

Propiedad inmunomoduladora del extracto etanólico de propóleos sobre la Bursa de Fabricio de pollos bebés F1 Rhode Island Red x Rhode Island White

José G. Valles¹, Judith Principal² y Carlos Barrios²

¹Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" (UCLA). Departamento de Producción y Tecnología, Área Avicultura. Núcleo Tarabana, municipio Palavecino, estado Lara, Venezuela.

²UCLA. Estación de Apicultura. Decanato de Ciencias Veterinarias, estado Lara, Venezuela.

*Correo electrónico: judith.principal@gmail.com.

RESUMEN

Este estudio se realizó con el propósito de evaluar la propiedad inmunomoduladora del extracto etanólico de propóleos (EEP), sobre la Bursa de Fabricio en pollos bebés F1 Rhode Island Red X Rhode Island White. Para ello, fueron seleccionados al azar 180 pollos bebés F1 del cruce antes señalado, procedente de una planta de incubación ubicada en el estado Carabobo, Venezuela, los cuales se dividieron en 5 grupos de 36 aves cada uno, alojados en un módulo vertical formado por 5 jaulas metálicas y manejados en condiciones físicas y ambientales similares. Se aplicó un diseño aleatorizado conformado por un control, un placebo y tres grupos experimentales, a los cuales se les suministró 100 µl del EEP al 5%, 10% y 20% respectivamente, por vía oral durante 7 días consecutivos. El tratamiento control solo recibió 100 µl de agua y el grupo placebo recibió 100 µl de alcohol etílico al 56%. Los datos colectados fueron analizados a través de un análisis de varianza univariante para el peso de la Bursa de Fabricio, observándose diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre los tratamientos. Con la prueba de Tukey se confirmó que el extracto etanólico de propóleos tiene efecto inmunomodulador sobre la Bursa de Fabricio en pollos bebés F1 Rhode Island Red X Rhode Island White, en comparación con los grupos control y placebo.

Palabras clave: pollos bebés, propóleos, propiedad inmunomoduladora, tejido linfoide.

Immunomodulatory property of ethanolic extract of propolis on the Bursa of Fabricio in F1 male babies chicken Rhode Island Red X Rhode Island White

ABSTRACT

This study was done with the purpose of evaluating the immunomodulatory effect of ethanolic extract of propolis on the Bursa of Fabricio in F1 male babies chicken Rhode Island Red X Rhode Island White, from an incubation farm located at Carabobo state, Venezuela. To do the study 180 F1 male babies chicken from the genetic crossed mentioned before was randomly selected and divided in five groups of 36 chickens each one, managed in physical and ambient similar conditions. A randomized design was applied conformed by a control, a placebo and three experimental groups to which was administered 100 µl of EEP at 5%, 10% and 20% respectively by oral route for seven days consecutive. The control treatment only received 100 µl of water and the placebo group received 100 µl of ethanol at 56 %. The collected data were analyzed by one way ANOVA for the Bursa of Fabricio weight. It was observed statistical significant differences between treatments ($P < 0.05$). The Tukey test confirmed that the ethanolic propolis extract has an immunomodulatory effect on the Bursa of Fabricio in F1 male babies chicken Rhode Island Red X Rhode Island White compared to the control and placebo groups.

Keywords: babies chicken, propolis, immunomodulatory property, lymphoid tissue.

INTRODUCCIÓN

El sistema inmunológico es el mecanismo de defensa que los seres vivos tienen para proteger su integridad frente a elementos extraños, siendo considerado como un sistema complejo, refinado y dinámico que funciona a nivel celular y subcelular. Los tejidos y órganos linfoides son los que básicamente proveen las células capacitadas para reconocer y destruir elementos extraños, lo cual permite formar una línea de defensa contra virus, bacterias, hongos, parásitos y tumores. Durante el desarrollo embrionario las células primordiales pluripotenciales migran del saco vitelino hacia la médula ósea, y de ahí hacia el timo o a la Bursa de Fabricio, donde se desarrollan como células T y B, respectivamente; desde estos sitios las células B y T migran hacia otros tejidos formando órganos linfoides secundarios (Fletcher, 1983).

