, P., Jeong, S. C., Lee, S., Khoo, C., y Koyyalamudi, S. R. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants and fungi containing phenolic and flavonoid compounds. *Chinese Medicine*, 7(1), 26.

Díaz-González, F., y Sánchez-Madrid, F. (2015). NSAIDs: Learning new tricks from old drugs. *European Journal of Immunology*, 45(3), 679-686.

Dighe, S. B., Kuchekar, B. S., y Wankhede, S. B. (2016). Analgesic and anti-inflammatory activity of β -sitosterol isolated from leaves of *Oxalis corniculata*. *Int. J. Pharmacol. Res*, 6, 109-113.

- Dolores-Mijangos, G., Santiago-Cruz, M. D. J., Arana-Coronado, J. J., y Utrera-Quintana, F. (2017). Estudio del impacto de la actividad apícola en el Istmo de Tehuantepec, Oaxaca, México. *Agricultura Sociedad y Desarrollo*, 14(2), 187-203.
- Domínguez-Ortiz, M. A., Muñoz-Muñiz, O., García-Rodríguez, R. V., Vázquez-Hernández, M., Gallegos-Estudillo, J., y Cruzsánchez, J. S. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Moussonia deppeana*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9(1), 13-19.
- Donkor, P. O., Chen, Y., Ding, L., y Qiu, F. (2016). Locally and traditionally used *Ligusticum* species – A review of their phytochemistry, pharmacology and pharmacokinetics. *Journal of Ethnopharmacology*, 194, 530-548.
- Duester, K. C. (2001). Avocado fruit is a rich source of beta-sitosterol. *Journal of the American Dietetic Association*, 101(4), 404–405.
- Edwards, C. J., Arden, N. K., Fisher, D., Saperia, J. C., Reading, I., Van Staa, T. P., y Cooper, C. (2005). The changing use of disease-modifying anti-rheumatic drugs in individuals with rheumatoid arthritis from the United Kingdom General Practice Research Database. *Rheumatology*, 44(11), 1394-1398.
- El Rabey, H. A., Al-Seeni, M. N., y Bakhashwain, A. S. (2017). The Antidiabetic Activity of *Nigella Sativa* and Propolis on Streptozotocin-Induced Diabetes and Diabetic Nephropathy in Male Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 1-14.
- El-Guendouz, S., Aazza, S., Lyoussi, B., Antunes, M. D., Faleiro, M. L., y Miguel, M. G. (2016). Anti-acetylcholinesterase, antidiabetic, anti-inflammatory, antityrosinase and antixanthine oxidase activities of Moroccan propolis. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(8), 1762-1773.
- El-Shitany, N. A., y Eid, B. G. (2019). Icariin modulates carrageenan-induced acute inflammation through HO-1/Nrf2 and NF-kB signaling pathways. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 120, 109567.
- Escriche, I., y Juan-Borrás, M. (2018). Standardizing the analysis of phenolic profile in propolis. *Food Research International*, 106, 834-841.

Gómez estrada, H. A., González ruiz, K. N., y Domingo Medina, J. (2011). Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10(3), 182-217.

Fardet, L., y Fève, B. (2014). Systemic Glucocorticoid Therapy: a Review of its Metabolic and Cardiovascular Adverse Events. *Drugs*, 74(15), 1731-1745.

Fernandes, E. S., Passos, G. F., Medeiros, R., da Cunha, F. M., Ferreira, J., Campos, M. M., Pianowski, L. F., y Calixto, J. B. (2007). Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *European Journal of Pharmacology*, 569(3), 228-236.

Ferro, A. M., Ramos, P., Guerra, Â., Parreira, P., Brás, T., Guerreiro, O., Jerónimo, E., Capel, C., Capel, J., Yuste-Lisbona, F. J., Duarte, M. F., Lozano, R., Oliveira, M. M., y Gonçalves, S. (2018). Haplotype analysis of the germacrene A synthase gene and association with cynaropicrin content and biological activities in *Cynara cardunculus*. *Molecular Genetics and Genomics*, 293(2), 417-433.

Fideicomiso de Riesgo Compartido. (2016). *Apicultura, Actividad De Gran Importancia Para La Economía Y El Medio Ambiente En México*. Gobierno de México. <https://www.gob.mx/firco/articulos/apicultura-actividad-de-gran-importancia-para-la-economia-y-el-medio-ambiente-en-mexico?idiom=es>

Fischer, J., Jung, N., Robinson, N., y Lehmann, C. (2015). Sex differences in immune responses to infectious diseases. *Infection*, 43(4), 399-403.

Fish, E. N. (2008). The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 8(9), 737-744.

Fogel, O., Richard-Miceli, C., y Tost, J. (2017). Epigenetic Changes in Chronic Inflammatory Diseases. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 106, 139-189.

Fraile, L., Crisci, E., Córdoba, L., Navarro, M. A., Osada, J., y Montoya, M. (2012). Immunomodulatory properties of beta-sitosterol in pig immune responses. *International immunopharmacology*, 13(3), 316-321.

Fujiki, H., Suttajit, M., Rawangkan, A., Iida, K., Limtrakul, P., Umsumarng, S., y Sukanuma, M. (2017). Phorbol esters in seed oil of *Jatropha curcas* L. (saboodam in Thai) and their

association with cancer prevention: from the initial investigation to the present topics. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 143(8), 1359-1369.

Funakoshi-Tago, M., Ohsawa, K., Ishikawa, T., Nakamura, F., Ueda, F., Narukawa, Y., Kiuchi, F., Tamura, H., Tago, K., y Kasahara, T. (2016). Inhibitory effects of flavonoids extracted from Nepalese propolis on the LPS signaling pathway. *International Immunopharmacology*, 40, 550-560.

Funakoshi-Tago, M., Okamoto, K., Izumi, R., Tago, K., Yanagisawa, K., Narukawa, Y., Kiuchi, F., Kasahara, T., y Tamura, H. (2015). Anti-inflammatory activity of flavonoids in Nepalese propolis is attributed to inhibition of the IL-33 signaling pathway. *International Immunopharmacology*, 25(1), 189-198.

Gábor, M. (2003). Models of Acute Inflammation in the Ear. *Inflammation Protocols*, 129-138.

Galdo Fernández, A. (2005). Prodigio de las abejas: El propóleos y la jalea real. Salud Vida. Lo Natural y Tradicional. [Internet]. La Habana; 2005 [citado 3 marzo 2012]; [aprox. 3 p].

Gamal-Eldeen, A. M., Amer, H., Alrehaili, A. A., Saleh, A., Al Ghamdi, A. E.-R., Hawsawi, N. M., Salman, A., y Raafat, B. M. (2020). Cancer Chemopreventive Properties of Sulfated *Enterolobium cyclocarpum* Extract. *Nutrition and Cancer*, 1-13.

Garay-Renteria, P.D. (2018). *Caracterización química y actividad biológica de extractos etanólicos de propóleo del estado de Sinaloa* (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Sinaloa, México.

