



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

Evaluación *in vitro* de la actividad antiviral de dos propóleos del Estado de México contra el virus del Distemper canino.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNOSTICA

P R E S E N T A:

YAZMIN MONSERRAT MARTINEZ BISTRAIN

ASESOR:

Dr. CARLOS IGNACIO SOTO ZÁRATE

COASESOR:

Dr. TONATIUH ALEJANDRO CRUZ SÁNCHEZ



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DEPARTAMENTO DE

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Evaluación in vitro de la actividad antiviral de dos propóleos del Estado de México contra el virus de Distemper canino.

Que presenta la pasante: **Yazmín Monserrat Martínez Bistrain**

Con número de cuenta: 309347376 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 30 de Mayo de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dr. Carlos Ignacio Soto Zárate</u>	
VOCAL	<u>Q.F.B. Leticia Cubillo Carrillo</u>	
SECRETARIO	<u>M. en C. Paola Edith Briseño Lugo</u>	
1er. SUPLENTE	<u>Dra. Dolores Molina Jasso</u>	
2do. SUPLENTE	<u>M. en C. Betsabé Rodríguez Pérez</u>	

NOTA: los sindocales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).



“En este lugar perdemos demasiado tiempo mirando hacia atrás. Camina hacia el futuro, abriendo nuevas puertas y probando cosas nuevas, se curioso... porque nuestra curiosidad siempre nos conduce por nuevos caminos”

- Walt Disney-



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Otorgan el presente

3er CONGRESO DE CIENCIA, EDUCACIÓN Y TECNOLOGÍA



RECONOCIMIENTO

A: Y. M. Martínez Bistrain, F. R. González Díaz, B. Rodríguez Pérez M.
J. González Búrquez, T. A. Cruz Sánchez, C. I. Soto Zárate

Por haber obtenido el Primer lugar en cartel en el área de Ciencias
Biológicas

Con el título de cartel:

Actividad antiviral *in vitro* de dos propóleos
mexicanos en contra del virus de Distemper Canino

que se llevó a cabo del
19 al 22 de junio de 2017
en las instalaciones de esta Facultad

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Estado de México, junio de 2017

Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez
Jefe de la División de Ciencias Químico Biológicas

3er CONGRESO



3er CONGRESO DE
CIENCIA, EDUCACIÓN Y
TECNOLOGÍA



AGRADECIMIENTOS

Dios tiene caminos que son aptos para nosotros y coloca lo que más deseamos sin darnos cuenta. Hoy en día sé que me encanta el camino que Dios me puso a andar y la maravillosa familia que él me concedió para caminar, así como las bellas personas que se tropezaron y son parte de mi familia que yo escogí para seguir andando.

Dios me dio a mi abuelita Carmelita que hoy acompaña mis pasos en el cielo, ella fue la primera que me dio fuerzas y las alas para andar, con ella empezó la unión de esta gran familia a la cual agradezco a Dios. Cuando la vida nos sonríe nos da abuelitos como Papá Esteban y Mamá Chata, que con su grandeza y sabiduría me han enseñado gran parte de este mundo guiándome y esforzándose para que hoy tenga este pequeño gran logro, el primero de muchos que vendrán y que espero en Dios tengan el gusto de verlos.

A lo largo de mi camino mis tíos Paco y mi tío Gera me enseñaron a luchar por los sueños y la decisión para hacerlos realidad, mi tía Ale y mi tía Lupe ellas me enseñaron la alegría y la fortaleza de seguir a pesar de los problemas. Ella es mi gran amiga, confidente y lo más alegre de la familia mi prima Ximena gracias mi pequeña por ser tú, a mi pequeño Víctor y pequeña Isabel por darme sonrisa y travesuras, los quiero mis niños. En esta familia encontré una persona seria pero con un corazón muy grande, mi pequeño Raúl, gracias por ser como eres hermanito. Yo no tuve primos tuve hermanos y ellos son con los que caminaron en mis travesuras, uno se convirtió padre de una hermosa niña la cual te agradezco Diego y el siguiente es un medico extraordinario, contigo conocí y aprendí pasión de luchar por lo que más amas hacer, el no dejarlos y querer lograr grandes cosas.

Ellos comparten mi camino desde se enteraron que sería un pequeño ser latoso e insoportable. Papi gracias por enseñarme que las cosas sencillas de la vida son las más complicadas, pero nunca hay que dejarlas a medias siempre hay que luchar y ser valiente para poder seguir, a mi Mami gracias por ser el pilar de todos mis logros, tú has visto mis frustraciones, mis alegrías y mis tristeza, no sabes cómo agradezco que seas mi mama y siempre apoyarme .

También a esas personas amigables, confiables e interesantes que de algún modo me ayudaron a dar lo mejor de mí en esta etapa, mis amigos David, Diana, Claudia Camacho, Alma Ortiz, Jonatán, Sandy, Alma Escalante, Ximena e Itzel. Mis tocheras hermosas (Karla, Yubia, Ana, Clara, Brenda, Sandy, Angi, Vicky, Marlen, Claudia, Pete, Dani, Aideth, Adriana y Marisol), mis coachs: Ceci,



Fernando y Héctor, de tod@s ustedes aprendí la lealtad, el compañerismo, y alguna que otra gracia.

A mis profesores y doctores Nacho, Mary, Francisco, Betsa, Tona, Gerardo y José Luis por confiar en mí y confiar que este proyecto se lograría en mis manos, por enseñarme, regañarme, por tener paciencia y divertirse conmigo.

A mi compañero que en este camino a decidió seguirme y acoplarse conmigo que pase lo que pase será mi acompañante que espero darle una grata vida a mi lado, llena de sueños, esperanzas y buenos momentos, por eso y más Gracias Enrique por estar en mi camino y a Dios por ponerte en él.

Gracias a todos por estar en mi camino, por impulsar mis sueños, mis victorias, y hacer más amenas mis amarguras, pequeños tropiezos. Y hacerme levantar a diario y ser mejor.

"La familia es para los creyentes una experiencia de camino, una aventura rica en sorpresas, pero abierta sobre todo a la gran sorpresa de Dios, que viene siempre de modo nuevo a nuestra vida"

-Juan Pablo II



AGRADECIMIENTO

El presente trabajo se realizó gracias al apoyo otorgado por los siguientes proyectos:

- UNAM, DGAPA, PAPIIT-IT200915, “Desarrollo de productos con propóleo para su uso en la Pasteurelisis del conejo, el Distemper canino y la otitis canina”
- UNAM, FESC, PIAPI 1602 y UNAM, FESC, PIAPI 1632.

LUGAR DE REALIZACION

El trabajo se realizó en los siguientes laboratorios:

Laboratorio número 4 “Morfología veterinaria y biología molecular” de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 4, UNAM. Bajo la asesoría del Dr. Carlos Gerardo García Tovar, Dr. Carlos Ignacio Soto Zárate, cDra. María de Jesús Búrquez González y el M. C. Francisco Rodolfo González Díaz.

Laboratorio número 6 “Microbiología” de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 4. UNAM. Bajo la asesoría del Dr. Tonatiuh Cruz Sánchez y la M. C. Betsabé Rodríguez Pérez.



ÍNDICE

Abreviaturas	i
Índice de Figuras	ii
Índice de Tablas	iii
Glosario	iv
RESUMEN	1
1.0 INTRODUCCIÓN	2
1.1 Generalidades del Propóleo	2
1.2 Compuestos fenólicos	4
1.3 Virus del <i>Distemper canino</i> (VDC)	6
1.3.1 Diagnóstico	9
2.0 JUSTIFICACIÓN	13
3.0 HIPÓTESIS	13
4.0 OBJETIVO GENERAL	14
5.0 OBJETIVOS PARTICULARES	14
6.0 DISEÑO EXPERIMENTAL	15
7.0 MATERIALES Y MÉTODOS	16
7.1 Etapa 1	16
7.1.1 Extracto de Propóleo	16
7.1.2 Almacenamiento de las muestras	17
7.1.3 Características organolépticas de los extractos de propóleos	18
7.1.4 Especificaciones químicas	18
7.1.4.1 Cuantificación de Compuestos Fenólicos Totales	18
7.1.4.2 Cuantificación de Flavonoides	19
7.2 Etapa 2	19
7.2.1 Línea celular y virus	19
7.2.2 Ensayo de citotoxicidad y viabilidad celular	19
7.2.3 Identificación del virus de <i>Distemper canino</i> por RT-PCR punto final	20
7.3 Etapa 3	22
7.3.1 Evaluación de la actividad antiviral	22
7.3.1.1 Tratamiento con los extractos en células Vero infectadas con Virus de <i>Distemper canino</i>	22
7.3.1.2 Análisis estadístico	22



8.0 RESULTADOS	23
8.1 Características de los Propóleos.....	23
8.1.1 Especificaciones Organolépticas de los Propóleos.....	23
8.2 Cuantificación de Fenoles Totales y Flavonoides.....	25
8.3 Titulación del Virus.....	26
8.4 Efecto citopático del virus de <i>Distemper canino</i>	27
8.5 Ensayos de Citotoxicidad.....	28
8.5.1 Citotoxicidad del DMSO.....	29
8.5.2 Citotoxicidad del EEP de la FESC.....	30
8.5.3 Citotoxicidad del EHP de Toluca.....	31
8.6 Identificación del virus del Distemper canino por RT-PCR punto final.....	32
8.7 Evaluación Antiviral del EEP de FESC.....	33
8.8 Evaluación Antiviral del EHP de Toluca.....	35
9.0 DISCUSIÓN	37
10.0 PERSPECTIVAS	39
11.0 CONCLUSIONES	40
12.0 ANEXOS	41
13.0 REFERENCIAS	49



ABREVIATURAS

- ❃ ADN. Acido Desoxirribonucleico
- ❃ ADNc. Acido Desoxirribonucleico complementario
- ❃ BrE. Bromuro de Etidio
- ❃ CC₅₀. Concentración citotóxica media
- ❃ CFT. Concentración de Fenoles Totales
- ❃ E. Proteína de envoltura
- ❃ EEP. Extracto Etanólico de Propóleo
- ❃ EHP. Extracto Hidrosoluble de Propóleo
- ❃ F. Proteína de fusión
- ❃ FC. Folin Ciocalteau
- ❃ DMEM. Medio Eagle modificado por Dulbecco
- ❃ DMSO. Dimetil sulfóxido
- ❃ dNTP's. Deoxinucleótidos trifosfatos
- ❃ DTT. Ditiotreitól
- ❃ HN. Hemaglutinina
- ❃ HPLC. High Performance Liquid Chromatography
- ❃ INAFED. Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal
- ❃ L. Proteína grande
- ❃ msnm. Metros sobre el nivel del mar
- ❃ M. Proteína de matriz
- ❃ MDBK. Madin Darby Bovine Kidney
- ❃ M-MLV RT. Retrotranscriptasa del virus de la leucemia murina de Moloney
- ❃ MTT. 3-(4,5 dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenill tetrazolio bromuro
- ❃ nm. Nanómetros
- ❃ PCR. Reacción en Cadena de la Polimerasa
- ❃ qPCR. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (cuantitativa)
- ❃ RNA. Ácido Ribonucleico
- ❃ RNP's. Ribonucleoproteínas
- ❃ RNAm. Ácido Ribonucleico mensajero



- 🐾 RT. Retrotranscriptasa
- 🐾 RT-PCR. Retrotranscripción y Reacción en cadena de la polimerasa
- 🐾 SNC. Sistema nervioso central
- 🐾 STAT. Transductor de la señal y activadores de la transcripción
- 🐾 TCID₅₀. Dosis infecciosa media en cultivo de tejido
- 🐾 VDC. Virus de *Distemper canino*
- 🐾 Vero. Células de riñón de mono verde africano
- 🐾 VIH. Virus de Inmunodeficiencia Humana

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Abeja recolectando polen.

Figura 2. Estructura básica de los flavonoides.

Figura 3. Esquema representativo del virus de *Distemper canino*.

Figura 4. Representación gráfica del ciclo de los Paramixovirus.

Figura 5. Proceso de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Figura 6. Mapa del Municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

Figura 7. Mapa del Municipio de Toluca, Estado de México.

Figura 8. Condiciones para la Reacción en Cadena de la Polimerasa punto final.

Figura 9. Propóleo de FES Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

Figura 10. Propóleo de Toluca, Estado de México.

Figura 11. Porcentaje de fenoles y flavonoides de los propóleos.

Figura 12. Efecto citopático del virus de *Distemper canino*.

Figura 13. Curva de citotoxicidad del DMSO.

Figura 14. Curva de citotoxicidad del propóleo de la Facultad de Estudios



Superiores Cuautitlán.

Figura 15. Curva de citotoxicidad del propóleo de Toluca.

Figura 16. Identificación del virus de *Distemper canino* por RT-PCR punto final.

Figura 17. Evaluación antiviral del Extracto Etanólico de Propóleo (EEP) de FESC con el método colorimétrico de MTT.

Figura 18. Tratamiento con Extracto Etanólico de Propóleo (EEP) de FESC.

Figura 19. Evaluación antiviral del Extracto Hidrosoluble de Propóleo de Toluca con el método de MTT.

Figura 20. Tratamiento con Extracto Hidrosoluble de Propóleo de Toluca.

Figura 21. Curva de calibración de ácido gálico.

Figura 22. Curva de calibración de quercetina

Figura 23. Ensayo colorimétrico de MTT.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades organolépticas del Propóleo.

Tabla 2. Concentración y porcentaje de Fenoles y Flavonoides.

Tabla 3. Concentración citotóxica media y concentración empleada de los extractos de propóleo.

Tabla 4. Curva de calibración para cuantificación de fenoles totales.

Tabla 5. Curva de calibración para la cuantificación de flavonoides.



GLOSARIO

Sincitio.- Célula multinucleada que resulta de la fusión de varias células uninucleadas con reabsorción de las membranas correspondientes.

Amplicones.- Es un conjunto de secuencias de DNA amplificadas y como tal un producto de una PCR

Tripsina.- Enzima del jugo pancreático que transforma las proteínas en aminoácidos. Tripsinas se utilizan para volver a suspender las células adherentes a la pared de placa de cultivo celular durante el proceso de recolección de las células.

In vitro.- Es la técnica que se realiza fuera del organismo, dentro de un tubo de ensayo, en un medio de cultivo, o en cualquier otro ambiente artificial.

Citopático.- Efecto de la infección viral sobre el cultivo celular, visible al microscopio o por examinación visual directa. Provoca cambios en la morfología celular, lisis celular, vacuolización, formación de sincitios, formación de cuerpos de inclusión, etc.

DMEM.- Una variación del medio desarrollado por Harry Eagle para mantener células en el cultivo de tejidos, llamado medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), (medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco / Vogt modificado), contiene cuatro veces más de las vitaminas y aminoácidos presentes en la fórmula original y dos a cuatro veces más glucosa. Además, contiene hierro y rojo fenol. DMEM es adecuado para la mayoría de los tipos de células, incluyendo humanos, mono, hamster, rata, ratón, pollo y pescado.

Antioxidante. - Compuestos que protegen contra el daño celular producido por moléculas llamadas radicales libres sin oxígeno que constituyen una causa principal de enfermedad y envejecimiento.

Fotoquímico.- Son diversas sustancias con clasificadas según su estructura química según los siguientes grupos: carotenos, fenoles, alcaloides y compuestos azufrados.

Radicales Libres.- Átomos o conjuntos de ellos que disponen de un electrón sin aparejar, una condición que les confiere inestabilidad y reactividad. En búsqueda de equilibrio, los átomos que tienen un electrón desaparejado intentan obtener un electrón adicional a costa de otro átomo. Una vez logrado



esto, el átomo que cede el electrón pasa a convertirse en un radical libre y trata, entonces, de recuperar ese electrón en un tercer átomo.

Virosis.- Denominación genérica de las enfermedades causadas por virus.