Las aves presentan tres órganos linfoides primarios, a saber: la médula ósea, Bursa de Fabricio y Timo, donde ocurre la maduración linfocitaria independiente de antígenos (Payne y Powel, 1984; Rountree, 1986), mientras que los órganos linfoides secundarios son: bazo, glándula de Harder, tejido linfoide asociado a los bronquios (BALT) y tejido linfoide asociado al intestino (GALT), el cual se puede organizar como placas de Sëller y tonsilas cecales o como agregados de células epiteliales a lo largo del tracto digestivo, siendo en estos órganos donde se crea el ambiente en el cual los linfocitos pueden interactuar entre sí y con los antígenos, y al mismo tiempo donde se expande la respuesta inmunitaria (Butcher *et al.*, 1991; Sharma, 1994).

La Bursa de Fabricio es un órgano linfoide presente únicamente en las aves, de morfología sacular, con pliegues internos que surgen desde la cloaca dorsal en cuyo lumen sobresalen 12 a 15 pliegues longitudinales llenos de folículos linfoides (Payne y Powell, 1984), la cual crece rápidamente las tres primeras semanas de vida e inicia su regresión fisiológica a partir de las 12 semanas (Gordon y Jordan, 1985), involucionando por completo a las 14 semanas por estímulo de las hormonas sexuales, permaneciendo sólo vestigios atrofiados (Riddell, 1987).

Algunos investigadores han propuesto métodos o técnicas para evaluar anatómicamente a la Bursa de Fabricio, lo que sin duda tiene una gran relevancia desde el punto de vista inmunológico. De aquí la

importancia del uso de inmunomoduladores que incidan sobre los tejidos y órganos linfoides, con efectos adaptogénicos, para lograr una respuesta inmunitaria específica y eficiente, de mayor magnitud y en corto tiempo, además de evitar los productos residuales que afectan al animal o consumidor. En este sentido, diversas sustancias han sido propuestas como una opción para mejorar la respuesta inmune y resistencia a las infecciones en pollos y otros animales domésticos, utilizando para ello el alimento y/o el agua bebida o la inoculación por diferentes vías.

En este contexto, el propóleo surge como una alternativa natural que puede contribuir como agente inmunomodulador en esta especie. Este producto de la colmena es una mezcla de resinas colectadas por las abejas de las yemas jóvenes y corteza de algunas especies de plantas, ha sido utilizado ampliamente en la medicina humana y veterinaria por sus propiedades terapéuticas como: antibacteriano (Orsi *et al.*, 2005; Principal *et al.*, 2004; 2005; Moreno *et al.*, 2007; Manrique, 2006; Tovalino y Sacsquispe, 2010), antifúngico (Freitas-Fernandes *et al.*, 2007; Quintero-Mora *et al.*, 2008; Tolosa y Cañizares 2002), antiparasitario (Principal *et al.*, 2002, Principal, 2005), antiinflamatorio (Peña, 2008), antiulcerativo (Primon de Barros *et al.*, 2008), antioxidante (Anh *et al.*, 2007, Kumazawa *et al.*, 2004; Salamanca *et al.*, 2007; Palomino *et al.*, 2009) antitumoral (Russo *et al.*, 2004;) inmunomoduladoras (Sforcin *et al.*, 2005; Orsolich *et al.*, 2006). Algunas de estas propiedades han sido relacionadas con el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides (Lozina *et al.*, 2010) y al ácido caféico y sus ésteres (Hegazy, 2000; Orsolich *et al.*, 2006).

La acción inmunoestimulante de este producto de la colmena ha sido demostrada en varias especies animales incluyendo el hombre (Banskota *et al.*, 2002; Sá-Nunes *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2004; Cuesta *et al.*, 2004, Orsolich *et al.*, 2004; 2005; 2006; Sforcin *et al.*, 2002), estos investigadores han evaluado el efecto del propóleo en diversos procesos inmunitarios en ratones, ratas y peces. Sin embargo, escasas contribuciones se han reportado en la literatura (Giurgea *et al.*, 1982; Hegazi *et al.*, 1996), donde se estudie los efectos de este producto sobre el sistema inmunitario en las aves. Por lo anteriormente expuesto, el presente estudio tiene como propósito, evaluar el efecto inmunomodulador del extracto etanólico de propóleo (EEP) sobre el peso de la

Bursa de Fabricio de pollos bebés F1 del cruce Rhode Island Red x Rhode Island White.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aves, equipos, instalaciones y extracto etanólico de propóleos