García-Rodríguez, R. V., Gutiérrez-Rebolledo, G. A., Méndez-Bolaina, E., Sánchez-Medina, A., Maldonado-Saavedra, O., Domínguez-Ortiz, M. Á., Vázquez-Hernández, M., Muñoz-Muñiz, O. D., y Cruz-Sánchez, J. S. (2014). *Cnidocolus chayamansa* Mc Vaugh, an important antioxidant, anti-inflammatory and cardioprotective plant used in Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(2), 937-943.

Ghisalberti, E. L. (1979). Propolis: A Review. *Bee World*, 60(2), 59-84.

González, R. G., Hernández, A. D., y Portillo, J. A. S. (2015). Visión panorámica de las enfermedades crónico-degenerativas. *Revista Internacional de Acupuntura*, 9(2), 57-69.

- Gregory, S. R., Piccolo, N., Piccolo, M. T., Piccolo, M. S., y Hegggers, J. P. (2002). Comparison of Propolis Skin Cream to Silver Sulfadiazine: A Naturopathic Alternative to Antibiotics in Treatment of Minor Burns. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 8(1), 77-83.
- Gutiérrez-Rebolledo, G. A., Garduño-Siciliano, L., García-Rodríguez, R. V., Pérez-González, M. Z., Chávez, M. I., Bah, M., Siordia-Reyes, G. A., Chamorro-Cevallos, G. A., y Jiménez-Arellanes, M. A. (2016). Anti-inflammatory and toxicological evaluation of *Moussonia deppeana* (Schldl. & Cham) Hanst and Verbascoside as a main active metabolite. *Journal of Ethnopharmacology*, 187, 269-280.
- Guzmán-Gutiérrez, S., Nieto-Camacho, A., Castillo-Arellano, J., Huerta-Salazar, E., Hernández-Pasteur, G., Silva-Miranda, M., Argüello-Nájera, O., Sepúlveda-Robles, O., Espitia, C., y 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(2), 334.
- Haggag, Y. A., El-Ashmawy, N. E., y Okasha, K. M. (2020). Is hesperidin essential for prophylaxis and treatment of COVID-19 Infection? *Medical Hypotheses*, 144, 109957.
- Hamilton, K. D., Brooks, P. R., Ogbourne, S. M., y Russell, F. D. (2017). Natural products isolated from *Tetragonula carbonaria* cerumen modulate free radical-scavenging and 5-lipoxygenase activities in vitro. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 232.
- Hanchang, W., Khamchan, A., Wongmanee, N., y Seedadee, C. (2019). Hesperidin ameliorates pancreatic β -cell dysfunction and apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rat model. *Life Sciences*, 235, 116858.
- Harvey, A. L., Edrada-Ebel, R. A., y Quinn, R. J. (2015). The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(2), 111-129.
- Hausen, B. M., Wollenweber, E., Senff, H., y Post, B. (1987). Propolis allergy. (I). Origin, properties, usage and literature review. *Contact Dermatitis*, 17(3), 163-170.
- He, W., Li, Y., Liu, M., Yu, H., Chen, Q., Chen, Y., Ruan, J., Ding, Z., Zhang, Y., y Wang, T. (2018). *Citrus aurantium* L. and Its Flavonoids Regulate TNBS-Induced Inflammatory Bowel

Disease through Anti-Inflammation and Suppressing Isolated Jejunum Contraction. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 3057.

Henshaw, F. R., Bolton, T., Nube, V., Hood, A., Veldhoen, D., Pfrunder, L., McKew, G. L., Macleod, C., McLennan, S. V., y Twigg, S. M. (2014). Topical application of the bee hive protectant propolis is well tolerated and improves human diabetic foot ulcer healing in a prospective feasibility study. *Journal of Diabetes and its Complications*, 28(6), 850-857.

Hernandez, J., Goycoolea, F. M., Quintero, J., Acosta, A., Castañeda, M., Dominguez, Z., Robles, R., Vazquez-Moreno, L., Velazquez, E. F., Astiazaran, H., Lugo, E., y Velazquez, C. (2007). Sonoran propolis: chemical composition and antiproliferative activity on cancer cell lines. *Planta Medica*, 73(14), 1469-1474.

Hernández-Pasteur, G., Silva-Bermúdez, P. S., Reyes-Chilpa, R., Vibrans, H., y Soto-Hernández, M. (2019). Evaluación *In Vitro* de la Actividad Cicatrizante y Antibacteriana de Extractos de *Buddleja Cordata* Kunth y *Vismia baccifera* (L.) Triana & Planch. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 42(2), 93-99.

Herrera-López, M. G., Rubio-Hernández, E. I., Leyte-Lugo, M. A., Schinkovitz, A., Richomme, P., Calvo-Irabién, L. M., y Peña-Rodríguez, L. M. (2019). Botanical origin of triterpenoids from Yucatecan propolis. *Phytochemistry Letters*, 29, 25-29.

Hodeib, A. A., Mohammad Ali, B. M., Ghoname, N. F., y Elbadawy, M. A. (2015). Significance of topical propolis in the treatment of facial acne vulgaris. *Egyptian Journal of Dermatology and Venerology*, 35(1), 29.

Hoult, J. R. S., y Payá, M. (1996). Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential. *General Pharmacology: The Vascular System*, 27(4), 713-722.

Hu, F., Hepburn, H. R., Li, Y., Chen, M., Radloff, S. E., y Daya, S. (2005). Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(3), 276-283.

Huang, S., Zhang, C. P., Wang, K., Li, G. Q., y Hu, F. L. (2014). Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*, 19(12), 19610-19632.

Instituto Nacional de Economía Social. (2018). *Historia e importancia de la Apicultura*. Gobierno de México. <https://www.gob.mx/inaes/articulos/historia-e-importancia-de-la-apicultura?idiom=es>

Inui, S., Hatano, A., Yoshino, M., Hosoya, T., Shimamura, Y., Masuda, S., Ahn, M. R., Tazawa, S., Araki, Y., y Kumazawa, S. (2014). Identification of the phenolic compounds contributing to antibacterial activity in ethanol extracts of Brazilian red propolis. *Natural Product Research*, 28(16), 1293-1296.

Jain, P., Pandey, R., y Shukla, S. S. (2015). *Inflammation: Natural Resources and Its Applications (SpringerBriefs in Immunology) (English Edition)* (2015.^a ed.). Springer.

Jaudan, A., Sharma, S., Malek, S., y Dixit, A. (2018). Induction of apoptosis by pinostrobin in human cervical cancer cells: Possible mechanism of action. *PloS one*, 13(2), e0191523.

Jegal, J., Park, N. J., Jo, B.G., Kim, S. N., y Yang, M. H. (2019). Dioscorea japonica Thunb. Ethanolic Extract Attenuated Oxazolone-Induced Atopic Dermatitis-like Skin Lesions in BALB/c Mice. *Natural Product Sciencekos*, 25(3), 261-267.

Jesus, A. A., y Goldbach-Mansky, R. (2014). IL-1 blockade in autoinflammatory syndromes. *Annual Review of Medicine*, 65, 223-244.

Johnson, R. M., y Vinetz, J. M. (2020). Dexamethasone in the management of covid -19. *BMJ*, 370, m2648.