Lisis.- Destrucción de una célula, normalmente por rotura de la membrana celular mediante un agente específico o un proceso físico.



RESUMEN

En el presente trabajo se comprobó la presencia de actividad antiviral en los extractos de propóleos, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC) y de Toluca, en un modelo *in vitro* utilizando cultivos de células Vero infectadas con el virus de *Distemper canino*. Los extractos de propóleo fueron evaluados por sus propiedades organolépticas: color, olor, sabor y consistencia, y analizados químicamente para cuantificar la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides, responsable de la actividad biológica de este. El extracto hidrosoluble de propóleo (EHP) de Toluca presento una mayor cantidad de compuestos fenólicos y una menor de flavonoides en comparación con el extracto etanólico de propóleo (EEP) de FESC.

Los ensayos de citotoxicidad permitieron determinar las concentraciones citotóxicas medias (CC₅₀) y las concentraciones a emplear en los tratamientos antivirales, para el extracto de propóleo de FESC fue de 0.25 mg/ml y para el propóleo de Toluca de 1 mg/ml. Los ensayos de infección fueron diseñados para realizar el tratamiento antiviral a tres diferentes tiempos: 1) Extracto de propóleo aplicado dos horas antes de la infección, 2) Extracto de propóleo aplicado simultáneamente a la infección y 3) Extracto de propóleo aplicado dos horas después de la infección.

El estudio reveló que los extractos de propóleos evaluados poseen una buena actividad antiviral cuando se utilizan simultáneamente y después de la infección del virus de *Distemper canino*, de tal manera que los resultados obtenidos con ambos extractos fueron estadísticamente significativos en relación con el control positivo (células Vero infectadas con el virus de *Distemper canino*).



1.0 INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del Propóleo

El interés del hombre por las colmenas data de hace miles de años, si bien la miel es el producto apícola más antiguo, existen otros de gran interés como las ceras, el polen, la jalea real, el veneno de abeja y el propóleo (Bankova, 2005). El propóleo es un material resinoso que las abejas (*Apis mellifera* L.) elaboran a partir de exudados de árboles, plantas y flores; tiene fines desinfectantes, cerrar grietas, reducir vías de acceso y consolidar la estructura de la colmena (Burdock, 1998; Bankova, 2005; Bedascarrasbure *et al.*, 2006).

La palabra propóleo proviene del griego *pro*; en defensa o para, y *polis*; ciudad. Su importancia radica en que las abejas lo usan para proteger paredes internas y proteger a la colonia de enfermedades, cubrir los cadáveres de los intrusos que murieron dentro de la colmena evitando su descomposición (Salatino, *et al.*, 2005). Una colonia de abejas puede recoger anualmente entre 100 y 400 gramos de propóleo dependiendo de sus necesidades, raza, condiciones climáticas y disponibilidad de fuentes de materia primas vegetales en un perímetro de 1 a 2 kilómetros de la colmena (Chil *et al.*, 2002).

El color puede variar de amarillo a castaño oscuro, el sabor puede ser amargo, ligeramente picante o insípido (Farre *et al.*, 2004), la consistencia es viscosa, tiene un olor agradable y dulce (López, 2004), su composición y propiedades depende en gran medida de su origen botánico y condiciones climáticas.

En la actualidad se sabe que el propóleo es una mezcla químicamente compleja que puede estar constituida por más de 300 componentes, entre ellos cera (30%), resina (50%), bálsamo de verduras, aceites esenciales y aromáticos (10%), polen (5%) y otras sustancias (Sforcin, 2007; Bankova *et al.*, 1995).

En temperaturas mayores a 37°C es muy suave, flexible y muy pegajoso; sin embargo, a temperaturas menores a 37°C se endurece (Kuropatricki, 2013).



Figura 1. Abeja recolectando polen. Fotonatura.org.

Los principales usos del propóleo se vinculan con su capacidad antimicrobiana, cicatrizante y antiinflamatoria, pero también tiene propiedades de gran relevancia como son la antioxidante, inmuno-estimulante y citotóxica (Fierro, 1995; Londoño, 2008).

El propóleo se comporta como un antiviral de amplio espectro y presenta buena actividad frente a los virus de *Herpes* y *Poliovirus*. En 1992 la Dra. Françoise Sauvager confirmó su acción viricida con el *Herpes tipo 1* y *Herpes tipo 2* (Amoros *et al.*, 1994). Otro virus que responde favorablemente al propóleo es el *Herpes Zoster* o “culebrillas”, ésta es una patología con expresión cutánea, dolorosa, de pobre respuesta a los tratamientos convencionales (Bedascarrasbure *et al.*, 2006). También se ha probado en otras enfermedades importantes en humanos como son el virus de la *inmunodeficiencia humana* (VIH) y el virus del *dengue* (Ito *et al.*, 2001).

La actividad antiviral del propóleo también ha sido investigada en diferentes virus de origen animal como virus de *Newcastle*, *herpes aviar* y se ha reportado en los últimos años la evaluación *in vitro* de un propóleo de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán sobre el virus de *Pseudorabia* mediante la infección de cultivos de la línea celular MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) (Koning *et al.*, 1985; Amoros *et al.*, 1992; Búrquez *et al.*, 2015).



1.2 Compuestos fenólicos

En los últimos 50 años se han realizado estudios científicos enfocados en determinar la composición química del propóleo, sus propiedades curativas y el uso farmacológico (Guerrero, 2013).

El propóleo es heterogéneo y se puede determinar por medio de la técnica de HPLC, y su composición depende de la vegetación que predomine alrededor de la colmena y de la estación del año (Rodríguez, 2015).

La actividad antioxidante y antimicrobiana está dada por los compuestos fenólicos (Kumar *et al.*, 2008), denominados a veces impropriamente poli fenoles, tienen una estructura química formada por un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo (Kaur *et al.*, 2001).

Estos compuestos están distribuidos en todo el reino vegetal y su forma más frecuente de encontrarlos en la naturaleza es conjugados con uno o más residuos de azúcar unidos a los grupos hidroxilo (Huang *et al.*, 2005). El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse con la alimentación o en forma de suplemento (Soler, 2009).

Existe una gran variedad de compuestos fenólicos y se clasifican en:

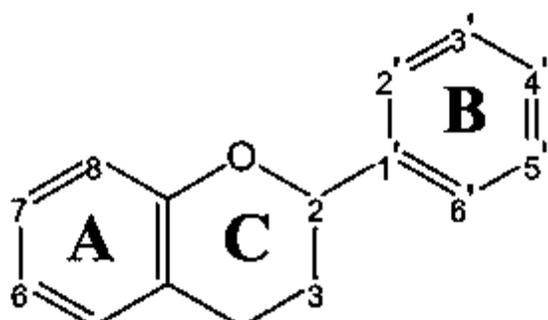


Figura 2. Estructura básica de los flavonoides. Quiñones *et al.*, 2012.

1) Flavonoides, formados por dos anillos aromáticos unidos por un heterociclo oxigenado y que dependiendo del grado de hidrogenación y de la sustitución del heterociclo son: flavonoles, flavonas, isoflavonas, antocianos, proantocianidinas ó flavanonas, y se encuentran generalmente en forma de glicósidos.

Los flavonoides constituyen el grupo más importante dentro de los compuestos fenolicos, siendo los más encontrados en las plantas, tienen un bajo peso molecular y juegan papeles importantes en el control de diferentes enfermedades humanas (Saxena *et al.*, 2012).



Estos fotoquímicos pueden presentar diferentes mecanismos que se complementen o sean sinérgicos para diversas funciones, como neutralización de agentes oxidantes, estimulación del sistema inmune, regulación de la expresión de genes implicados en proliferación y apoptosis celular, regulación del metabolismo de hormonas y efecto antiviral (Bedascarrasbure *et al.*, 2004).

El creciente interés en los flavonoides se debe a la apreciación de su amplia actividad farmacológica. Pueden unirse a polímeros biológicos como enzimas, transportadoras de hormonas y al ácido desoxirribonucleico (ADN); quela iones metálicos transitorios, tales como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , catalizar el transporte de electrones y depurar radicales libres (Saskia *et al.*, 1998).

Las diferencias de las cantidades de fenoles y flavonoides en el propóleo están determinadas principalmente por la flora del área ecológica, los ciclos evolutivos de las plantas proveedoras de resinas que condicionan cambios en las concentraciones de las mismas, microorganismos presentes en el entorno geográfico, factores climatológicos, etc. (Palomino *et al.*, 2010).

- 2) **No flavonoides**, compuestos benzoicos y cinámicos, llamados comúnmente ácidos fenólicos, que contienen un anillo aromático con diferentes grupos funcionales y que pueden estar formando ésteres con los ácidos orgánicos.
- 3) Otros compuestos de naturaleza polifenólica son estil bencenos, taninos, ligninas y lignanos. Algunas de las propiedades de los productos de origen vegetal, como color, astringencia y aroma son debidas a la presencia de compuestos de este tipo (Quiñones *et al.*, 2012).

En la actualidad hay un interés creciente en los antioxidantes, en particular en aquellos que previenen los efectos nocivos de los radicales libres en el cuerpo humano y las que se le atribuye sobre determinadas enfermedades, existe preferencia por los antioxidantes naturales y no de fuentes sintéticas. El número de fenoles podría conducir a que el extracto tiene el potencial para rescatar



radicales libres, y demostrar bio-actividades unido con este potencial (Sforcin y Bankova, 2011).

1.3 Virus de *Distemper canino* (VDC)

El virus de *Distemper canino* es el agente causal de la enfermedad multisistémica del mismo nombre Moquillo canino o Enfermedad de Carré. Posee envoltura y un tamaño entre 150 a 300 nm de diámetro (Summer y Appel, 1994).

Es la enfermedad más difundida, contagiosa y letal en cánidos y otras nueve familias de mamíferos (*Mustelidae*, *Procyonidae*, *Ursidae*, *Viverridae*, *Hyaenidae*, *Phocidae* y *Felidae*) y la más cercana al sarampión de los humanos. Afecta principalmente al aparato digestivo, aparato respiratorio y, en casos más avanzados, también puede afectar al sistema nervioso central (Sousa, 2016).

Se contagia por secreciones, exudados y fluidos corporales a partir del séptimo día post-infección, posee alta infectividad y se disemina rápidamente gracias a la existencia de animales infectados que eliminan el virus antes de manifestar signos clínicos asociados a la virosis (Summer y Appel, 1994).

ORDEN	<i>Mononegavirales</i>
FAMILIA	<i>Paramyxoviridae</i>
GENERO	<i>Morbilivirus</i>
VIRUS	<i>Distemper canino</i>

La familia de *Paramixovirus* es un grupo grande de virus envueltos con genoma constituido de ácido ribonucleico (RNA) de polaridad negativa, causantes de enfermedades significativas tanto en humano como animales. Tiene la habilidad de transmitirse mediante vectores o anfitriones intermediarios (Summer y Appel, 1994).

Los miembros de este tipo de familia codifican proteínas estructurales correspondientes a la matriz (M), nucleocápside (NP), proteína P (P), fosfoproteína, glicoproteína de envoltura (E) y hemaglutinina (HN). Al encontrarse el RNA viral empaquetado en la nucleocápside y, una vez dentro del citoplasma, funciona junto con la polimerasa, la proteína de alto peso molecular (L) y las

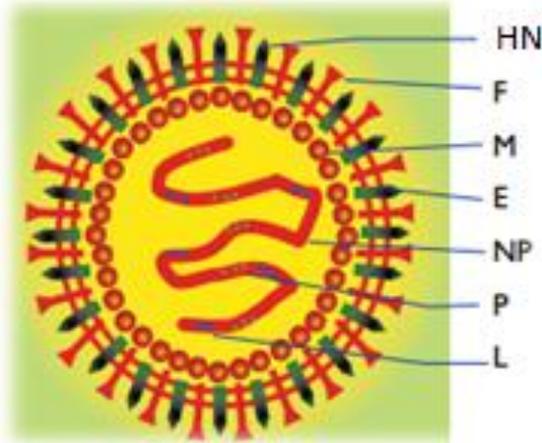


Figura 3. Esquema representativo del virus de *Distemper canino*. HN: hemaglutinina, F: Proteína de fusión, M: proteína de matriz, E: envoltura lipoproteica, NP: nucleocápside, L: Proteína grande. P: Proteína P Laboratorios Virbac, salud animal.

ribonucleoproteínas (RNP's), como un complejo ribonucleico que sintetiza RNA mensajero cubierto y poliadenilado, que mediante transcripción y replicación secuencial genera un antigenoma esencial para la síntesis de proteínas estructurales y mediadores solubles del virus (Von Messling *et al.*, 2001).

Dentro de esta familia también se incluyen virus que producen infecciones neurológicas y sistémicas, como el virus del *Sarampión*, el de *Distemper canino*, el de la enfermedad de *Newcastle aviar* y el de la *Parotiditis humana* (Lamb y Kolakofsky *et al.*, 1996).

Asimismo el género *Morbillivirus* es sumamente infeccioso en las vías respiratorias, causando una inmunosupresión profunda y tienen una predisposición a causar grandes brotes asociados con alta morbilidad y mortalidad (Vries *et al.*, 2015).

La manera en que actúan las partículas virales se representan en la **Figura 4**, estas partículas virales se adsorbe en la membrana de la célula huésped por medio de la HN, que reconoce como receptor específico el oligosacárido (1). Un cambio conformacional de la HN activa la proteína F, la cual lleva a cabo la fusión de las membranas celular y viral , provocando que el ARN viral sea liberado en el citoplasma (2). En este punto comienza, por un lado, la síntesis de ARN anti-genómico (cadena complementaria al genoma), la cual da origen a genomas nuevos (3) y, por otro lado, la producción de los ARN mensajeros (4), que codifican para las proteínas virales (5). Los productos de la traducción se dirigen al sitio de ensamble, las proteínas NP, P y L son acopladas al ARN recién sintetizado y la proteína M se ubica en la parte interna de la membrana celular (6). Las glicoproteínas (HN y F), sintetizadas en retículo endoplásmico, son