Se emplearon 180 pollos machos F1 del cruce Rhode Island Red X Rhode Island White de 1 día de edad, no vacunados, suministrados por una planta de incubación perteneciente a una empresa avícola nacional, alojadas en un módulo vertical, lavado y desinfectado previamente, de estructura metálica, constituido por 5 jaulas, cada una con las siguientes dimensiones: 100 cm de ancho, 100 cm de largo y 35 cm de alto, con bebederos y comedores plásticos longitudinales a razón de 1/36 aves. La fuente de luz y calor fue suministrada por bombillas de 40 vatios colocadas en el techo de cada jaula. Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Patología Aviar del Decanato de Ciencias Veterinarias de la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” (UCLA); ubicado 10°01'02.22" N Latitud Norte y 69°17'03.79" O Longitud Oeste. El extracto etanólico de propóleos (EEP), fue obtenido siguiendo la técnica propuesta por Park e Ikegaki (1998), en la Estación de Apicultura de esta misma institución.

Sistema de crianza y manejo de las aves

El manejo de las aves se realizó durante dos semanas, siguiendo un programa de crianza “todo dentro, todo fuera”, empleando un iniciador de Protinal® concentrado, suministrado por la empresa avícola que patrocinó el ensayo; la distribución se hizo en forma manual una vez al día y el consumo *ad libitum*.

Durante los primeros 3 días, el suministro de luz fue de 24 horas y a partir del 4 día se usó un programa de 23 horas de luz y 1 hora de oscuridad. Se utilizó agua potable envasada, la cual fue suministrada en forma manual y el consumo *ad libitum*. Diariamente se eliminaron las heces de las aves, se lavaron y desinfectaron los bebederos y los comederos.

Diseño experimental

Se aplicó un diseño completamente aleatorizado; 5 grupos experimentales (1, 2, 3, 4 y 5) de 36 aves cada uno, alojadas en igualdad de condiciones físicas y ambientales en 5 jaulas del módulo vertical respectivamente, a las cuales se les administró un tratamiento diferente utilizando la vía oral durante 7 días consecutivos, comenzando a los 4 días de edad y finalizando a los 10 (Cuadro 1).

El proceso de inoculación (b.i.d.) se efectuó en la mañana (6:00 am) y en la tarde (6:00 pm). Para garantizar la adecuada administración y consumo de los tratamientos, se suspendió el consumo de alimento por 2 horas antes de cada inoculación, logrando de esta manera, evacuar el contenido alimenticio del buche; tomando en forma individual a las aves de cada jaula a tratar, se les suministró 100 µl de la solución respectiva utilizando una pipeta calibrada monocanal (Oxford Laboratorios Sampler, Micro Pipetting System).

Análisis estadísticos

Los datos obtenidos fueron analizados con un ANOVA unifactorial utilizando el paquete estadístico SPSS versión 10.0 y con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Stell y Torrie, 1985).

Cuadro 1. Diseño experimental utilizado en este ensayo.

Grupo	Tratamiento	Edad (días)	Sacrificio y toma de muestras (días)
1	Control	4-10	14
2	Etanol (56%) vía oral b.i.d.	4-10	14
3	Extracto etanólico de propóleos (5%) vía oral b.i.d.	4-10	14
4	Extracto etanólico de propóleos (10%) vía oral b.i.d.	4-10	14
5	Extracto etanólico de propóleos (20%) vía oral b.i.d.	4-10	14

Las aves fueron sacrificadas para disectar y pesar las bursas, utilizando una balanza electrónica digital (H10, Mettler Instrumente AG, Greiffensee, Zurich).

El modelo estadístico utilizado fue el siguiente:

$$y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$$

Donde:

y_{ij} = Peso de la bursa de Fabricio j, bajo el tratamiento i.

μ = Media teórica de la población.

t_i = Efecto del tratamiento i, i = control, placebo, propóleo al 5%, propóleos al 10%, propóleos al 20%.

e_{ij} = residual.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura, muestra los valores correspondientes al peso de la Bursa de Fabricio de las aves en cada grupo experimental: control $0,417 \pm 0,018$, placebo $0,406 \pm 0,013$, EEP al 5% $0,578 \pm 0,024$, EEP al 10% $0,571 \pm 0,028$ y EEP al 20% $0,612 \pm 0,023$, en la cual se evidencia un incremento en el peso de la Bursa de Fabricio de las unidades experimentales que recibieron el EEP en las diferentes concentraciones.

