



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

*"EVALUACIÓN ANTIVIRAL DEL PROPÓLEO MEXICANO
EN CULTIVO CELULAR INFECTADO
CON EL VIRUS DE AUJESZKY"*

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
M A E S T R A E N C I E N C I A S

P R E S E N T A
MARÍA DE JESÚS GONZÁLEZ BÚRQUEZ

TUTOR:

DR. TONATIUH A. CRUZ SÁNCHEZ
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

COMITÉ TUTOR:

DR. HUMBERTO RAMÍREZ MENDOZA - FMVZ
DRA. MARÍA DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA - FMVZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Éste trabajo fue apoyado por los siguientes proyectos:

Proyecto UNAM ,DGAPA,PAPIIT IT223811-3: Perspectivas del uso del propóleo en la Salud Animal.

Cátedra de investigación NCONS14 Programa PACIVE.

Cátedra de investigación NCONS-07 Programa PACIVE 2012.

Durante la elaboración de la presente investigación se contó con el apoyo de CONACYT con número de Apoyo 327076 a través de una beca de estudio.

Éste trabajo fue realizado en los siguientes laboratorios:

Laboratorio 4 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán campo 4, UNAM, bajo la supervisión del Dr. Carlos Ignacio Soto Zárate.

Laboratorio 6 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán campo 4, UNAM bajo la responsabilidad del Dr. Tonatiuh A. Cruz Sánchez.

Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de Ciudad Universitaria bajo la supervisión de la Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda.

Laboratorio 121 del edificio de Química Orgánica de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán campo 1, UNAM bajo la responsabilidad del Dr. José Guillermo Penieres Carrillo.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
I.A. Virus de Aujeszky.....	3
I.B. Biología celular del virus de Aujeszky.....	6
I.C. Estructura del virión.....	6
I.D. Ciclo de replicación de PRV.....	9
I.E. Aislamiento de virus.....	11
I.F. Antivirales empleados contra herpesvirus.....	13
2. Propóleo.....	15
II. JUSTIFICACIÓN	21
III. OBJETIVOS	22
IV. HIPÓTESIS	23
V. DISEÑO EXPERIMENTAL	24
V.1 Primera etapa	
Evaluación de citotoxicidad del propóleo	25
V.1.1 Obtención de EEP.....	26
V.1.2 Crecimiento y morfología celular.....	27
V.1.3 Determinación del rango de tolerancia.....	28
V.1.4 Resultados primera etapa.....	29
V.2 Segunda etapa	
Infección Viral	38
V.2.1 Efecto citopático.....	38
V.2.2 Resultados segunda etapa.....	39
V.3 Tercera etapa	
Evaluación del efecto antiviral del propóleo sobre el virus de Aujeszky	40
V.3.1 Resultados tercera etapa.....	42
V.3.2 Tinciones cristal violeta.....	44
V.3.3 Análisis estadístico.....	47
V.3.4 Microscopía electrónica.....	49
VI. DISCUSIÓN	53
VII. CONCLUSIONES	57
VIII. PERSPECTIVAS	58

IX. ANEXOS	
Anexo I.....	59
Anexo II.....	60
Anexo III.....	61
X. LITERATURA	62

INDICE DE CUADROS.

Cuadro 1. Signos clínicos de la enfermedad de Aujeszky en cerdos.....	5
Cuadro 2. Efectos biológicos de los componentes del propóleo.....	18
Cuadro 3. Componentes generales del propóleo.....	19
Cuadro 4. Microorganismos sobre los que tiene efecto el propóleo.	20
Cuadro 5. Diluciones seriadas.....	28
Cuadro 6. Promedios y desviación estándar de ufp.....	47

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Estructuras virales (PRV).....	7
Figura 2. Diagrama de replicación del virus PRV.....	8
Figura 3. Diseño experimental.....	24
Figura 4. Propóleo en greña.....	25
Figura 5. Cultivo celular MDBK.....	27
Figura 6. Cultivo celular celular RK13.....	27
Figura 7. Cultivo de células RK13.....	29
Figura 8. Cultivo de células RK-13 expuesto a etanol al 70%.....	30
Figura 9. Cultivo celular RK13 con una dosis de 4 mg de Propóleo y OH 70%....	30
Figura 10. Cultivo celular RK-13 expuesto a DMSO.....	31
Figura 11. Cultivo celular RK13 con una dosis de 4 mg/ml de propóleo y DMSO.....	31
Figura 12. Cultivo celular RK13 con una dosis de 1.2 mg/ml de propóleo y DMSO....	32
Figura 13. Cultivo celular RK13 con una dosis de 0.5 mg/ml de propóleo y DMSO....	32
Figura 14. Cultivo celular MDBK.....	33
Figura 15. Cultivo celular MDBK expuesto a OH 70%.....	34
Figura 16. Cultivo celular MDBK con una dosis de 4 mg/ml de Propóleo y OH 70%...34	34
Figura 17. Cultivo celular MDBK expuesto a DMSO.....	35
Figura 18. Cultivo celular MDBK con una dosis de 4 mg/ml de propóleo y DMSO.....	35
Figura 19. Cultivo celular MDBK con una dosis de 1.2 mg/ml de propóleo y DMSO...36	36
Figura 20. Células MDBK con una dosis de 1.2 mg/ml propóleo de FESC y DMSO.....	36
Figura 21. Cultivo celular MDBK con una dosis de 0.5 mg/ml de propóleo y DMSO...37	37
Figura 22. Efecto citopático causado por el virus de Aujeszky	39
Figura 23. Control positivo PRV	43
Figura 24. Cultivo celular MDBK infectado con virus de Aujeszky y tratado con 0.5 mg/ml de propóleo de FESC 2 horas antes de la infección viral	43

Figura 25. Cultivo celular MDBK teñido con cristal violeta.	44
Figura 26. Cultivo celular MDBK infectado PRV y teñido con Cristal Violeta.....	44
Figura 27. Cultivo celular MDBK tratado 2 horas antes de la infección con PRV.....	45
Figura 28. Cultivo celular MDBK tratado durante la infección con PRV.	45
Figura 29. Cultivo celular MDBK tratado 2 horas post infección con PRV.....	46
Figura 30. Gráfica de promedios de UFP en los cultivos celulares.....	48
Figura 31. Célula MDBK examinada por Microscopía Electrónica de Transmisión....	49
Figura 32. Célula MDBK observada en Microscopio Electrónico de Transmisión infectada con PRV con y sin tratamiento previo de propóleo.....	50
Figura 33. Membrana citoplasmática de célula MDBK.....	51
Figura 34. Membrana citoplasmática MDBK tratada con propóleo.....	51
Figura 35. Estructura viral PRV.....	52

RESUMEN

En la presente investigación se llevó a cabo la evaluación del efecto antiviral que tiene el propóleo de Estado de México (FESC), sobre el virus de Aujeszky (PRV), ésta evaluación se realizó *in vitro* mediante la infección de cultivos de la línea celular MDBK (Madin Darby Bovine Kidney). Con el fin de conocer la capacidad antiviral del propóleo el experimento se llevó a cabo en tres etapas; 1) Se determinó el rango de inocuidad del propóleo mediante la realización de pruebas de citotoxicidad, con esto se determinó que la dosis en la cual el propóleo no genera cambios ni daños a la monocapa celular es de 0.5 mg/ml empleando como disolvente dimetilsulfoxido (DMSO). 2) Se determinó la dosis infectiva mínima para PRV cepa Shope, a partir de un solución stock con 1.86×10^6 unidades formadoras de placa (ufp) y 3) Finalmente se realizó la interacción del propóleo y del virus en relación con el cultivo celular (dos horas antes-, durante- y dos horas después-de la infección). Con el fin de evaluar el efecto citopático del virus de Aujeszky se realizó el conteo de las placas formadas (teñidas con cristal violeta) encontrando un promedio de 164.3 ufp placas en el cultivo infectado y 86.7 ufp en el cultivo tratado dos horas antes de ser infectado, al realizar el análisis se encontró que esta diferencia es estadísticamente significativa (** $p < 0.01$). Estos datos permitieron determinar que la aplicación del tratamiento con propóleo dos horas antes de ser infectado el cultivo presenta una reducción en el número de placas en contraste con los cultivos que fueron tratados al mismo tiempo de la infección (166.3 ufp) y dos horas después de la infección (154.3 ufp), en donde el número de placas fue semejante al cultivo control positivo, con lo cual se abre la posibilidad del uso profiláctico del propóleo en contra de la enfermedad de Aujeszky.

ABSTRACT

In the present investigation was conducted to evaluate the effect propolis antiviral having mexican state (FESC) on Aujeszky virus (PRV), this evaluation was performed in vitro by infecting cultures of MDBK cell line (Madin Darby Bovine Kidney). In order to determine the capacity of propolis antiviral experiment was conducted in three stages: 1) was determined safety range of propolis by cytotoxicity testing with this dose was determined that propolis in which it does not change or damage to the cell monolayers is 0.5 mg/ml using dimethyl sulfoxide as a solvent (DMSO). 2) determined the minimum infective dose PRV Shope strain, from a stock solution with a degree of 1.86×10^6 plaque forming units (pfu) and 3) finally made the interaction of propolis and related viruses in cell culture (two –hours before, during, and two hours later, the infection). In order to evaluate the cytopathic effect of PRV was counting plaques former (stained with crystal violet) by finding an average of 164.3 pfu culture plates and infected at 86.7 pfu treated culture two hours before being infected, at perform the analysis we found that this difference is statistically significant (**p < 0.01). These data allow to determine that the application of propolis treatment two hours before being infected culture presents a reduction in the number of plaques in contrast to cultures were treated at the same time of the infection and two hours after infection, where the number of plaques was similar cultivation with positive control, which opens the possibility of prophylactic use of propolis against Aujeszky's disease.

I. INTRODUCCIÓN

I. A Virus de Aujeszky, pseudorrabia (PRV)

La pseudorrabia o enfermedad de Aujeszky es una enfermedad viral, contagiosa y aguda que afecta a muchas especies animales, ésta es causada por un herpesvirus (Echeverría, 1999). Se observa principalmente en los cerdos, los cuales constituyen un reservorio natural. La severidad de la enfermedad está relacionada con la virulencia de la cepa viral, el grado de exposición y la edad del animal afectado. La enfermedad fue descrita por primera vez en los Estados Unidos en 1813 en el ganado vacuno que padecía de un intenso prurito y finalmente moría; en consecuencia la enfermedad fue denominada “locura prurítica” (Wheeler J.G., Osorio F. A., 1991). El término “pseudorrabia” fue utilizado por primera vez en Suiza en 1849 debido a que los signos clínicos en el ganado vacuno eran similares a los de la rabia. En 1902 Aujeszky estableció que el agente etiológico no era bacteriano y en 1910 Schmiedhofer confirmó que era un virus por medio de experimentos de filtración. En 1934 Sabin y Wright lo identificaron como un Herpes virus inmunológicamente relacionado al herpes simple (Pejsak Z.K., 2006). Otras características biológicas de los alfa-herpesvirus son los ciclos de replicación lítica de menos de 24 horas y la capacidad de establecer infecciones latentes en los ganglios sensitivos del sistema nervioso y en tonsilas (Straw et al., 2000).

El cuadro clínico de la PRV en los cerdos varía en forma considerable según la edad del animal (Ver cuadro 1). Cuanto más jóvenes son los animales, más serios son los signos y más elevada la mortalidad. El periodo de incubación oscila entre 1 y 11 días, siendo por lo general de 3 a 6 días. El índice de mortalidad llega al 100% en los cerdos de menos de dos semanas, a aproximadamente 50% en los cerdos de 3 semanas y disminuye a menos del 5% en los cerdos adultos. Sin embargo, no sólo influye la edad sino también otros factores, como la cantidad y virulencia del virus, el estado de salud de cada animal y las situaciones de stress (Alcántar, 2010) (Plonait, 2001).

Introducción

Los cerdos de más de tres semanas pueden morir presentando pocos o ningún signo clínico. En general la muerte es precedida de fiebre, letargo, pérdida de apetito, debilidad, falta de coordinación y convulsiones. Pueden observarse también vómitos y diarrea. Por lo general los cerdos de menos de 2 semanas mueren. Los cerdos en lactancia pueden haber sido infectados antes del nacimiento (Echeverría, 2000).

Después del nacimiento mueren en un lapso de dos días, en algunos casos después de presentar escalofríos violentos y temblores (síndrome de escalofrío del cerdo). Los cerdos infectados inmediatamente después del nacimiento muestran signos clínicos en los primeros 2 días, y en general mueren antes de los 5 días de edad. En los cerdos de mayor edad, los signos se inician con fiebre, y luego se suman pérdida de apetito, apatía, pérdida de la voz, somnolencia, dificultades respiratorias, vómitos, paso vacilante y en algunos casos falta de coordinación y debilidad de los miembros traseros. La muerte es precedida en general por convulsiones. La afección de las vías respiratorias se revela a través de estornudos, tos y descargas nasales. Los cerdos que se curan muestran pérdidas considerables de peso. La intensidad de los signos clínicos disminuye con la edad. Por lo tanto, en los cerdos adultos la enfermedad no suele ser severa. Siempre presentan fiebre, a menudo descarga nasal, tos, pérdida de la voz y somnolencia, mientras que los signos nerviosos típicos pueden observarse sólo ocasionalmente. Por lo general no se desarrolla ningún prurito marcado en los cerdos, cualquiera que sea su edad (Straw et al., 2000).

La infección con virus de la PRV en las primeras etapas de la preñez conduce a la muerte y a la reabsorción de los fetos. La infección en un momento más avanzado de la preñez provoca la expulsión de los fetos momificados, mientras que la infección al final de la preñez provoca abortos o nacimiento de cerdos muertos o de cerdos débiles que mueren a los pocos días (Plonait, 2001).

Cuadro 1. Signos clínicos de la enfermedad de Aujeszky en las diferentes etapas de crecimiento de los cerdos (Plonait, 2001).

	SIGNOS CLINICOS		
	LECHONES (0 a 9 semanas)	CERDOS EN CRECIMIENTO	CERDOS REPRODUCTORES
Periodo de incubación	3-4 días	3 - 6 días	3 - 6 días
Primeros signos de la enfermedad	Fiebre (41 - 42°C)	Fiebre	Fiebre
	Anorexia	Inapetencia	Inapetencia
	Apatía	Depresión	Depresión
signos nerviosos	Hipersalivación	Temblores y convulsiones	
	Opistótonos		
	movimientos rotatorios		
	braceo persistente		
	postura de "perro sentado"		
Frecuencia	Muy frecuente	A veces	
Signos respiratorios		estornudos	Estornudos
		Disnea	Disnea
		Tos	Tos
		respiración trabajosa	Respiración trabajosa
Signos reproductivos			Repeticiones de celo, abortos, fetos macerados
			nacidos muertos
Signos digestivos	Vómitos		
	Diarrea		
Frecuencia	raros		
Morbilidad	100%	100%	20%
Mortalidad	50 - 100%	1 - 2%	1 - 2%

Introducción

El cerdo es el único huésped natural del virus de la pseudorrabia (PRV), aunque un gran número de especies pueden ser infectadas de manera natural o experimental. El PRV es infeccioso para bovinos, ovinos, cabras, perros y gatos. Por otra parte es muy difícil infectar equinos. Los primates superiores, incluyendo el hombre, no son susceptibles a la infección. También existen animales silvestres susceptibles a la infección mortal PRV, las más comunes son el mapache, la zarigüeya, zorros, ratas y ratones, todos los cuales se encuentran con frecuencia en los alrededores de las granjas de cerdos (Mettenleiter, 1999).

Las áreas conocidas de PRV son los mecanismos moleculares involucrados en la fijación del virus, la entrada, replicación, montaje, tráfico intracelular y la salida, además de las diversas facetas de la patogénesis del virus, incluyendo los mecanismos de neuroinvasión trans-neuronal y la respuesta inmune del huésped (Pejsak, 2006).

I. B Biología celular del virus de Aujeszky, pseudoirrabia (PRV).

I. C Estructura del Virión.

El virión maduro o partículas virales infecciosas, consta de cuatro distintos componentes estructurales (Fig. 1).

La doble hebra de ADN del genoma del virus está encerrado dentro de una cápside icosaédrica protectora para formar la nucleocápside; la cápside está incrustada en una matriz proteica conocida como el tegumento; finalmente, el tegumento está rodeado por una membrana lipídica que contiene varias glicoproteínas virales (Straw et al, 2000).

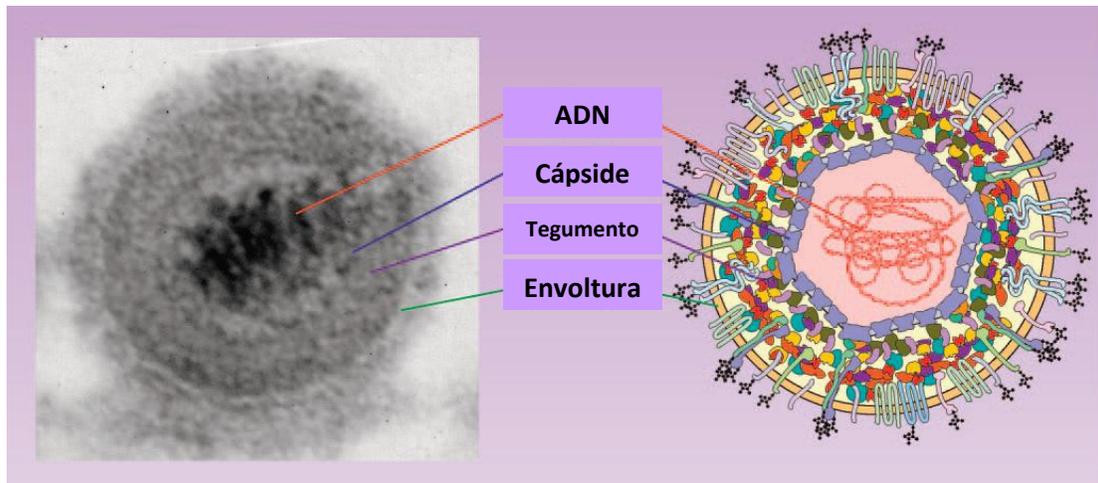


Figura 1. Estructuras virales. Se muestra imagen del virus PRV y esquemáticamente las estructuras que lo conforman (Pomeranz, 2005).

Un conjunto de 40 genes del virus herpes simple se conservan entre todos los alfa, beta y gamma-herpesvirinae. Estos "genes centrales" codifican las proteínas que llevan a cabo los pasos fundamentales para la replicación de virus herpes simple, en parte, debido a la frecuente estructura de la nucleocápside, los requisitos básicos para la replicación del ADN viral y el envasado, y los pasos comunes de entrada y de salida de las células (Pomeranz, 2005).

El análisis filogenético del genoma del virus herpes de mamíferos y aves sugiere que un virus ancestral contribuyó con 40 genes básicos a los modernos alfa, beta y gamma herpesvirus. Si bien muchos de los genes principales muestran la secuencia de conservación en el Herpesviridae, sólo algunos comparten la relativa posición del genoma y la función de las proteínas (Earnshaw, 1992).

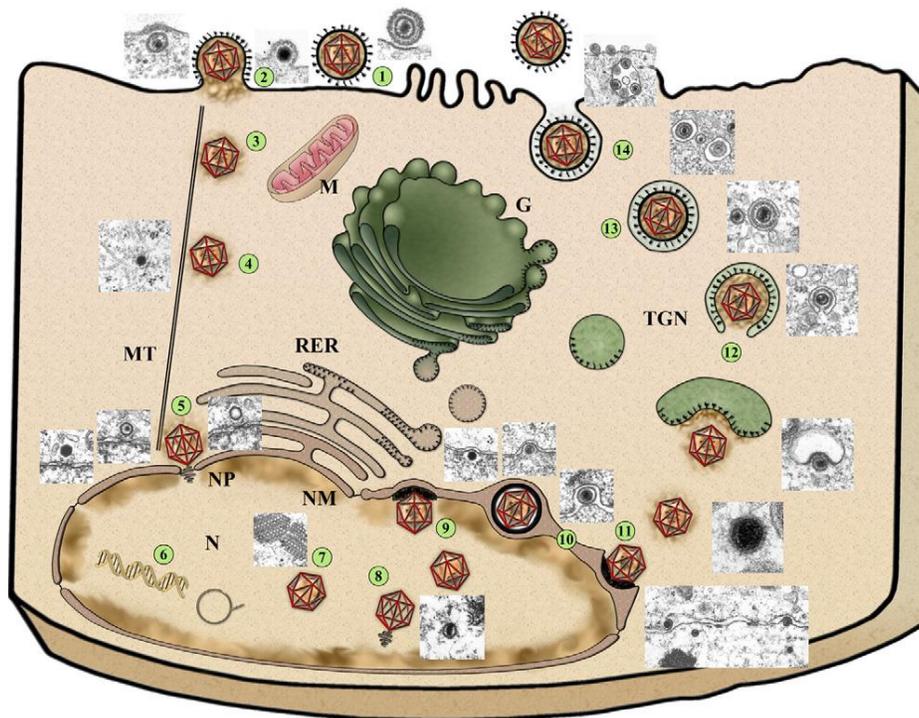


Figura 2. Diagrama del ciclo de replicación del virus PRV. Se muestran imágenes de microscopía electrónica del ciclo viral, unión (1), penetración (2), transporte al núcleo (N) (3), interacción con microtúbulos (MT) (4), acoplamiento al poro nuclear (NP) (5) donde el genoma viral es liberado al núcleo. Aquí se lleva a cabo la transcripción de genes virales y se produce la replicación del genoma (6). Los genomas virales replicados se separan durante la encapsidación (8). A continuación la cápside preformada (7) deja el núcleo por gemación (9) seguida de la fusión de la envoltura de los viriones primarios ubicados en el espacio perinuclear (10) con la membrana nuclear externa (11). A continuación se da la maduración final, ésta se produce en el citoplasma, la envoltura secundaria de la cápside intracitosólica a través de gemación por medio de vesículas de la red trans-Golgi TGN (12) que contiene las glicoproteínas virales (puntos negros), lo que resulta en un virión envuelto dentro de una vesícula celular. Después del transporte a la superficie celular (13), se da la fusión entre las membranas de las vesículas y la membrana plasmática, liberando un virión maduro envuelto (14). **RER**, retículo endoplásmico rugoso; **M**, mitocondria; **G**, aparato de Golgi (Mettenleiter, 2009).