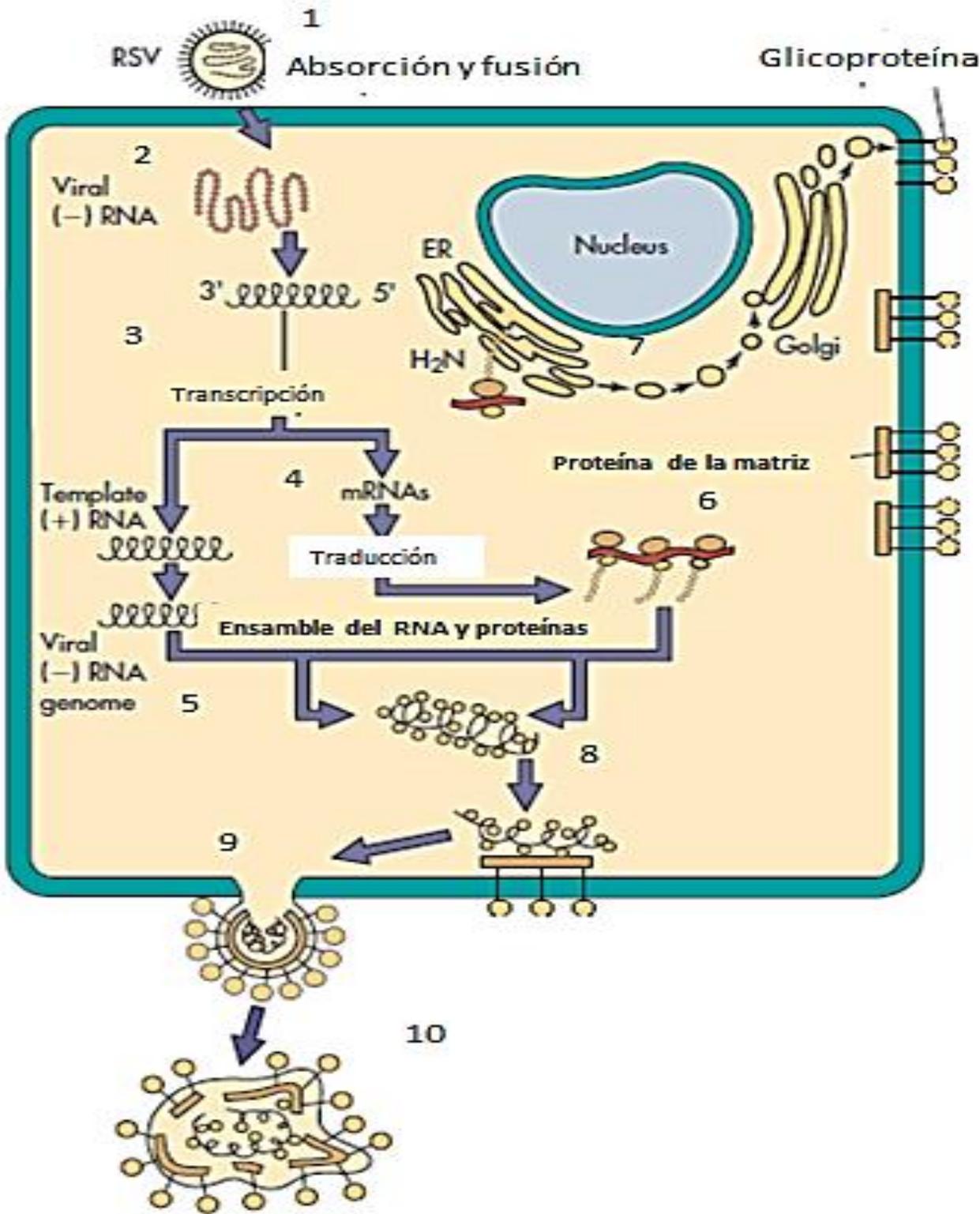


Figura 4. Representación gráfica del ciclo de los *Paramixovirus*.



modificadas en aparato de Golgi (7) y posteriormente expresadas en la membrana citoplásmica, en contacto íntimo con la proteína M (8). La afinidad de las proteínas del genoma (NP, P y L) con la proteína de matriz y de ésta con las glicoproteínas es determinante para el ensamble del virión, que es liberado de la célula por exocitosis (9). Es característico en los paramixovirus que además de la formación de viriones, los virus pueden infectar las células inmediatamente vecinas a través de la fusión membranal célula-célula, debido a la expresión de las proteínas virales en la membrana de la célula huésped (10), lo cual le permite dispersarse sin necesidad de salir al medio extracelular (Lamb y Kolakofsky, 1996).

El *Distemper canino* se describió como una enfermedad infecciosa de perros desde el siglo XX. La infección puede borrar prácticamente todos los linfocitos en un anfitrión, conduciendo a la supresión inmunológica. El virus del Distemper canino puede evadir el mecanismo del sistema inmunológico como la actividad de los interferones y se “enmascaran” mediante la envoltura que adquiere de las células del hospedero en que se replican. La infección por el virus del Distemper tiene varias etapas que pueden presentarse en diferentes órdenes digestivas, respiratorias, conjuntival y compromete al SNC (Céspedes *et al.*, 2010). La llegada del virus al SNC a través de la barrera hematoencefálica ocurre en un escenario de severa inmunosupresión y se desarrolla un proceso temprano de desmielinización no inflamatoria, asociada a fenómenos derivados de la replicación viral en astrocitos y microglía, que corresponden a las poblaciones celulares responsables de mantener y facilitar la propagación viral en el SNC (Vandeveld, 1995).

1.3.1 Diagnóstico

Se llega al diagnóstico no sólo a través de los signos clínicos, sino también con la observación de la evolución y la escasa respuesta a los tratamientos, también con métodos complementarios que el veterinario podrá solicitar como un hemograma, citología de secreciones oculares y/o las determinaciones virales para confirmar el diagnóstico presuntivo.

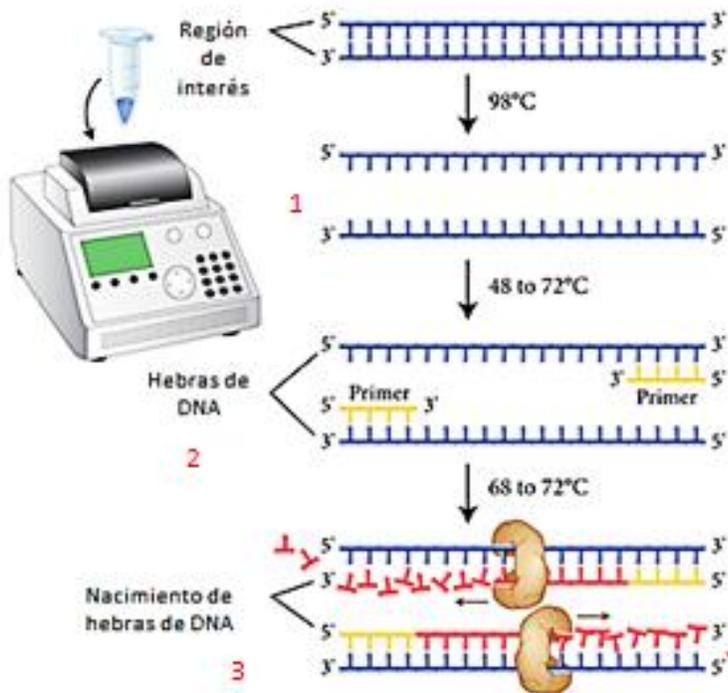


Distemper canino es ocasionado por un virus y que no se elimina con antibióticos, sino que es una enfermedad que se previene con vacunas. La mayoría de los virus se diagnostican en general por una historia de exposición, signos clínicos, pruebas serológicas/víricas, lesiones histopatológicas características e identificación de partículas o inclusiones virales dentro de las células infectadas (Ian *et al.*, 2009).

En animales muertos, se utiliza la prueba de inmunofluorescencia directa en cortes de nodos linfáticos aumentados de tamaño, con el fin de detectar antígenos específicos del virus de *Distemper canino*. También se utilizan pruebas de inmunohistoquímica (Ian *et al.*, 2009).

La **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)** es una técnica de la biología molecular que representa la herramienta diagnóstica más confiable ya que determina con exactitud la presencia de los agentes etiológicos en los diversos especímenes clínicos.

Dicha reacción consta de tres etapas: desnaturalización, hibridación y extensión.



1) **Desnaturalización:** Para que pueda iniciarse la reacción es preciso que las moléculas molde de DNA se encuentren en forma de cadena simple. Esto se consigue al incrementar la temperatura de 90 a 95°C para que se produzca la ruptura de los puentes de hidrógeno intercatenarios y se lleve a cabo la separación de ambas cadenas. Si el DNA sólo se desnaturaliza

Figura 5: Proceso de la técnica de PCR. Neb.com parcialmente éste tenderá a renaturalizarse muy rápidamente dificultando con esto el proceso de



hibridación.

- 2) **Hibridación:** Una vez que el DNA está desnaturalizado se disminuye la temperatura de la reacción hasta un rango comprendido entre 40 y 60°C para que se pueda producir la hibridación específica de los iniciadores a las secuencias que flanquean el fragmento que se desea amplificar. La temperatura a la que se realiza esta etapa debe establecerse para cada reacción en función de la longitud de los iniciadores y su secuencia (temperaturas inferiores a la óptima producirán hibridaciones inespecíficas de los iniciadores y temperaturas superiores dificultarán la eficiencia de la misma).
- 3) **Extensión:** Durante esta etapa la DNA polimerasa termo-resistente incorpora nucleótidos en el extremo 3' del iniciador utilizando como molde la cadena de DNA previamente desnaturalizada. La temperatura a la que se realiza esta etapa de la reacción suele ser de 72° C, es la temperatura a la que la "Taq polimerasa" alcanza su máxima actividad.

Al finalizar cada uno de los ciclos el número de copias obtenido se duplica y después de 20 ciclos ya tienen aproximadamente 1 millón de copias de cada una de las moléculas de ADN molde iniciales (Higuchi *et. al*, 1992).

Transcripción inversa con Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

Es una variante de la PCR, esta técnica se utiliza habitualmente en biología molecular para determinar la expresión de los ARN mensajeros. Es una reacción conocida como transcripción reversa y la realiza la enzima transcriptasa reversa, capaz de convertir el ARN mensajero (ARNm) en una molécula de ADN complementario (ADNc) (de Dios L *et al.*, 2013). Después de la retrotranscripción, sigue la reacción de PCR, en la cual se realiza la amplificación del gen blanco. Finalmente, para saber si la reacción transcurrió eficientemente, los amplicones son visualizados a través de una electroforesis en geles de agarosa.



La electroforesis consiste en la separación de grandes moléculas como los ácidos nucleicos a través de una matriz sólida que funciona como un filtro para separar las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica. Esta separación se hace bajo un amortiguador específico. En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato les proporciona la carga negativa, por lo que durante la electroforesis migran hacia el polo positivo. Para ello, se prepara un gel diluyendo una cantidad de agarosa en el amortiguador, se calienta hasta que la agarosa hierva lo suficiente para quedar totalmente diluída y, posteriormente, se vacía a un recipiente que sirve de base para que solidifique. Generalmente el porcentaje al que se prepara el gel es al 1.5% aunque, dependiendo del tamaño de las moléculas, puede ser de hasta el 2%. Otro ingrediente que se agrega al gel es el bromuro de etidio, una molécula intercalante capaz de unirse al ADN de doble cadena y cuando es excitado con luz UV emite una señal que permite la visualización de los amplicones en forma de bandas (de Dios L *et al.*, 2013).



2.0 JUSTIFICACIÓN

En los últimos años ha existido un interés creciente por conocer las propiedades biológicas del propóleo, si bien existe una vasta información donde se comprueban sus propiedades antibacterianas y antifúngica, actualmente aún existe poca información sobre su actividad antiviral. El propóleo es una sustancia compleja que dentro de sus componentes más importantes destacan los flavonoides y fenoles, dichos compuestos se han señalado en diversos trabajos como responsables de inhibir la replicación de algunos virus, por tal motivo, en este trabajo se busca determinar la cantidad de fenoles y flavonoides presentes en los propóleos estudiados y correlacionar su contenido con el efecto antiviral del propóleo en cultivos celulares infectados con virus de *Distemper canino*.

3.0 HIPÓTESIS

Si el Extracto Etanólico de Propóleo (EEP) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC) y el Extracto Hidrosoluble de Propóleo (EHP) de Toluca, Edo. México contiene compuestos fenólicos y flavonoides, entonces tiene actividad antiviral *in vitro* ante el virus de *Distemper canino*.



4.0 OBJETIVO GENERAL

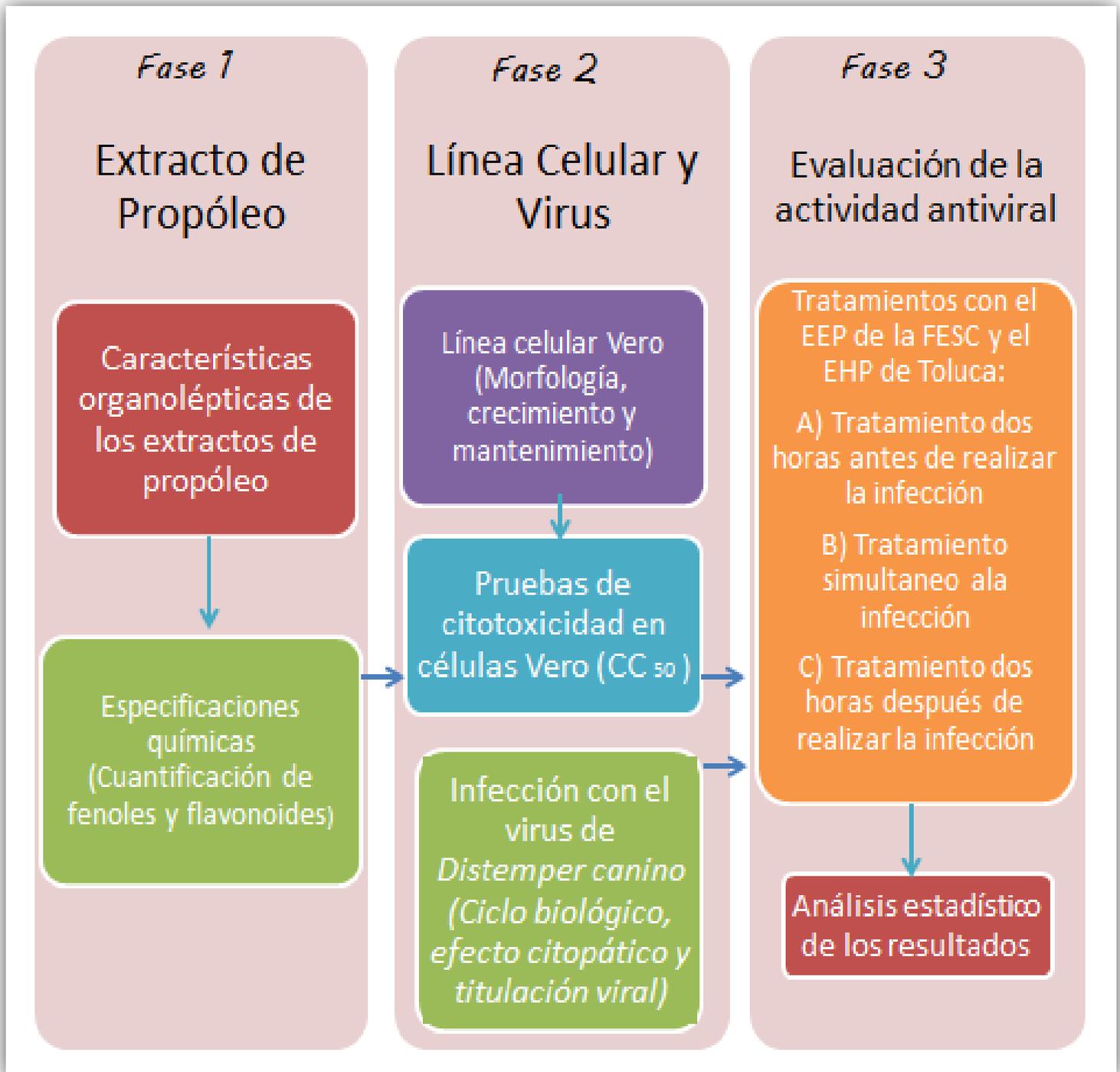
Evaluar la actividad antiviral *in vitro* de un Extracto Etanólico de Propóleo (EEP) proveniente de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC), Edo. de México y de un Extracto Hidrosoluble de Propóleo (EHP) proveniente de Toluca, Edo de México en contra del virus de *Distemper canino*.

5.0 OBJETIVOS PARTICULARES

- a. Determinar el contenido de fenoles y flavonoides del EEP de FESC y el EHP de Toluca.
- b. Determinar la Concentración Citotóxica media (CC₅₀) del EEP de FESC y del EHP de Toluca.
- c. Determinar el título viral e identificar el efecto citopático del virus de *Distemper canino* en células Vero (Riñón de mono verde africano).
- d. Evaluar la actividad antiviral de los extractos de propóleos de FESC y de Toluca administrados: 2 horas previas, de forma simultánea y dos horas después de la infección mediante la determinación de la viabilidad del cultivo celular.



6.0 DISEÑO EXPERIMENTAL





7.0 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 ETAPA 1

7.1.1 Extractos de Propóleo.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio 4 de “Morfología veterinaria y biología molecular” de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (Campo 4) de la Universidad Nacional Autónoma de México.