Judd, L. L., Schettler, P. J., Brown, E. S., Wolkowitz, O. M., Sternberg, E. M., Bender, B. G., Bulloch, K., Cidlowski, J. A., Ronald de Kloet, E., Fardet, L., Joëls, M., Leung, D. Y. M., McEwen, B. S., Roozendaal, B., Van Rossum, E. F. C., Ahn, J., Brown, D. W., Plitt, A., y Singh, G. (2014). Adverse Consequences of Glucocorticoid Medication: Psychological, Cognitive, and Behavioral Effects. *American Journal of Psychiatry*, 171(10), 1045-1051.

Kariawasam, K. W. J. C., Pathirana, R. N., Ratnasooriya, W. D., Handunnetti, S., y Abeysekera, W. P. K. M. (2017). Phytochemical profile and in vitro anti-inflammatory activity of aqueous leaf extract of Sri Lankan variety of *Psidium guajava* L. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(4), 22-26.

Kauss, T., Moynet, D., Rambert, J., Al-Kharrat, A., Brajot, S., Thiolat, D., Enneman, R., Fawaz, F., y Mossalayi, M. D. (2008). Rutoside decreases human macrophage-derived inflammatory

mediators and improves clinical signs in adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 10(1), R19.

Khan, R. A., Mallick, N., y Feroz, Z. (2016). Anti-inflammatory effects of *Citrus sinensis* L., *Citrus paradisi* L. and their combinations. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29(3), 843-852.

Khayyal, M. T., el-Ghazaly, M. A., y el-Khatib, A. S. (1993). Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. *Drugs under experimental and clinical research*, 19(5), 197-203.

Kiattisin, K., Nitthikan, N., Poomanee, W., Leelapornpisid, P., Viernstein, H., y Mueller, M. (2019). Anti-inflammatory, Antioxidant Activities and Safety of *Coffea arabica* Leaf Extract for Alternative Cosmetic Ingredient. *Chiang Mai Journal of Science*, 46(2), 284-294.

Klein, S. L., y Flanagan, K. L. (2016). Sex differences in immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 16(10), 626-638.

Ko, J. H., Sethi, G., Um, J. Y., Shanmugam, M. K., Arfuso, F., Kumar, A. P., Bishayee, A., y Ahn, K. S. (2017). The Role of Resveratrol in Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), 2589.

Kolesnichenko, P. D., Peresyphkina, A. A., Poromov, A. A., Kareva, E. N., Tverskoi, A. V., y Demidenko, A. N. (2019). Study to Investigate the anti-inflammatory effect of Codelac® Broncho with Thymus Serpyllum (elixir) in comparison with reference drug Fenspiride (syrup) using acute Carrageenan-induced Paw Inflammation Model. *Research Results in Pharmacology*, 5(1), 45-52.

Komakech, R., Kim, Y. G., Matsabisa, G. M., y Kang, Y. (2019). Anti-inflammatory and analgesic potential of *Tamarindus indica* Linn. (*Fabaceae*): a narrative review. *Integrative Medicine Research*, 8(3), 181-186.

Krishnan, K., Mathew, L. E., Vijayalakshmi, N. R., y Helen, A. (2014). Anti-inflammatory potential of β -amyrin, a triterpenoid isolated from *Costus igneus*. *Inflammopharmacology*, 22(6), 373-385.

Kumari, S., Katare, P. B., Elancheran, R., Nizami, H. L., Paramesha, B., Arava, S., Sarma, P. P., Kumar, R., Mahajan, D., Kumar, Y., Devi, R., y Banerjee, S. K. (2020). *Musa balbisiana* Fruit

Rich in Polyphenols Attenuates Isoproterenol-Induced Cardiac Hypertrophy in Rats via Inhibition of Inflammation and Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 1-14.

Kumar, V., Chaudhary, N., Garg, M., Floudas, C. S., Soni, P., y Chandra, A. B. (2017). Current Diagnosis and Management of Immune Related Adverse Events (irAEs) Induced by Immune Checkpoint Inhibitor Therapy. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 49.

Kurano, M., Hasegawa, K., Kunimi, M., Hara, M., Yatomi, Y., Teramoto, T., y Tsukamoto, K. (2018). Sitosterol prevents obesity-related chronic inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1863(2), 191-198.

Kurt, Z., Minoia, M., y Spain, J. C. (2018). Resveratrol as a Growth Substrate for Bacteria from the *Rhizosphere*. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(10), e00104-18.

Lampiasi, N., y Montana, G. (2016). The molecular events behind ferulic acid mediated modulation of IL-6 expression in LPS-activated Raw 264.7 cells. *Immunobiology*, 221(3), 486-493.

Laveti, D., Kumar, M., Hemalatha, R., Sistla, R., Naidu, V. G., Talla, V., Verma, V., Kaur, N., y Nagpal, R. (2013). Anti-inflammatory treatments for chronic diseases: a review. *Inflammation & Allergy Drug Targets*, 12(5), 349-361.

Lee, H. S., Park, J. W., Kwon, O. K., Lim, Y., Kim, J. H., Kim, S. Y., Zamora, N., Rosales, K., Choi, S., Oh, S. R., y Ahn, K. S. (2019). Anti-inflammatory effects of ethanol extract from the leaves and shoots of *Cedrela odorata* L. in cytokine-stimulated keratinocytes. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 18(1), 833-840.

Leelarungrayub, J., Sriboonreung, T., Pothasak, Y., Kaju, J., y Puntumetakul, R. (2019). Anti-oxidant and Anti-inflammatory Activities of *Manilkara zapota* (Sapodilla) In vitro and Efficiency in Healthy Elderly Persons. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 15(2), 1-12.

Li, F., Zhang, J., Lin, M., Su, X., Li, C., Wang, H., Li, B., Chen, R., y Kang, J. (2019). Anti-inflammatory terpenes from *Schefflera rubriflora* C. J. Tseng & G. Hoo with their TNF- α and IL-6 inhibitory activities. *Phytochemistry*, 163, 23-32.

Lima Cavendish, R., de Souza Santos, J., Belo Neto, R., Oliveira Paixão, A., Valéria Oliveira, J., Divino de Araujo, E., Berretta e Silva, A. A., Maria Thomazzi, S., Cordeiro Cardoso, J., y Zanardo Gomes, M. (2015). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 173, 127-133.

Lima, L. D., Andrade, S. P., Campos, P. P., Barcelos, L. S., Soriani, F. M., y Moura, S. A. (2014). Brazilian green propolis modulates inflammation, angiogenesis and fibrogenesis in intraperitoneal implant in mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), 177.

Lima, N. de F. M. (2018). *Mecanismo de ação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da Persea americana* (Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto e da Criança/CCBS). Universidade Federal do Maranhão, Brasil.

Londono Orozco, A., Avila Acevedo, J.G., Canales Martinez, M.M., Hernandez Delgado, C. T., Serrano, P. R., Flores Ortiz, C. M., Duran Diaz, A., Penieres Carrillo, J. G., Garcia-Tovar, C. G. y Cruz Sanchez, T. A. (2010). Antibacterial comparative study between extracts of Mexican propolis and of three plants which use *Apis mellifera* for its production. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(8), 1250-1254.