I. D Ciclo de replicación del virus de Aujeszky (PRV).

La entrada del virión de herpesvirus requiere de una cascada de eventos que son mediados por las glicoproteínas del mismo (Figura 1). PRV primero ataca a la célula mediante la interacción de gC con heparan sulfato de la matriz extracelular, gD de PRV se une a los receptores específicos de la célula para establecer la interacción virus-célula. Finalmente gB, gH y gL de PRV median la fusión de la envoltura viral y la membrana de la célula logrando la penetración de la cápside y el tegumento del virus en el citoplasma celular (Mettenleiner, 2009).

Es decir, el primer contacto entre el virus y la célula blanco involucra la interacción de gC con el heparan sulfato de la superficie celular (Pomeranz, 2005). Cinco receptores celulares gD son colectivamente los mediadores de la entrada de PRV (HveA (TNFRSF14), HveB (PRR2, nectina 2), HveC (PRR1, nectina 1), HveD (PVR, CD55) y 3-O-heparán sulfato. La entrada requiere de la fusión entre la membrana celular y la envoltura viral. El proceso de fusión involucra al menos a cuatro proteínas virales; gB, gH/gL y gD. La ausencia de cualquiera de estas glicoproteínas produce virus incapaces de realizar la fusión. Después de la fusión de PRV con la célula huésped éste interactúa con dineína siendo ésta una proteína motora de los microtúbulos celulares para transportar a lo largo de la célula al virus herpes hasta la periferia del poro nuclear. La cápside es orientada hacia el poro nuclear de tal forma que el vértice se ubica opuesto al complejo del poro (Mettenleitter, 2009). El ADN abandona el virión y entra al núcleo a través de este vértice (Fuchs, 2009).

Al entrar el ADN lineal al núcleo se circulariza e inicia la transcripción. Primero se expresan los genes tempranos-inmediatos, los cuales codifican proteínas reguladoras, en PRV se trata de un solo gen, (IE 180). Este es un potente activador de genes tempranos, entre los que se encuentran aquellos que codifican proteínas requeridas para la replicación del ADN y otras funciones enzimáticas. Los genes tempranos se caracterizan por ser expresados antes de la replicación del ADN. La replicación del

genoma viral requiere de la presencia de las proteínas UL5 (helicasa), UL8 (helicasa/primasa), UL9 (proteína de unión al origen de replicación), UL29 (proteína principal de unión al ADN), UL30 (ADN polimerasa), UL42 (proteína asociada a la polimerasa) y UL52 (primasa) (Fuchs, 2009). La replicación del ADN de los herpesvirus se realiza por un mecanismo de círculo-rodante que conlleva a la síntesis de largas moléculas que necesitan ser cortadas en secuencias genómicas únicas. Los genes tardíos codifican para componentes de la cápside y envoltura, como gC las que después de ser sintetizadas en el citoplasma, entran al núcleo y forman la base para el ensamble de la cápside. Este proceso es autocatalítico y requiere solamente de los componentes correspondientes (Figura 2) (Pomeranz, 2005).

Las cápsides completas salen del núcleo a través de la membrana interna del núcleo. Esta primera envoltura viral aparece “lisa” al microscopio electrónico lo cual indica la ausencia de glicoproteínas. Los viriones dejan el espacio perinuclear por fusión de la envoltura primaria con la membrana externa del núcleo resultando en la liberación de cápsides desnudas al citoplasma (Figura 2). La maduración final se desarrolla en el Aparato de Golgi. En este paso, la envoltura muestra con claridad proyecciones que representan a las glicoproteínas. El resultado final de estos eventos de gemación es la presencia de una partícula viral completa dentro de una vesícula. Finalmente estas vesículas se dirigen hacia la membrana citoplasmática, se fusionan con ella y se liberan las partículas virales al espacio extracelular (Mettenleiter, 2005).

Se sabe que los alphaherpesvirus infectan a las células por dos mecanismos generales: 1) por viriones libres que se unen a receptores en la superficie de la célula, o 2) la infección puede propagarse directamente a partir de una célula infectada, la propagación de la infección de célula a célula permite la evasión de los anticuerpos neutralizantes en un huésped inmunizado. Las células no infectadas son reclutadas en sincitios en mucho menos tiempo del que tarda una célula infectada en producir viriones (Echeverría, 1999).

La propagación intercelular de la infección por Alphaherpesvirus puede producirse por al menos dos procesos. En el primero, la membrana plasmática de la célula infectada se fusiona con la de las células adyacentes no infectadas, dando como resultado la formación de sincitios gigantes y multinucleados (Flinz, 2004). No todos los tipos celulares se fusionan cuando son infectadas por estos virus, lo que indica que es necesario un ambiente celular específico (Fenner, 1992). En el segundo proceso, se considera que la difusión de la infección se realiza a través de las uniones celulares y, en este proceso, no hay formación de sincitios. También se ha demostrado que el mecanismo molecular por el cual se realiza la propagación intercelular de la infección es diferente del proceso de infección por viriones libres. Es necesario señalar que la propagación de la infección intercelular requiere un mayor repertorio de proteínas virales del que requiere la infección con viriones libres. (Alcántar, 2010).

I. E Aislamiento del virus

Para aislar el virus de Aujeszky se inoculan triturados de tejido en cultivos celulares. Los animales más sensibles son los conejos, seguidos por los ratones y las ratas (Echeverría, 2000). En la actualidad se han reemplazado casi por completo las pruebas en los animales por ensayos realizados en cultivos celulares (Cedeño, 1998). El virus se multiplica en un gran número de cultivos celulares de diferentes especies. Las líneas celulares más utilizadas son las líneas celulares porcinas PK-15, SK y SK-6, la línea celular de hamster BHK-21, las líneas celulares del conejo RK-13 y NRK, la línea celular bovina MDBK, la línea celular del gato CRFK, la línea celular del perro MDCK y la línea celular Vero del mono. También se utilizan cultivos celulares primarios de riñones de cerdos, terneros, corderos, conejos y perros, de testículos de cerdos y de terneros y de embriones de pollo (Dezengrini et al., 2001).

Introducción

El virus induce tres tipos de efecto citopático: formación sincitial, redondeo de las células y formación de placas. Todos estos tipos conducen a una lisis celular. Los sincitios se observan sobre todo cuando los virus aislados son sumamente virulentos, y las células son redondeadas en el caso de virus de menor virulencia (Mettenleiter, 2009). Esta diferencia está particularmente acentuada en las células primarias de los riñones de cerdo, mientras que en el caso de otros cultivos celulares aparecen formas mixtas en las que predomina uno de los dos tipos de efecto citopático (Cedeño, 1998).

Para corroborar una infección en los cultivos celulares se puede hacer uso de la microscopía electrónica ya que nos permite confirmar la presencia de las partículas virales (Straw, 2000).

La Campaña Nacional contra la enfermedad de Aujeszky existe desde 1994, y su objetivo es erradicar la enfermedad en granjas de cerdos tecnificadas. Esta campaña es obligatoria en el territorio nacional y es realizada de manera coordinada entre los tres ámbitos de gobierno y los productores en todo el país. La obligatoriedad de la misma se basa en la Norma Oficial Mexicana **NOM-007-ZOO-1994**, Campaña Nacional Contra la Enfermedad de Aujeszky (NOM EA), la cual reglamenta la Ley Federal de Sanidad Animal (LFSA).

I. F Antivirales empleados contra Herpesvirus.

La mayoría de los antivirales desarrollados para contrarrestar al herpes virus simple, son antivirales llamados análogos de nucleósidos y nucleótidos, los cuales bloquean la replicación viral. Entre estos están incluidos el aciclovir, valaciclovir y famciclovir. Estos productos detienen la replicación del herpes virus y disminuyen la severidad del brote inicial. Los antivirales inhiben la síntesis de DNA viral. El aciclovir y penciclovir tienen un mecanismo antiviral similar; ambos compuestos son fosforilados por la timidin-quinasa solamente dentro de células infectadas por el virus. Después de esta fosforilación por enzimas celulares se obtiene la producción de aciclovir o penciclovir trifosfato, los cuales compiten con el nucleótido dGTP, resultando en la inhibición selectiva de la DNA polimerasa viral que al ser incorporada en la cadena de ADN en síntesis detiene su replicación. El penciclovir tiene mayor afinidad sobre el HSV que el aciclovir, por lo que consecuentemente, los niveles de penciclovir trifosfato en células infectadas son mayores que aciclovir trifosfato. El penciclovir es más estable que el aciclovir en células infectadas por HSV, por lo que su tiempo de vida intracelular es mayor (Bagla, 2012).

El aciclovir fue desarrollado en 1985, es un análogo de la guanina y se metaboliza en el hígado, siendo el metabolito resultante el 9-carboximetilguanina. Su poca afinidad a las polimerasas celulares, sumado al hecho de que la fosforilación ocurre sólo en las células infectadas, hace que tenga una toxicidad baja. Dado que el mecanismo de acción inhibe la replicación del ADN viral, el efecto es la detención de la replicación del virus; este efecto es muy selectivo de los virus herpes simple tipos 1 y 2, virus varicela-zoster, virus de Epstein-Barr. (Bagla, 2012).

La forma de resistencia más común asociada al aciclovir entre las cepas del virus herpes simple es una deficiencia en la síntesis de la enzima timidina-cinasa. No obstante, se ha comprobado que el penciclovir es activo frente a una cepa del herpes simple recientemente aislada que es resistente al aciclovir y tiene alterada la ADN-polimerasa (Datema, 1997).

Introducción

El valaciclovir es un precursor del aciclovir; es hidrolizado por la enzima valaciclovir hidroxilasa que lo transforma en aciclovir y valina e inhibe la síntesis del ADN viral. El famciclovir es un precursor del penciclovir, un antiviral de acción prolongada, el famciclovir se metaboliza rápidamente en penciclovir, posee una actividad demostrable frente a los virus del herpes simple tipos 1 y 2, al virus de la varicela-zoster, al virus de Epstein-Barr y al citomegalovirus (Earnshaw, 1992).

2. PROPÓLEO.

El propóleo es una sustancia resinosa recolectada por las abejas (*Apis mellifera*) a partir de diferentes árboles y arbustos. Las abejas recogen con sus mandíbulas partículas resinosas y secreciones aromáticas de las yemas y brotes de los árboles y vegetales como pino, abeto, roble, abedul, álamo, olmo, entre otros. Una vez en la colmena las abejas mezclan estas sustancias con cera, polen y secreciones salivares para obtener el propóleo (Linares, 2009). El término própolis deriva del griego pro – delante y polis – ciudad (Huleilehl, 2002). Las abejas utilizan este material para sellar las paredes de la colmena y su entrada, para fortalecer la frontera de los panales y embalsamar a los muertos. También se le conoce como “pegamento de las abejas”, “cemento de las colmenas” o “penicilina rusa” (Schnitzler, 2010).

Es un producto que ha utilizado el hombre desde tiempos antiguos debido a sus propiedades medicinales y ha mantenido su popularidad a través de los años debido a que posee actividad antifúngica, antibacteriana, antiviral y antiparasitaria (cuadro 2), además de que es utilizado como remedio popular en medicina y como componente de bio-cosmética, alimentos saludables, entre otros, mostrando variación en su actividad biológica dependiendo de su origen geográfico (Schnitzler, 2010). El propóleo es aromático, de color amarillo y sabor amargo característico, ligeramente picante (Londoño, 2007).

El propóleo puede clasificarse por su origen botánico y geográfico, dependiendo esto también varía su composición química, el propóleo es extremadamente complejo y contiene una rica variedad de terpenos potentes y ácido benzoico, caféico, cinámico y fenólicos (ver cuadro 3). También es alto en flavonoides, a los que se les atribuye acción antiviral (Sforcin, 2007).

Introducción

La composición química de los propóleos es compleja y depende de varios factores como son: clima, relieve, vegetación, hidrografía y otros. La vegetación que rodea a la colmena es de importante consideración ya que es a la que recurren las abejas. Es por esto que los propóleos de diferentes zonas geográficas poseen efectos similares pero difieren en su composición (Londoño, 2010).

Según indican los diversos autores consultados, el própolis es un producto muy utilizado como complemento alimenticio y suscita un interés extraordinario para la medicina y la industria farmacéutica. Se le atribuyen efectos antiinflamatorios, inmunoestimulantes, hepatoprotectores, carcinoestáticos. También tiene efectos antimicrobianos, antivirales, antifúngicos, antiprotozoarios (cuadro 4), anestésicos y de regeneración tisular (Sforcin, 2007).

El própolis contiene flavonoides, incluyendo quercetina, apigenina, pinocembrina, galangina, pinobanksina y pinobanksina-3-acetato. Estos compuestos, además de ser tóxicos para las levaduras, inhiben la actividad enzimática de la hialuronidasa. Adicionalmente el ácido cafeico y el hidrofolato podrían explicar su actividad semejante a los antiinflamatorios no esteroideos (Huleiehl, 2002).

Se cree que los flavonoides son los responsables de la mayoría de las actividades biológicas. Las propiedades antimicrobianas de esta mezcla de sustancias naturales es atribuida principalmente a la flavonona pinocembrina, el flavonol galangina y el ácido caféico que es un compuesto fenólico (Sforcin, 2007). La actividad antivírica es atribuible mayormente a los compuestos fenólicos que contiene el propóleo (González, 1997).

Estudios europeos han demostrado que tanto los compuestos fenólicos como los aromáticos son compuestos ampliamente encontrados en las plantas de manera natural y representan más de la mitad de los 160 compuestos identificados en ésta resina (Rojas, 2008).

Introducción

Existe poca información de las propiedades antivirales del propóleo y se ha reportado en virus de influenza aviar, Herpes, VIH, Marek, entre otros. Cabe mencionar que se reportan pocos datos de actividad antiviral en el caso de la enfermedad de Aujeszky (Rojas, 2008).

El estudio del efecto antiviral del propóleo es importante ya que los virus y las enfermedades son completamente diferentes en su mecanismo de acción y su efecto a nivel celular es variado (Kujumglev, 1999).

Muchos de los virus son causantes de trastornos respiratorios, por lo que el propóleo podría servir para su prevención. Esta actividad se le atribuye a sus compuestos fenólicos (Linares, 2009). Hay estudios donde se compara con otros fármacos de uso común como por ejemplo se habla de la acción del propóleo frente a Aciclovir en Herpes genital. El propóleo por vía tópica redujo la inflamación, los síntomas locales y fue más efectivo que Aciclovir (Schenitzler, 2008).

Cuadro 2. Efectos biológicos de los Componentes del Propóleo (Bogdanov, 2012).

Tipos de componentes del propóleo	Actividad Biológica
Poli fenoles y flavonoides (presentes en la mayoría de los propóleos)	Antibacterial, antiviral, antifungico, antioxidante, anticancerígeno, antialérgico, anti inflamatorio, cicatrizante.
Éster fenetil ácido cafeico (CAPE).	Antioxidante, anti inflamatorio, antitumoral, antiviral, fungicida, inmunomodulador, hepatoprotector, cardioprotector, antiosteoporosis.
Ácido caféico (CA)	Antiviral, antioxidante, antitumoral, antiulceroso.
Benzofenoles	Antioxidante, anti inflamatorio, antitumoral.
Flavonoides	Antioxidantes, anticancerígenos, inducción de apoptosis.
Terpenos	Antibacterial, antifungico.
Aceites esenciales	Antibacterial

Cuadro 3. Componentes generales del propóleo (Rojas, 2008).

Componentes	Ejemplos
Ácidos orgánicos	Como el ácido benzóico, C_6H_5-COOH gálico. $C_7H_6O_5$
Ácidos fenólicos	Ácidos cafeico $C_9H_8O_4$, cinámico $C_{11}H_{13}NO_2S_2$, pumarínico, insofenílico y fenílico.
Aldehídos aromáticos	Vainillina $C_8H_8O_3$, isovainillina $C_8H_8O_3$.
Cumarinas	Esculetol $C_9H_6O_4$, escopuletol.
Flavonoides	Pinocembrina $C_{15}H_{12}O_4$, galangin $C_{15}H_{10}O_5$, pinobanksina $C_{15}H_{12}O_5$
Flavonas	Acacetina $C_{16}H_{12}O_5$, cresina amarilla, pectolinaringenina $C_{17}H_{14}O_6$, tectocrisina $C_{16}H_{12}O_4$.
Flavonoles	Izalqinina, kaempferido $C_{16}H_{12}O_6$, quercetina $C_{15}H_{10}O_7$, remnocitrina.
Flavononas	Pinostrobina $C_{16}H_{14}O_4$, sakuranetina $C_{16}H_{14}O_5$.
Flavononoles	Pinobanksina, ferúlico, los sesquiterpenos y las flavononas (principalmente las galangina $C_{15}H_{10}O_5$)
Minerales	Aluminio, plata, bario, boro, cromo, cobalto, cobre, estaño, hierro, magnesio, manganeso, molibdeno, níquel, plomo, silicio, estroncio, titanio, vanadio, zinc.
Vitaminas	Provitamina A y vitamina B3

Cuadro 4. Microorganismos sobre los que tiene efecto el propóleo (Bogdanov,2012).

Bacterias Gram Positivas
<i>Bacillus cereus, Bacillus mesentericus, Corynebacterium spp., Corynebacterium diphtheriae, Diplococcus pneumoniae, Enterococcus spp., Mycobacteria spp., Mycobacterium tuberculosis, Staphylococcus aureus, Streptococcus: critecus epidermis faecalis mutans, pyogenes, viridans, sobrinus.</i>
Bacterias Gram Negativas
<i>Branhamella catarrhanlis, E. coli, Helicobacter pylori, Klebsiella ozaemae, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella: choleraesuis, dublin,enteriditis,exneri, gallinarum, pullonum,paratyphi-A, parathyphi - B, Shigella: Dysinteriae, somnei.</i>
Hongos y levaduras
<i>Aspergillus sp., Candida: albicans, guiliermondi, parapsilosis, tropicallis; Cryptococcus sp., Cryptococcus neoformans, Histoplasma encapsulatum, Madurella mycetomi, Microsporium: audoinini, canis, cepleo, distortum, ferrigeneum, gypseum,; piedra hortae, Trischosporum cutaneum.</i>
Virus
<i>Adenovirus, Coronavirus, herpes simple, Influenza A y B, Enfermedad de Newcastle, virus del Polio, Rotavirus, Virus de la estomatitis vesicular.</i>
Parásitos
<i>Cholomonas paramecium, Eimeria: magna, media, perforans, Giardia lambia, Trichomonas vaginalis, Trypanosoma cruzi.</i>

La recolección del propóleo responde a un patrón de forraje, en donde las abejas recolectoras extraen el propóleo de las yemas valiéndose de sus mandíbulas y de su primer par de patas, durante este proceso la secreción del ácido 10-hidroxidecenoico por las glándulas mandibulares permite el ablandamiento y trituración del propóleo para facilitar su transporte en los cestillos de polen de las patas traseras. Al ingresar a la colmena se dirigen inmediatamente al lugar donde éste es requerido y permanecen quietas, dejando que las abejas propolizadoras tomen algunas partículas de la sustancia para comprimirla, agregarle cera y proceder al propolizado (Londoño, 2010).