- **Extracto Etanólico de Propóleo (EEP) de la Facultad Estudios Superiores Cuautitlán.**

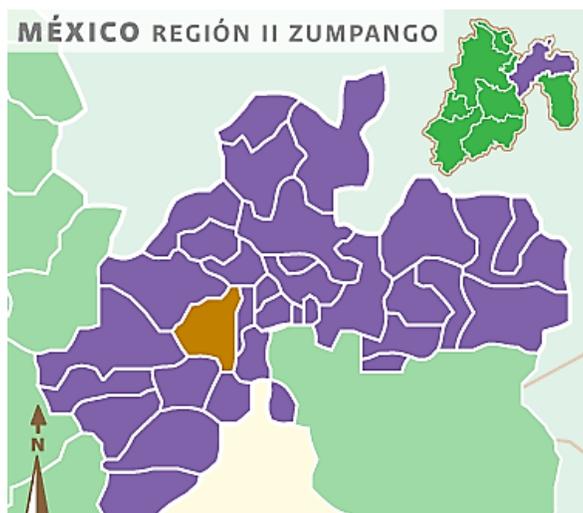


Figura 6. Mapa del municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México. INAFED, 2017.

El propóleo en greña obtenido del apiario de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC), Campo 4, ubicado en Cuautitlán Izcalli, Estado de México fue procesado en el Laboratorio 6 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FESC con el fin de obtener el Extracto Etanólico de Propóleo.

La localización geográfica es latitud norte 19° 40' 50", longitud occidental 99° 12' 25", a una altitud de 2260 msnm. Cuenta con clima tipificado como templado subhúmedo con lluvia

en verano, de humedad media que se presenta en un 30.6% de la superficie territorial y templado húmedo con lluvias en verano de menor humedad en un 69.4% de la superficie.

El Municipio cuenta con una gran variedad de vegetación, principalmente constituida por bosques y pastizales. Se caracteriza por presentar; pirul (*Schinus molle*), aile (*Alnus acuminata Kunt*), jacarandas (*Jacaranda mimosifolia*), álamo blanco (*Populus alba L.*), fresno (*Fraxinus excelsior L*), colorin (*Erythrina americana*), trueno (*Ligustrum vulgare*) en sus diferentes variedades; teja blanca



(*Tilia platphyllos Scop.*), cedro (*Cedrela odorata L.*), eucalipto (*Eucalyptus globulus*) y fresno (*Fraxinus excelsior L.*), entre otros (INAFED, 2015).

- **Extracto Hidrosoluble de Propóleo (EHP) de Toluca.**

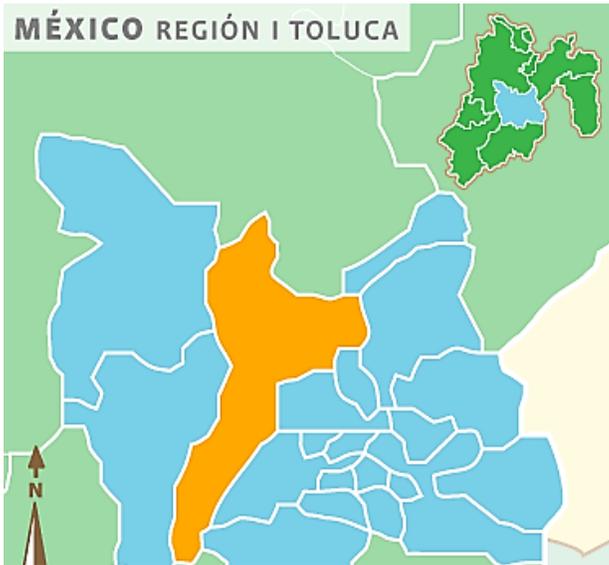


Figura 7. Mapa del municipio de Toluca, Estado de México. INAFED, 2017.

El municipio se localiza en la zona central del Estado de México. Sus coordenadas extremas varían de los 18° 59' 02" a los 19° 27' 09" de latitud norte, de los 99° 31' 43" a los 99° 46' 58" de longitud oeste. La altura promedio es de 2,600 msnm. El clima del municipio está clasificado como templado sub-húmedo. La temperatura media anual es de 13.7° C.

La flora del municipio está, compuesta por bosques de pino (*Strobus*), aile (*Alnus acuminata Kunt*), ocote (*Pinus teocote*) y oyamel (*Abies religiosa*). También encontramos árboles

de fresno (*Fraxinus excelsior L.*), encino (*Quercus oleoides*), trueno (*Ligustrum vulgare*), sabino (*Guarea grandifolia*), guaje (*Leucaena leucocephala*), tepehuaje (*Lysiloma acapulcense*), madroño (*Arbutus unedo*), jacaranda (*Jacaranda mimosifolia*), capulín (*Prunus serótina*), zapote blanco (*Casimiroa edulis*), ciruelo (*Prunus domestica*), sauz (*Salix alba*), eucalipto (*Eucalyptus baueriana Schauer*), granada (*Punica granatum*), pinzán (*Fringilla montifringilla*) y nanche (*Byrsonima crassifolia*), entre otros (INAFED, 2017).

7.1.2 Almacenamiento de las muestras.

El Extracto Etanólico de Propóleo de FESC y el Extracto Hidrosoluble de Propóleo de Toluca fueron proporcionados por el Laboratorio 6 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 4, UNAM. Se refrigeraron a 4°C para su adecuada conservación. Posteriormente para proteger las muestras de la luz se colocaron en un recipiente



de vidrio color ámbar, el cual fue abierto en esterilidad en el momento de su análisis (Rodríguez, 2015).

7.1.3 Características organolépticas de los extractos propóleos.

Tomando una porción de las muestras se procedió a determinar sus características organolépticas y físicas.

- **Color:** Se colocó la muestra sobre una superficie blanca y se comparó con una escala de colores y en un ambiente de buena iluminación, asimismo se utilizó un microscopio estereoscópico con cámara digital para visualizar más definidamente los colores presentes. Se clasificó el color según las tonalidades predominantes de la muestra.
- **Olor y sabor:** Se retiró una porción de la muestra a fin de que el envase no interfiera en la percepción olfativa. Posteriormente, por unos segundos la muestra se colocó en la parte media de la lengua y se analizó mediante la comparación de sus atributos de sabor con los que mejor se distinguían.
- **Consistencia y textura a temperatura ambiente:** Para determinar su consistencia se retiró una porción de la muestra y se colocó en un vidrio de reloj hasta que alcanzó la temperatura ambiente. La consistencia se determinó tocando la muestra con los dedos y comparándola con el atributo que mejor la describiera (Rodríguez, 2015).

7.1.4 Especificaciones químicas.

7.1.4.1 Cuantificación de compuestos fenólicos.

Para realizar el análisis químico se aplicó la metodología propuesta por Rodríguez 2015: Extractos de propóleos .Se empleó el reactivo de Folin-Ciocalteu (**Anexo 1**) para realizar una curva de calibración con ácido gálico, a diferentes concentraciones (6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). De cada extracto se utilizó una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y el valor de absorbancia obtenido con cada uno



de los propóleos fue interpolado en la curva de calibración del ácido gálico (Rodríguez, 2015).

7.1.4.2 Cuantificación de flavonoides.

Este análisis se realizó con la metodología propuesta por Rodríguez 2015 con algunas modificaciones (**Anexo 2**). Se realizó una curva de calibración con un estándar de quercetina a diferentes concentraciones (1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 y 90 µg/L). Para hacer la determinación se utilizaron 200 µg/ml de cada uno de los extractos y los valores de absorbancia obtenidos se interpolaron en la curva de calibración de quercetina.

7.2 ETAPA 2

7.2.1 Línea celular y virus.

Se emplearon monocapas de células de riñón de mono verde Africano (Vero) en cajas de cultivo de 100 mm x 20 mm, mantenidas con medio de cultivo DMEM (por sus siglas en inglés) suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibiótico (penicilina-estreptomicina) en una incubadora a 37°C bajo una atmósfera humidificada de 95% de aire y 5% de CO₂.

Se utilizó la cepa *Buzzel* del virus de *Distemper canino* y se tituló mediante el método de Reed and Muench (Melnick et al., 2010) expresándose como la dosis infectante media en cultivo de tejido (TCID₅₀).

7.2.2 Ensayo de citotoxicidad y viabilidad celular.

Para realizar este ensayo, se utilizaron cultivos de células Vero con un 90% de confluencia, los cuales fueron tripsinizadas, las células fueron contabilizadas en cinco campos de la cámara de Neubauer y se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de 2.5×10^4 células/pozo, posteriormente, se incubaron por 24 horas a las condiciones ya señaladas. Por otro lado, el EEP fue diluído en una 30 µl de Dimetil Sulfóxido (DMSO) / en 1ml medio de cultivo (DMEM). En el caso del EHP fue diluído solo con DMEM. Los cultivos de células Vero fueron expuestos a



concentraciones decrecientes de EEP (2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 y 0.065 mg/ μ l de DMEM) y de EHP (4, 3, 2, 1.5, 1, 0.75, 0.5 mg/ μ l de DMEM). Utilizando como control negativo, células en pozos a los que sólo se les agregó DMEM (200 μ l), y como control positivo se utilizaron pozos a los que se agregó peróxido de hidrógeno (10 μ l/970 de DMEM). Después del período de pre-incubación de 24 horas, fueron tratadas por períodos de 24 y 48 horas con el EEP y EHP. Al final, la sustancia a analizar fue retirada y se agregaron 200 μ l de DMEM. La viabilidad celular fue determinada empleando el método colorimétrico del MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), el cual es reducido por deshidrogenasas mitocondriales de las células viables a formazán y sus absorbancias son obtenidas por un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 595 nm (Mossman, 1983). Se calculan los porcentajes relativos de supervivencia de las células tratadas, tomando como referencia las células control no tratadas. Se graficó la concentración con el porcentaje de supervivencia con el fin de calcular la Concentración Citotóxica Media (CC₅₀).

7.2.3 Identificación del Virus de *Distemper canino* (VDC) por RT-PCR punto final.

Se confirmó la presencia del VDC se realizó la técnica de RT-PCR punto final. Para esto, se preparó un cultivo celular sin infectar (control negativo) y otro infectado (control positivo). La extracción del ácido ribonucleico (RNA) se hizo a partir de las células Vero sembradas en cajas de cultivo de 100 mm, el RNA se aisló y se extrajo utilizando el Kit GeneJET (Thermo Scientific, cat. K0731). Para la retrotranscripción (RT) se utilizaron 2 μ g de RNA, en una mezcla de reacción de 40 μ l, que contenía; 4 μ l de retrotranscriptasa del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV RT, Invitrogen), 25 moles del iniciador, 4 μ l de la mezcla de deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) (250 μ M de cada uno), 8 μ l de amortiguador RT 5 \times , 2 μ l de Ditiotreitól (DTT) 20 mM y agua libre de ARNasa para completar el volumen final. Posteriormente se realizó la estimación de la pureza y cantidad del cDNA, mismo que fue empleado como molde para la realización de la PCR punto final. Se diseñaron los iniciadores para realizar la amplificación del gen de la



nucleoproteína de *Distemper canino* (secuencias: Forward 5'AGCTTCCATCTTGGCTCAAA'3 y Reverse 5'CCATGAATCGCCTCAAAGAT'3) y para el gen de β -actina (gen endógeno) (secuencias: Forward 5'-GTGTGACGTTGACATCCGCA-3 y Reverse 5'-TCCACACAGAGTACTTGCGC-3). Estos iniciadores habían sido diseñados previamente en el Laboratorio 4 de la UIM FESC. Las condiciones de reacción se estandarizaron para realizar la PCR a las mismas condiciones de temperatura y número de ciclos y obtener la amplificación de ambos genes en la misma reacción.

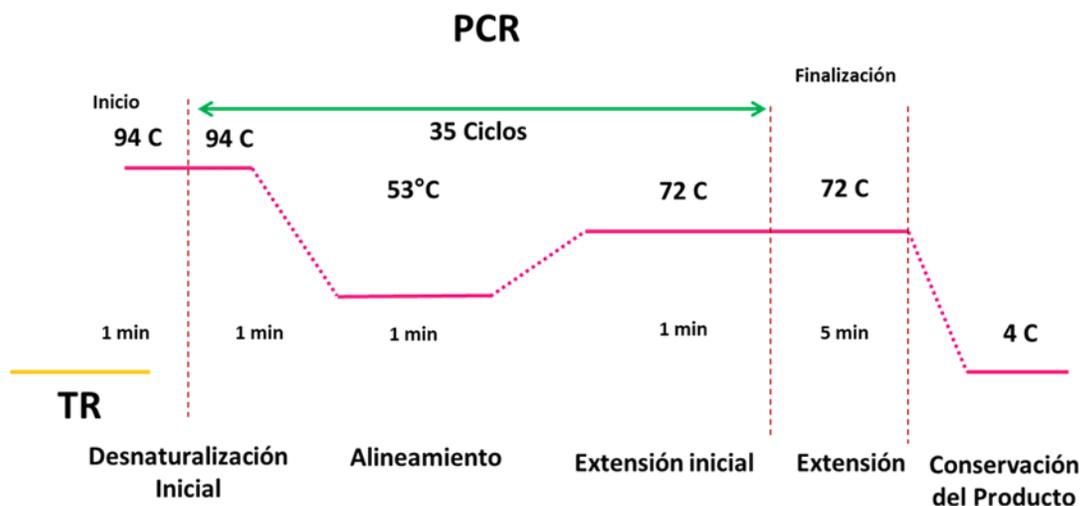


Figura 8. Condiciones utilizadas en la PCR. Se observan las temperaturas utilizadas para la desnaturalización, alineamiento, extensión y conservación del producto, las cuales fueron las mismas para ambos genes.

Para corroborar la presencia del amplicón esperado, se realizó la electroforesis en geles de agarosa al 1.5 %, a 70 volts durante 90 minutos. Finalmente, los geles fueron teñidos con Bromuro de Etidio (BrE) y visualizados en un transiluminador marca Wise Uv .



7.3 ETAPA 3

7.3.1 Evaluación de la actividad antiviral.

7.3.1.1 Tratamiento con los extractos de propóleo en células Vero infectadas con el Virus de *Distemper Canino*.

La actividad antiviral de EEP y EHP fue evaluada *in vitro* empleando monocapas de células Vero en placas de 96 pozos, el ensayo se realizó empleando el EEP de FESC y EHP de Toluca, Edo. de México, aplicados en tres diferentes tiempos:

Tratamiento 1: dos horas antes de la infección viral; a cada pozo se le adicionaron 100 µl de propóleo (**Cuadro 3**) y transcurridas dos horas de incubación se agregaron 100 µl de la suspensión viral.

Tratamiento 2: simultáneo a la infección viral; a cada pozo se le adicionaron al mismo tiempo, 100 µl de propóleo y 100 µl de la suspensión viral.

Tratamiento 3: dos horas después de la infección viral; se infectaron los pozos con 100 µl de suspensión viral, se incubaron por 2 horas y después se adicionaron 100 µl de propóleo.

En todos los tratamientos los cultivos fueron incubados y evaluados a las 48 horas post-infección. La efectividad de los tratamientos fue evaluada mediante el método colorimétrico de MTT, descrito previamente, y se realizó la lectura en un lector de placas de ELISA a 595 nm.

7.3.1.2 Análisis estadístico.

Para evaluar el efecto antiviral de los extractos de propóleo se obtuvo el valor promedio de las absorbancias obtenidas en cada uno de los tratamientos y controles, estos datos fueron procesados mediante el programa Graph Pad Prism versión 7, utilizando la prueba de 2-ANOVAS.



8.0 RESULTADOS

Origen de los propóleos

El propóleo de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán corresponde a la cosecha de primavera del 2013, mientras que se desconocen los datos correspondientes al propóleo proveniente de Toluca, Estado de México. Una diferencia importante se refiere al método de extracción pues mientras que el de FESC es un extracto etanólico el de Toluca es hidrosoluble.