López-Hernández, Wilma Adriana, Garza-Bueno, Laura Elena, Cruz-Galindo, Bartolomé, y Nieto-Angel, Raúl. (2019). Competitividad del limón persa en la región del Papaloapan, Oaxaca. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(4), 921-934.

Lorea, F., y Munn, X. (2005). Estudio florístico de los bosques mesófilos de la Sierra Mazateca de Oaxaca, México. Instituto de Ecología AC División de Vegetación y Flora. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. U028. Ciudad de México Luna I, Almeida L, Villers L, Lorenzo I. 1988. Reconocimiento florístico y consideraciones fitogeográficas del bosque mesófilo de montaña de Teocelo, Veracruz. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 48, 35-63.

Lotti, C., Campo Fernandez, M., Piccinelli, A. L., Cuesta-Rubio, O., Marquez Hernandez, I., y Rastrelli, L. (2010). Chemical constituents of red Mexican propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(4), 2209-2213.

Lucero-Gómez, P., Mathe, C., Vieillescazes, C., Bucio, L., Belio, I., y Vega, R. (2014). Analysis of Mexican reference standards for *Bursera spp.* resins by gas chromatography–mass

spectrometry and application to archaeological objects. *Journal of Archaeological Science*, 41, 679-690.

Ludeña-Huaman, M. A., y Ramos-Inquiltupa, D. A. (2019). Determination of the content of ursolic and oleanolic acid in the cuticular wax of fruits of different species of *Rosaceae*. *Revista Colombiana de Química*, 48(2), 15-20.

Luna Ruiz, X. (2007). *Mazatecos. Pueblos indígenas del México contemporáneo*. Comisión Nacional para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas, México.

<https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/11676/mazatecos.pdf>

M Devi, D., S Dhanalakshmi, D., Govindarajan, G. E. T., BA Tanisha, T., Sonalika, T., JE Ruth, R., T Avinash, A., Sri, C. J., K Logeswaran, L., y Ramasamy, M. N. (2020). A Review on *Phaseolus vulgaris* Linn. *Pharmacognosy Journal*, 12(5), 1160-1164.

Magalhães, W. S., Corrêa, C. M., Alencastro, R. B., y Nagem, T. J. (2012). Bases moleculares da ação anti-inflamatória dos ácidos oleanólico e ursólico sobre as isoformas da ciclooxigenase por docking e dinâmica molecular. *Química Nova*, 35(2), 241-248.

Magro Filho, O., y de Carvalho, A. C. P. (1990). Application of propolis to dental sockets and skin wounds. *The Journal of Nihon University School of Dentistry*, 32(1), 4-13.

Mihaličová Malčovská, S., Dučaiová, Z., Maslaňáková, I., y Bačkor, M. (2014). Effect of Silicon on Growth, Photosynthesis, Oxidative Status and Phenolic Compounds of Maize (*Zea mays* L.) Grown in Cadmium Excess. *Water, Air, & Soil Pollution*, 225(8), 2056.

Maldini, M., Montoro, P., Piacente, S., y Pizza, C. (2009). Phenolic compounds from *Bursera simaruba* Sarg. bark: phytochemical investigation and quantitative analysis by tandem mass spectrometry. *Phytochemistry*, 70(5), 641-649.

Mancarz, G. F. F., Laba, L. C., da Silva, E. C. P., Prado, M. R. M., de Souza, L. M., de Souza, D., Nakashima, T., y Mello, R. G. (2019a). *Liquidambar styraciflua* L.: A new potential source for therapeutic uses. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 174, 422-431.

Mancarz, G. F. F., Laba, L. C., Morais Silva, T. A., Pazzim, M. S., de Souza, D., Prado, M. R. M., de Souza, L. M., Nakashima, T., y Mello, R. G. (2019b). Chemical composition and biological activity of *Liquidambar styraciflua* L. leaf essential oil. *Industrial Crops and Products*, 138, 111446.

Marcotullio, M. C., Curini, M., y Becerra, J. X. (2018). An Ethnopharmacological, Phytochemical and Pharmacological Review on Lignans from Mexican *Bursera spp.* *Molecules*, 23(8), 1976.

Mariscal Torroella, M. T. (2011). *Centro Cultural Modelo Tuxtepec Oaxaca*.

<http://192.203.177.185/bitstream/handle/ibero/320/015381s.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Massaro, F. C., Brooks, P. R., Wallace, H. M., y Russell, F. D. (2011). Cerumen of Australian stingless bees (*Tetragonula carbonaria*): gas chromatography-mass spectrometry fingerprints and potential anti-inflammatory properties. *Naturwissenschaften*, 98(4), 329-337.

Matias, E. F. F., Alves, E. F., Santos, B. S., Sobral de Souza, C. E., Alencar Ferreira, J. V., Santos de Lavor, A. K. L., Figueredo, F. G., Ferreira de Lima, L., Vieira dos Santos, F. A., Neves Peixoto, F. S., Viana Colares, A., Augusti Boligon, A., Saraiva, R. A., Athayde, M. L., da Rocha, J. B. T., Alencar Menezes, I. R., Douglas Melo Coutinho, H., y da Costa, J. G. M. (2013). Biological Activities and Chemical Characterization of *Cordia verbenácea* DC. as Tool to Validate the Ethnobiological Usage. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1-7.

McLennan, S. V., Bonner, J., Milne, S., Lo, L., Charlton, A., Kurup, S., Jia, J., Yue, D. K., y Twigg, S. M. (2008). The anti-inflammatory agent Propolis improves wound healing in a rodent model of experimental diabetes. *Wound Repair and Regeneration*, 16(5), 706-713.

Miguel-Álvarez, M., Santos-Lozano, A., Sanchis-Gomar, F., Fiuza-Luces, C., Pareja-Galeano, H., Garatachea, N., y Lucia, A. (2015). Non-steroidal anti-inflammatory drugs as a treatment for alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis of treatment effect. *Drugs & Aging*, 32(2), 139-147.

Miraj, S. (2016). Pharmacological effects of *Saccharum officinarum* L. *Der Pharmacia Lettre*, 8(13), 223-225.

Mohtar, L. G., Messina, G. A., Bertolino, F. A., Pereira, S. V., Raba, J., y Nazareno, M. A. (2020). Comparative study of different methodologies for the determination the antioxidant activity of Venezuelan propolis. *Microchemical Journal*, 158, 105244.

Montpied, P., de Bock, F., Rondouin, G., Niel, G., Briant, L., Courseau, A. S., Lerner-Natoli, M., y Bockaert, J. (2003). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents inflammatory stress in organotypic hippocampal slice cultures. *Molecular Brain Research*, 115(2), 111-120.

Moo-Huchin, V. M., Canto-Pinto, J. C., Cuevas-Glory, L. F., Sauri-Duch, E., Pérez-Pacheco, E., y Betancur-Ancona, D. (2019). Effect of extraction solvent on the phenolic compounds content and antioxidant activity of Ramon nut (*Brosimum alicastrum*). *Chemical Papers*, 73(7), 1647-1657.

Moon, J. H., Lee, M. Y., Chung, Y. J., Rhee, C. K., y Lee, S. J. (2018). Effect of topical Propolis on wound healing process after tonsillectomy: randomized controlled study. *Clinical and experimental otorhinolaryngology*, 11(2), 146-150.