II. JUSTIFICACIÓN.

En lo referente a la enfermedad de Aujeszky (PRV), en nuestro país el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) presentó el último reporte de 2013 referente al mes de Enero señalando que sólo un estado del país (San Luis Potosí) se encuentra con escasa prevalencia de la enfermedad y cinco estados se encuentran en etapa de erradicación, existe la Campaña Nacional para el Control y la Erradicación de la Enfermedad de Aujeszky, la NOM-007-ZOO-1994 indica diversas estrategias de control de la misma. Investigadores tanto en medicina humana como en medicina veterinaria desarrollan tecnología farmacéutica natural, sintética o semi-sintética para disminuir el daño provocado por agentes patógenos, ya sea para prevenir o intentar combatirlos completamente modificando dosis, vías de dosificación, etc., éstos fármacos presentan reacciones secundarias y un costo elevado, es por eso que el empleo de productos y subproductos naturales son importantes como alternativa de tratamiento en diversas enfermedades virales, micóticas, bacterianas, etc. Entre los productos naturales el propóleo destaca pero existe poca información de las propiedades antivirales del mismo, se describe su efecto y aplicación *in vitro* en el caso de Influenza Aviar, Herpes simple, VIH, Marek, entre otros. Por tal motivo, en este trabajo se busca evaluar el efecto antiviral del propóleo en cultivos celulares MDBK, resulta de interés como tratamiento terapéutico y preventivo de la enfermedad de Aujeszky en un futuro reduciendo costos para el productor, reacciones secundarias y sobre todo reducir la presentación de la enfermedad en la piara (nacidos muertos, momificados, abortos, etc.). Aujeszky es una excelente elección para el estudio de la biología de alpha-herpesvirus ya que tiene una gama muy amplia de hospedadores, causa una infección letal en animales diversos y representa poco peligro para el laboratorio, presenta ciclos rápidos de replicación y es fácil de manipular, cabe resaltar que para dicho trabajo se emplearon también cultivos celulares RK-13 para la prueba de citotoxicidad y una prueba de dilución del propóleo en etanol al 70%, se hace notar que las pruebas de efecto citopático y evaluación antiviral del propóleo se llevaron a cabo únicamente en cultivo celular MDBK.

III. OBJETIVOS DEL PROYECTO.

Objetivo General.

- Determinar la actividad antiviral del Extracto Etanólico de Propóleo (EEP) sobre el virus de Aujeszky.

Objetivos Particulares.

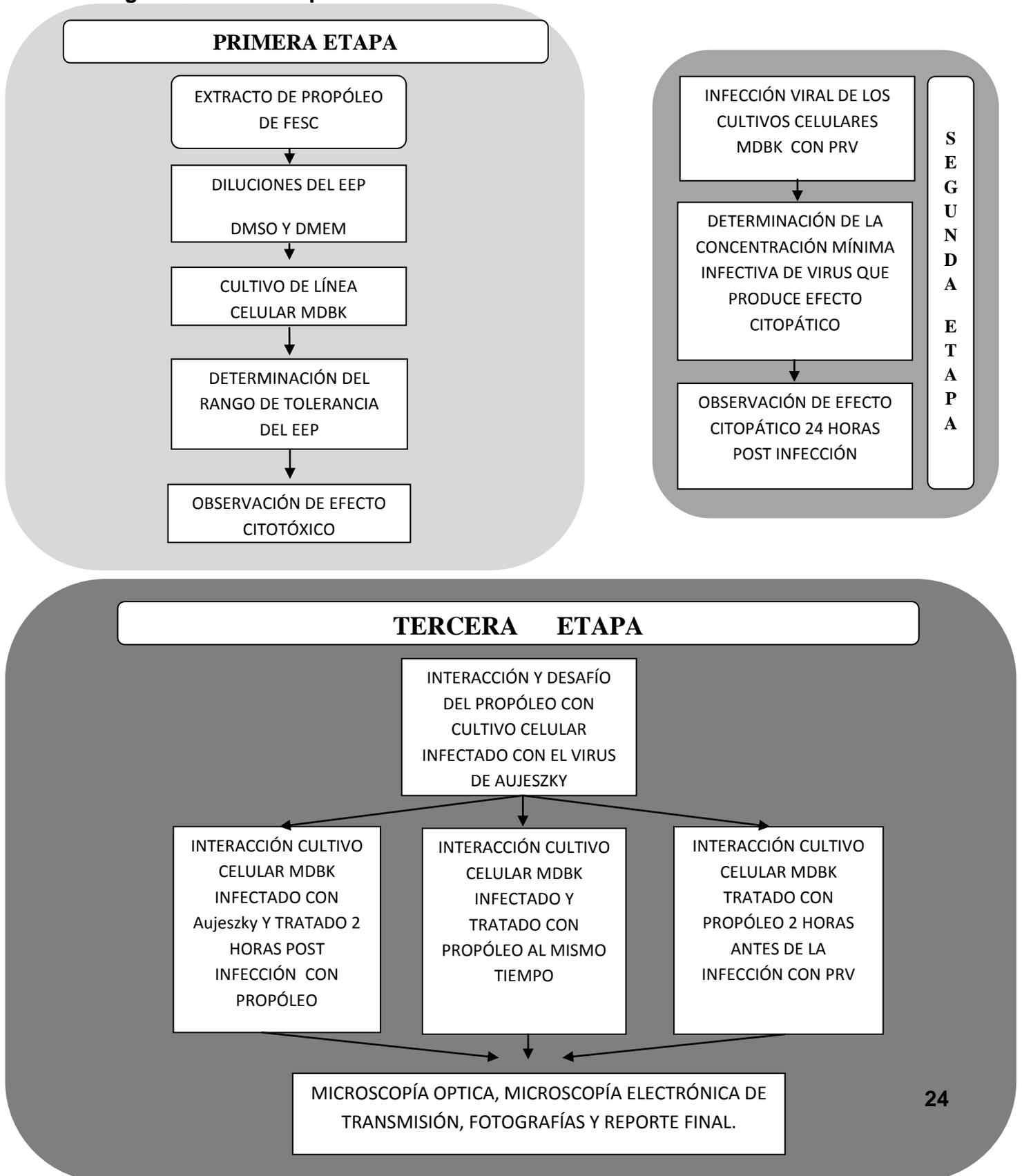
- Determinar los efectos citotóxicos del EEP proveniente del Edo. de México (FESC), sobre las células MDBK (Madin Darby Bovine Kidney).
- Determinar la actividad antiviral del propóleo de FESC sobre el virus de Aujeszky, mediante la cuantificación del efecto citopático.

IV HIPÓTESIS

El propóleo mexicano posee actividad antiviral *in vitro* contra el virus de la enfermedad de Aujeszky.

V. DISEÑO EXPERIMENTAL

Figura 3. Diseño Experimental



V. METODOLOGÍA

V. I PRIMERA ETAPA – Prueba de citotoxicidad del Propóleo.

- MATERIAL BIOLÓGICO

- a) *Propóleo*
- b) *Cultivo celular RK-13 y MDBK.*

-MÉTODO.

V. I. I Obtención del propóleo (EEP).

La Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FES-C) se localiza en el municipio de Cuautitlán Izcalli del Estado de México y se ubica a una latitud: 19° 40' 50'' N, longitud: 99° 12' 25'' O, altitud: 2,260 msnm.

La obtención del extracto de propóleo originario de FESC-C4 a partir de la materia prima (greña), en el Laboratorio de Química Orgánica de FESC campo 1 bajo supervisión del Dr. Guillermo Penieres



Figura 4. Propóleo en greña proveniente del Estado de México – Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

Obtención del extracto etanólico del propóleo (EEP).

- 1.- Se llevó a cabo la limpieza del propóleo eliminando todas las ceras, basura, restos de insectos, flores y se procedió a la fragmentación del propóleo en trozos pequeños.
- 2.- Se realizó la inmersión de los trozos en etanol al 70% en frasco ámbar por 15 días y procurando mezclar dos veces al día la mezcla.
- 3.- Una vez transcurridos los 15 días se realizó una maceración en el mismo frasco en donde se encontraba el propóleo con el etanol.
- 4.- Se llevó a cabo la filtración de la inmersión en un matraz Kitazato con papel filtro.
- 5.- Nuevamente se filtró con ayuda de gasas limpias y estériles para retirar la mayor cantidad de material.
6. Se vació el concentrado del propóleo en un matraz bola para ser colocado en el rotavapor para eliminar el etanol.
- 7.- La mezcla de etanol y propóleo fraccionado fue resuspendido..
- 8.- Nuevamente la mezcla fue colocada en el rotavapor y se colocó en vacío para que se obtuviera una consistencia resinosa del propóleo.
- 9.- Fue conservado en un frasco color ámbar en espera de ser empleado para las diferentes diluciones posteriores.

V . I. 2 Revisión de crecimiento y morfología celular:

1.- Líneas celulares.- Para este trabajo se emplearon inicialmente cultivos de células RK-13 (Rabbit Kidney) proporcionadas por el Dr. Carlos Ignacio Soto Zárate y MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) proporcionadas por el Dr. Humberto Ramírez Mendoza, destacando que la experimentación a partir de la segunda etapa sólo fue realizada en cultivo celular MDBK.

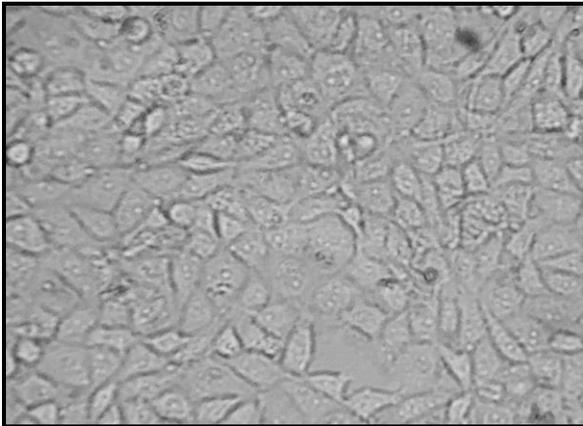


Figura. 5 Monocapa de células MDBK, Cultivo celular incubado con medio DMEM, 10% SFB, observadas a las 24 horas.

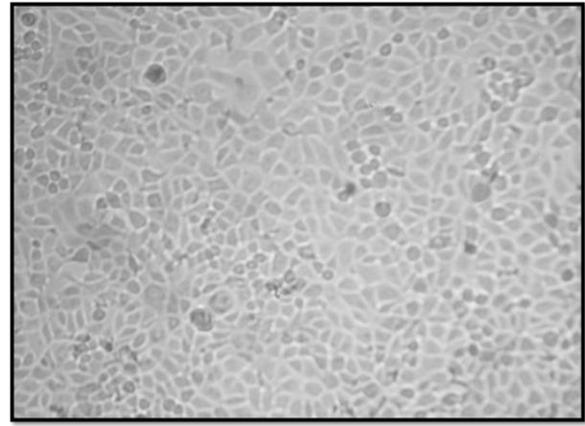


Figura. 6 Monocapa de células RK13. Cultivo celular incubado con medio DMEM, 10% SFB, observadas a las 24 horas.

Las monocapas de células MDBK fueron crecidas en cajas de cultivo celular de poliestireno de 100 mm x 20 mm, posteriormente se adicionó 900 ul de tripsina durante 4 minutos y levantadas para realizar nuevamente la siembra de las mismas en cajas nuevas y otra parte de la suspensión celular fue empleada para realizar la estandarización de la suspensión a 800,000 células por ml, posteriormente se procedió a realizar la siembra en placa de 96 pozos, para lo cual se colocaron 50 ul de la suspensión celular en cada pozo (aproximadamente 16 000 células x pozo) y 150 ul de medio de cultivo DMEM (Medio Mínimo de Eagle modificado por Dulbecco), suplementado con 10% de suero fetal bovino y penicilina, estreptomycin. Se incubaron a 37°C en un ambiente húmedo y bajo una atmosfera de CO₂.al 5%.

Los cultivos fueron revisados a las 24 horas de incubación.

V . I. 3 Determinación del rango de tolerancia del cultivo celular al propóleo.

- ✓ Se realizaron diluciones del propóleo con etanol al 70% y dimetilsulfoxido (DMSO), esto con el fin de realizar la elección del mejor solvente para el extracto de propóleo y así minimizar la posible acción tóxica del solvente. Como solvente final para el propóleo se empleó el DMSO en una solución de 1 mg de propóleo en 50 μ l de DMSO y 950 μ l de medio DMEM.
- ✓ A partir de la solución original se realizaron diluciones dobles seriadas para generar las soluciones de trabajo con 1.0, 0.5, 0.25, 0.125 y 0.0625 mg/ml (Cuadro 5).
- ✓ Sobre los cultivos celulares se colocaron 50 μ l de cada una de las soluciones de trabajo y 150 μ l de medio DMEM, posteriormente, fueron incubadas a las condiciones ya señaladas. Se revisaron a las 24 horas y se realizó el registro fotográfico. Este ensayo fue realizado por triplicado y se manejó un cultivo sin exposición al propóleo.

Cuadro 5. Diluciones seriadas de propóleo.

TUBO 1 STOCK	TUBO 2	TUBO 3	TUBO 4	TUBO 1
50 μ l DMSO	500 μ l STOCK	500 μ l Sol.	500 μ l Sol.	500 μ l
950 μ l DMEM	500 μ l DMEM	500 μ l DMEM	500 μ l DMEM	500 μ l DMEM
1 mg propóleo = 1 ml	0.5 mg/ml propóleo	0.25 mg/ml propóleo	0.125 mg/ml propóleo	0.0625 mg/ml propóleo

Se agregó una dilución de trabajo de 4 mg/ml de propóleo al ensayo para observar afecto citotóxico a una dosis mayor de 1 mg/ml.

V. I. 4 RESULTADOS PRIMERA ETAPA.

PRUEBA DE CITOTOXICIDAD DEL PROPÓLEO.

De acuerdo con los resultados obtenidos se encontró que el etanol al 70% ejerce una acción tóxica sobre el cultivo celular evidenciada por la presencia de alteraciones morfológicas, mientras que el DMSO resultó ser un mejor solvente para el EEP y sus efectos tóxicos sólo se observaron a dosis de 4 mg/ml. En la dosis de 0.5 mg/ml no hay alteración morfológica considerable y por lo tanto es tolerable por las células.

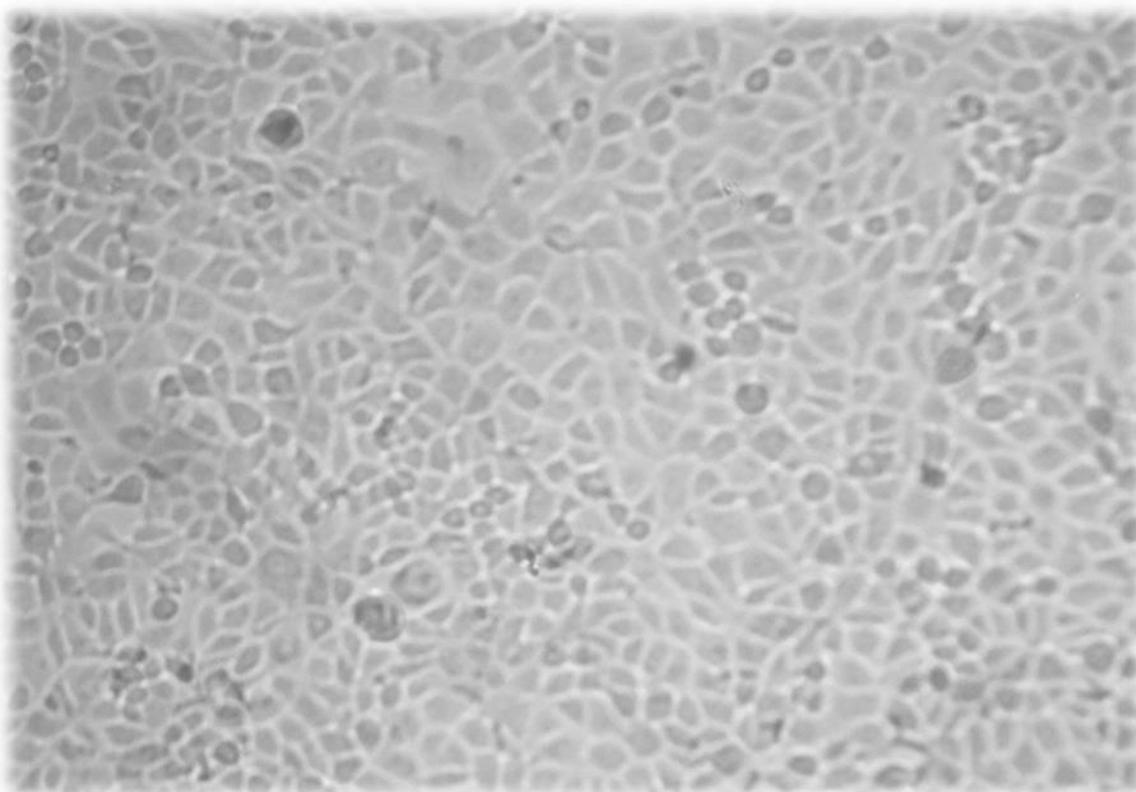


Figura 7. Cultivo de células RK13. Se observa la manocapa de células 24 horas después de sembradas. (40x)

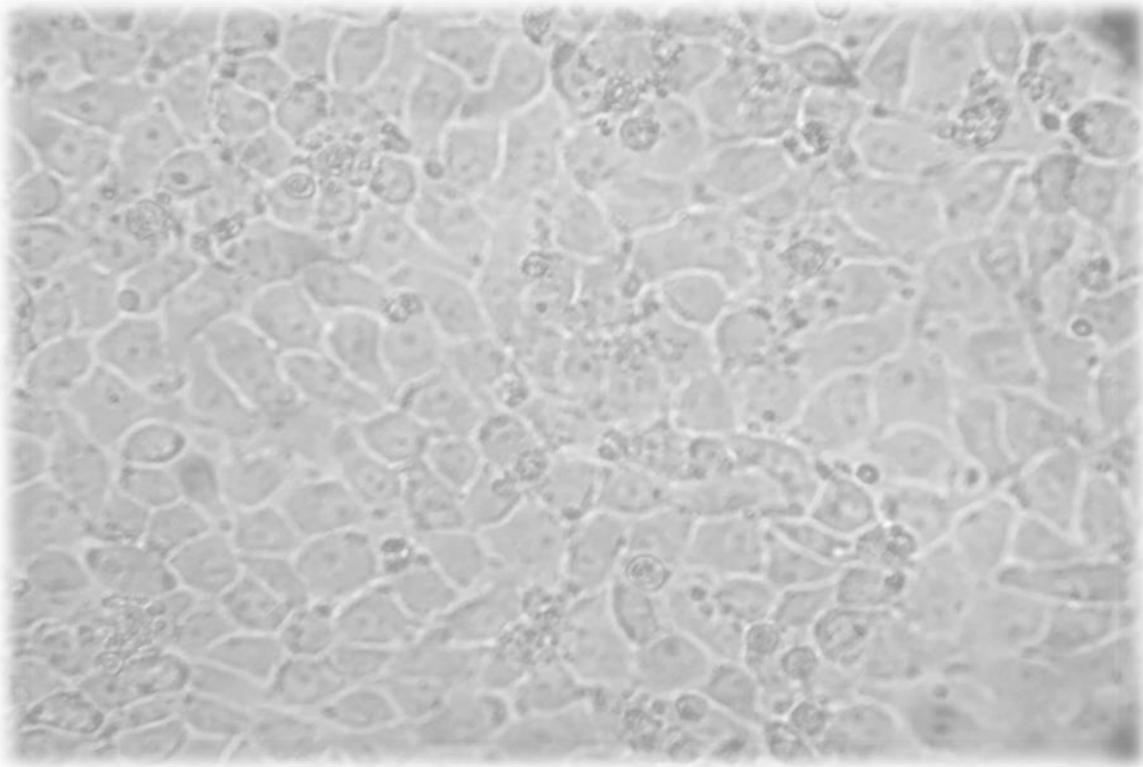


Figura 8. Cultivo de células RK-13 expuesto a OH 70%. Se observa alteración de la monocapa, mostrando cambios en la morfología celular evidenciando células redondeadas y lisis de las mismas. Microscopio invertido(100x).