El análisis de la varianza para el peso de la Bursa de Fabricio, se presenta en el Cuadro 2, donde se aprecia que el efecto incluido en el modelo (29,4%) fue significativo ($P < 0,05$), es decir, que el peso de Bursa de Fabricio de las aves control, las tratadas con placebo y las que recibieron las tres concentraciones etanólicas de propóleos son estadísticamente diferentes. Los resultados obtenidos en los análisis con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey indican que, el EEP incrementa el peso de la Bursa de Fabricio en las concentraciones utilizadas en los experimentos, en comparación con los grupos control y placebo. Estos resultados son congruentes con los obtenidos por Giurgea *et al.* (1982) y Hegazi *et al.* (1996), quienes reportaron un aumento del peso de órganos linfoides centrales y periféricos, de aves inyectadas diariamente vía intraperitoneal con 20 mg de extracto estándar de propóleos/100 g de peso vivo, durante 14 días, siendo el timo, las tonsilas cecales y la Bursa de Fabricio, los órganos linfoides que presentaron mayores incrementos.

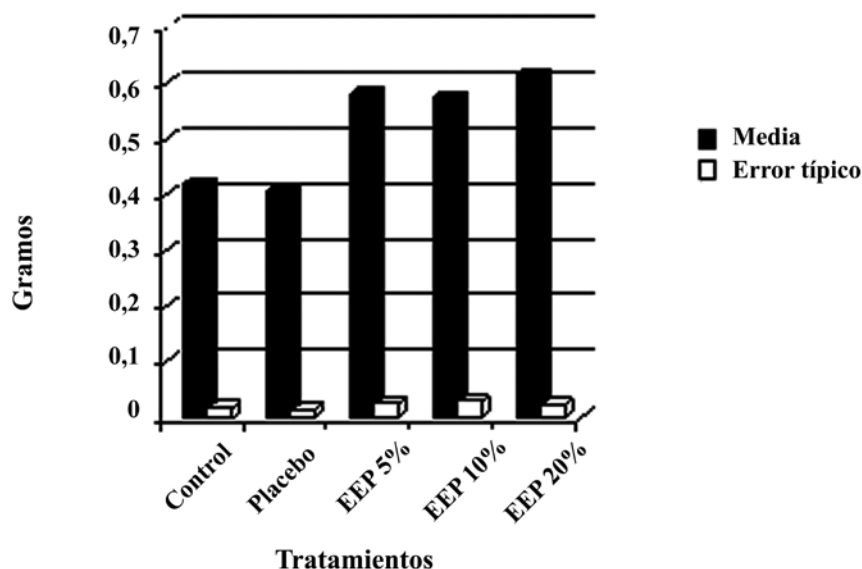


Figura. Peso (g) de la Bursa de Fabricio de las aves para cada grupo experimental.

Cuadro 2. ANOVA Unifactorial para peso de la Bursa de Fabricio.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	Fisher calculado	P
Intergrupos	1,361	4	0,34000	19,6350,000	0,000
Intragrupos	3,032	175	0,01733		
Total	4,393	179			

a. $R^2 = 31\%$ (R^2 corregido = 29,4%).

Aunque, en la presente investigación se utilizaron vías y tiempo de inoculación diferentes a los empleados en los trabajos anteriores, los resultados tienden a ser similares. En este sentido, es posible inferir que ambos factores no son determinantes para conseguir en forma directa, un incremento en el peso de la Bursa de Fabricio.

Dentro de esta misma perspectiva, Sforcin *et al.*, 2002, 2005; Orsolich *et al.*, 2006 y Missima y Sforcin 2008, evidenciaron que el propóleos estimula la producción de anticuerpos y mejora la actividad natural de destruir las células tumorales en ratas, mientras que, en ratones estresados mediante inmovilización, el EEP induce la generación de peróxido de hidrógeno e inhibe la producción de óxido nítrico por los macrófagos peritoneales, modulando el sistema inmune.

En este mismo orden de ideas, estudios realizados por Orsolich *et al.*, 2006 revelaron la acción inmunomoduladora del propóleos en ratones tratados con una solución hidrosoluble de propóleos (WSDP) y dos componentes del mismo: el ácido caféico (CA) y el éster del ácido caféico (CAPE).