Morales-Muñoz, H. (2015). *Perfil de HPLC, RMN y Actividad biológica de Extractos Etanólicos de Geopropóleos de Abejas Meliponas de la Región Centro de Veracruz* (Tesis de licenciatura). Universidad Veracruzana, México.

Muir, A. D., Cole, A. L. J., y Walker, J. R. L. (1982). Antibiotic compounds from New Zealand plants. *Planta Medica*, 44(03), 129-133.

Mujica, V., Orrego, R., Pérez, J., Romero, P., Ovalle, P., Zúñiga-Hernández, J., Arredondo, M., y Leiva, E. (2017). The Role of Propolis in Oxidative Stress and Lipid Metabolism: A Randomized Controlled Trial. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 4272940.

Murphy, L. B., Cisternas, M. G., Pasta, D. J., Helmick, C. G., y Yelin, E. H. (2018). Medical expenditures and earnings losses among US adults with arthritis in 2013. *Arthritis Care & Research*, 70(6), 869-876.

Naik, D. G., Mujumdar, A. M., y Vaidya, H. S. (2013). Anti-inflammatory activity of propolis from Maharashtra, India. *Journal of Apicultural Research*, 52(2), 35-43.

Nandakumar, K. S., Svensson, L., y Holmdahl, R. (2003). Collagen type II-specific monoclonal antibody-induced arthritis in mice: description of the disease and the influence of age, sex, and genes. *The American Journal of Pathology*, 163(5), 1827-1837.

Narang, N., y Jiraungkoorskul, W. (2016). Anticancer activity of key lime, *Citrus aurantifolia*. *Pharmacognosy Reviews*, 10(20), 118.

Nasri, M., Bedjou, F., Porras, D., y Martínez-Flórez, S. (2017). Antioxidant, anti-inflammatory, and analgesic activities of *Citrus reticulata* blanco leaves extracts: an in vivo and in vitro study. *Phytothérapie*, 1-13.

Necas, J., y Bartosikova, L. (2013). Carrageenan: a review. *Veterinární Medicina*, 58(4), 187-205.

Newman, D. J., y Cragg, G. M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 79(3), 629-661.

Newton, K., y Dixit, V. M. (2012). Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(3), a006049.

Ngenge, T. A., Emmanuel, T., Maurice, T. F., y Joseph, M. T. (2017). A New Spinastane-type Triterpenoid from a Cameroonian Propolis sample and Evaluation of Antibacterial and Anti-inflammatory Potential of Extracts. *Journal of Chemistry and Chemical Sciences*, 7(10), 763-770.

Nguyen, T. P., Tran, T. T. V., Mai, D. T., Le, T. D., Phan, N. M., y Bui, T. D. (2015). New C20-gibberellin diterpene from the leaves of *Schefflera sessiliflora* De P. V. *Natural Product Research*, 29(15), 1432-1436.

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Gobierno de México. Revisado y publicado el 08-08-2011.

https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf

Norma Oficial Mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017. Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento. Diario Oficial de la Federación del Viernes 6 de Octubre del 2017.

http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5500103&fecha=06/10/2017

Núñez, D., Balboa, N., Alvear, M., Ceron, A., Abarzua, K., y Vasconcellos, A. (2018). Evaluación de la actividad anti-inflamatoria de propóleos chileno sobre cortes histológicos de orejas de ratón. *International Journal of Morphology*, 36(1), 189-193.

Ohlsson, A., Walia, R., y Shah, S. S. (2015). Ibuprofen for the treatment of patent ductus arteriosus in preterm or low birth weight (or both) infants. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (2), CD003481.

Oliveira-Tintino, C. D. M., Pessoa, R. T., Fernandes, M. N. M., Alcântara, I. S., da Silva, B. A. F., de Oliveira, M. R. C., Martins, A. O. B. P. B., da Silva, M. S., Tintino, S. R., Rodrigues, F. F. G., da Costa, J. G. M., de Lima, S. G., Kerntopf, M. R., da Silva, T. G., y de Menezes, I. R. A. (2018). Anti-inflammatory and anti-edematogenic action of the *Croton campestris* A. St.-Hil (*Euphorbiaceae*) essential oil and the compound β -caryophyllene in in vivo models. *Phytomedicine*, 41, 82-95.

Olivera-Castillo, L., Grant, G., Kantún-Moreno, N., Acevedo-Fernández, J. J., Puc-Sosa, M., Montero, J., Olvera-Novoa, M. A., Negrete-León, E., Santa-Olalla, J., Ceballos-Zapata, J., Bercansil, M. C. M., Merca, F. E., Lindsay-Edwards, J., Puerto-Castillo, C., Gil-Zamorano, J., Fernández-Herrera, M. A., Pérez-Tapia, M., Dávalos, A., Y Rodríguez-Canul, R. (2018). Sea cucumber (*Isostichopus badionotus*) body-wall preparations exert anti-inflammatory activity in vivo. *PharmaNutrition*, 6(2), 74-80.

Oray, M., Abu Samra, K., Ebrahimiadib, N., Meese, H., y Foster, C. S. (2016). Long-term side effects of glucocorticoids. *Expert Opinion on Drug Safety*, 15(4), 457-465.

Oresanya, I. O., Sonibare, M. A., Gueye, B., Balogun, F. O., Adebayo, S., Ashafa, A. O. T., y Morlock, G. (2020). Isolation of flavonoids from *Musa acuminata* Colla (Simili radjah, ABB) and the in vitro inhibitory effects of its leaf and fruit fractions on free radicals, acetylcholinesterase, 15-lipoxygenase, and carbohydrate hydrolyzing enzymes. *Journal of Food Biochemistry*, 44(3), e13137.

Oscanoa-Espinoza, T., y Lizaraso-Soto, F. (2015). Antiinflamatorios no esteroides: seguridad gastrointestinal, cardiovascular y renal [Nonsteroidal antiinflammatory drugs: gastrointestinal and cardiovascular and renal safety]. *Revista de Gastroenterología del Perú: Órgano Oficial de la Sociedad de Gastroenterología del Perú*, 35(1), 63-71.

Oyeleke, S. A., Ajayi, A. M., Umukoro, S., Aderibigbe, A. O., y Ademowo, O. G. (2018). Anti-inflammatory activity of *Theobroma cacao* L. stem bark ethanol extract and its fractions in experimental models. *Journal of Ethnopharmacology*, 222, 239-248.