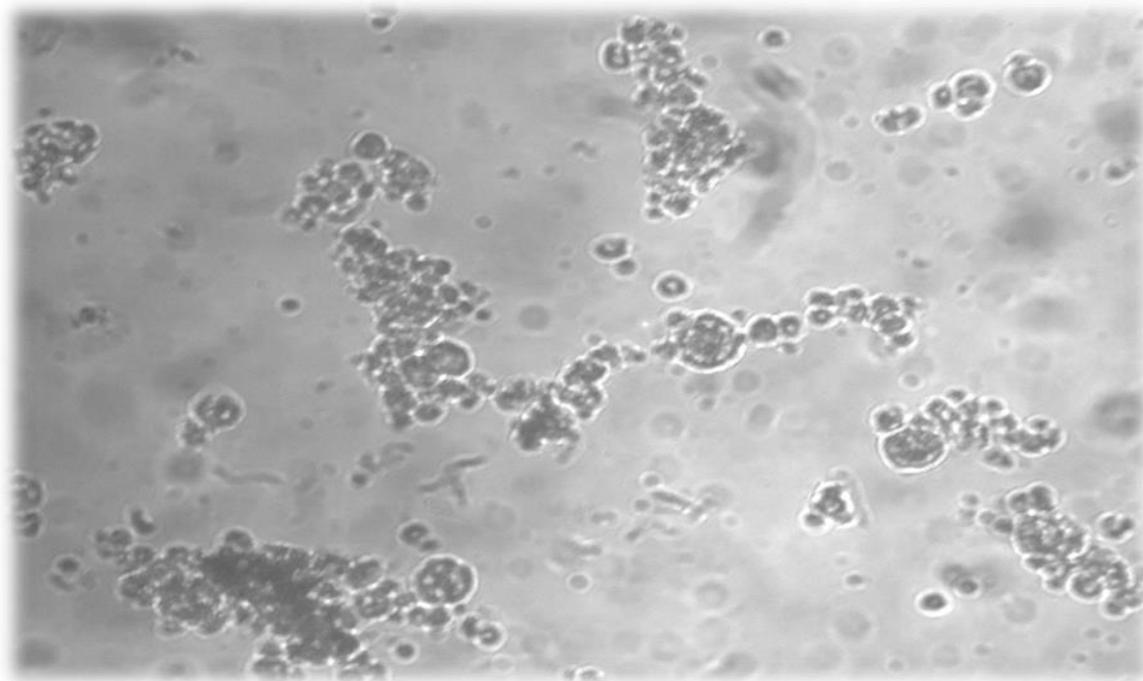


Figura 9. Cultivo celular RK13 con una dosis de 4 mg de Propóleo y OH 70%. Se observa lisis celular y pérdida completa de morfología de la monocapa (40X)

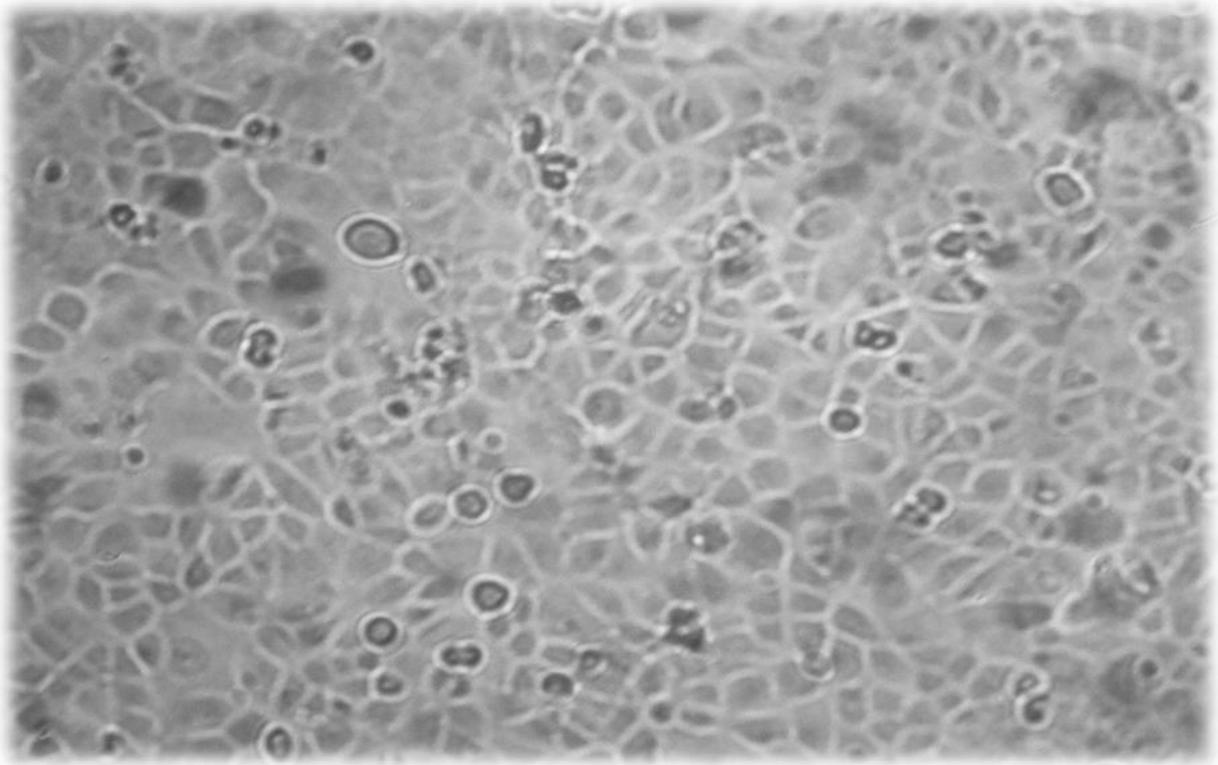


Figura 10. Cultivo celular RK-13 expuesto a DMSO. Se observa poca alteración de la monocapa, mostrando cambios en la morfología celular y células redondeadas (40 x).

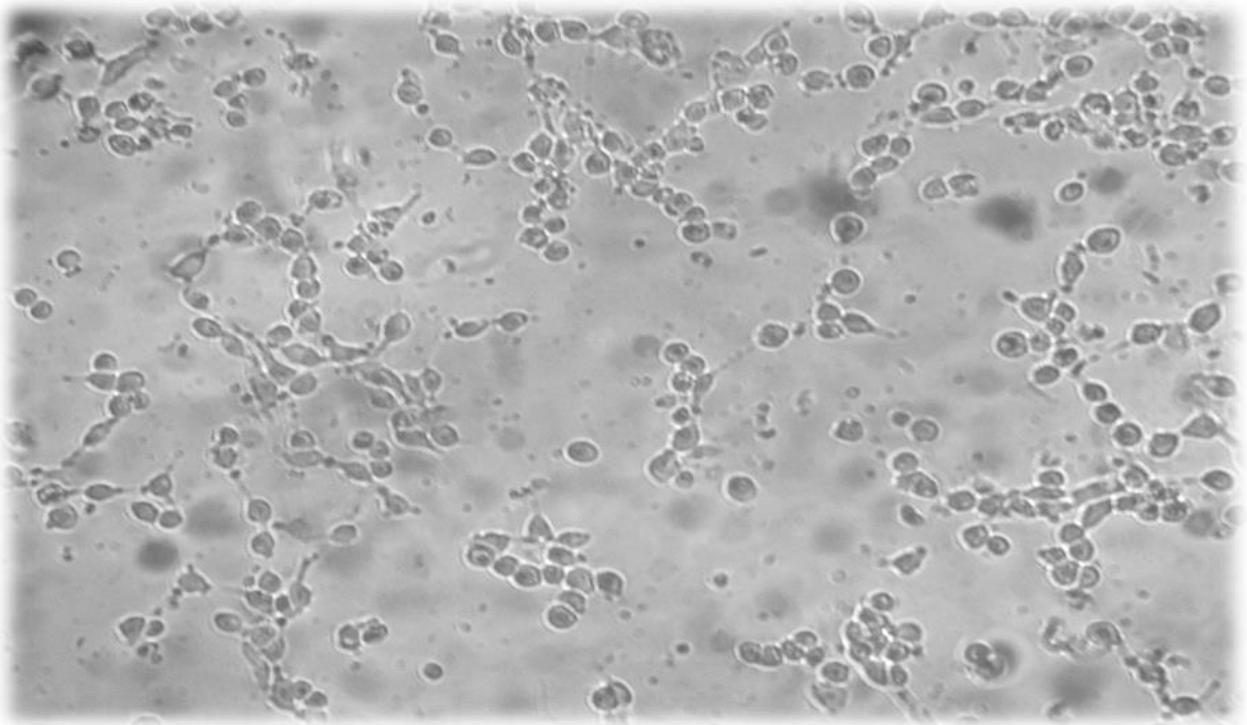


Figura 11. Cultivo celular RK13 con una dosis de 4 mg/ml de propóleo y DMSO. Se observa lisis celular y pérdida de morfología de la monocapa (40x)

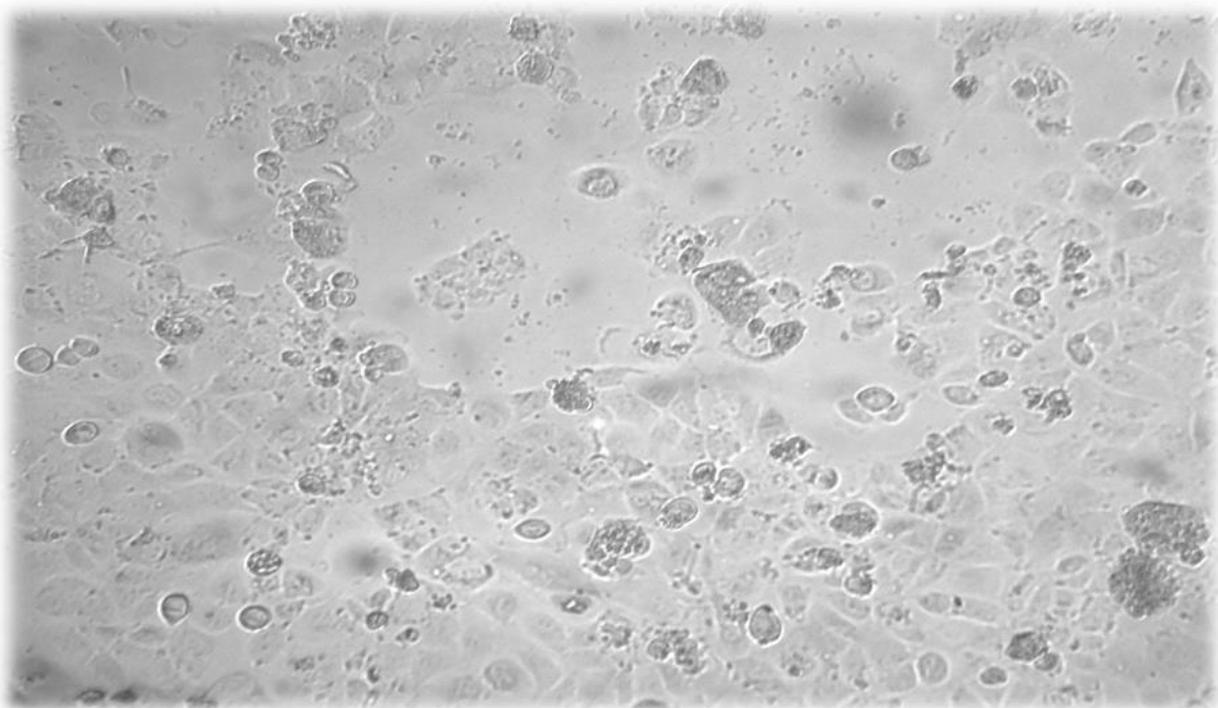


Figura 12. Cultivo celular RK13 con una dosis de 1.2 mg/ml de propóleo y DMSO. Se observa lisis celular en menor cantidad en comparación con el OH 70% (40x).

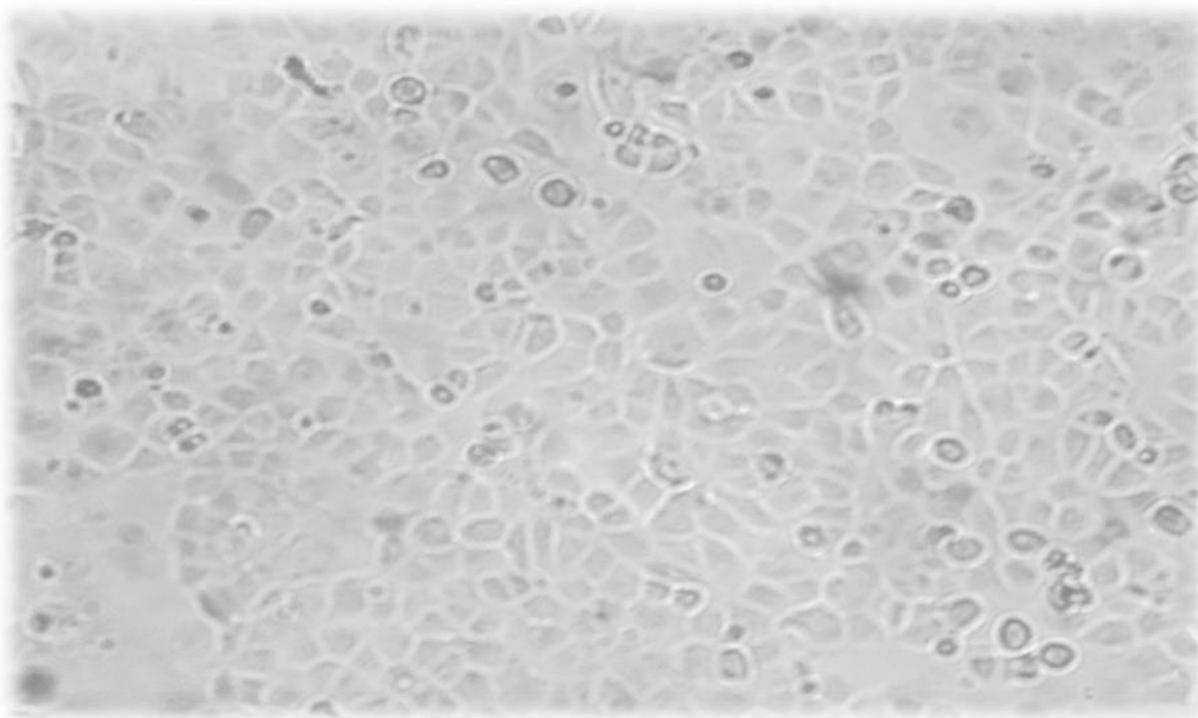


Figura 13. Cultivo celular RK13 con una dosis de 0.5 mg/ml de propóleo y DMSO. Se observa una menor alteración morfológica de las células que conforman la monocapa (40x)

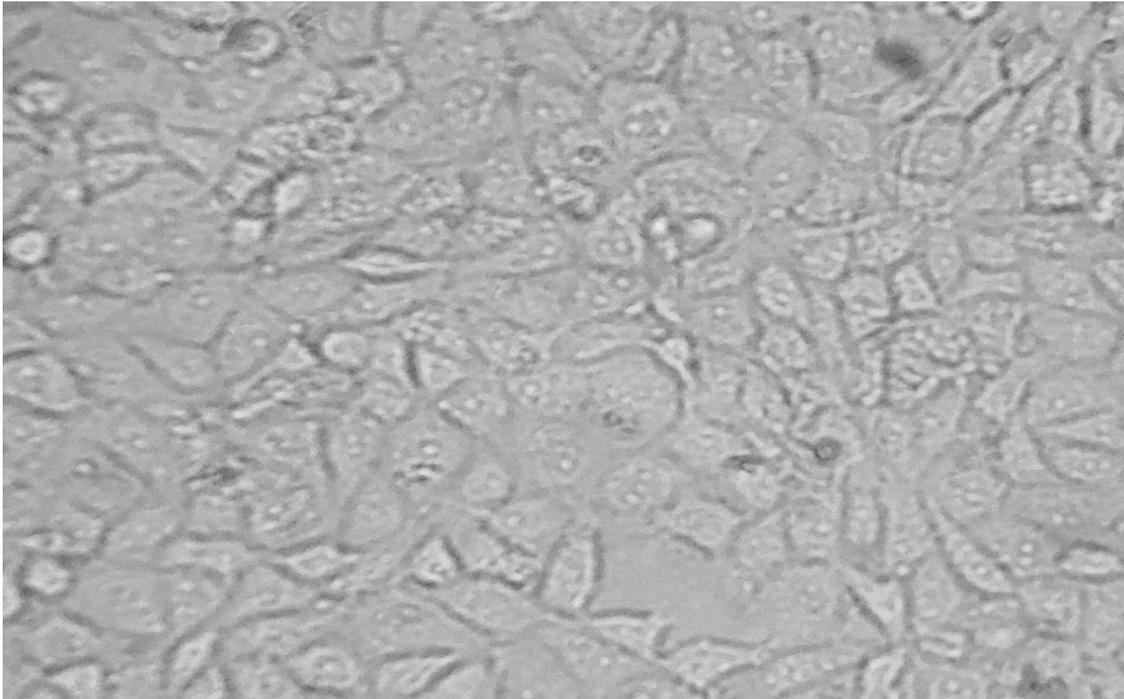


Figura 14. Cultivo celular MDBK. Se observa poca alteración de la monocapa, mostrando cambios en la morfología celular y células redondeadas (40 x).

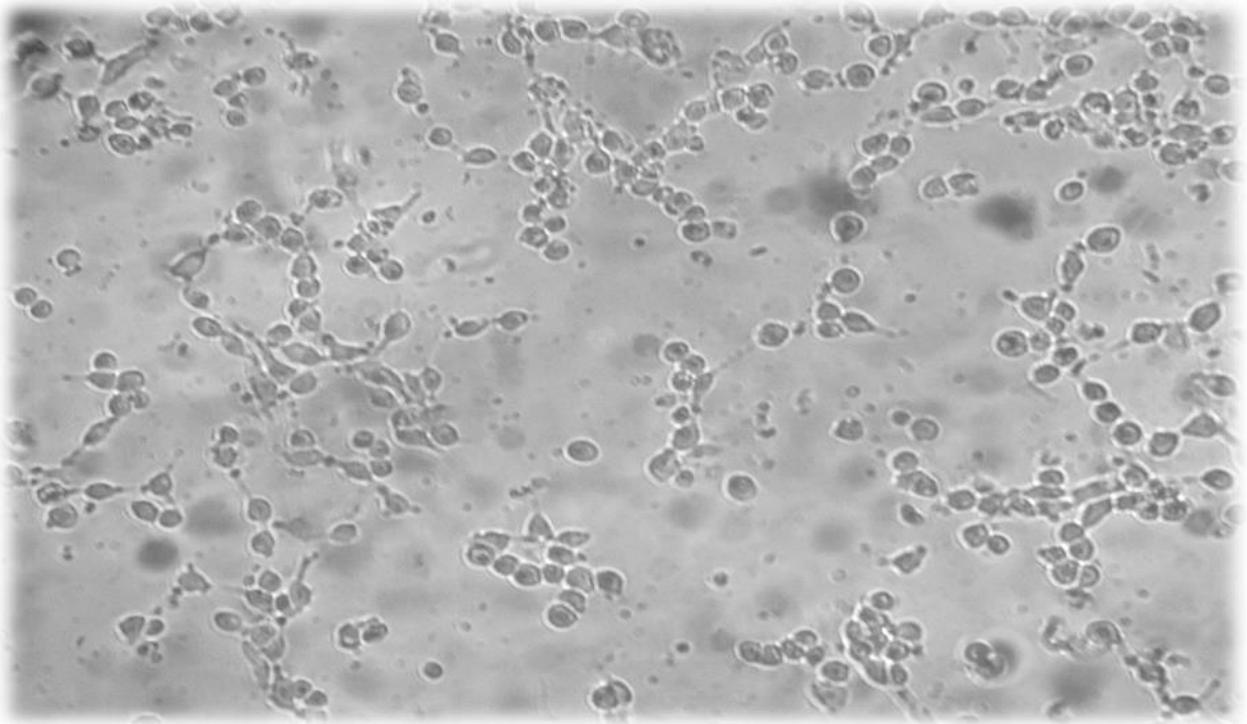


Figura 15. Cultivo celular MDBK expuesto a OH 70%. Se observa alteración de la monocapa, mostrando cambios en la morfología celular evidenciando células redondeadas. (40x)

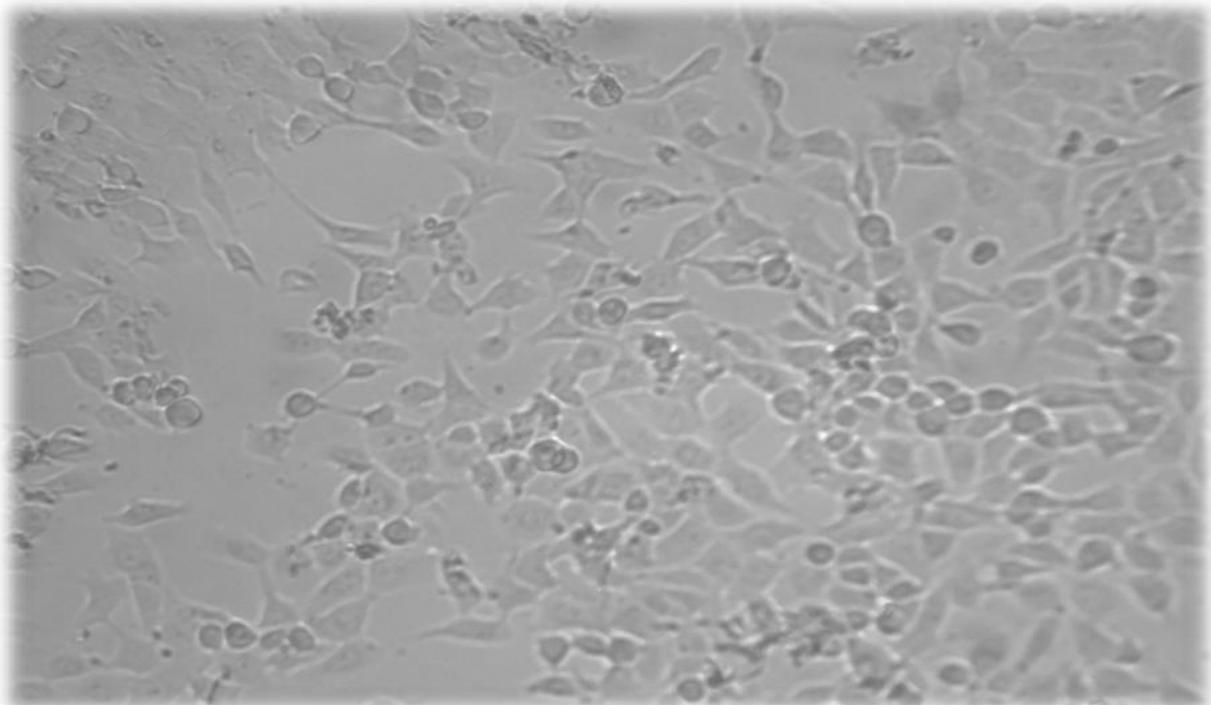


Figura 16. Cultivo celular MDBK con una dosis de 4 mg/ml de Propóleo y OH 70%. Se observa lisis celular y pérdida completa de morfología de la monocapa, desprendimiento de la misma (40x).