8.1 Características de los propóleos.

8.1.1 Especificaciones organolépticas de los extractos de propóleos.

Las características organolépticas de los propóleos estudiados se determinaron mediante pruebas sensoriales descriptivas. El **color** abarcó distintas tonalidades de marrón, con diversos tintes verdes y amarillos. El **olor** fue resinoso y/o aromático. El **sabor** fue de dulce, amargo, picante, insípido y/o resinoso. La **consistencia** percibida a temperatura ambiente fue de maleabilidad (**Tabla 1**).

Tabla 1. Propiedades organolépticas de los extractos de propóleos.1

Procedencia	Color	Olor	Sabor	Consistencia
FESC	Marrón, con tonalidades verdoso	Aromático	Amargo de sabor fuerte	Blando
Toluca	Marrón con tonalidades leves de verde y tintes en amarillo	Aromático	Intensamente Amargo	Blando

Su composición depende de su origen botánico y de las condiciones geográficas y climáticas donde se encuentran las plantas que producen las resinas. Por lo tanto se muestran los extractos de propóleos proporcionados (**Figuras 9 y 10**).



Figura 9. Vista macroscópica del Extracto Etanólico de Propóleo de FESC, Estado de México. (Fotografía de Alma Ortiz y Monserrat Martínez)



Figura 10. Vista macroscópica del Extracto Hidrosoluble de Propóleo de Toluca, Estado de México. . (Fotografía de Alma Ortiz y Monserrat Martínez)



8.2 Cuantificación de fenoles totales y flavonoides.

El contenido de compuestos fenólicos fue determinado por el método de Folin-Cicoalteu (**Anexo 1**). Se usó el ácido gálico como compuesto estándar para construir la curva de calibración y los resultados fueron expresados como miligramos de ácido gálico por cada gramo de propóleo. Por otra parte, el contenido de flavonoides fue determinado por el método descrito por Rodríguez (2015), empleando cloruro de aluminio ($AlCl_3$) para formar un complejo. Se utilizó un patrón de quercetina para realizar la curva de calibración, y los resultados fueron expresados como miligramos de quercetina por cada gramo de propóleo (**Tabla 2**).

Tabla 2. Contenido de fenoles y flavonoides en los extractos de propóleos.

Propóleo	Fenoles totales (mg ácido gálico/g EEP o EHP)	Porcentaje de fenoles	Flavonoides (mg eq de quercetina/g EEP o EHP)	Porcentaje de flavonoides
FESC	128.7	12.9	10.8	5.4
Toluca	230.17	23.01	1.73	3.48

En la **Figura 11** se indican los valores porcentuales del contenido total de fenoles totales y flavonoides obtenidos para cada extracto, y se comparan entre ellos la cantidad de estos compuestos

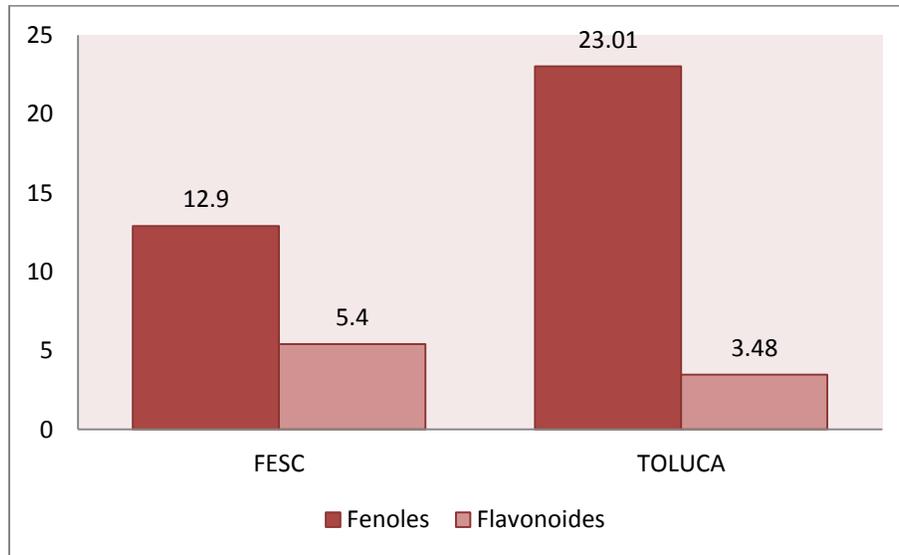


Figura 11. Porcentaje de fenoles y flavonoides presentes en el propóleo de FESC y de Toluca, Edo. de México.

8.3 Titulación del virus.

Para determinar el título viral presente en la solución viral de nuestro trabajo se realizó el método de Reed & Muench, éste se basa en que el número de unidades celulares afectadas, varían proporcionalmente al \log_{10} de la dilución, es decir que a diluciones menores (mayor concentración de virus) el porcentaje de efecto será mayor que a diluciones mayores (menor concentración de virus) determinado mediante la visualización del efecto citopático (**Anexo 6**). Así se determinó que la solución viral utilizada tuvo un título de $10^{12.16}$ (**TCID₅₀ = $10^{12.16}$**).



8.4 Efecto citopático del Virus de *Distemper Canino*.

La cepa Buzzell de *Distemper canino* fue adaptada a las células Vero mostrando cambios evidentes en las células, conocido como efecto citopático (**Figura 12**). A las 24 horas post-infección, el efecto citopático fue evidenciado por la formación de sincitios, redondeamiento celular y vacuolización; a las 48 horas se observó la presencia de placas líticas y, posteriormente, lisis total del cultivo.

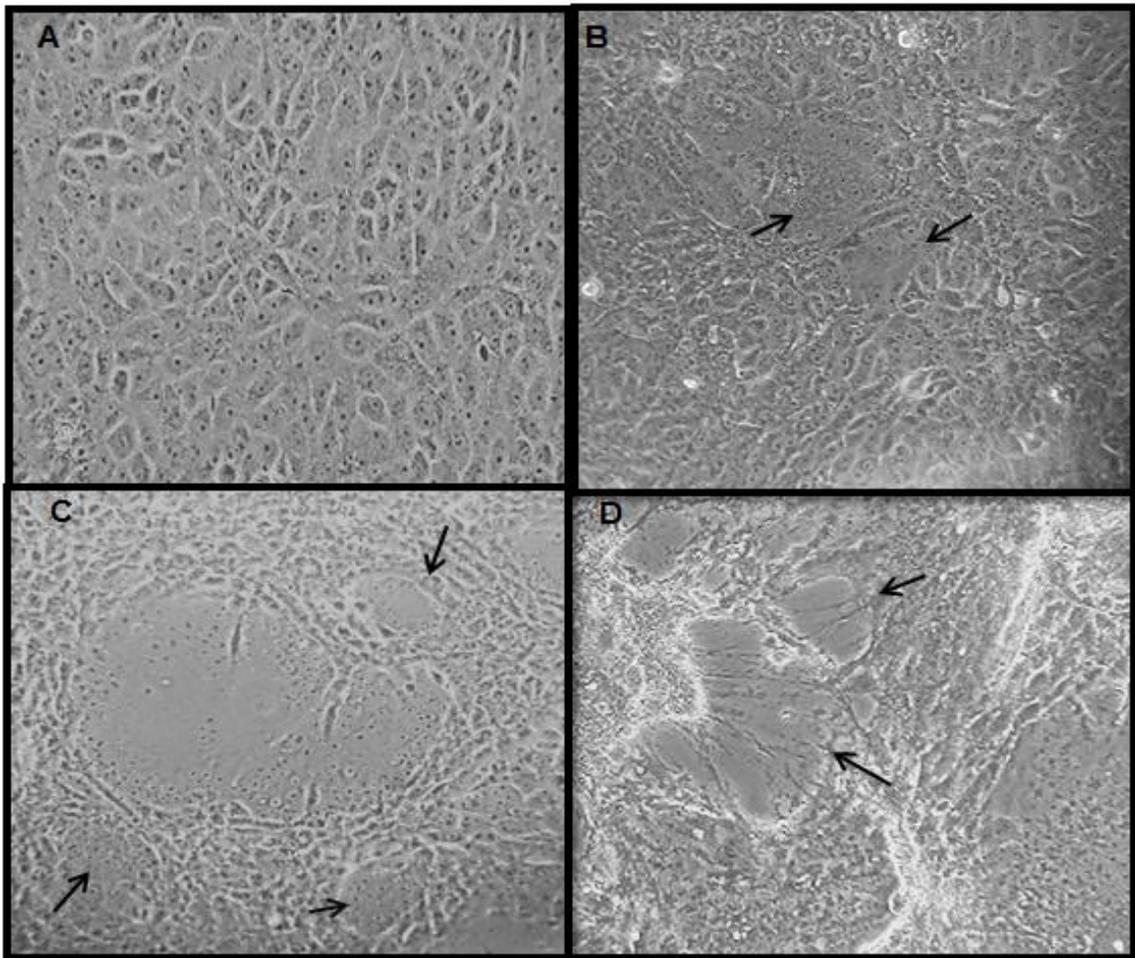


Figura 12. Efecto citopático del virus de *Distemper canino* en un cultivo de células Vero. A) Células Vero sin infectar. B) y C) Efecto citopático a las 24 horas post infección se observa la formación de sincitios. D) Efecto citopático ocasionado a las 48 horas evidenciando la pérdida de la morfología celular y muerte celular con la consecuente formación de placas líticas. Microscopio invertido, 400x. (Fotografía Monserrat Martínez,2017)



8.5 Ensayos de Citotoxicidad.

La investigación *in vitro* de la actividad antiviral de los extractos de propóleo requiere, como requisito previo, conocer su nivel de citotoxicidad sobre las células y con el fin de evaluar esta citotoxicidad del propóleo en cultivos celulares se empleó el método colorimétrico de MTT.

Conociendo la máxima concentración que se puede aplicar al cultivo sin alterar el metabolismo, es posible implementar los ensayos de infección, ya que conociendo la concentración de los extractos de propóleo aplicada no interferirá con los resultados de los estudios posteriores. En la mayoría de los casos es necesario contar con una medida cuantitativa, como lo es la Concentración Citotóxica Media (CC₅₀). En la **Tabla 3** se muestra la CC₅₀ extrapolando en la ecuación de la recta de cada uno de los gráficos al 50% de viabilidad celular en función con la concentración del compuesto. También se encuentran las concentraciones a utilizar en los tratamientos de la actividad antiviral, estas concentraciones son las que garantizan un 70% de viabilidad celular.

Tabla 3. Concentración citotóxica media y concentración a emplear del EEP de FES Cuautitlán y del EHP de Toluca, Edo. de México.

Propóleo	CC ₅₀ (mg/ml)	Concentración utilizada (mg/ml)
FES Cuautitlán, Estado de México	0.458	0.25
Toluca, Estado de México	2.4	1



8.5.1 Citotoxicidad del DMSO.

El DMSO es un compuesto organosulfurado, usado como solvente dipolar, esto quiere decir, que se mezcla con materiales orgánicos e inorgánicos, tales como agua y aceite, Por ello se utilizó como un disolvente del extracto etanólico de propóleo, FESC. El DMSO es tóxico a concentraciones altas para las células, siendo necesario evaluar el parámetro con una curva de citotoxicidad (**Figura 13**). La grafica muestra la disminución de la viabilidad celular por la concentración creciente de DMSO, encontrando una concentración citotóxica media aproximada de 4.5 μ l de DMSO por ml de DMEM. En este trabajo se utilizó a una concentración de 2 μ l, la cual garantiza un 70% de viabilidad ya que nos interesa observar el daño causado por el propóleo y no por el DMSO.

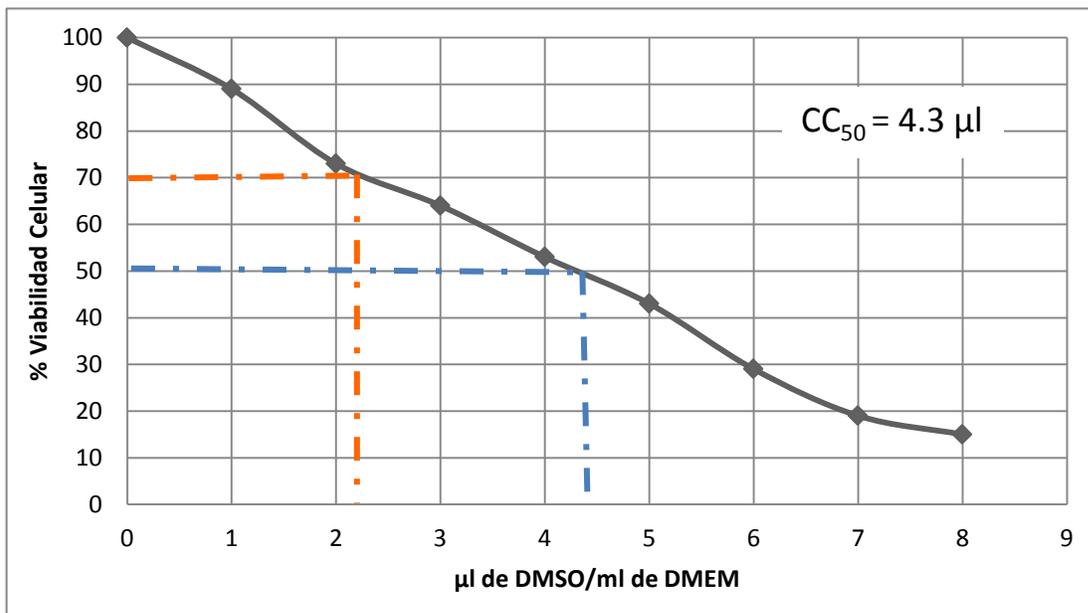


Figura 13. Curva de citotoxicidad del DMSO. Se muestra la cantidad de DMSO (μ l) por volumen de DMEM (ml) (eje X) en relación con el porcentaje de viabilidad celular (eje Y). Línea roja marca el 70% de la concentración y la azul el 50% de la concentración.



8.5.2 Citotoxicidad del EEP de la FESC.

El Extracto Etanólico de Propóleo de la FESC afectó la viabilidad celular de tal forma que la concentración citotóxica media fue de 0.458 mg/ml (**Figura 14**). La pérdida de viabilidad celular dependió tanto de las concentraciones del extracto como del tiempo de exposición (48 horas, ya que el efecto citopático del virus se observa a este tiempo). El EEP parece ser un compuesto altamente citotóxico puesto que a pesar de utilizar concentraciones bajas induce cambios morfológicos y muerte celular.