En ese estudio, los autores señalan que la administración oral de 50 mg/kg de un derivado hidrosoluble de propóleos, CA y CAPE mejoraron el peso y las células del bazo ($P < 0,05$) e inhibieron la formación de colonias de células HeLa de monocapas de macrófagos en los ratones tratados, indicando que la actividad antitumoral de los compuestos suministrados incluye una pronunciada actividad inmunomoduladora debida principalmente, a la resistencia antitumoral no específica en los ratones tratados.

Por otra parte, Sforcin *et al.*, 2005, estudiaron el efecto de los extractos de propóleos provenientes de Brasil y Bulgaria, extractos de *Baccharis*, la principal fuente del propóleos Brasileiro, algunos compuestos aislados componentes del propóleos: Ácido caféico (CA) y la quercitina, en la producción de anticuerpos en ratas inmunizadas con seroalbúmina bovina (BSA), no encontrando efectos en la producción de anticuerpos, indicando que la acción del propóleos es una consecuencia de los productos derivados de las

plantas con efectos sinérgicos en ese ensayo. Esos autores concluyeron que el propóleos estimula la producción de anticuerpos independientemente de la estación y origen geográfico.

En esta investigación, los resultados de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para el peso de la Bursa de Fabricio, se muestran en el Cuadro 3, donde se observa que el peso del órgano linfóide de las aves control y las que recibieron el placebo es estadísticamente similar ($P > 0,05$), pero ambos se comportan estadísticamente diferente ($P < 0,05$) al de las aves tratadas con propóleos.

Experimentalmente, este hecho es muy importante, porque se demuestra que las variaciones observadas no son influenciadas por el vehículo, (alcohol etílico 56%) en el cual se diluye el principio activo. Al mismo tiempo, la citada prueba, demuestra que el peso de la Bursa de Fabricio de las aves tratadas con las tres concentraciones de EEP fue estadísticamente similar ($P > 0,05$). Esto sugiere, que independientemente de la concentración inoculada a las aves, el efecto sobre el peso de la Bursa de Fabricio es similar.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta investigación evidencian que el extracto etanólico de propóleos (EEP) tiene un efecto inmunomodulador sobre la Bursa de Fabricio en pollos bebés F1 del cruce Rhode Island Red X Rhode Island White, influyendo en el incremento del peso de la misma, el cual es independiente de la concentración del EEP utilizada en el extracto.

RECOMENDACIONES

En virtud de los resultados obtenidos en esta investigación, se recomienda diseñar experimentos que impliquen la evaluación del extracto alcohólico de propóleos sobre el porcentaje existentes de linfocitos (población linfóide expresada en gramos), en el tejido de la Bursa de Fabricio, valorar el efecto adaptógeno de este producto natural asociándolo con un antígeno específico y comparar el efecto inmunomodulador de este producto con el de otros compuestos comerciales utilizados en las aves.

Cuadro 3. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey para peso de la Bursa de Fabricio.

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia Medias (I-J)	dep	Intervalo de confianza al 95%	
1	2	0,01056	0,997	-0,074073	0,09518
	3	-0,1608	0,000*	-0,2455	-0,076205
	4	-0,1539	0,000*	-0,2385	-0,069260
	5	-0,1947	0,000*	-0,2794	-0,1101
2	1	-0,010556	0,997	-0,095184	0,07407
	3	-0,1714	0,000*	-0,2560	-0,086760
	4	-0,1644	0,000*	-0,2491	-0,079816
	5	-0,2053	0,000*	-0,2899	-0,1206
3	1	0,1608	0,000*	0,07620	0,2455
	2	0,1714	0,000*	0,08676	0,2560
	4	0,006944	0,999	-0,077684	0,09157
	5	-0,033889	0,811	-0,1185	0,05074
4	1	0,1539	0,000*	0,06926	0,2385
	2	0,1644	0,000*	0,07982	0,2491
	3	-0,0069444	0,999	-0,091573	0,07768
	5	-0,040833	0,681	-0,1255	0,04380
5	1	0,1947	0,000*	0,1101	0,2794
	2	0,2053	0,000*	0,1206	0,2899
	3	0,03389	0,811	-0,050740	0,1185
	4	0,04083	0,681	-0,043795	0,1255

Error típico: 0,03102

* La diferencia de medias es significativa al nivel (P<0,05).