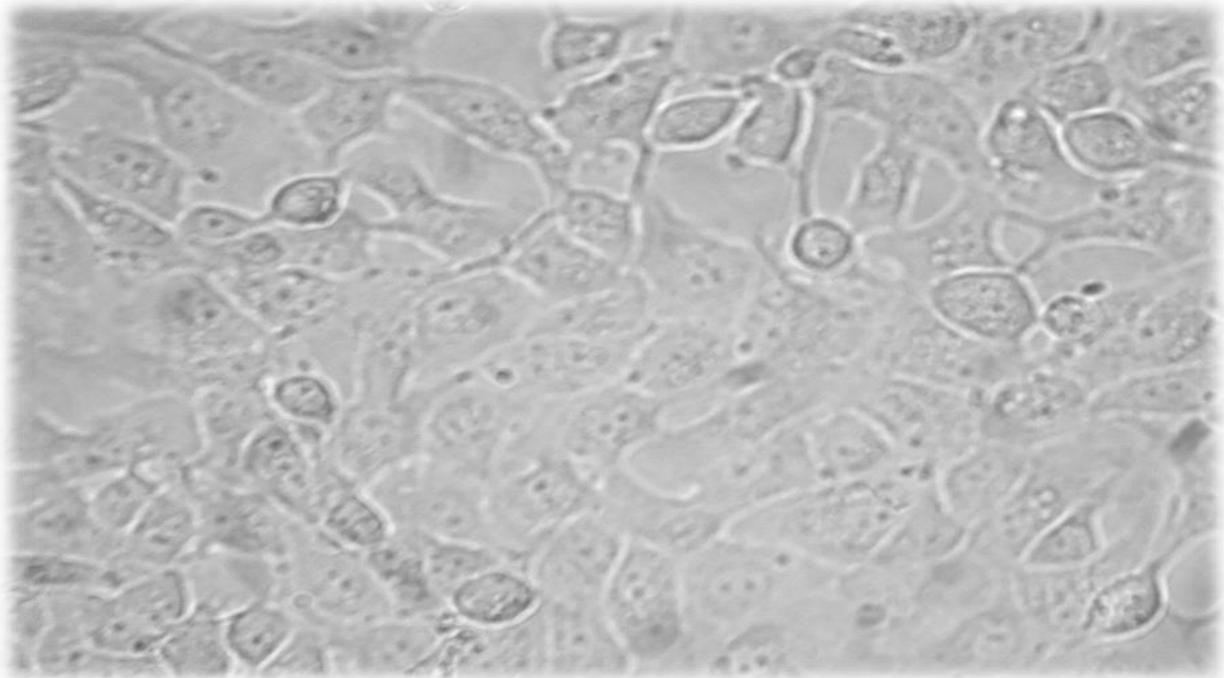


Figura 17. Cultivo celular MDBK expuesto a DMSO. Se observa poca alteración de la monocapa, mostrando cambios en la morfología celular evidenciando células redondeadas (250X)

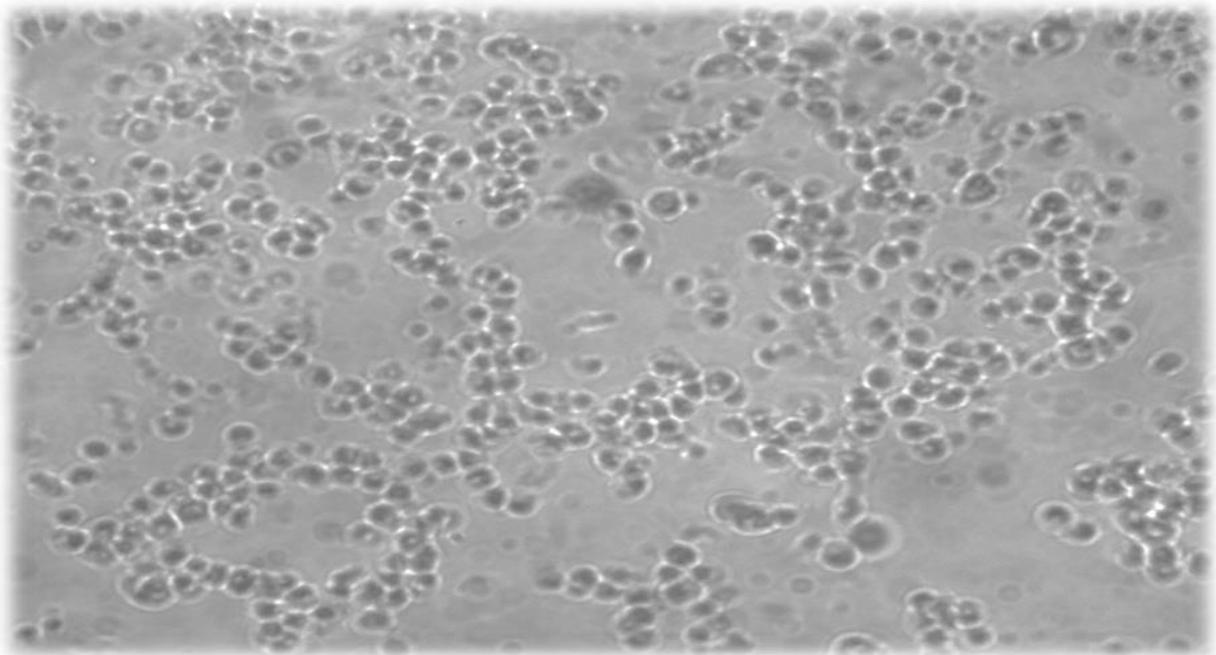


Figura 18. Cultivo celular MDBK con una dosis de 4 mg/ml de propóleo y DMSO. Se observa lisis celular, redondeamiento celular y pérdida de morfología de la monocapa (40x)

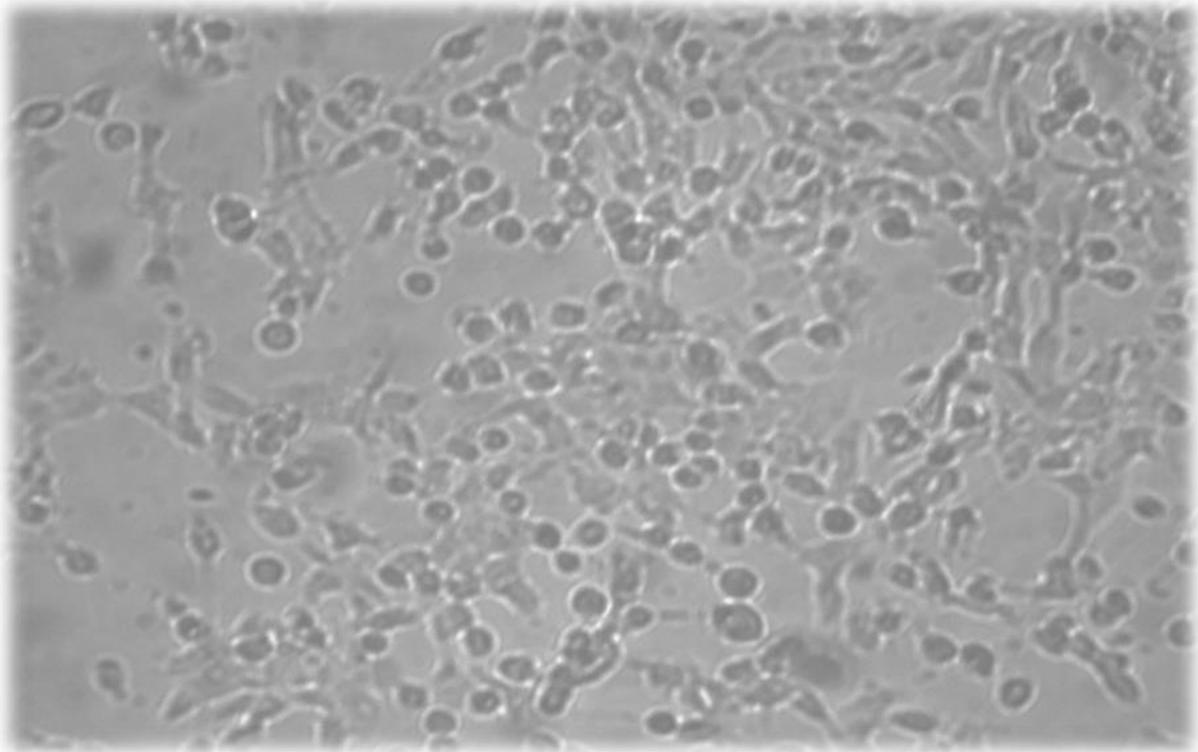


Figura 19. Cultivo celular MDBK con una dosis de 1.2 mg/ml de propóleo y DMSO. Se observa lisis celular y redondeamiento de células (100x).

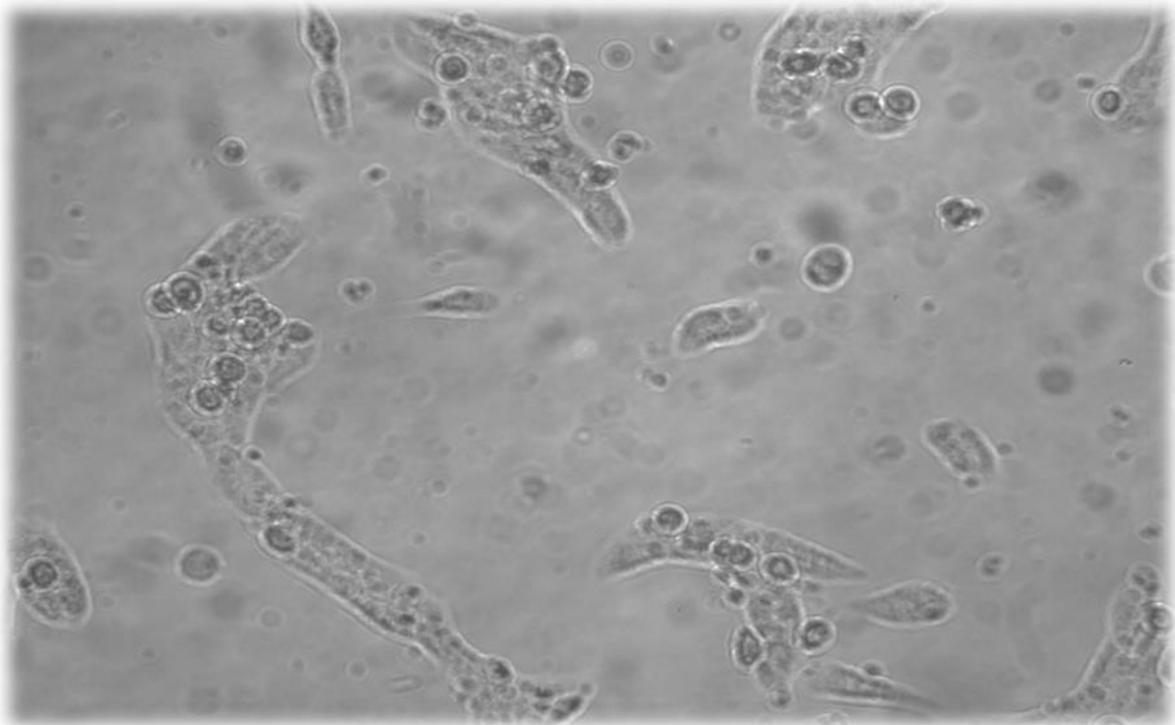


Figura 20. Células MDBK con una dosis de 1.2 mg/ml propóleo de FESC y DMSO. Se observa formación de sincitios y destrucción celular, así como desprendimiento de la monocapa celular (250x)

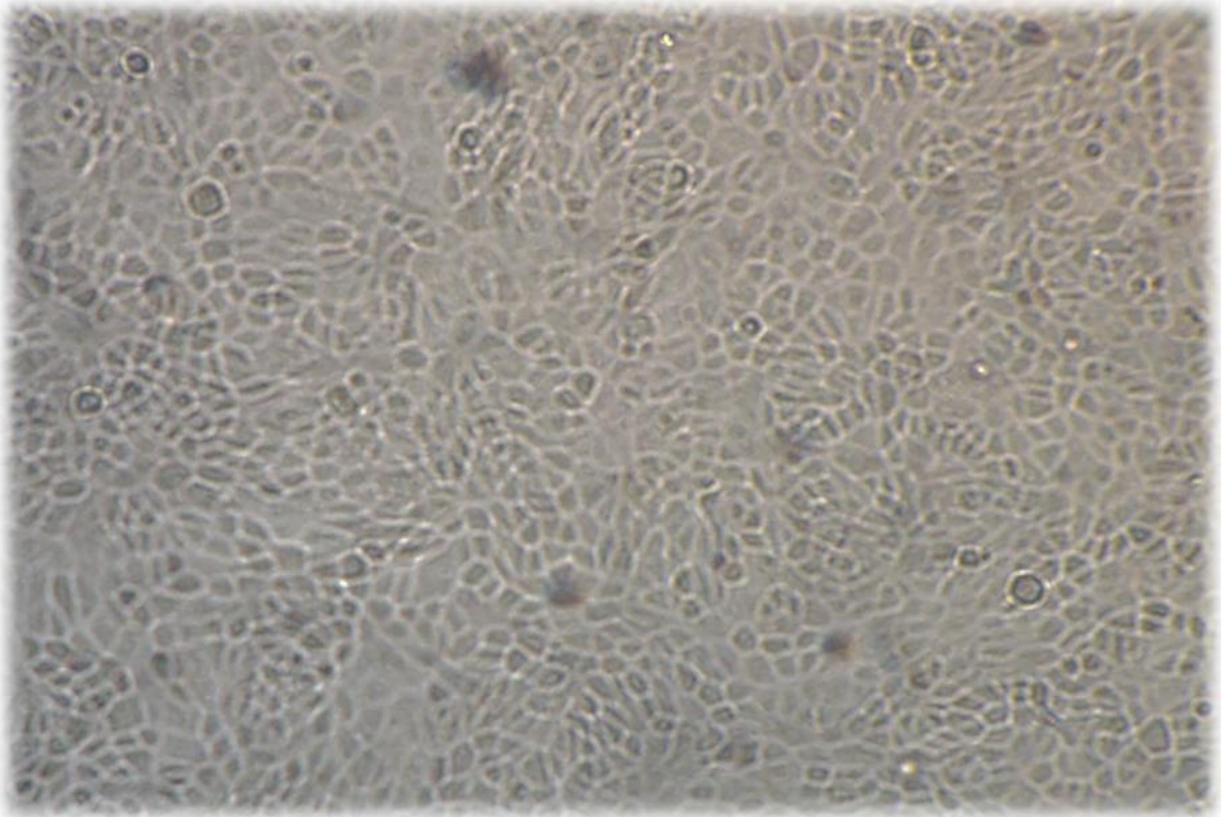


Figura 21. Cultivo celular MDBK con una dosis de 0.5 mg/ml de propóleo y DMSO. No se observa alteración morfológica de las células que conforman la monocapa (40X)

V. 2 SEGUNDA ETAPA - INFECCIÓN VIRAL.

-MATERIAL BIOLÓGICO.

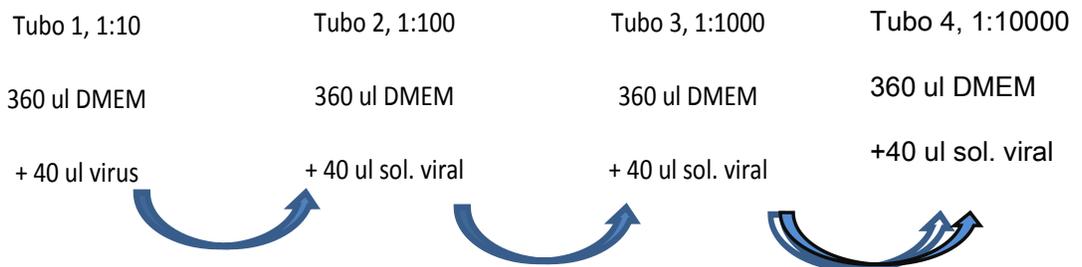
- a) Línea celular MDBK, pase 75.
- b) Virus de Aujeszky, cepa Shope

-MÉTODO.

V. 2. I Cultivo celular y virus.

Las monocapas de células MDBK se inocularon con 200 μ l de suspensión viral para congelar y almacenar, posteriormente se realizaron diluciones en base 10 con medio de cultivo DMEM empleando un stock de 1.86×10^6 ufp de la cepa Shope de PRV, se procedió a inocular los cultivos en la placa de 96 pozos para la infección se adicionaron 50 μ l de sol madre + 150 μ l de DMEM, preparándolas en la mañana para crecimiento y realizar la infección viral en la tarde (aproximadamente 6 hrs). El mantenimiento de los cultivos celulares fue a 37° C y 5% CO₂.

360 μ l DMEM + 40 μ l virus Cepa Shope



V. 2. 2 RESULTADOS SEGUNDA ETAPA

OBSERVACIÓN DE EFECTO CITOPÁTICO

Para los ensayos de infección se utilizó un stock con 1.86×10^6 ufp de PRV cepa Shope con la cual se infectó al cultivo celular, se dejó adsorber por una hora, se eliminó el exceso de solución y se agregaron 10 ml de DMEM. Los cultivos desarrollaron las placas características de la cepa Shope.

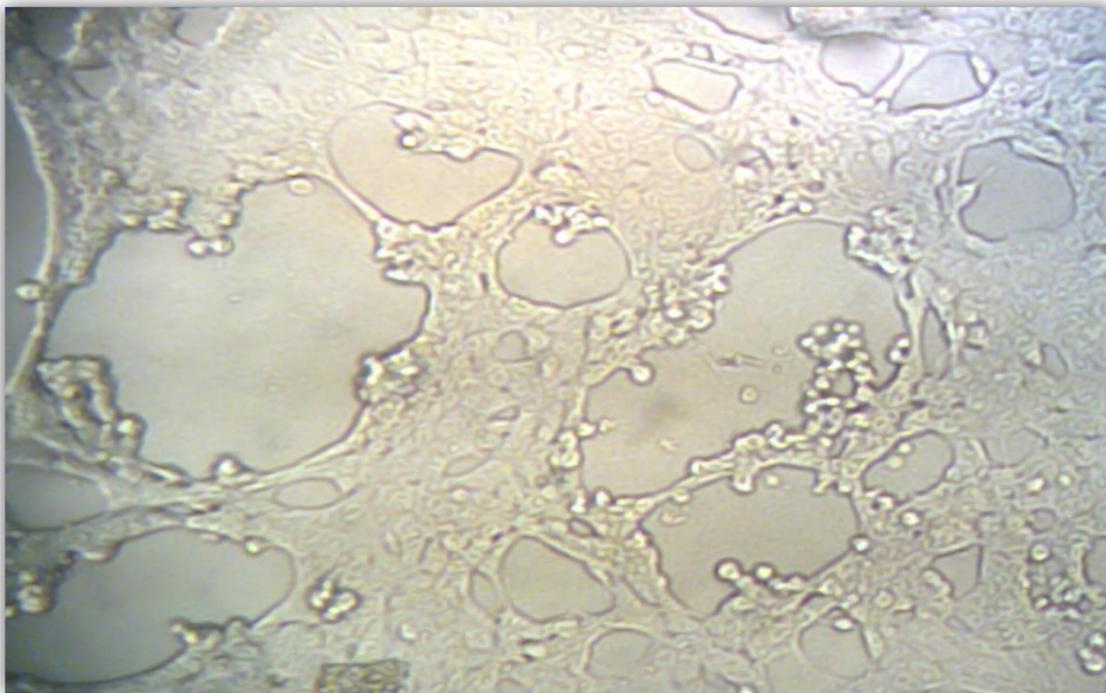


Figura 22. Efecto citopático causado por el virus de Aujeszky. Formación de placas en la monocapa de células MDBK, causado por el virus de Aujeszky cepa Shope (100x)

V. 3 TERCERA ETAPA.

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIVIRAL DEL PROPÓLEO SOBRE EL VIRUS DE AUJESZKY.

-MATERIAL BIOLÓGICO.

- a) Células MDBK.
- b) Virus de PRV cepa Shope.
- c) Propóleo mexicano originario de FESC.

-METODO.

A) INTERACCIÓN VIRUS Y PRÓPOLEO.

La actividad antiviral del propóleo se llevó a cabo mediante la inhibición de efecto citopático en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4, Laboratorio 4 Biología celular bajo la supervisión del Dr. Carlos Ignacio Soto Zárate y Laboratorio 6 de Microbiología a cargo del Dr. Tonatiuh A. Cruz Sánchez.

Una vez establecido el cultivo celular MDBK, DMSO como disolvente del propóleo, dosis del propóleo (0.5 mg/ml) y el stock viral, se procedió al desafío en diferentes tiempos, es decir, con tratamiento dos horas antes de realizar la infección, realizar la infección al mismo tiempo que se aplicaba el tratamiento y tratamiento aplicado dos horas después de realizada la infección, los ensayos se realizaron en placas de 96 pozos y por triplicado, posteriormente fueron fijadas con paraformaldehído por 10 minutos y teñidas con Cristal Violeta por 10 minutos para su observación.