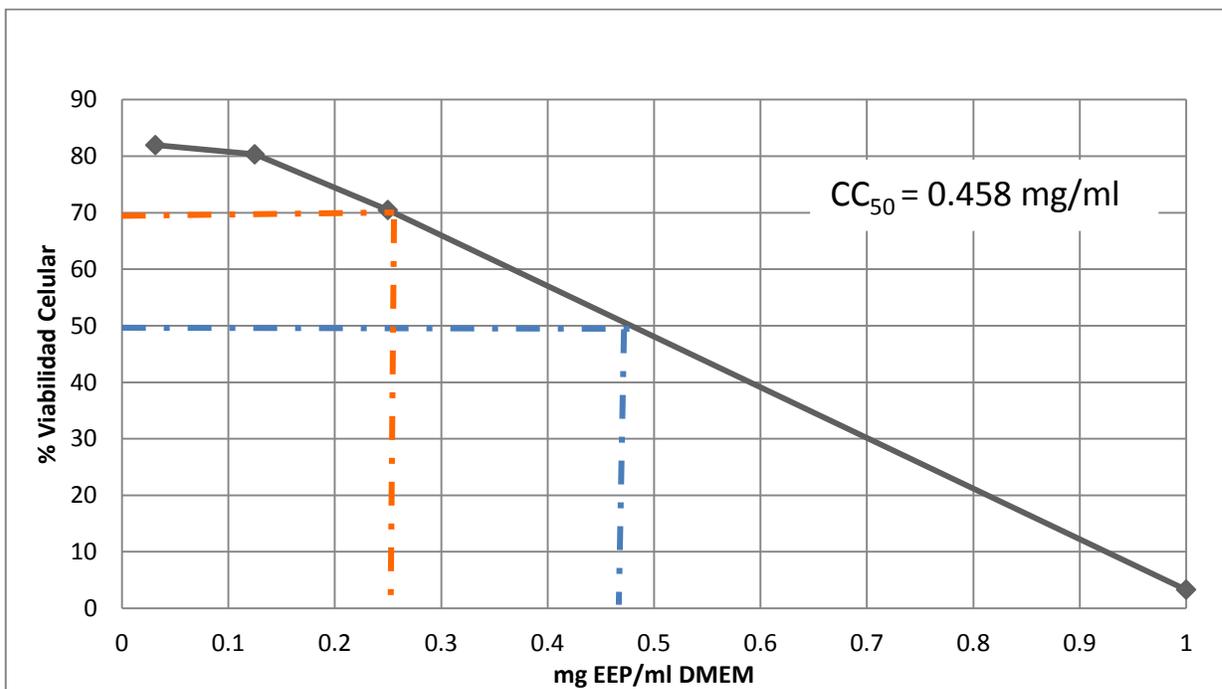


Figura 14. Curva de citotoxicidad del EEP de FESC. Se observa la CC_{50} del EEP de la FESC a las 48 horas de exposición de las células Vero. Concentraciones de propóleo (eje X) en relación con el porcentaje de viabilidad celular (eje Y). Línea roja marca el 70% de la concentración y la azul el 50% de la concentración.



8.5.3 Citotoxicidad del EHP de Toluca.

El Extracto Hidrosoluble de Propóleo de Toluca también afectó la viabilidad celular (**Figura 15**), esta pérdida de viabilidad celular dependió tanto de las concentraciones del extracto como del tiempo de exposición (48 horas). Se encontró que las células son más tolerantes al propóleo hidrosoluble ya que a concentraciones altas las células aún son viables.

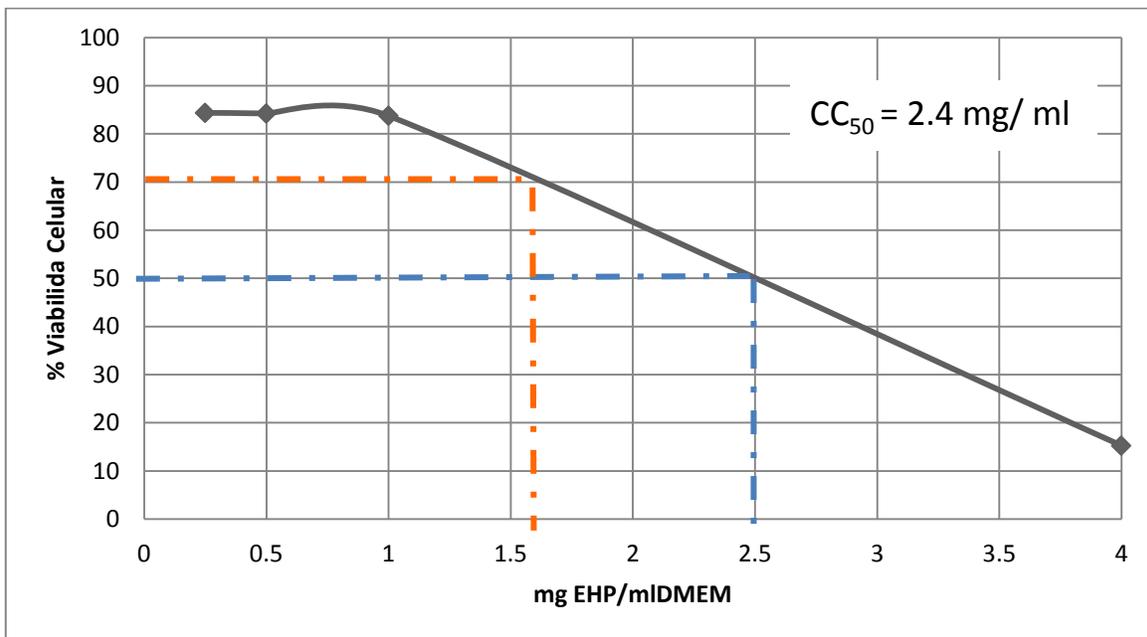


Figura 15. Curva de citotoxicidad del EHP de Toluca. Se observa la CC_{50} del EHP de Toluca a las 48 horas de exposición de las células Vero. Concentraciones de propóleo (eje X) en relación con el porcentaje de viabilidad celular (eje Y). Línea roja marca el 70% de la concentración y la azul el 50% de la concentración.



8.6 Identificación del virus de Distemper Canino por RT-PCR Punto final

El genoma viral fue extraído y purificado de acuerdo a métodos previamente descritos. El rendimiento del ensayo depende de la cantidad y la calidad del ARN viral purificado a partir de los cultivos celulares infectados. Los amplicones fueron visualizados por medio de una electroforesis en gel de agarosa (**Figura 16**). Así, fuimos capaces de corroborar la presencia del VDC en nuestra solución stock y la posibilidad de utilizarlo en los ensayos de infección.

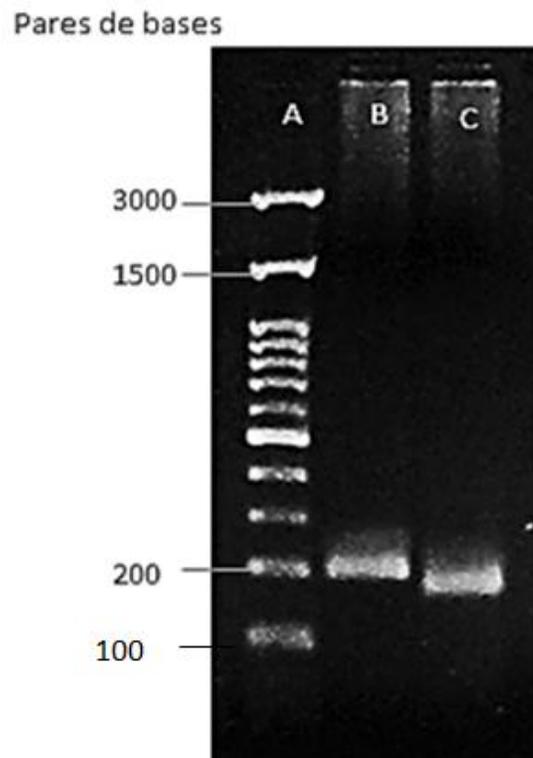


Figura 16. Determinación de la presencia del virus de *Distemper canino*. El gen de la nucleoproteína de VDC fue detectado por PCR punto final a partir de un cultivo infectado. **A)** Marcador de 100 pb (DNA Ladder H3 RTU, marca Genetics). **B)** Amplicón correspondiente al gen de la nucleoproteína del VDC (200 pb). **C)** Amplicón del gen endógeno (β -actina, 170 pb). Gel de agarosa al 1.5% y teñido con bromuro de etidio.



8.7 Evaluación antiviral del EEP de la FESC

Una forma de evaluar el efecto antiviral de un compuesto es determinando la capacidad del producto para reducir o anular el efecto citopático inducido por el virus (lisis celular). La actividad antiviral del EEP fue evaluada como la capacidad para reducir la mortalidad de las células al colocar el tratamiento de propóleo.

Se realizó el tratamiento en tres diferentes tiempos (dos horas antes de la infección, simultáneo a la infección y dos horas después de la infección), cada tratamiento tuvo ensayos por triplicado y los resultados obtenidos fueron evaluados por medio del análisis estadístico de 2 ANOVAS. Se tuvieron diferencias significativas entre el control positivo (cultivo infectado) y cada uno de los tratamientos (**Figura 17**), la actividad antiviral del EEP se favorece cuando se aplica de manera simultánea a la infección viral, manteniendo la viabilidad celular.

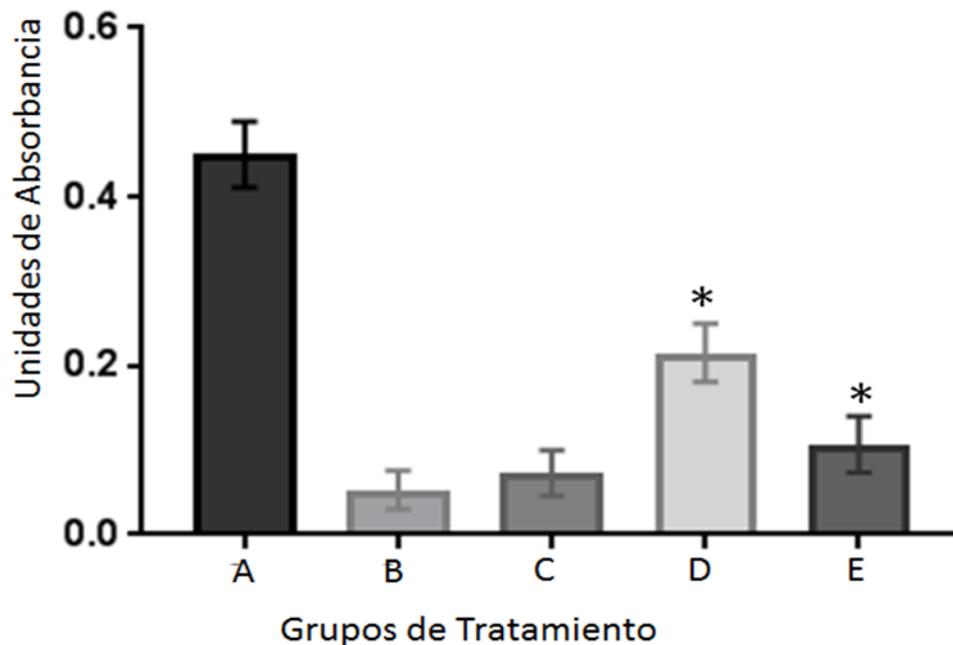


Figura 17. Evaluación antiviral del EEP de FESC. Se muestran los valores promedio de cada grupo de tratamiento. **A)** Control negativo, **B)** Control positivo, **C)** Tratamiento dos horas antes de la infección viral, **D)** Tratamiento simultáneo a la infección viral y **E)** tratamiento dos horas después de la infección viral. Con $p: 0.0006$. (*) Diferencia significativa.

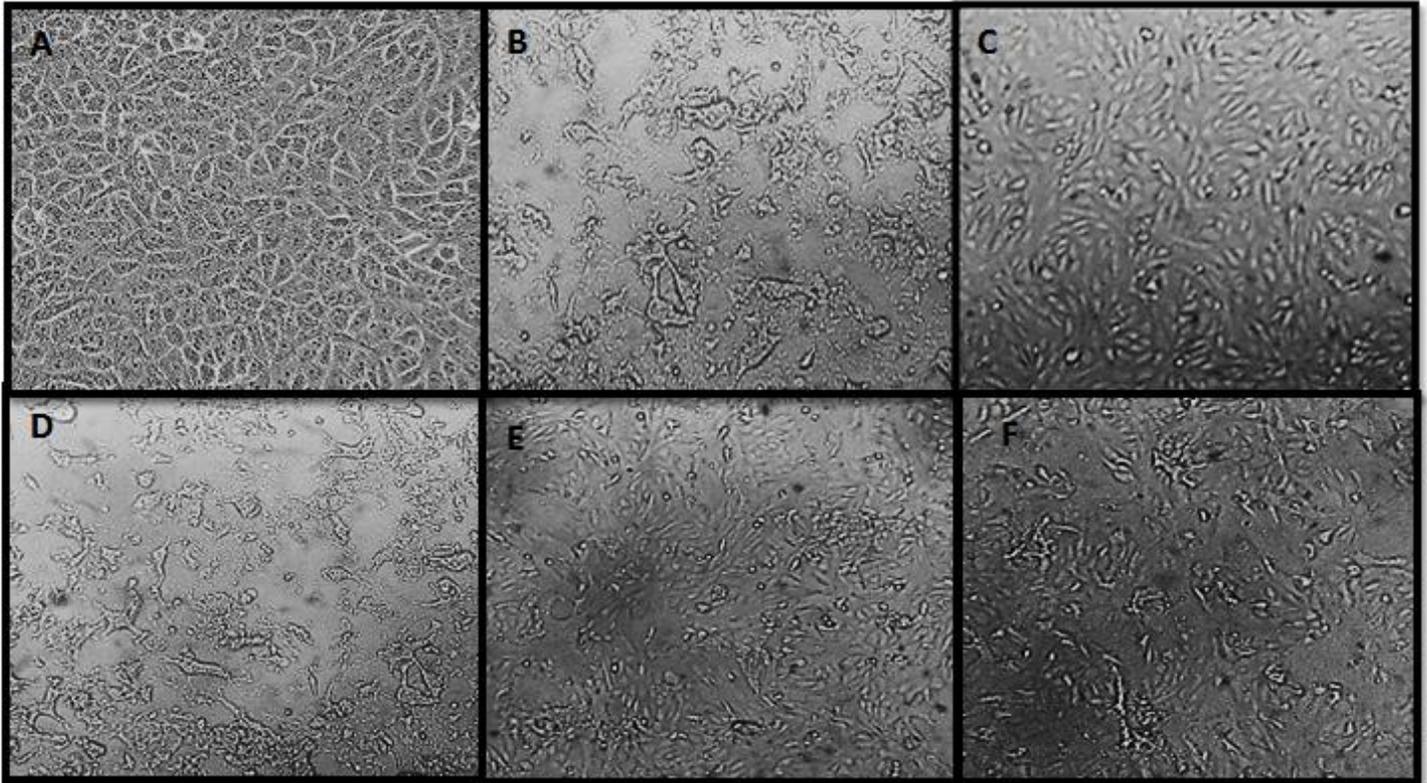


Figura 18. Cultivo de células Vero después del tratamiento con EEP de FESC. A) Células Vero sin infectar. **B)** Células Vero infectadas con VDC, **C)** Células Vero con EEP a una concentración de 0.25 mg/ml. **D)** Tratamiento dos horas antes de la infección viral. **E)** Tratamiento simultáneo a la infección y **F)** Tratamiento dos horas después de la infección. Microscopio invertido, 100x.



8.8 Evaluación antiviral del EHP de Toluca

Se realizaron el mismo tratamiento (dos horas antes de la infección, simultáneo a la infección y dos horas después de la infección). Los resultados obtenidos fueron evaluados por medio del análisis estadístico de 2 ANOVAS, se tuvieron diferencias significativas entre el control positivo (cultivo infectado) y cada uno de los tratamientos (**Figura 19**), su actividad antiviral se favorece cuando se aplica el EHP de manera simultánea a la infección viral, en comparación con el EEP de FESC, se siguió detectando actividad antiviral significativa con el tratamiento administrado después de la infección viral.