LITERATURA CITADA

- Ahn M. R., S. A., Kumazawa, Y. A. Usui, J. Nakamura, M. B. Matsuka and F.C. Zhu. 2007. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chem.*; 101(4): 1383-1392.
- Banskota, A. H., T. Nagaoka, L. Y. Sumioka, Y. Tezuka, S. Awalw, K. Midorikawa, K. Matsushige and S. Kadota. 2002. Antiproliferative Activity of The Netherlands Propolis and Its Active Principles in Cancer Cell Lines. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/03788741>
- Butcher, G., R. Miles y A. Nilipour. 1991. El Sistema Inmune Aviar. *Industria Avícola* 6:14-17.
- Cuesta, A., A. Rodriguez, M. A. Esteban and J. Meseguer. 2004. *In vivo* Effects of Propolis, A Honeybee Product, on Gilthead Seabream Innate Immune Responses. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/03788741>
- Fletcher, O. J. 1983. *Inmunología Aviar*. V Seminario Internacional de Patología y Producción Aviar. Atlanta, Georgia. Memorias p.161.
- Freitas Fernandes, F., A. L. Tranches Dias, C. Lacerda Ramos, M. Ikegaki, A. Martins de Siqueira and M. Caixeta Franco. 2007. The *in vitro* antifungal activity evaluation of propolis G12 ethanol extract on *Cryptococcus neoformans*. *Rev. Inst. Med. Trop.* 49 (2) 93-95.
- Giurgea, R., H. Popescu and C. Polinicencu. 1982. Effects of Standardized Propolis Extract on The Central Lymphatic System and The Immunological Reactions of Chickens. *Clujul Medical* 55 (1): 72-76.
- Gordon, R. F. y W. Jordan. 1985. *Enfermedades de Las Aves*. Editorial El Manual Modemo S.A. México D.F. p.383.
- Hegazi, A. G., F. A. El Miniawy and F. K. Abd El Hady. 1996. Influence of Administration of

- Propolis on Chicken Immune Status. The Egyptian Journal of Immunology 3(1):111-116.
- Hegazi, A. G. 2000. Propolis An Overview. Actas del Congreso Internacional de Propóleos. Buenos Aires, Argentina. <http://www.apinetla.com.ar/congreso/c05.pdf>.
- Kumazawa S., T. Hamasaka and T. Nakayama. 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. Food Chem. 84 (3): 329-339.
- Lozina, L., M. E. Peichoto, O. C. Acosta y G. E. Granero. 2010. Estandarización y caracterización organoléptica y físico-química de 15 propóleos argentinos. Lat. Am. J. pharm. 29 (1) 102-110.
- Manrique, A. 2006. Actividad antimicrobiana de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del estado Miranda, Venezuela. Efecto de la variación estacional. Zootecnia Tropical 24 (1) 43-53.
- Missima, F. and M. Sforcin. 2008. Green Brazilian propolis action on macrophages and lymphoid organs of chronically stressed mice. Evidence Based Complementary Alternative Medicine 5 (1) 71-75
- Moreno Z., P. Martínez y J. Figueroa. 2007. Efecto antimicrobiano *in vitro* de propóleos argentinos, colombianos y cubano sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Nova. 5 (7): 70-75.
- Orsi, R. O., L.M. Sforcin, S. R. Funari and V. Bankova. 2005. Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against *Salmonella typhimurium*. Int. Immunopharmacology 5 (2) 359-368.
- Orsolich, N., A. Kneaevec, L. Sver, S. Terzic and I. Basic (2004). Immunomodulatory and Antimetastatic Action of Propolis and Related Polyphenolic Compounds. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/03788741>.
- Orsolich, N., I. Kosalec and I. Basic. 2005. Sinergistic antitumour effect of polyphenolic components of water soluble derivative of propolis against Ehrlich ascites tumour. Biological and Pharmaceutical Bulletin 28 (4) 694-700.
- Orsolich, N., A. B. Saranovic and I. Basic. 2006. Direct and Indirect mechanism of antitumour activity of propolis and its polyphenolic compounds. Plant. Med. 72 (1) 20-27.
- Palomino, L. R., M. C. Garcia P., J. H. Gil G., B. A. Rojano y D. L. Durango R. 2009. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos colectados en el departamento de Antioquia, Colombia. Vitae 16 (3) 388-395.
- Park, J. H., J. K. Lee. H. S. Kim, S. T. Chung, J. H. Eom, K. A. Kim, S. J. Chung, S.Y. Paik and H. Y. Oh. 2004. Immunomodulatory Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester in Balb/c Mice. <http://www.sciencedirect.com/science/journal/15675769>.
- Park, Y. K. and M. Ikegaki. 1998. Preparation of Water and Ethanolic Extracts of Propolis and Evaluation the Preparations. http://ecsoc2.hcc.ru/DP_TOP5/dp264/dp264.htm
- Payne, L. N. and P.C. Powell. 1984. The Lymphoid System. **In:** Physiology and Biochemistry Of The Domestic Fowl. Vol. 5. B. M. Freeman, Ed. Academic Press. New York pp. 278-322.
- Peña, R. 2008. Estandarización en propóleos. Antecedentes químicos y biológicos. Ciencia Inv. Agr. 35 81) 17-26.
- Primon de Barros M., M. Lemos, E. L. Maistro, M. Freire Leitec, J. P. Barreto Sousac, K. J. Bastos and S. Faloni de Andrade. 2008. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. J Ethnopharmacol. 120 (3): 372-377.
- Principal, J. 2005. El propóleos: Perspectivas terapéuticas en la medicina humana y veterinaria. **In:** Memorias I Congreso Internacional de Apicultores de los Andes y III Convención de Apicultores, San Cristóbal, Táchira, Venezuela. 57- 60.
- Principal, J. C. Barrios, N. T. Pacheco, F. Corrales y F. Moreno. 2005. Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de propóleos sobre una cepa clínica de *Staphylococcus aureus*. Gaceta de Ciencias Veterinarias 11(1) 31-36.
- Principal, J. R. D'Aubeterre y Z. Graterol. 2004. El propóleos: Antibiótico natural de la colmena. Importancia en la medicina humana y Veterinaria. Agroservicios 5 (9) 58-60.