Se colocaron 50 *ul* de solución de 0.5 mg/ml de propóleo, 100 *ul* de medio de cultivo DMEM y después de dos horas se inoculó con 50 *ul* de la dilución viral. Para los cultivos que se desafiaron al mismo tiempo propóleo y virus fueron colocados 50 *ul* de dilución viral y 50 *ul* de la dilución del propóleo (0.5 mg/ml) con 100 *ul* de medio de cultivo.

En el caso del tercer cultivo fueron colocados 50 *ul* de propóleo (0.5 mg/ml) después de dos horas de haber sido realizada la infección viral, igualmente se completaron los 200 *ul* del pozo con 100 *ul* de medio de cultivo DMEM. Los cultivos fueron revisados después de 24 horas de realizada la infección.

B) CONTEO DE UFP

Las placas originadas por PRV fueron observadas y contabilizadas en cada uno de los casos (cultivo infectado, cultivo tratado con propóleo dos horas antes de la infección, durante la infección y dos horas después de la infección).

C) MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Estos cultivos finalmente fueron procesados para Microscopia Electrónica en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. [ANEXO I]

D) ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para la evaluación del efecto antiviral del Extracto Etanólico del Propóleo (EEP) de FESC se llevó a cabo el conteo de las UFP, estos datos fueron procesados mediante el programa Grad Pad Prism versión 4.

V .3 .I RESULTADOS TERCERA ETAPA

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIVIRAL DEL PROPÓLEO DE FESC SOBRE EL VIRUS DE AUJESZKY.

Mediante las interacciones realizadas se encontró que el cultivo tratado con propóleo dos horas antes de realizarse la infección viral presenta una reducción en la cantidad de ufp evidentes en el cultivo teniendo un promedio de 86.7 ufp, mientras que en los cultivos tratados al mismo tiempo de la infección presentaron una media de 166.3 ufp y los cultivos tratados dos horas después de haber sido infectados con PRV presentaron una media de 154.3 ufp haciéndose evidente la presencia de ECP en el cultivo celular.

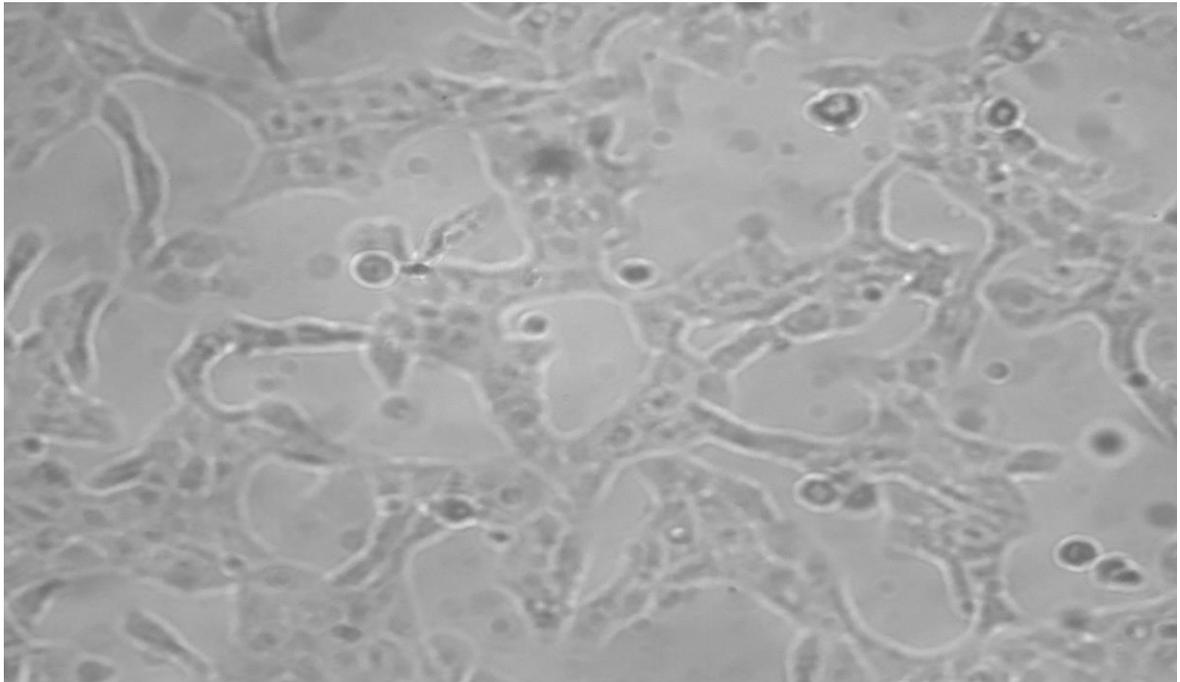


Figura 23. Control positivo PRV. Se muestra el efecto citopático típico de la cepa Shope, formación de placas (100X)

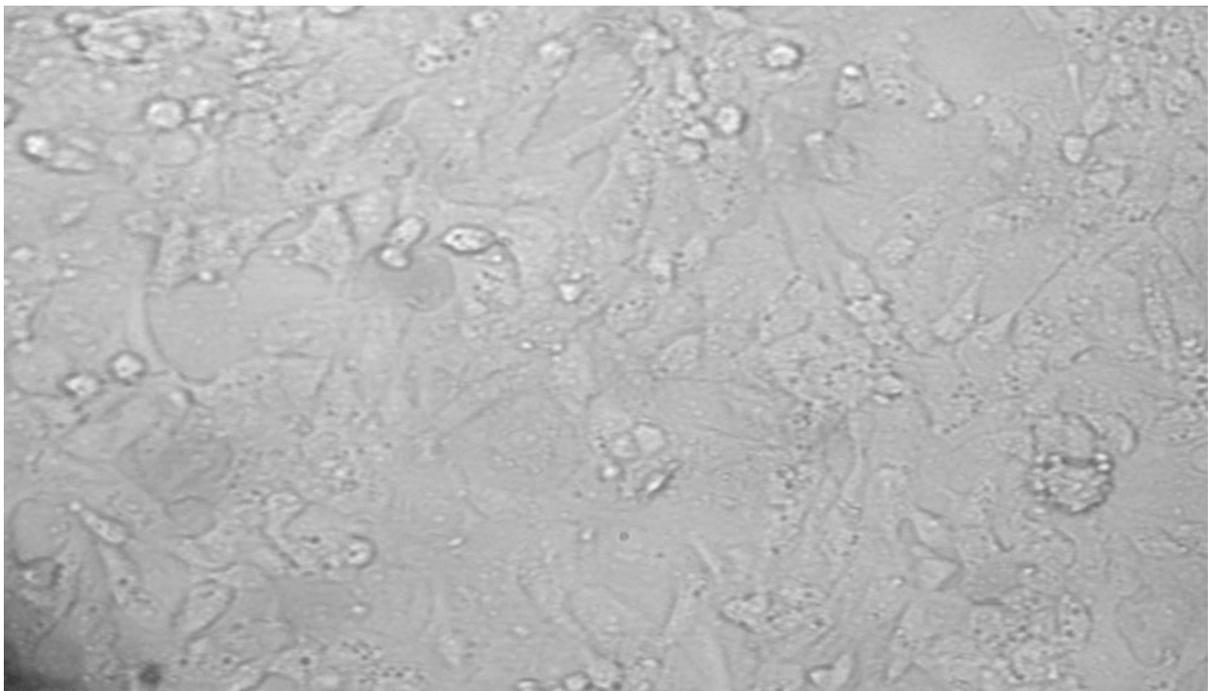


Figura 24. Cultivo celular MDBK infectado con virus de Aujeszky y tratado con 0.5 mg/ml de propóleo de FESC 2 horas antes de la infección viral. Se muestra menor número de placas en la monocapa y menor cambio en la morfología celular. (40x)

V. 3. 2 CONTEO DE UFP TINCIÓN CRISTAL VIOLETA.

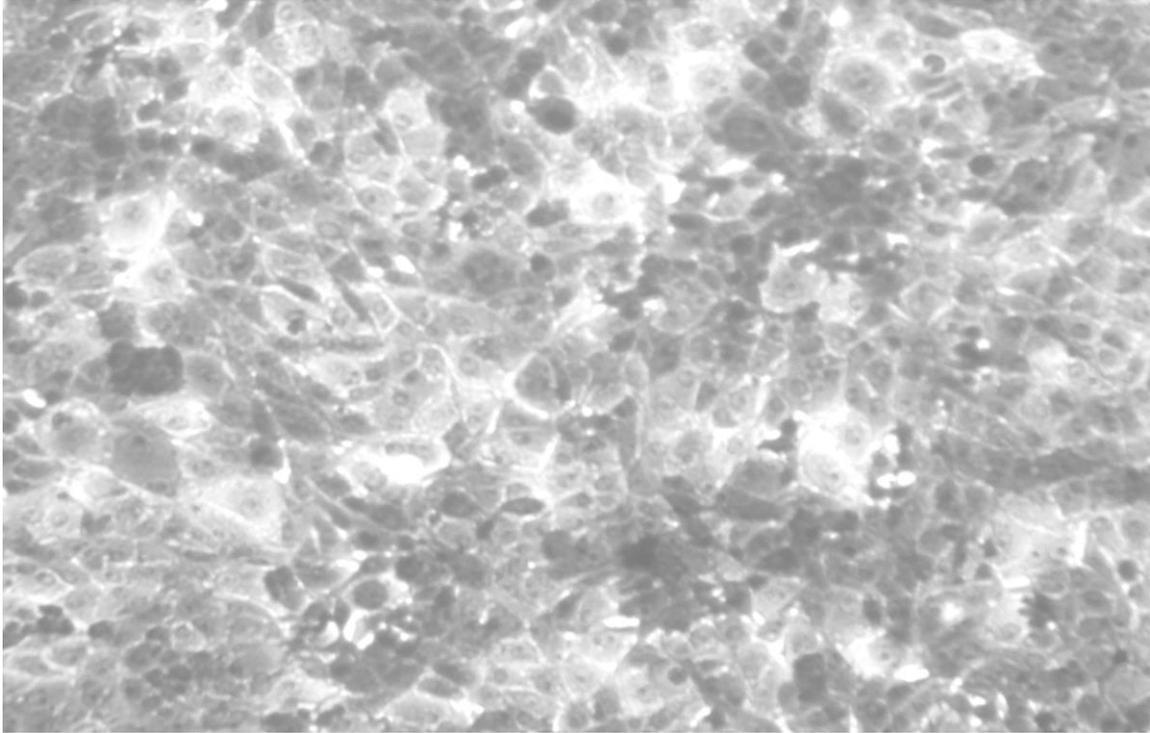


Figura 25. Cultivo celular MDBK teñido con cristal violeta. Se observan los cultivos sin alteración a las 24 horas de sembradas, 250 x.

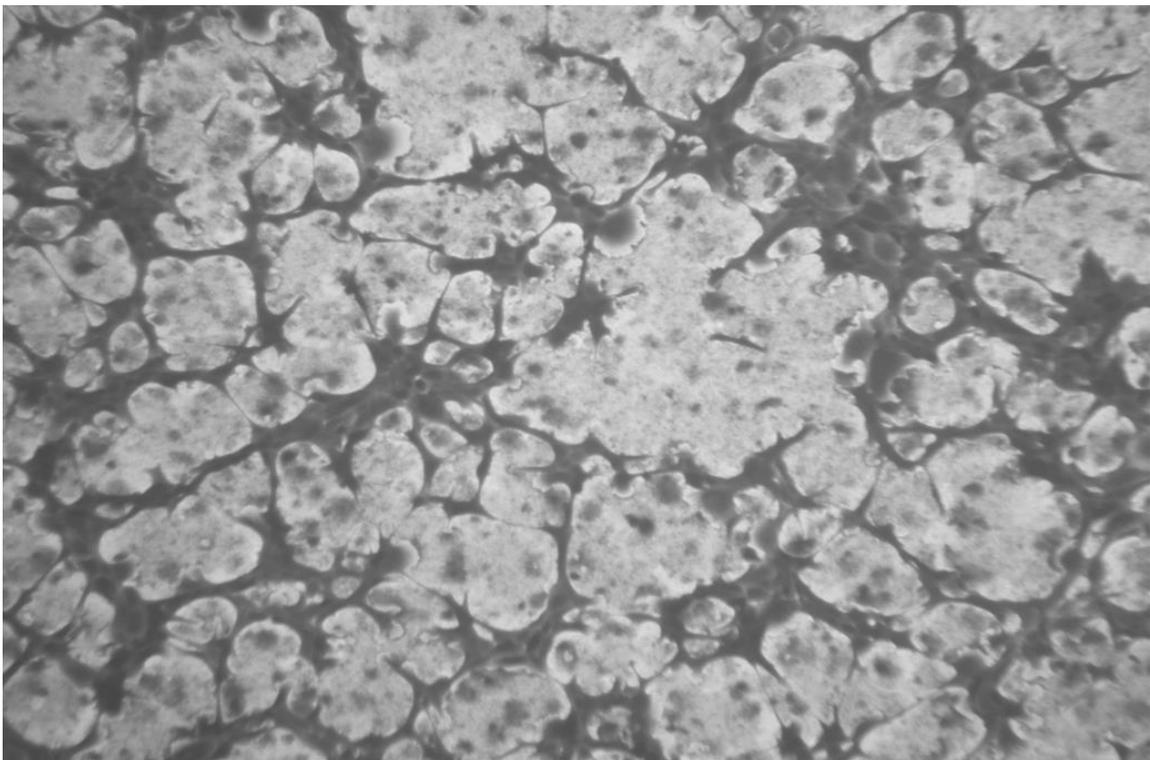


Figura 26. Cultivo celular MDBK infectado PRV. Cultivo infectado con PRV, observado y teñido con cristal violeta 24 horas post infección. (250 x).

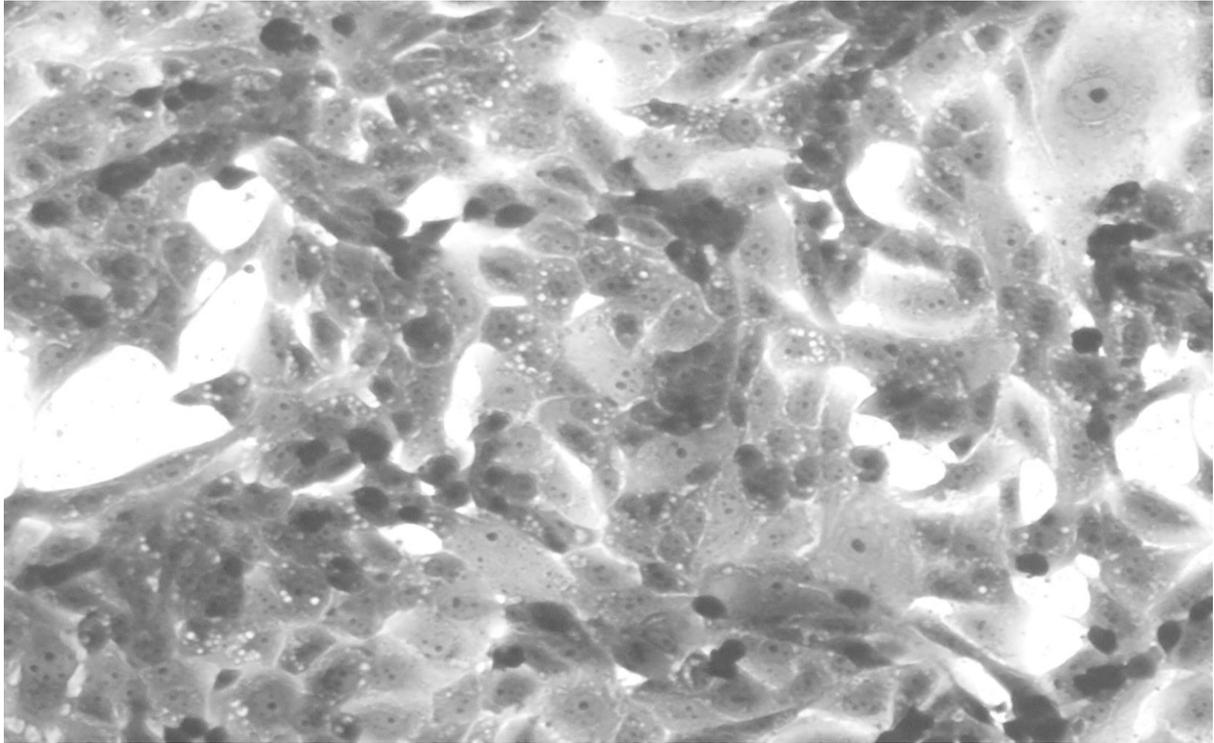


Figura 27. Cultivo celular MDBK tratado 2 horas antes de la infección con PRV. Cultivo tratado con 0.5 mg/ml de propóleo dos horas antes de infectar con PRV, observado y teñido con cristal violeta 24 horas post infección (250 X).

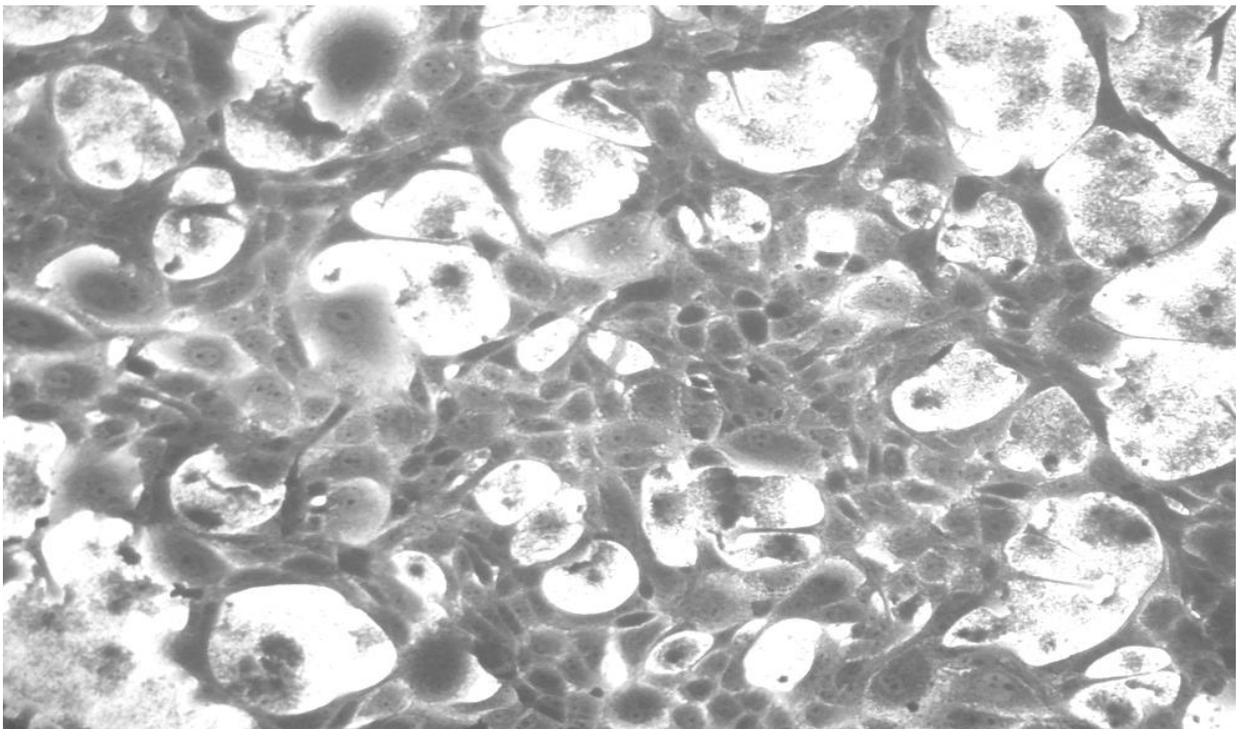


Figura 28. Cultivo celular MDBK tratado durante la infección con PRV. Cultivo tratado con 0.5 mg/ml de propóleo al mismo tiempo de realizada la infección con PRV, observado y teñido con cristal violeta 24 horas post infección (250 X).