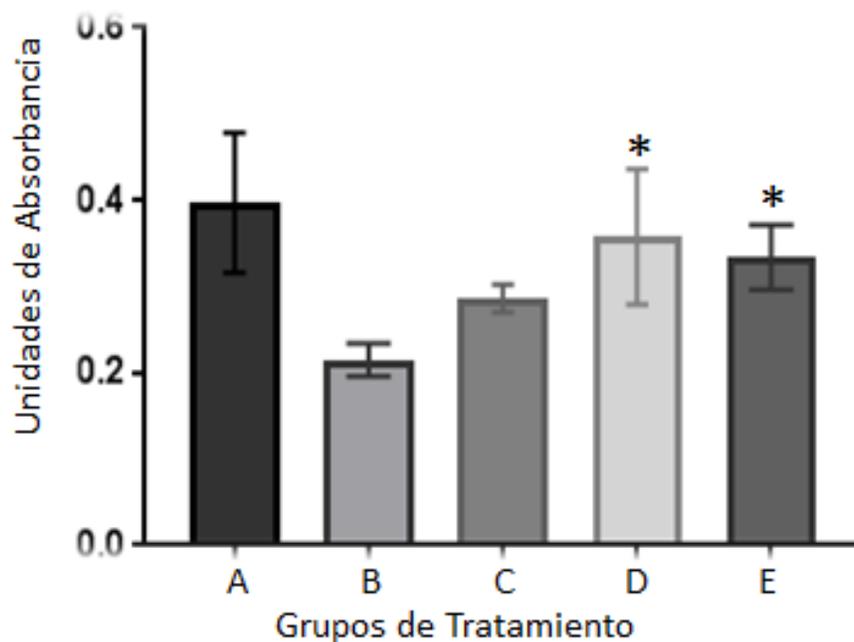


Figura 19. Evaluación antiviral del EHP de Toluca. Se observan los promedios de cada grupo de tratamiento. **A)** Control negativo. **B)** Control positivo. **C)** Tratamiento dos horas antes de la infección viral. **D)** Tratamiento simultáneo a la infección viral y **E)** Tratamiento dos horas después de la infección viral. Con P: 0.0080. (*) Diferencia significativa.

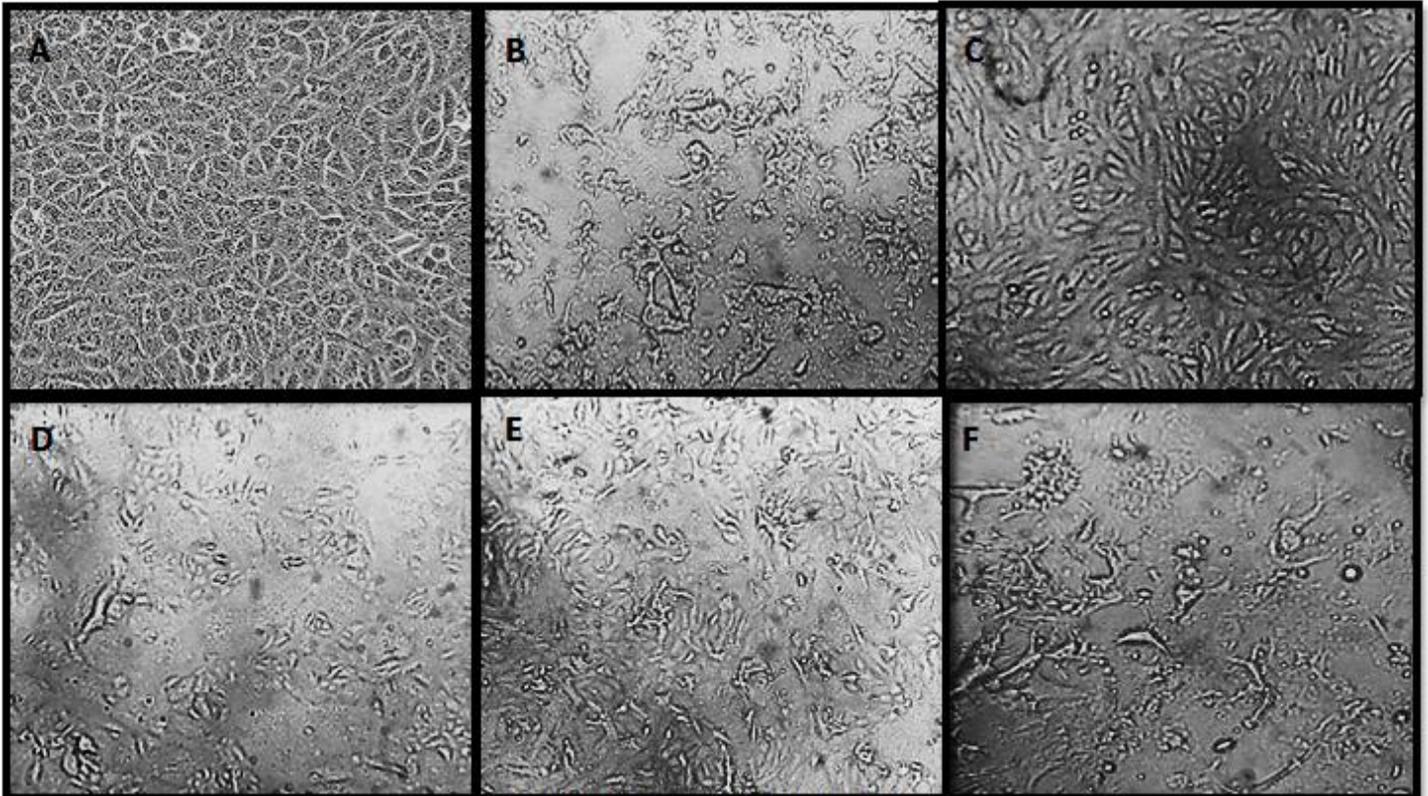


Figura 20. Tratamiento con EHP de Toluca. Observamos a las 48 horas la presencia de efecto citopático. **A)** Células Vero sin infectar. **B)** Células Vero infectadas con VDC. **C)** Células Vero con EHP a una concentración de 1 mg/ml. **D)** Tratamiento dos horas antes de la infección viral. **E)** Tratamiento simultáneo a la infección y **F)** Tratamiento dos horas después de la infección viral.



9.0 DISCUSIÓN

Este trabajo fue realizado para comprobar si los propóleos mexicanos poseen actividad antiviral, el propóleo es una mezcla compleja que las abejas elaboran a partir de partículas resinosas de diferentes vegetales. De este modo se determinaron y compararon las propiedades organolépticas de los propóleos de FESC y Toluca Edo. de México, este último presenta una variación en el color y sabor, que pueden atribuirse a la región de origen, época de colecta, entorno y especies vegetales de las cuales se extrae la resina.

Rodríguez (2015), constata que la propiedad más importante del propóleo es su actividad antimicrobiana y el uso para el tratamiento de infecciones en seres humanos y animales; y está determinada por la presencia de fenoles y flavonoides.

Al realizar una comparación de la cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides presentes en ambos propóleos, se encontró que el EHP de Toluca contiene una menor cantidad de flavonoides y una mayor cantidad de compuestos fenólicos que el EEP de FESC. Como se sabe los compuestos fenólicos son antioxidantes capaces de neutralizar la acción oxidante de una molécula inestable, como los radicales libres, sin perder su propia estabilidad electroquímica.

La actividad biológica no es equivalente a la concentración de fenoles presentes en el propóleo, cuando se evalúa la capacidad de secuestro de radicales no es importante el contenido de fenoles, sino la posición del grupo hidroxilo (Zavaleta et al., 2005)

El EHP de Toluca mostró citotoxicidad a una mayor concentración que el EEP de FESC, esto puede deberse a que las células soportan la toxicidad de los extracto, sin embargo hay que considerar que el extracto de EEP está constituido por etanol inicialmente por lo tanto éste resulta considerablemente toxico para las células al momento de su empleo.

Burquez et al. (2013) y Nolkemper et al. (2010), reportan que la toxicidad de los extractos de propóleo se ve reflejada en un cambio en la morfología celular, ya que éstas se presentan alargadas en comparación con los cultivos no expuestos a



los extractos (**Figura 13 y 14**) y mencionan que su acción tóxica está dada por las ceras, compuestos fenólicos, resinas, polen, entre otros, que contienen los propóleos.

El virus fue adaptado a las células Vero, de tal forma que fue posible apreciar un efecto citopático evidente a las 24 horas, con formación de sincitios (**Figura 11**), Este virus termina su infección con una lisis celular y la formación de placas líticas, esto quiere decir, que posterior al ensamble del virión, éste es liberado de la célula por exocitosis (Reyes 2002).

Amoros et al. (1992), refiere que el propóleo es un potente inhibidor del *Poliovirus*, inhibiendo la formación de placas a concentraciones menores a las empleadas en este estudio y comenta que el tamaño de las placas que producen los virus *Herpes Simple*, *Adenovirus* y *virus de la estomatitis vesicular* se reducen enormemente cuando el propóleo está presente en el medio. Otros estudios reportan una concentración de propóleo menor produciendo inhibición en el efecto citopático del virus del *Herpes Simple tipo 2* (Nolkemper et al., 2010). Búrquez et al. (2013), describe inicialmente el uso del propóleo mexicano como antiviral, usando concentraciones diferentes de EEP de FESC 2015 y empleándose en el virus de *Pseudorabia*, encontrando una reducción significativa en el número de unidades formadoras de placa.

El presente trabajo destaca el mantenimiento de la viabilidad celular observándose una inhibición del efecto citopático que ocasiona el virus *de Distemper canino* cuando los extractos de propóleo fueron utilizados; simultáneamente y después de la infección viral. Varios autores han demostrado que los flavonoides son capaces de inhibir a la polimerasa viral e interferir con la síntesis del ácido nucleico (Formican y Regelson, 1995; Cushnie y Lamb, 2005). Por otra parte, Nolkemper et al. (2010), reportan que la administración del propóleo antes o simultáneamente a la infección produce un efecto inhibitorio significativo, ya que interfiere con la estructura de la envoltura viral o enmascara los componentes virales, los cuales son necesarios para la adhesión y absorción a la célula. Por su parte Carvalho et al. (2013), ha demostrado que los flavonoides ejercen acción antiviral directa sobre



el virus de *Distemper canino*, por lo cual sugiere que el propóleo realiza la inactivación directa sobre el virus. Muñoz et al. (2011), señala que los flavonoides presentan un efecto sinérgico y menciona que fortalecen la membrana celular con lo cual presentan una menor susceptibilidad a la infección viral. Por su parte Gallina et al. (2011), mencionan y demuestran que la interferencia de los compuestos fenólicos en la etapa pos-infección del *Distemper canino* reduce la síntesis de RNA viral y su progenie.

10.0 PERSPECTIVA

El objetivo es dar un punto de vista para poder continuar más a fondo la investigación. Realizar el análisis HPLC permitirá conocer cada uno de los compuestos fenólicos presentes en los propóleos utilizados y poder estudiar más a fondo cada uno de ellos y el papel que desempeñan en la actividad antiviral. También podrían iniciarse nuevas investigaciones con diferentes tipos de virus y con otros propóleos, comparando los hallazgos realizados.



11.0 CONCLUSIONES

- ∞ Los extractos de propóleo estudiados presentan diferencias en su contenido de compuestos fenólicos y flavonoides. Ya que estos compuestos dependen de la flora que existe alrededor de la colmena.
- ∞ El Extracto Etanólico de Propóleo de la FESC no causa alteraciones en la morfología y mantiene la viabilidad celular a una concentración de 0.25 mg/ml, las concentraciones mayores de 0.45 mg/ml inducen cambios morfológicos y lisis celular. Esto indica que la concentración de 0.25 mg/ml es idea ya que no afecta los ensayos de tratamientos con el virus.
- ∞ El propóleo de FESC muestra ser más efectivo cuando se administra de manera simultánea a la infección viral presentando un menor efecto citopático y una mayor viabilidad celular en comparación con el tratamiento aplicado dos horas antes y dos horas después de la infección viral.
- ∞ El Extracto Hidrosoluble de Propóleo de Toluca no causa alteraciones en la morfología y mantiene la viabilidad celular a una concentración 1 mg/ml. las concentraciones mayores de 2.3 mg/ml inducen cambios morfológicos y lisis celular. Esto indica que la concentración de 1 mg/ml es idea ya que no afecta los ensayos de tratamientos con el virus.
- ∞ El propóleo de Toluca muestra ser más efectivo cuando se administra de manera simultánea a la infección viral presentando un menor efecto citopático y una mayor viabilidad celular en comparación con el tratamiento aplicado dos horas antes, también se encontró una buena actividad antiviral cuando fue utilizado dos horas después de la infección viral.



∞ Comparación:

	Extracto Etanólico de Propóleo de FESC	Extracto Hidrosoluble de Propóleo de Toluca
Concentración	0.25 mg/ml	1 mg/ml
Toxicidad	A menores concentraciones toxica	A mayores concentraciones toxicas
Compuestos	Etanol +DMEM + DMSO	DMEM
Sabor	Amargo de sabor fuerte	Intensamente amargo
Efecto Antiviral (encontrado)	Mayor actividad antiviral simultaneo a la infección	Mayor actividad antiviral simultaneo a la infección y dos horas después de la infección



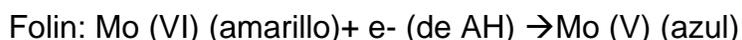
12. ANEXO

Anexo 1. Compuestos fenólicos: Método de Folin-Ciocalteu.

Fundamento:

La concentración de fenoles totales (CFT) se mide por espectrofotometría con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción, para ello el agente oxidante que se utiliza es el reactivo de Folin-Ciocalteu (FC). $3\text{H}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5\text{I}_3\text{WO}_3-5\text{MoO}_3-10\text{H}_2\text{O}$.

Se fundamenta en una reacción de oxidación-reducción que es el mecanismo básico, gracias al carácter reductor del reactivo que consiste en una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato (coloración amarilla), en el cual el molibdeno y el tungsteno se encuentra en estado de oxidación 6^+ . La reducción con ciertos agentes reductores genera la formación de molibdeno y tungsteno con un promedio de estado de oxidación entre 5^+ y 6^+ formando una solución azul.



La absorbancia de color azul desarrollado se mide a una longitud de onda de 765 nm. Los resultados se expresan en mg de ácido gálico por g de muestra (Orozco, 2010)

Material:

- Gradilla
- Micro pipetas de volumen variable
- Puntas para micro pipetas
- Pizeta
- Pipeta graduada de 2 ml
- Espátula
- Espectrofotómetro UV-VIS
- Matraz aforado de 100 ml
- Matraz aforado de 1000 ml
- Tubos de ensaye de 12 x 75 mm
- Vaso de precipitados de 50 ml
- Celdas de cuarzo
- Cronómetro
- Balanza analítica



Reactivos

- Agua destilada
- Estándar puro de ácido gálico
- Metanol grado HPLC
- Reactivo de Folin- Ciocalteu
- Carbonato de sodio anhidro (Na_2CO_3)
- Solución stock de ácido gálico (0.2 mg/ml). Disolver 1 mg de ácido gálico en 5 ml de agua. Mantener en refrigeración.
- Carbonato de sodio (Na_2CO_3 200 g/L). Disolver 200 g de carbonato de sodio anhidro en 700 ml de agua caliente. Dejar enfriar y aforar a 1000 ml con agua destilada.

Procedimiento

- A partir de la solución stock, preparar las siguientes concentraciones 0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.2 mg/ml, como se indica en el **Tabla 4**.

Preparación de las muestras

- Preparar una solución estándar de 0.02 mg/ml de cada muestra de propóleo.

Curva de calibración

El ácido gálico es una pequeña molécula que por su estabilidad y estructura fenólica, presenta un grupo benceno unido a un grupo hidroxilo. Se utiliza como material de referencia o patrón para determinar el contenido de fenoles de diversos analitos mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu.

En la Tabla 4 se indica el rango de las concentraciones preparadas y los sistemas que serán leídos en el espectrofotómetro.

Tabla 4. Curva de calibración para cuantificación de fenoles totales.