- Ozer, H. K. (2017). Phenolic compositions and antioxidant activities of Maya nut (*Brosimum alicastrum*): Comparison with commercial nuts. *International Journal of Food Properties*, 20(11), 2772-2781.
- Pace, S., Sautebin, L., y Werz, O. (2017). Sex-biased eicosanoid biology: impact for sex differences in inflammation and consequences for pharmacotherapy. *Biochemical Pharmacology*, 145, 1-11.
- Paniagua-Pérez, R., Flores-Mondragón, G., Reyes-Legorreta, C., Herrera-López, B., Cervantes-Hernández, I., Madrigal-Santillán, O., Morales-González, J. A., Álvarez-González, I., y Madrigal-Bujaidar, E. (2016). Evaluation of the Anti-inflammatory Capacity of Beta-Sitosterol in Rodent Assays. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, 14(1), 123-130.
- Paniagua-Pérez, R., Madrigal-Bujaidar, E., Reyes-Cadena, S., Molina-Jasso, D., Gallaga, J. P., Silva-Miranda, A., Velazco, O., Hernández, N., y Chamorro, G. (2005). Genotoxic and Cytotoxic Studies of Beta-Sitosterol and Pteropodine in Mouse. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2005(3), 242-247.
- Paniagua-Zambrana, N. Y., Bussmann, R. W., y Romero, C. (2020). *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav.) Oken *Cordia lutea* Lam. Boraginaceae. *Ethnobotany of Mountain Regions*, 1-6.
- Pasparakis, M., y Vandenabeele, P. (2015). Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*, 517(7534), 311-320.
- Park, E. H., y Kahng, J. H. (1999). Suppressive effects of propolis in rat adjuvant arthritis. *Archives of Pharmacal Research*, 22(6), 554-558.
- Park, W. S., Park, M. S., Kang, S. W., Jin, S. A., Jeon, Y., Hwang, J., y Kim, S. K. (2019). Hesperidin Shows Protective Effects on Renal Function in Ischemia-induced Acute Kidney Injury (Sprague-Dawley Rats). *Transplantation Proceedings*, 51(8), 2838-2841.
- Patel, K., Kumar, V., Rahman, M., Verma, A., y Patel, D. K. (2018). New insights into the medicinal importance, physiological functions and bioanalytical aspects of an important bioactive compound of foods 'Hyperin': health benefits of the past, the present, the future. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 7(1), 31-42.

Peraza-Sánchez, S. R., Salazar-Aguilar, N. E., y Peña-Rodríguez, L. M. (1995). A new triterpene from the resin of *Bursera simaruba*. *Journal of Natural Products*, 58(2), 271-274.

Peres, R. S., Menezes, G. B., Teixeira, M. M., y Cunha, F. Q. (2016). Pharmacological opportunities to control inflammatory diseases through inhibition of the leukocyte recruitment. *Pharmacological Research*, 112, 37-48.

Rodríguez Pérez, B., Canales Martínez, M. M., Penieres Carrillo, J. G., y Cruz Sánchez, T. A. (2020). Composición química, propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana de propóleos mexicanos. *Acta Universitaria*, 30, 1-30.

Pérez-González, M. Z., Gutiérrez-Rebolledo, G. A., Yépez-Mulia, L., Rojas-Tomé, I. S., Luna-Herrera, J., y Jiménez-Arellanes, M. A. (2017). Antiprotozoal, antimycobacterial, and anti-inflammatory evaluation of *Cnidioscolus chayamansa* (Mc Vaugh) extract and the isolated compounds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 89, 89-97.

Ponnulakshmi, R., Shyamaladevi, B., Vijayalakshmi, P., y Selvaraj, J. (2019). In silico and in vivo analysis to identify the antidiabetic activity of beta sitosterol in adipose tissue of high fat diet and sucrose induced type-2 diabetic experimental rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 29(4), 276-290.

Prabhu, D. S., Selvam, A. P., y Rajeswari, V. D. (2018). Effective anti-cancer property of *Pouteria sapota* leaf on breast cancer cell lines. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 15, 39-44.

Prokopchuk, E., Kravchenko, I., y Alexandrova, A. (2018). Anti-inflammatory activity of new complex compounds SnCl₄ with salicyloyl hydrazones benzaldehyde and 4-bromobenzaldehyde on different models of inflammation. 5641.

Qiao, W., Zhao, C., Qin, N., Zhai, H. Y., y Duan, H. Q. (2011). Identification of trans-tiliroside as active principle with anti-hyperglycemic, anti-hyperlipidemic and antioxidant effects from *Potentilla chinesis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 135(2), 515-521.

Qi, W., Lin, C., Fan, K., Chen, Z., Liu, L., Feng, X., Zhang, H., Shao, Y., Fang, H., Zhao, C., Zhang, R., y Cai, D. (2019). Hesperidin inhibits synovial cell inflammation and macrophage polarization through suppression of the PI3K/AKT pathway in complete Freund's adjuvant-induced arthritis in mice. *Chemico-Biological Interactions*, 306, 19-28.

Qureshi, M. N., Numonov, S., Abudurexiti, A., y Aisa, H. A. (2016). Phytochemical investigations and evaluation of antidiabetic potential of *Prunus dulcis* nuts. *LWT-Food Science and Technology*, *66*, 311-317.

Rajoo, M., Parolia, A., Pau, A., y Amalraj, F. D. (2014). The Role of Propolis in Inflammation and Orofacial Pain: A Review. *Annual Research & Review in Biology*, *4*(4), 651-664.

Rakel MD, University of Wisconsin Medical School Wisconsin David. (2017). *Integrative Medicine* (4th ed.). Elsevier.

RECOVERY Collaborative Group, Horby, P., Lim, W. S., Emberson, J. R., Mafham, M., Bell, J. L., Linsell, L., Staplin, N., Brightling, C., Ustianowski, A., Elmahi, E., Prudon, B., Green, C., Felton, T., Chadwick, D., Rege, K., Fegan, C., Chappell, L. C., Faust, S. N., Jaki, T., ... Landray, M. J. (2020). Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19 - Preliminary Report. *The New England Journal of Medicine*, NEJMoa2021436. Advance online publication.

Regulski, M., Regulska, K., Prukała, W., Piotrowska, H., Stanisiz, B., y Murias, M. (2016). COX-2 inhibitors: a novel strategy in the management of breast cancer. *Drug Discovery Today*, *21*(4), 598-615.

Reis, C. M. F., Carvalho, J. C. T., Caputo, L. R. G., Patrício, K. C. M., Barbosa, M. V. J., Chieff, A. L., y Bastos, J. K. (2000). Atividade antiinflamatória, antiúlcera gástrica e toxicidade subcrônica do extrato etanólico de própolis. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *9*(1), 43-52.

Ristivojević, P., Trifković, J., Andrić, F., & Milojković-Opsenica, D. š. (2015). Poplar-type Propolis: Chemical Composition, Botanical Origin and Biological Activity. *Natural Product Communications*, *10*(11), 1934578X1501001.

Robinson, D. E., Dennison, E. M., Cooper, C., van Staa, T. P., y Dixon, W. G. (2016). A review of the methods used to define glucocorticoid exposure and risk attribution when investigating the risk of fracture in a rheumatoid arthritis population. *Bone*, *90*, 107-115.

Rodrigues, A. P., Pereira, G. A., Tomé, P. H. F., Arruda, H. S., Eberlin, M. N., y Pastore, G. M. (2019). Chemical composition and antioxidant activity of Monguba (*Pachira aquatica*) seeds. *Food Research International*, *121*, 880-887.

Rodríguez-Archilla, A., y Raissouni, T. (2017). Randomized clinical trial of the effectiveness of complementary therapies for recurrent aphthous stomatitis. *Medicina Clínica*, 149(2), 55-60.