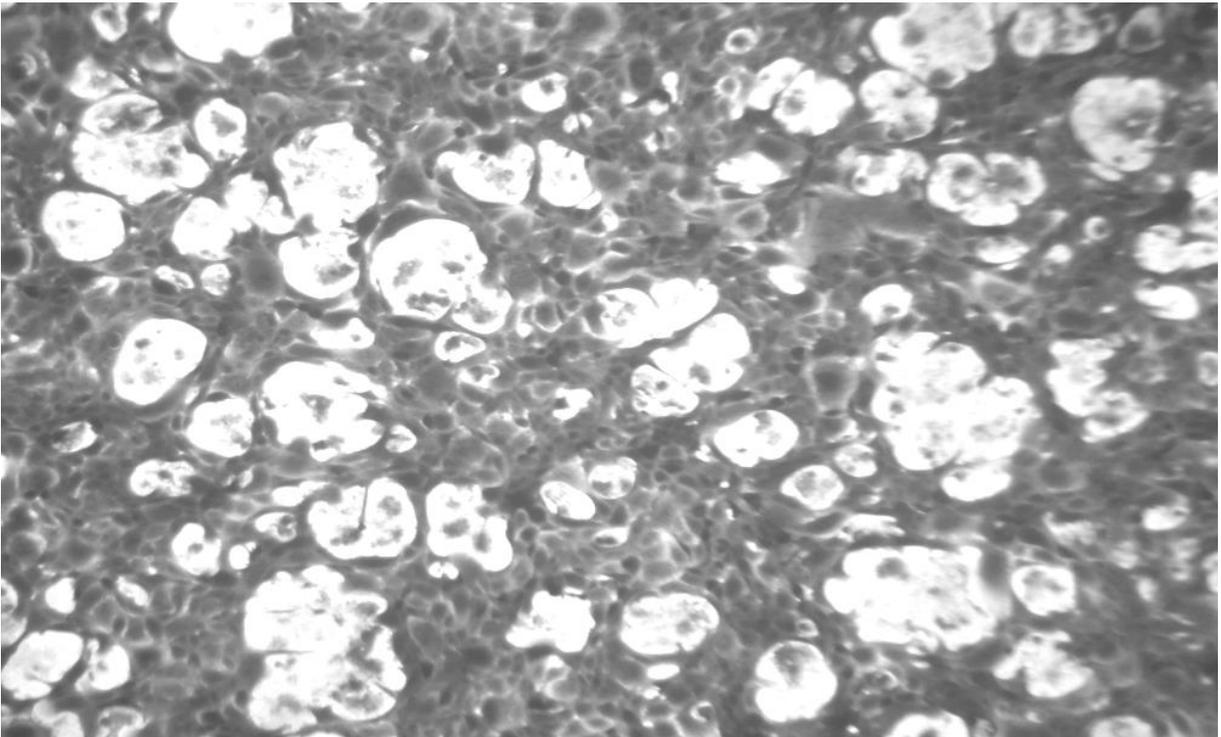


Figura 29. Cultivo celular MDBK tratado 2 horas post infección con PRV. Cultivo celular MDBK en medio DMEM, tratado con 0.5 mg/ml de propóleo dos horas después de infectar con PRV, observado y teñido con cristal violeta 24 horas post infección (250 X)

V. 3. 3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

De acuerdo a los resultados obtenidos en el conteo de ufp se observó que existe una diferencia significativa (**p < 0.01), lo cual indica una evidencia estadística para aceptar que el propóleo tiene un efecto antiviral en los cultivos infectados con el virus de la enfermedad de Aujeszky.

Cuadro 6.

Media aritmética de unidades formadoras de placa en los tratamientos previos con EEP a la infección con PRV de los cultivos celulares MDBK.

Ensayo	Promedio de UFP (±DS)
Control negativo	0
Control positivo (Cultivo infectado)	164.3 (±18.8)
Propóleo 2 horas antes de infección con PRV	86.7(±8.5)
Propóleo e infección simultánea con PRV	166.3(±22.3)
Propóleo 2 horas después de infección con PRV	154.3(±11.2)

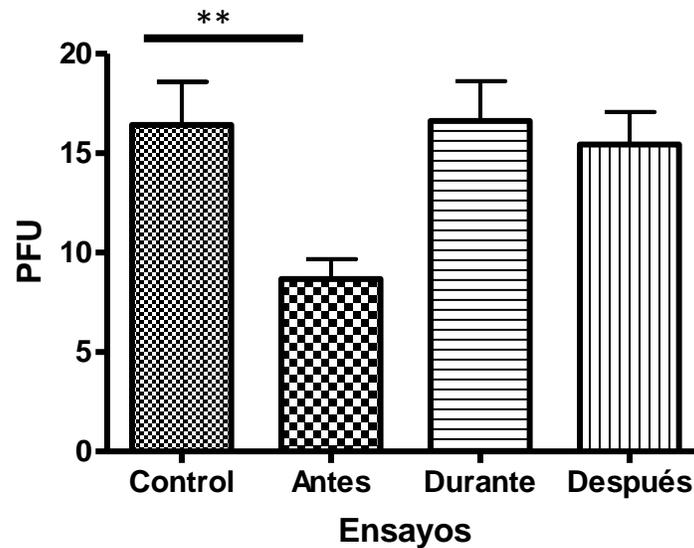


Figura 30. Gráfica de promedios de ufp en los cultivos celulares. Se obtuvo el número de ufp por triplicado por cultivo celular tomando en cuenta 10 campos de manera aleatoria, fijadas con paraformaldehído y teñidas con cristal violeta. Las barras representan la media +/- el error estándar por cultivo estudiado. 1, Cultivo celular MDBK infectado con 1.86×10^6 ; 2, Cultivo celular MDBK tratado con una dosis de 0.5 mg de propóleo 2 horas antes de la infección con PRV; 3, Cultivo celular MDBK tratado al mismo tiempo con 0.5 mg de propóleo y realizada la infección con PRV; 4, Cultivo celular MDBK tratado con 0.5 mg de propóleo 2 horas después de realizada la infección con PRV. (** $p < 0.01$). Prueba estadística ANOVA de dos vías.

V. 3. 4 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.

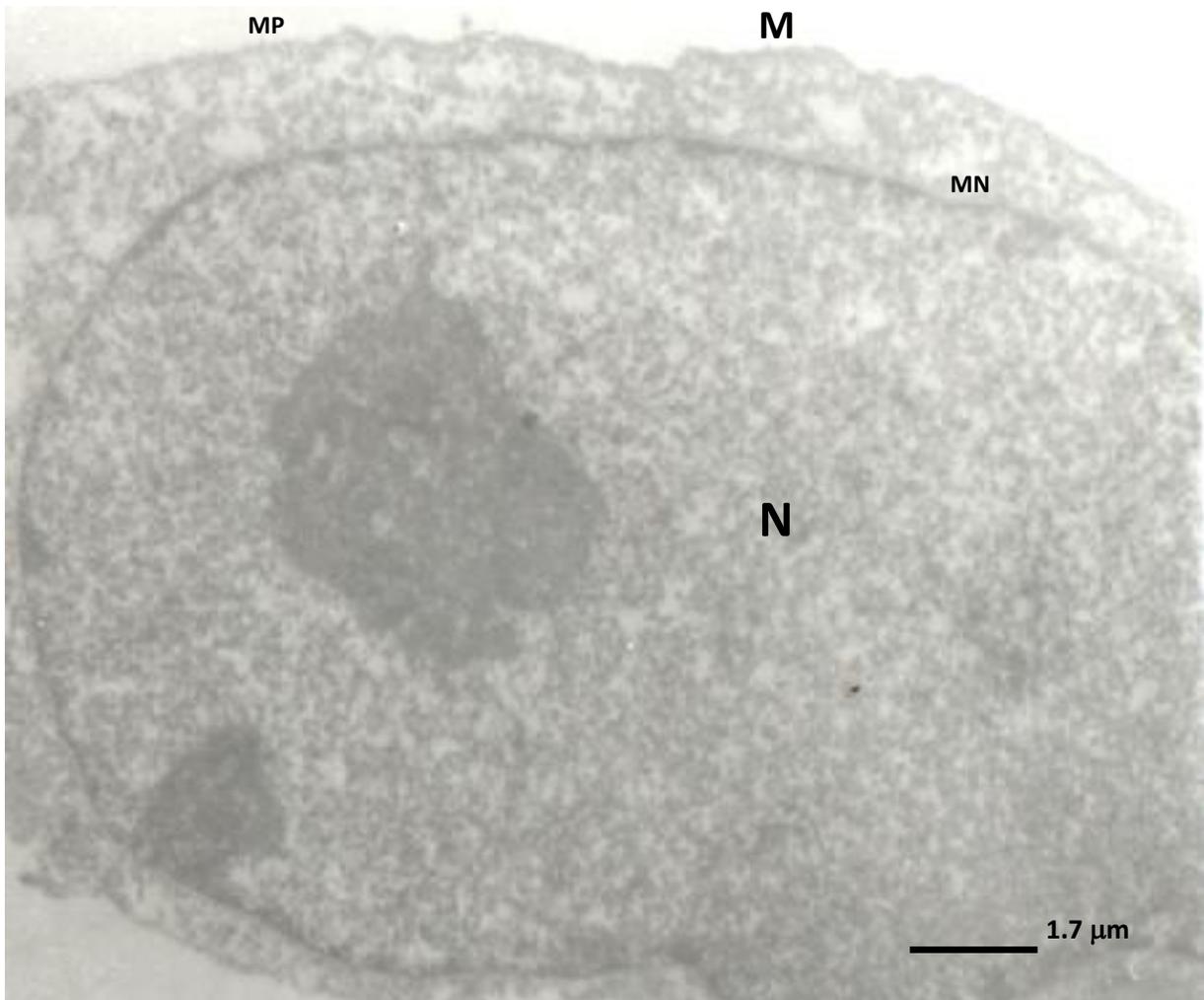


Figura 31. Célula MDBK examinada por Microscopía Electrónica de Transmisión. Se observa la membrana citoplasmática íntegra y continua de la célula MDBK (MP), membrana nuclear íntegra y delimitando AL núcleo (MN), y El núcleo de la célula delimitado, hay presencia de nucléolos y citoplasma celular homogéneo.

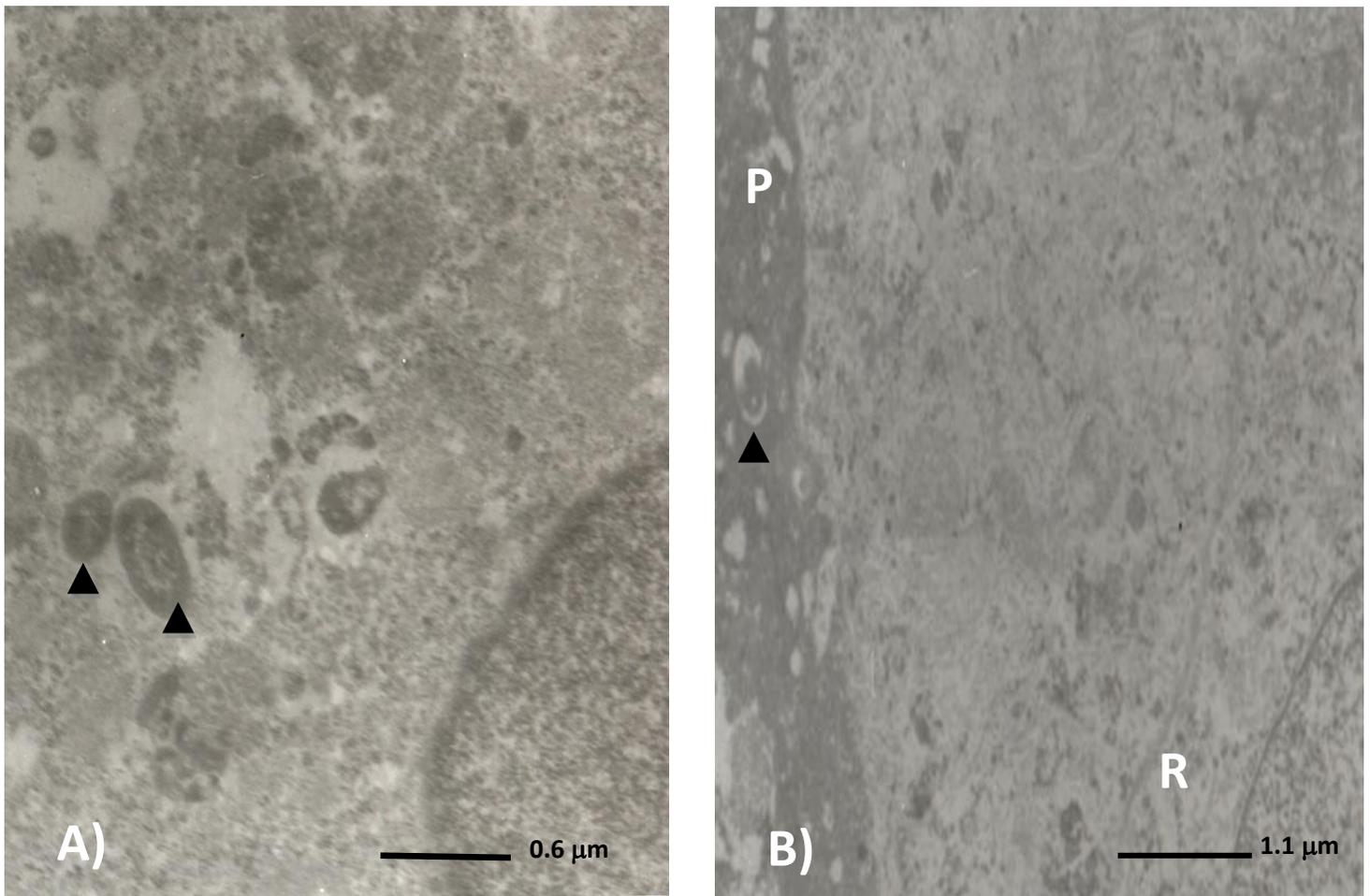


Figura 32. Célula MDBK observada al Microscopio Electrónico de Transmisión. A) Célula con infección viral de PRV en donde se observan partículas víricas (▲) B) Se observa célula tratada con propóleo dos horas antes de la infección viral con PRV en donde se aprecia gran de actividad en retículo endoplásmico (R) y una ausencia de partículas virales en el citoplasma celular, así como una estructura densa de aspecto grumoso en la parte externa de la membrana celular (P) en donde se localizan partículas víricas (▲).

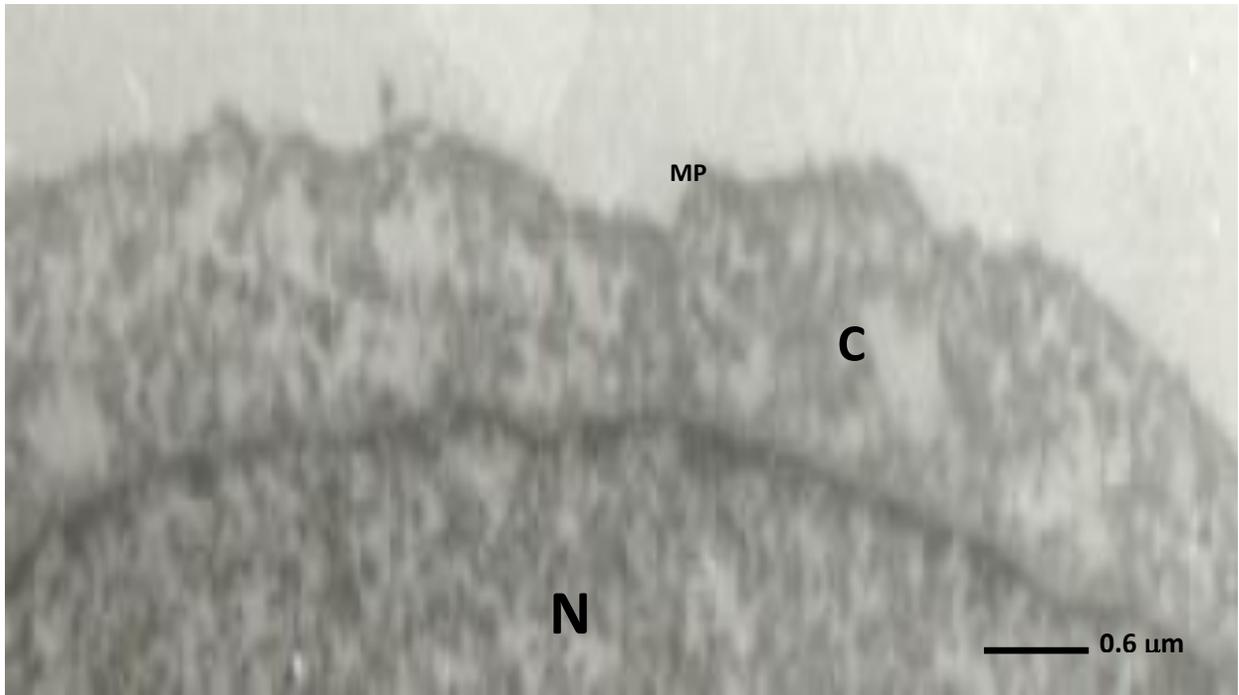


Figura 33. Membrana citoplasmática de célula MDBK. Se observa la amplificación de la membrana citoplasmática (M) de la figura 35 de célula MDBK incubada 24 horas, se aprecia la membrana (MP), núcleo (N) y citoplasma (C).

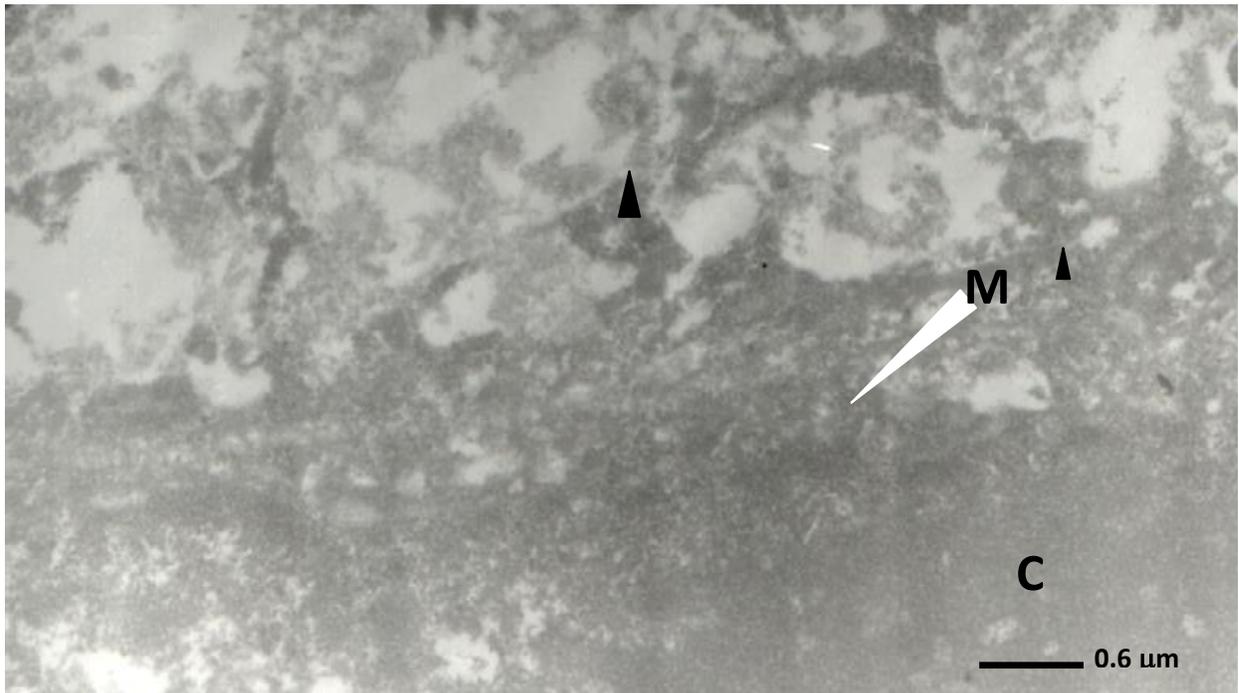


Figura 34. Membrana citoplasmática MDBK tratada con propóleo. Se muestra parte de la membrana celular de MDBK, tratada previamente dos horas antes de la infección con 1.86×10^6 ufp de PRV se muestran las partículas virales (▲) del citoplasma también se observa una estructura densa de aspecto grumoso localizada en la parte externa de la membrana celular (M) en la cual se encuentran adheridas estructuras víricas.

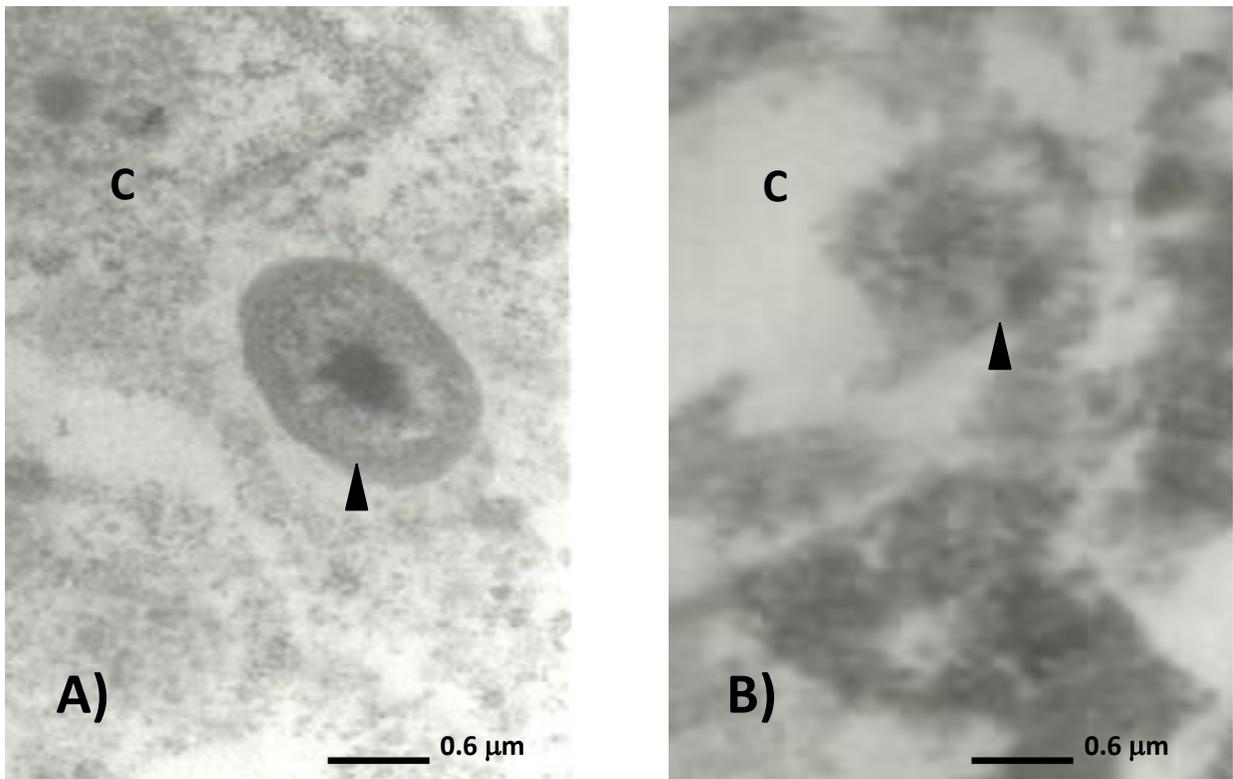


Figura 35. Estructuras virales de PRV. Se observan estructuras virales en el cultivo celular MDBK infectado con 1.86×10^6 ufp (B) Microfotografía ampliada de la figura 35 en la que se observan alteraciones en el virus PRV de cultivo celular MDBK tratado previamente con 0.5 mg/ml de propóleo 2 horas antes de la infección, encontrada en la membrana externa de la célula infectada.