- Principal, J., I. Hernández, R. D'Aubeterre y J. Rodríguez. 2002. Eficacia del propóleo en el control de las helmintiasis de ovinos naturalmente infestados. *Revista Científica de la Universidad del Zulia*. Vol. XII. Supl 2. 604-60.
- Quintero-Mora, M. L., A. Londoño-Orozco, F. Hernández-Hernández, P. Manzano-Gayosso, R. López-Martínez, C. I. Soto-Zárate, L. Carrillo-Miranda, G. Penieres-Carrillo, C. G. García-Tovar y T. Cruz-Sánchez. 2008. Efecto De Extractos De Propóleos Mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25, (1) 22-26.
- Riddell, C. 1987. *Avian Histopathology*. Ed. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, Pennsylvania.p.152.
- Rountree, J. L. 1986. Aplicaciones de la Inmunología en el Campo. VI Seminario Internacional de Patología y Producción Aviar. Atlanta, Georgia. Memorias p. 147.
- Russo A., V. Cardile, F. Sánchez, N. Troncoso, A. Vanella and J. A. Garbarino. 2004. Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life Sci.*; 76 (5): 545-558.
- Salamanca Grosso, G., I. Correa Carvajal y J. Principal. 2007. Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. *Zootecnia Tropical* 25 (2) 95-102.
- Sa-Nunes, A., L. Faccioli and J. Sforcin. 2003. Propolis: Lymphocyte Proliferation and IFN- γ Production. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/0378741>.
- Sforcin, J.M., R. O. Orsi y V. Bankova. 2005. Effects of propolis, some isolated compounds and its source plants on antibody production. *J. Ethnopharmacol.* 98: 301-305.
- Sforcin, J. M., R. Kaneno and S. R. C. Funari. 2002. Absence of seasonal effect on the immunomodulatory action of Brazilian propolis on natural killer activity. *J. Venom Anim. Toxins* 8: 19-29.
- Sharma, J. M. 1994. Avian Respiratory System Immunity. Proc. 43th Westem Poultry Disease Conference. 55-57p.
- Stell, R .G. D y J. H. Torrie. 1985. *Bioestadística: Principios y Procedimientos*. Editorial McGraw Hill. Bogotá, Colombia. p. 622.
- Tolosa, L. y E. Cañizares, E. 2002. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de propóleos de Campeche. *ARS Pharmaceutica* 43 (1,2) 187-204.
- Tovalino- Mayta, F. Y. y S. J. Sacsquispe- Contreras. 2010. Evaluación *in vitro* del extracto etanólico de propóleos de Oxapampa, Perú sobre cultivos de *Streptococcus mutans* (ATCC 251759 y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). *Rev. Estomatol. Herediana* 20 (1) 19-24.