Roh, K.-B., Kim, H., Shin, S., Kim, Y.-S., Lee, J.-A., Kim, M. O., Jung, E., Lee, J., y Park, D. (2016). Anti-inflammatory effects of *Zea mays L.* husk extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 1-8.

Rojczyk, E., Klama-Baryła, A., Łabuś, W., Wilemska-Kucharzewska, K., y Kucharzewski, M. (2020). Historical and modern research on propolis and its application in wound healing and other fields of medicine and contributions by Polish studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 262, 113159.

Romero-Estrada, A., Maldonado-Magaña, A., González-Christen, J., Bahena, S. M., Garduño-Ramírez, M. L., Rodríguez-López, V., y Alvarez, L. (2016). Anti-inflammatory and antioxidative effects of six pentacyclic triterpenes isolated from the Mexican copal resin of *Bursera copallifera*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 1-10.

Sadhana, N., Lohidasan, S., y Mahadik, K. R. (2017). Marker-based standardization and investigation of nutraceutical potential of Indian propolis. *Journal of Integrative Medicine*, 15(6), 483-494.

Salas, M. P., Céliz, G., Geronazzo, H., Daz, M., y Resnik, S. L. (2011). Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from *citrus* species. *Food Chemistry*, 124(4), 1411-1415.

Scotland, R. S., Stables, M. J., Madalli, S., Watson, P., y Gilroy, D. W. (2011). Sex differences in resident immune cell phenotype underlie more efficient acute inflammatory responses in female mice. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 118(22), 5918-5927.

Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2015). *Análisis de la Estrategia Actual de Atención Territorial e Impacto de los Programas de Apoyo al Sector Rural, en los Municipios de la Cruzada Contra el Hambre o de Alta Marginación*. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/347571/Libro._Analisis_Cruzada_Contra_El_Ha-.pdf

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2016). *Apicultura, un arte endulzante*. Gobierno de México. <https://www.gob.mx/siap/articulos/apicultura-un-arte-endulzante-30224>

Sforcin, J. M. (2016). Biological properties and therapeutic applications of propolis. *Phytotherapy Research*, 30(6), 894-905.

Sharmila, R., y Sindhu, G. (2017). Evaluate the Antigenotoxicity and Anticancer Role of β -Sitosterol by Determining Oxidative DNA Damage and the Expression of Phosphorylated Mitogen-activated Protein Kinases', C-fos, C-jun, and Endothelial Growth Factor Receptor. *Pharmacognosy Magazine*, 13(49), 95-101.

Sherwood, E. R., y Toliver-Kinsky, T. (2004). Mechanisms of the inflammatory response. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, 18(3), 385-405.

Silva-Carvalho, R., Baltazar, F., y Almeida-Aguiar, C. (2015). Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 206439.

Silvan, J. M., Michalska-Ciechanowska, A., y Martinez-Rodriguez, A. J. (2020). Modulation of Antibacterial, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Properties by Drying of *Prunus domestica* L. Plum Juice Extracts. *Microorganisms*, 8(1), 119.

Simão da Silva, K. A. B., Paszcuk, A. F., Passos, G. F., Silva, E. S., Bento, A. F., Meotti, F. C., y Calixto, J. B. (2011). Activation of cannabinoid receptors by the pentacyclic triterpene α,β -amyrin inhibits inflammatory and neuropathic persistent pain in mice. *Pain*, 152(8), 1872-1887.

Soltani, E. K., Cerezuela, R., Charef, N., Mezaache-Aichour, S., Esteban, M. A., y Zerroug, M. M. (2017). Algerian propolis extracts: Chemical composition, bactericidal activity and in vitro effects on gilthead seabream innate immune responses. *Fish & Shellfish Immunology*, 62, 57-67.

Sosa-Ortega, A. (2010). *Plan Municipal de Desarrollo, Huautla de Jiménez, Oaxaca*. https://www.finanzasoxaca.gob.mx/pdf/inversion_publica/pmds/08_10/041.pdf

Süleyman, H., Demircan, B., y Karagöz, Y. (2007). Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacological Reports*, 59(3), 247-258.

Tan-No, K., Nakajima, T., Shoji, T., Nakagawasai, O., Niiijima, F., Ishikawa, M., Endo, Y., Sato, T., Satoh, S., y Tadano, T. (2006). Anti-inflammatory effect of propolis through inhibition of nitric oxide production on carrageenin-induced mouse paw edema. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29(1), 96-99.

Tao, L., Zhu, F., Qin, C., Zhang, C., Xu, F., Tan, C. Y., Jiang, Y. Y., y Chen, Y. Z. (2014). Nature's contribution to today's pharmacopeia. *Nature Biotechnology*, 32(10), 979-980.

Thatoi, H., y Patra, J. K. (2011). Biotechnology and pharmacological evaluation of medicinal plants: an overview. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 17(3), 214-248.

Thiébaud, V. (2014). *Liberalización económica y caña de azúcar: tres estudios de caso en México*. Ulúa. <https://ulua.uv.mx/index.php/ulua/article/view/1093>

Tian, C., Liu, X., Chang, Y., Wang, R., Lv, T., Cui, C., y Liu, M. (2021). Investigation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of luteolin, kaempferol, apigenin and quercetin. *South African Journal of Botany*, 137, 257-264.

Tolosa, L., y Cañizares, E. (2002). Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *Ars Pharmaceutica*, 43, 187-204.

Ungprasert, P., Cheungpasitporn, W., Crowson, C. S., y Matteson, E. L. (2015). Individual non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *European Journal of Internal Medicine*, 26(4), 285-291.

Troshev, K., Kozarev, I., y Markov, D. (1990). Regulation of traumatic skin wound healing by influencing the process in the neighbouring zone of the wound. *Acta Chirurgiae Plasticae*, 32(3), 152.

Uttra, A. M., Ahsan, H., Hasan, U. H., y Chaudhary, M. A. (2018). Traditional medicines of plant origin used for the treatment of inflammatory disorders in Pakistan: A review. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 38(4), 636-656.

Valerio, M., y Awad, A. B. (2011). β -Sitosterol down-regulates some pro-inflammatory signal transduction pathways by increasing the activity of tyrosine phosphatase SHP-1 in J774A. 1 murine macrophages. *International Immunopharmacology*, 11(8), 1012-1017.

Valeyre, D., Prasse, A., Nunes, H., Uzunhan, Y., Brillet, P. Y., y Müller-Quernheim, J. (2014). Sarcoidosis. *Lancet*, 383(9923), 1155-1167.

van der Goes, M. C., Jacobs, J. W., y Bijlsma, J. W. (2014). The value of glucocorticoid co-therapy in different rheumatic diseases - positive and adverse effects. *Arthritis Research & Therapy*, 16(Suppl 2), S2.

van Walsem, A., Pandhi, S., Nixon, R. M., Guyot, P., Karabis, A., y Moore, R. A. (2015). Relative benefit-risk comparing diclofenac to other traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2 inhibitors in patients with osteoarthritis or rheumatoid arthritis: a network meta-analysis. *Arthritis Research & Therapy*, 17(1), 66.