V. I DISCUSIÓN

Al evaluar la toxicidad del propóleo Huleihel and Isanu (2002) refieren dosis de 1, 10, 50 y 100 mg/ml no inducen cambios ni alteraciones en la morfología celular, mientras que la concentración de 200 mg/ml si causa alteración de los cultivos celulares, en el presente trabajo se observó que la concentración máxima de extracto de propóleo que no causa cambios morfológicos en el cultivo celular es de 0.5 mg/ml y que a dosis mayores resultan ser tóxicas para la célula, esta diferencia de dosis se debe a la composición química de los propóleos ya que son de origen distinto y por lo tanto la proporción de los componentes varía en cada uno de los mismos encontrando diferente concentración de cada uno de los compuestos y su efectividad por lo tanto es distinta.

Un estudio realizado por Cedeño (1998) propone el empleo de diversas líneas celulares para la reproducción del efecto citopático de PRV, asimismo recalca que en las células MDBK el efecto citopático del virus es menos evidente en comparación con otras células y por lo tanto es la línea celular menos indicada para realizar la replicación de PRV ya que no es posible observar el efecto citopático a las 48 horas. En el presente trabajo se encontró que las células MDBK son una línea celular que es de fácil manejo y muestra un buen índice de proliferación, además al ser infectadas muestran el efecto citopático siendo la formación de placas a las 24 horas post-infección.

En un estudio realizado con el fin de inhibir el crecimiento bacteriano Londoño et al. (2010) señalan que las dosis de propóleo empleadas se encuentran en un rango de 0.125 mg/ml hasta 3 mg/ml presentando acción microbicida de manera efectiva. En cuanto a la dosis antiviral del propóleo y al tiempo de exposición al mismo Huleihel and Isanu (2002) reportan que el efecto antiviral *in vitro* del propóleo sobre el virus Herpes simple tipo I empleando una concentración de

50 mg/ml dos horas antes de la infección confiere una protección total (100%) evaluada mediante la ausencia de efecto citopático, señalando la dosis de 5 mg/ml proporcionó un 50% de protección, se reporta que dosis de 100 mg/ml proporcionadas 2 horas post-infección brindan un 80% de protección. Por otro lado también se comenta que en concentraciones de 0.0005 y 0.0004 mg/ml (Nolkemper et al. (2010) el propóleo produce inhibición del efecto citopático del virus Herpes simple tipo 2 en el cultivo celular. En éste estudio se encontró que la dosis de 0.5 mg/ml proporcionada dos horas antes de la infección no brinda una protección del 100% del efecto citopático, sin embargo si presenta una reducción significativa en el número de ufp en el cultivo celular. En contraste con los ensayos realizados durante y post infección en donde no se observa una disminución significativa en el número de ufp. También se muestra que dosis menores a 0.5 mg/ml no brinda protección o bloqueo antiviral.

En cuanto al disolvente empleado Schnitzler et al. (2010) reporta que con el virus de influenza el uso de etanol al 30% como disolvente de los extractos etanólicos de propóleo no causan daño celular por lo que es recomendado para su uso en cultivo. En este trabajo se encontró que el etanol a una dilución al 60% es tóxico para la célula causando alteración morfológica y lisis, mientras que a concentraciones menores no es posible lograr una buena dilución de los extractos, lo que obliga a emplear concentraciones mayores al 60%, lo cual resulta tóxico para la célula por lo que no es recomendable emplearlo como solvente, por lo tanto se propone el uso de DMSO ya que a bajas concentraciones es un buen disolvente del propóleo sin presencia de alteraciones morfológicas celulares ya que no resulta tóxico para la célula.

En relación con el mecanismo de acción, las imágenes obtenidas por microscopía electrónica nos permiten proponer un posible mecanismo de acción del propóleo en relación con el efecto antiviral, Mahmoud (2002) experimentó con el virus herpes simple y sugiere que el propóleo interviene directamente en el virus, lo que evita que exista una adhesión y una multiplicación en la célula, por lo que no se produce el efecto citopático, sin embargo no hay un sustento para tal aseveración ni señala algún compuesto del propóleo que interactúe para éste posible mecanismo de acción. Mientras que Carvalho (2013) comenta que los flavonoides y otros ácidos fenólicos son los responsables de la acción antiviral por lo que los efectos se dan en etapas tempranas de la infección ya que tienen una interacción con las proteínas del virus formando complejos inestables y por lo tanto se ven afectadas las etapas de adsorción y penetración a la célula, también comenta que se ven afectados a nivel de la inhibición de la polimerasa viral con lo que hay una interferencia con la síntesis del genoma del mismo. En el presente trabajo se observó una disminución de las ufp, al ser analizadas por microscopía electrónica las muestras de las células tratadas dos horas antes de la infección con PRV se observó la formación de una estructura densa en la membrana celular lo que sugiere la formación de una barrera que impide la penetración de los virus a la célula huésped, los hallazgos encontrados muestran la presencia de estructuras vesiculares en el citoplasma de la célula que en su interior muestra algunos agregados grumosos que nos permiten pensar en una posible destrucción del virus dentro de la célula, por lo que no se pudo llevar a cabo la síntesis de DNA causando un posible cambio metabólico dentro de la célula lo cual ayuda a la modificación de las condiciones intracelulares afectando la replicación y el ciclo viral. Finalmente se observaron partículas virales con alteración en su estructura lo cual nos sugiere un daño directo quizás a las proteínas de la envoltura del virus provocando una desestabilización de toda la estructura vírica y por lo tanto se ve afectada la penetración y el ciclo replicativo del virus. Éstos efectos en las muestras procesadas pueden deberse a la acción de los flavonoides y ácidos fenólicos ya que se ha demostrado que tienen acción antiviral afectando directamente proteínas (Carvalho, 2013), es importante recordar que el propóleo

del Estado de México (FESC) tiene un alto contenido de éstos componentes los que posiblemente entonces sean los responsables de la inactivación del virus o de la alteración inicial de glicoproteínas de la envoltura del virus, habría que evaluar si esta alteración en la estructura es reversible o irreversible ya que sería importante para estudios futuros.

Otros componentes que posiblemente estén actuando directamente sobre las proteínas del virus es el ácido cinámico y el ácido caféico ya que se ha encontrado que actúan directamente sobre proteínas (Carvalho, 2013), lo que nos sugiere que afecta nuevamente a glicoproteínas de membrana.

Se comenta que en algunos estudios realizados se ha evaluado la actividad de un componente del propóleo llamado quercetina por lo que tiene propiedades antivirales, Schnitzler et al.(2008) comenta que este mismo compuesto unido a glicoproteínas bloquea la interacción virus- célula, pero que también inhibe la fase intracelular del ciclo de replicación viral ya que inhiben la polimerasa viral y por lo tanto interfieren con la síntesis de ácido nucleico viral.

Cabe hacer notar que basados en la revisión bibliográfica sobre el propóleo mexicano y su actividad antiviral no se encontraron reportes de trabajos previos. Por lo anterior y en base a los resultados encontrados se puede considerar que el propóleo tiene un posible potencial en la prevención de PRV y otros virus Herpes.

V. II CONCLUSIONES

- A) Los cultivos celulares de MDBK resultan adecuados para realizar estudios *in vitro* con PRV ya que es evidente la presentación de efecto citopático del virus de Aujeszky.

- B) El extracto etanólico de propóleo (EEP) del Estado de México (FESC) puede emplearse en cultivos de células MDBK sin inducir alteraciones morfológicas a una dosis máxima de 0.5 mg/ml.

- C) Las dosis mayores a 0.5 mg/ml inducen alteraciones morfológicas y lisis celular en cultivos de células MDBK.

- D) El empleo de etanol al 70% es tóxico para la célula aunque se muestra como un buen disolvente para el extracto etanólico de propóleo.

- E) El tratamiento con 0.5 mg/ml de propóleo 2 horas antes de realizarse la infección con PRV mostró actividad antiviral al provocar una disminución de ufp en el cultivo celular.

- F) El tratamiento con propóleo al mismo tiempo que se realiza la infección viral con PRV y dos horas post infección no muestran una disminución en las ufp en el cultivo celular.

V. III PERSPECTIVAS

- a)** Evaluar la actividad antiviral del Extracto Etanólico del Propóleo (EEP) en un modelo experimental *in vivo*.

- b)** Elaboración de EEP para el tratamiento o prevención de enfermedades del cerdo considerando la administración en alimento o en el agua de bebida, cabe resaltar que es de suma importancia tomar en cuenta para llevar a cabo éste punto la biodisponibilidad del producto.

- c)** Realizar una evaluación comparativa de la actividad antiviral de diversos propóleos mexicanos.

IX ANEXOS

ANEXO I

Protocolo de Microscopía Electrónica para Cultivo celular infectado con PRV.

FIJACIÓN: Las células son prefijadas con glutaraldehído al 2.5% por 1 hora a temperatura ambiente.

Se lavan las células 3 veces con PBS (buffer empleado en el fijador) cada lavado por 10 minutos

POST-FIJACIÓN: Las muestras se incuban por 1 hora a temperatura ambiente en una solución de O_5O_4 al 1%.

Lavar las muestras tres veces con amortiguador PBS, cada lavado por 10 minutos.

DESHIDRATACIÓN: ésta se lleva a cabo con etanol.

30% ET-OH 10 min.

50% ET- OH 10 min.

70% ET-OH 10 min.

80% ET-OH 10 min.

90% ET-OH 10 min.

100% ET-OH 2x 20 minutos cada uno.

INFILTRACIÓN: Empleando resina y alcohol

RESINA (Mezcla de Spurr [ANEXO II]): ALCOHOL

1 : 3 2 horas o toda la noche.

2 : 2 2 horas.

3 : 1 2 horas.

Resina 100% 2 horas o toda la noche.

INCLUSIÓN: Resina 100% 1 hora.

POLIMERIZACIÓN: 36 horas 60°C.

Posteriormente las muestras son cortadas con un micrótopo y teñidas con acetato de uranilo al 4% en alcohol al 70% y citrato de plomo (Reynolds)

Realizar la observación en un microscopio electrónico de transmisión.

ANEXO II

Fórmula para la elaboración de mezcla de Spurr.

ERL-4206 (g)	10
DER-736 (g)	6
NSA (g)	26
S-1 (ml)	0.40

Empleando un grado de dureza 2 (Medio)

- ERL-4206: Vinyl Cyclohexane dioxide (dióxido de vinilciclohexano).
- DER-736: Diglydicyl Ether of Polypropylene Glycol (Eter diglicidilico de glycol polipropileno).
- NSA: Nonenyl succinic anhydride grado em. (anhídrido nonenilsuccinico).
- S-1: Dimethyl amino etanol (dimetil aminoetanol)

ANEXO III

Protocolo para realizar citrato de plomo (Reynolds)

Citrato de plomo 1.33 gramos.

Citrato de sodio 1.76 gramos.

- a) Disolver en 30 ml de agua bidestilada por 15 a 20 minutos.
- b) Agregar hidróxido de sodio (8 ml).
- c) Aforar a 50 ml con H₂O bidestilada.
- d) Dejar reposar toda la noche para poder usarla.

X REFERENCIAS.

ALCÁNTAR F. (2011). Cambios en el citoesqueleto de actina inducidos por el virus de pseudorrabia en células 3T3, MDCK y C6. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

BALDEZ M. B. (2011). Efecto de propóleos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento *in vitro* de cepas de cándica spp. Aisladas de muestras de pacientes atendidos en el instituto nacional de perinatología Isidro Espinoza de los Reyes (INPerIER). Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitán, UNAM.

BAGLA, V. P., MCGAW, L. J., & ELOFF, J. N. (2012). The antiviral activity of six South African plants traditionally used against infections in ethnoveterinary medicine. *Veterinary microbiology*, 155(2-4), 198–206. doi:10.1016/j.vetmic.2011.09.015

BOGDANOV, S., & HENRY, K. (2012). Propolis : Composition , Health , Medicine : A Review, (January), 1–35.

CARVALHO, O. V, BOTELHO, C. V, FERREIRA, C. G. T., FERREIRA, H. C. C., SANTOS, M. R., DIAZ, M. A N., ... SILVA, A. (2013). In vitro inhibition of canine distemper virus by flavonoids and phenolic acids: implications of structural differences for antiviral design. *Research in veterinary science*, 95(2), 717–24. doi:10.1016/j.rvsc.2013.04.013

CUSHNIE, T. P. T., & LAMB, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(5), 343–356. doi:10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002

CEDEÑO I, ROLO M, PALENCIA L, LÓPEZ. N. (1998). Susceptibilidad de cinco líneas celulares estables al virus de pseudorrabia. Revista científica, FCV-LUZ/ Vol. VIII N° 1, 77-84.

DAL POZZO, F., GALLIGIONI, V., VACCARI, F., GALLINA, L., BATTILANI, M., & SCAGLIARINI, A. (2010). Antiviral efficacy of EICAR against canine distemper virus (CDV) *in vitro*. *Research in veterinary science*, 88(2), 339–44. doi:10.1016/j.rvsc.2009.08.010

DATEMA R, ERICSON H, FIELD A, LARSSON, STENBERG K. (1997). Critical determinants of antiherpes efficacy of buciclovir and related acyclovir guanosine analogs. *Antiviral Res.* 7:303-316.

DEZENGRINI et al. (2006). *Journal of Virological Methods.* 137:51-57.

- EARNSHAW D. L., T. H. BACON, S. J. DARLISON, K. EDMONDS, R. M. PERKINS, R. A. VERE HODGE.** (1992). Mode of antiviral action of penciclovir in MRC-5 cells infected with herpes simplex virus type 1 (HSV-1), HSV-2, and varicella-zoster virus. *Antimicrob. Agents Chemother.*36: 2747-2757.
- ECHEVERRÍA M.G, NOSETTO O.** (1999). Comportamiento antigénico de cepas del virus de la enfermedad de Aujeszky. *Analecta veterinaria.* 19,1: 1-10.
- ECHEVERRÍA M.G, NOSSETO O.** (2000). Actualización de la enfermedad de Aujeszky. *Analecta veterinaria.*20, 2:22-30.
- FENNER F.** (1992). *Virología Veterinaria.* Zaragoza, España, Ed. Acribia.
- FLINT S.J, ENQUIST L, RACANIELLO, R.** (2004). *Principles of virology.* Segunda edición, Whashington, ASM Press.
- FORMICA, J.V., REGELSON, W.** (1995). Review of biology of quercetin and related bioflavanoids. *Food and Chemical Toxicology.* 33: 1061–1080.
- FUCHS, W., BACKOVIC, M., KLUPP, B. G., REY, F. A, & METTENLEITER, T. C.** (2012). Structure-based mutational analysis of the highly conserved domain IV of glycoprotein H of pseudorabies virus. *Journal of virology,* 86(15), 8002–13. doi:10.1128/JVI.00690-12
- GONZÁLEZ G. A., MÉNDEZ R.** (1997). *Propóleos: un camino hacia la salud*”, Ed. Cuarto día, Primera edición, La Habana.
- GUTIERREZ, H. E.** Actividad antimicrobiana y perfil químico de propóleos mexicanos sobre cepas de *Pasteurella multocida* aisladas de conejos (2011). Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.
- HULEIEHL, PHD AND VLADIMIR ISANU, MD.**(2012). *Anti-herpes Simplex Virus Effect of an Aqueous Extract of Propolis*”, Mahmoud IMAJ. 4: 923-927.
- HIERHOLZER JC, KILLINGTON RA.** (1996). Quantitation of virus. In: Mahy BWJ, Kangro HO *Virology Methods Manual.* Academic Press, Boston, USA, pp. 35-45.
- JIALING H., HELEN M. LAZEAR, HARVEY M.** (2011) Completely assembled virus particles detected by transmission electron microscopy in proximal and mid-axons of neurons infected with herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2 and pseudorabies virus”.. *Friedman.Virology.* 409: 12-16.

- KUJUMGLEV I. TSEVELCOVA Y, SERKEJIEVA.** (1999). Antibacterial, Antifungica y Antiviral Activity of Propolis of different geographic origin.
- LINARES A.S.** (2009). El própolis y el regaliz. Evidencia científica y actividad biológica. Laboratorio de Farmacia de la Universidad de Barcelona.
- LONDOÑO et al.** (2010) Antibacterial comparative study between extracts of mexican propolis and of three plants which use *apis mellifera* for its production, 2010; 9, 8:1250-1254.
- LONDOÑO A.** (2007). Estudio de la actividad antifungica de un extracto de propóleo de la abeja *apis mellifera* proveniente del estado de México, 21-1: 49-55.
- MAHMOUD H.PHD AND ISANU MD.** (2002). Anti-herpes Simplex Virus Effect of an Aqueous Extract of Propolis. IMAJ. 4: 923-927.
- METTENLEITER TC.** (2000). Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: The virus and molecular pathogenesis. Vet Res. 31: 99-115
- METTENLEITER, T. C., KLUPP, B. G., & GRANZOW, H.** (2009). Herpesvirus assembly: an update. *Virus research*, 143(2), 222–34. doi:10.1016/j.virusres.2009.03.018
- NOLKEMPER, S., REICHLING, J., SENSCH, K. H., & SCHNITZLER, P.** (2010). Mechanism of herpes simplex virus type 2 suppression by propolis extracts. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 17(2), 132–8. doi:10.1016/j.phymed.2009.07.006
- PENSAERT M.B.**(1989).Virus Infections of porcines. Elsevier Science Publishers B.V. Oxford. Pp 34-59.
- PEJSAK Z.K., TRUSZCZNSKY M.J.** (2006). Aujeszky's disease (pseudorabies). In: Straw Be, Zimmerman J, Taylor DJ. Diseases of swine. 9a ed. Blackwell, Iowa. Pp 419-433.
- PLONAIT H., BICKHART K.** (2001). Manual de las enfermedades del cerdo. Edit. Acribia, S.A. Zaragoza, España. pp. 215-221.
- POMERANZ, E., REYNOLDS,A. AND HENGARTNER, C.** (2005). Molecular Biology of Pseudorabies Virus: Impact on Neurovirology and Veterinary Medicine. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2005; 462-500.

Referencias

- ROJAS, N.** (2008) Variabilidad biológica de los propóleos de cuba. Actas del XXII. Seminario Americano de Apicultura. Julio28-31 Mérida, Yucatán, ,59-66.
- SFORCIN, J. M.** (2007). Propolis and the immune system: a review. *Journal of ethnopharmacology*, 113(1), 1–14. doi:10.1016/j.jep. 05.012
- METTENLEITER S., RZIHA, H. J.** (1989). Pseudorabies virus displays variable numbers of a repeat unit adjacent to the 3' end of the glycoprotein gII gene. *The Journal of general virology*, 70 (Pt 5), 1239–46. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2543777>
- SCHNITZLER, P., NEUNER, A., NOLKEMPER, S., ZUNDEL, C., NOWACK, H.** (2010). Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds.. *Phytotherapy Research* 24: S20-S28.
- SCHNITZLER, P., NOLKEMPER, S., STINTZING, F.C., REICHLING, J.** (2008). Comparative In vitro Study on the Anti-Herpetic effect of phytochemically characterized aqueous and ethanolic extracts of *Salvia officinalis* grown at two different locations. *Phytomedicine* 15, 62–70.
- VRUBLEVSKAYA, ALESKSEY N. KORNEV, SERGEY V. SMIRNOV, OLEG S. MORENKOV** (2002). Cell-binding properties of glycoprotein B of Aujeszky's disease virus", *Virus Research* 86: 7-19.
- WHEELER J.G., OSORIO F.A.** (1991). Investigation of sites of pseudorabies virus latency, using polymerase chain reaction. *American Journal of Veterinary Research*. 52: 1799-1803.
- Senasica SAGARPA. 2012. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad alimentaria. <http://www.senasica.gob.mx>