Vargas-Orozco, J.H. (2011). *Actualización del Atlas de Riesgo del Municipio de San Juan Bautista Tuxtepec*. <http://www.proteccioncivil.oaxaca.gob.mx/wp-content/uploads/2019/03/SanjuanbautistatuxtepecAR.pdf>

Rangel-Velázquez, J. E. (2016). *Evaluación del Efecto Antinociceptivo de Rutina para la Determinación de la DE₅₀ en 2 Modelos Preclínicos* (Tesis de Pregrado). Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México. <http://repositorio.ugto.mx/handle/20.500.12059/3107>

Voss, G. T., Gularte, M. S., Vogt, A. G., Giongo, J. L., Vaucher, R. A., Echenique, J. V. Z., Soares, M. P., Luchese, C., Wilhelm, E. A., y Fajardo, A. R. (2018). Polysaccharide-based film loaded with vitamin C and propolis: A promising device to accelerate diabetic wound healing. *International Journal of Pharmaceutics*, 552(1-2), 340-351.

Wang, K., Hu, L., Jin, X.-L., Ma, Q.-X., Marcucci, M. C., Netto, A. A. L., Sawaya, A. C. H. F., Huang, S., Ren, W.-K., Conlon, M. A., Topping, D. L., y Hu, F.-L. (2015). Polyphenol-rich propolis extracts from China and Brazil exert anti-inflammatory effects by modulating ubiquitination of TRAF6 during the activation of NF- κ B. *Journal of Functional Foods*, 19, 464-478.

Winter, C. A., y Porter, C. C. (1957). Effect of alterations in side chain upon anti-inflammatory and liver glycogen activities of hydrocortisone esters. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, 46(9), 515-519.

Wu, C., Duan, Y.-H., Tang, W., Li, M.-M., Wu, X., Wang, G.-C., Ye, W.-C., Zhou, G.-X., y Li, Y. L. (2014). New ursane-type triterpenoid saponins from the stem bark of *Schefflera heptaphylla*. *Fitoterapia*, *92*, 127-132.

Wu, X. Q., Li, W., Chen, J. X., Zhai, J. W., Xu, H. Y., Ni, L., y Wu, S. S. (2019). Chemical Constituents and Biological Activity Profiles on Pleione (*Orchidaceae*). *Molecules*, *24*(17), 3195.

Wu, X., Song, M., Rakariyatham, K., Zheng, J., Wang, M., Xu, F., Gao, Z., y Xiao, H. (2015). Inhibitory Effects of 4'-Demethylnobiletin, a Metabolite of Nobiletin, on 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-Induced Inflammation in Mouse Ears. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(51), 10921-10927.

Yeom, Y. E., Kim, M. A., Kim, J., y Lee, C. M. (2019). Anti-inflammatory effects of the extract of *Solanum nigrum* L. on an acute ear edema mouse model. *Materials Technology*, *34*(14), 851-857.

Young, J. M., y De Young, L. M. (1989). Cutaneous models of inflammation for the evaluation of topical and systemic pharmacological agents. *Pharmacological Methods in the Control of Inflammation*, 215-231.

Zaccaria, V., Curti, V., Di Lorenzo, A., Baldi, A., Maccario, C., Sommatis, S., Mocchi, R., y Daglia, M. (2017). Effect of Green and Brown Propolis Extracts on the Expression Levels of microRNAs, mRNAs and Proteins, Related to Oxidative Stress and Inflammation. *Nutrients*, *9*(10), 1090.

Zhou, R., Li, D., Kou, Q., Jiao, Z., y Ning, Z. (2019). Evaluation of anti-inflammatory, antimicrobial and wound healing activity of *Morus nigra*. *South African Journal of Botany*, *124*, 540-545.

Zia, K. M., Tabasum, S., Nasif, M., Sultan, N., Aslam, N., Noreen, A., y Zuber, M. (2017). A review on synthesis, properties and applications of natural polymer based carrageenan blends and composites. *International Journal of Biological Macromolecules*, *96*, 282-301.

Žilić, S., Janković, M., Basić, Z., Vančetović, J., y Maksimović, V. (2016). Antioxidant activity, phenolic profile, chlorophyll and mineral matter content of corn silk (*Zea mays* L): Comparison with medicinal herbs. *Journal of Cereal Science*, *69*, 363-370.

Zohery, A. A., Meshri, S. M., Madi, M. I., Abd El Rehim, S. S., y Nour, Z. M. (2018). Egyptian propolis compared to nanohydroxyapatite graft in the treatment of Class II furcation defects in dogs. *Journal of Periodontology*, 89(11), 1340-1350.

12. ANEXOS

12.1. Formación de edema subplantar (mm) de los tratamientos EPP1, EPP2 y EPP3 en ratones hembra y macho *Balb/C* a las horas 1, 3, 5,7 y 24 h.

Tabla 6. Actividad antiinflamatoria de los tratamientos EPP1, EPP2 y EPP3 en inflamación aguda inducida por carragenina en ratones hembra *Balb/C*.

Formación de edema subplantar (mm)					
Tratamientos	1h	3h	5h	7h	24h
Vehículo	0.276±0.03	0.560±0.03	0.722±0.03	0.485±0.03	0.314±0.04
Indometacina	0.298±0.02	0.360±0.03 ^a	0.438±0.03 ^a	0.433±0.03	0.313±0.04
EPP1	0.348±0.01	0.562±0.04 ^b	0.586±0.05 ^{a,b}	0.463±0.04	0.322±0.04
EPP2	0.336±0.02	0.519±0.05 ^b	0.545±0.04 ^a	0.480±0.03	0.349±0.03
EPP3	0.310±0.04	0.547±0.04 ^b	0.583±0.04 ^{a,b}	0.531±0.04	0.424±0.03

Cada grupo representa la media ± error estándar de la media (ESM), Análisis de varianza (ANOVA) de una vía, post-hoc Student Newman Keuls ($p \leq 0.05$); $n=7$ para cada grupo.

^a VS. Vehículo; ^b VS. Indometacina.

Tabla 7. Actividad antiinflamatoria de los tratamientos EPP1, EPP2 y EPP3 en inflamación aguda inducida por carragenina en ratones macho *Balb/C*.

Formación de edema subplantar (mm)					
Tratamientos	1h	3h	5h	7h	24h
Vehículo	0.256±0.08	0.586±0.09	0.653±0.07	0.518±0.08	0.446±0.10
Indometacina	0.247±0.3	0.448±0.05	0.497±0.02	0.409±0.01	0.357±0.01
EPP1	0.352±0.04	0.462±0.03	0.539±0.06	0.444±0.07	0.399±0.06
EPP2	0.299±0.04	0.572±0.06	0.610±0.04 ^{b,c}	0.523±0.05 ^c	0.331±0.07
EPP3	0.201±0.05	0.504±0.01	0.396±0.03 ^{a,b}	0.348±0.02	0.275±0.02 ^b

Cada grupo representa la media ± error estándar de la media (ESM), Análisis de varianza (ANOVA) de una vía, post-hoc Student Newman Keuls ($p \leq 0.05$); $n=5$ para cada grupo.

^a VS. Vehículo; ^b VS. Indometacina; ^c VS. EPP3.