	Estándar 1	Estándar 2	Estándar 3	Estándar 4	Estándar 5	Estándar 6
Estándar ácido gálico (μl)	31.5	62.5	125	250	500	1000
Agua destilada (μl)	968.5	937.5	875	750	500	-
Concentración (mg/ml)	0.00625	0.0125	0.025	0.05	0.1	0.2



Al tener los sistemas anteriores preparados se procede de la siguiente manera:

1. Tomar 1 ml y se transfiere a un tubo de ensaye que contenga 6 ml de agua destilada.
2. Adicionar 500 μl de reactivo de Folin-Ciocalteu y esperar 5 minutos., se observara un cambio de color a verde.
3. Adicionar 1.5 ml de Na_2CO_3 y completar con agua destilada hasta un volumen de 10 ml, se observara un cambio de color azul.
4. Esperar 2 horas a temperatura ambiente para que se lleve a cabo la reacción y determinar la absorbancia a 760 nm.
5. Realizar las pruebas por triplicado y considerar el promedio.
6. Con los resultados obtenidos se grafica la concentración de ácido gálico contra vs la absorbancia, realizar una análisis de regresión lineal e interpolar la absorbancia de la muestra a evaluar (Figura 21)
7. Los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico o en porcentaje.

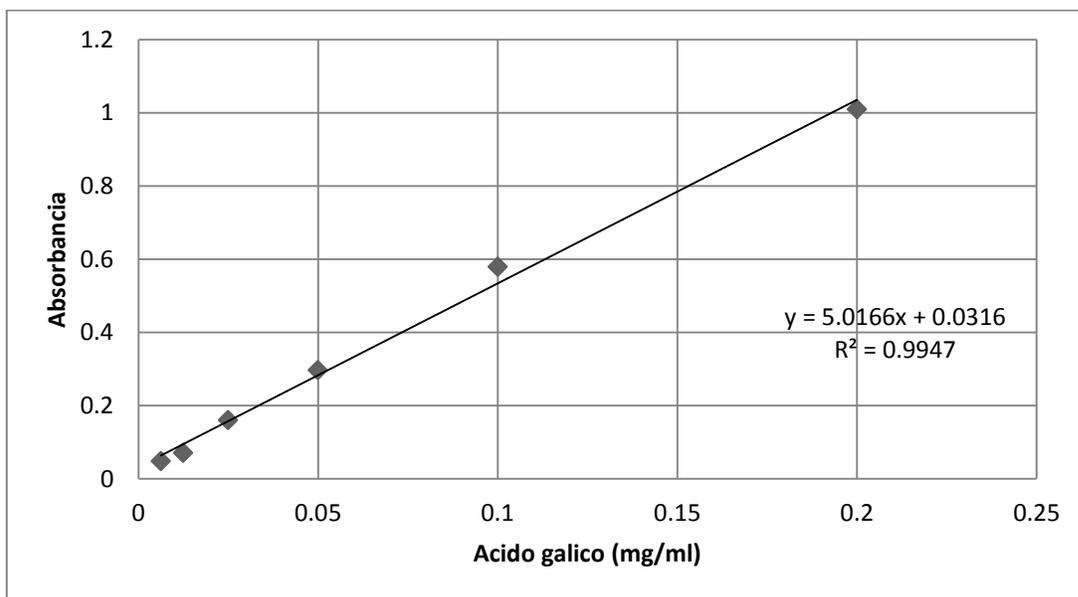


Figura 21. Curva de calibración de ácido gálico.



Anexo 2. Cuantificación de Flavonoides.

Fundamento:

El principio básico es la formación de complejos estables de ácidos con el grupo ceto C-4 y/o del C-3 o C-5 del grupo hidroxilo de las flavonas y flavonoles; como complejos lábiles, ácidos con los grupos ortodihidroxi en el anillo A o B de los flavonoides. La quercetina es la más adecuada para la construcción de la curva de calibración (Kiranmai et al., 2011)

Material

- Gradilla
- Micro pipetas de volumen variable
- Puntas para micropipetas
- Piseta
- Pipeta graduada de 2 ml
- Espátula
- Espectrofotómetro UV-VIS
- Matraz aforado de 100 ml
- Matraz aforado de 1000 ml
- Tubos de ensaye de 12 x 75 mm
- Vaso de precipitado de 50 ml
- Celdas de cuarzo o placas de ELISA de fondo plano
- Cronometro
- Balanza analítica

Reactivos

- Agua destilada
- Estándar puro de quercitina
- Cloruro de aluminio, $AlCl_3$
- Metanol, grado HPLC

Preparación de reactivos

- Solución *stock de quercetina* (1 mg/ml). Disolver 10 mg de quercetina en MeOH y aforar a 10 ml. Conservar en oscuridad y refrigerada.
- *Tricloruro de aluminio, $AlCl_3$* (2%). Disolver 2 g. de cloruro de aluminio en agua destilada aforar a 100 ml, con mucho cuidado ya que el producto es muy corrosivo e higroscópico.



Preparación de la curva de calibración

- A partir de la solución estándar de quercetina de 1 mg/ml, tomar alícuotas correspondientes para obtener las concentraciones seriadas como se muestra en la Tabla 5.

Procedimiento

1. Agregar a cada tubo 3 ml de AlCl_3 y esperar 10 minutos a que se lleve a cabo la reacción.
2. Seleccionar una longitud de onda de 415 nm y calibrar el espectrofotómetro a 0 de absorbancia con metanol.
3. Con los resultados obtenidos se grafica la concentración de quercetina, realizando un análisis de regresión lineal e interpolando la absorbancia de la muestra a evaluar (Gráfico 8).
4. El contenido total de flavonoides se expresa como μg de equivalentes de quercetina/g de extracto (Rodríguez, 2015).

Tabla 5. Curva de calibración para la cuantificación de flavonoides

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia
1	0.019
2	0.059
3	0.106
4	0.164
5	0.172
6	0.211
7	0.219
8	0.233
9	0.283
10	0.3
20	0.719
40	1.452
50	1.835

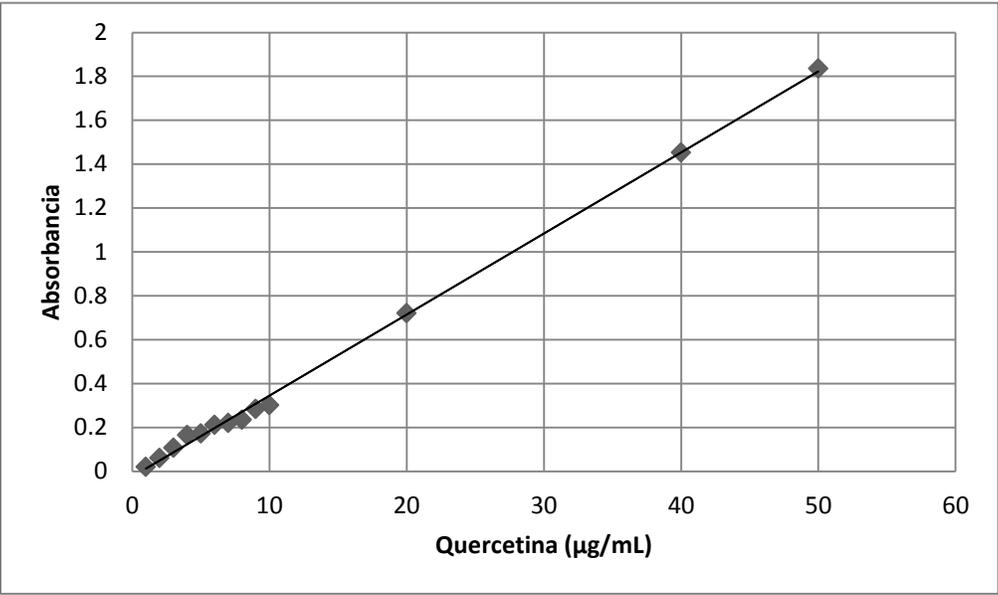


Figura 22. Curva de calibración de quercetina.



Anexo 4. Reed and Muench

Se basa en la suposición de que el número de unidades de prueba afectadas varía proporcionalmente al \log_{10} de la dilución, es decir que a diluciones menores (mayor concentración de virus) el porcentaje de efecto será mayor que a diluciones mayores (menor concentración de virus). Además, se supone que en la zona cercana al 50% de Efecto éste varía linealmente con la dosis. Es muy importante no omitir ninguna dilución intermedia.

Tabla 6. Dilución de dosis infectante

Diluciones \log_{10}	Unidades infectadas	Infectadas acumuladas		A/A+B	%
		A (infectadas)	B (no infectadas)		
10^{-3}	5/5	48	0	48/48	100%
10^{-4}	5/5	43	0	43/43	100%
10^{-5}	5/5	38	0	38/38	100%
10^{-6}	3/5	33	2	33/35	94.2%
10^{-7}	4/5	30	3	30/33	90.9%
10^{-8}	5/5	26	3	26/29	89.6%
10^{-9}	4/5	21	4	21/25	84%
10^{-10}	3/5	17	6	17/23	73.91%
10^{-11}	3/5	14	8	14/22	63.63%
10^{-12}	3/5	11	10	11/21	52.38%
10^{-13}	4/5	8	13	8/21	38.09%
10^{-14}	2/5	6	14	6/20	30%
$10^{12.16}$		Dosis que causa el 50% del efecto citopático			



REFERENCIAS

- **Amoros M.**, Lurton E., Boustie J., Girre L., Sauvager F. & Comier M. (1994). Comparison of the antiherpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-2-enyl caffeate. *Journal of Natural Products*, 57 (5), 644-6447.
- **Amoros**, Simoes, Girre, Sauvager, & Cormier. (1992). Synergistic effect of flavones and flavonols against Herpes Simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *Journal of Natural Products*, 55 (12), 1732-1740.
- **Bankova V.**, Christov, Kujumgiev, Marcucci & Popov. (1995). Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. *Z. Naturforsch.* 50, 167-172.
- **Bankova**. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 114-117
- **Bedascarrasbure E.**, Maldonado L., Álvarez A., Rodríguez E. (2004). Contenido de fenoles y flavonoides del propoleos argentino. *Acta Farmarmaceutica. Bonaerense*, 23 (3), 369-72.
- **Bedascarrasbure E.**, Maldonado L., Fierro W., Alvarez A. (2006). PROPOLEOS. Editorial Ediciones Magna, Argentina.
- **Brook Jawetz**, Melnick y Adelberg, Butel y Morse. (2005). *Microbiología médica*. (México): Manual Moderno.
- **Burdock (1998)**. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36.
- **Burquez M.J.** (2013) Evaluación antiviral Del propóleo mexicano en cultivo celular infectado en virus de Aujesky. Tesis de Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- **Carvalho**, Botelho, Ferreira, Santos, Diaz, Olivera, Soares, Almeida & Silva. (2013). In vitro inhibition of *Distemper canine* virus by flavonoids and phenolic acids. Implications of structural differences for antiviral desingn. *Veterinary Science*, 95, 717-724.



- **Céspedes**, Cruz P. & Navarro C. (2010) Modulación de la respuesta inmune durante la infección por virus *Distemper canino*: implicancias terapéuticas y en el desarrollo de vacunas. *Archivo de Medicina Veterinaria*, 42, 15-18.
- **Chil N.**, Pavón S., Galves H., Cuellar C. & Avila, B. (2002) Estudio de algunos parámetros para la cauterización del extracto blando de propóleos procedente de la región de Manzanillo como materia prima para la industria nacional. *Revista Cubana de Química*, 14, 34-41.
- **Cushnie T. & Lamb A.**, (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 343- 356.
- **de Dios L.**, Ibarra C. & Velasquillo C. (2013) Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad Tecnología en salud*, 2 (2) 70-78.
- **Farré R.**, Fresquet I. & Sanchez A. (2004). El propóleo y la salud. *Article Pharmaceutica*, 45, 21-43.
- **Fierro W. (1995)**
- Propoleos: propiedades terapéuticas y uso clínico. *Tendencia en medicina*, 30-38.
- **Formica J. & Regelson W.** (1995). Review of biology of quercetin and related bioflavanoids. *Food and Chemical Toxicology*, 33, 1061-1080.
- **Gallina L.**, Pozzo F., Galligioni V., Bombardelli R. & Scagliarinni A. (2011). Inhibition of viral RNA synthesis in canine Distemper virus infection by proanthocyanidin A2. *Antiviral Research* 92,447-452.
- **Greenway, W.**, T. Scaysbrook & F.R. Whatley (1990) *Bee World* 71: 107-18.
- **Guerrero J.** (2013) Estudio químico del propóleo negro de la región de Zacatecas. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- **Hegazi, G.H.** (2000) *Actas del Congreso Internacional de Propóleos*. Buenos Aires. Argentina.



- **Higuchi R.**, Dollinger G, Walsh PS & Griffith R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, 10, 413-417)
- **Huang D.**, Ou B, & Prior RL (2005) The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- **Ian R.**, Tizard. (2009). *Introducción a la inmunología veterinaria*. Editorial Elsevier Saunders, Barcelona España, 272-275.
- **INAFED (2015)** Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal Enciclopedia de los municipios y delegaciones del Estado de México. Recuperado el 15 de febrero del 2017 de <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM15121a.html>
- **Ito J.**, Chang F., Wang H., Park Y., Ikegaki M., Kilgore N. & Lee K. (2001) Anti-AIDS agents 48: Anti- HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. *Journal of Natural Products*, 64, 1278-1281
- **Kaur and Kapoor.** (2001) Antioxidants in fruits and vegetables - the millennium's health. *International Journal of Food Science and Technology*, 36(7), 703-725.
- **Kiranmai M.**, Mahendra C. & Ibrahim M. (2011). Comparison of total flavanoid content of *Azadirachta indica* root bark extracts prepared by different methods of extraction. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2 (3), 254-261
- **Koning B & Dustmann J.** (1985). The caffeoylics as a new family or natural antiviral compounds. *Naturwissenschaften*, 72, 659-661
- **Kumar N.**, Anmad K., Dang R. & Husain A. (2008) Antioxidant and antimicrobial activity of propolis from Tamil Nadu zone. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2(12), 361-364.
- **Kuropatnicki A.**, Szliszka E. & Wojciech K. (2013) GC-MS analysis of chloroform extract of *Croton bonplandianum*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4 (4), 613-617



- **Lamb R & Kolakofsky D.** (1996). Paramyxoviridae: The viruses and their replication. *Fields Virology*. Nueva York. 1177-1204
- **Londoño A.,** Penieres G., García C., Carrillo L., Quintero M., García S., Mendoza M., & Cruz T. (2008). Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja *Apis mellifera* proveniente del estado de México *Tecnología en Marcha*, 21 (1), 49-55
- **López F.** (2004). Abejas. Facultad de Medicina Veterinaria Zootecnia, UNAM, México. 17, 41 – 44
- **Melnick J.,** Adelberg E. & J. (2010). Manual de Microbiología Médica. Mc Graw Hill. Edición 25ª, 833.
- **Mossman T.** (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays Tim Mosmann *DNAX Research Institute of Molecular and Cellular Biology. Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
- **Morrison T & Portner.** (1991). Structure, function and intracellular processing of glycoproteins of *Paramyxoviridae*. D.W. Kingsbury (ed.) *The Paramyxoviruses*. Plenum Press, E.U.A, 347-382
- **Muñoz L.,** Linares S. & Narváez W. (2011). Propiedades del propóleo como un aditivo funcional en la nutrición animal. *Biosalud*, 10 (2): 101 – 111.
- **Naranjo N.,** García M., Portillo A. & Ruíz E. (2007). Validación del ensayo de proliferación celular colorimétrico por MTT, para la determinación de potencial del rHu-met-G-CSF. *Revista Cubana de Química*, 29 (1), 18-21.
- **Nolkemper S.,** Reichling J., Heinz K. & Schnitzler, P. (2010). Mechanism of herpes simplex virus type 2 suppression by propolis extracts. *Phytomedicine*, 17, 132-138.
- **Orozco J. (2010).** Estudio comparativo de algunas actividades biológicas de las cortezas de *Ceiba aesculifolia* subsp. *parvifolia*. *Juliania adstringens* y *Cyrtocarpa procera* de San Rafael, Coxcatlan, Puebla. Tesis Maestría. Universidad Nacional Autónoma de Mexico, UNAM.



- **Palomino L.**, Martínez J., García C., Gil J. & Durango D. (2010). Caracterización fisicoquímica y actividad antimicrobiana del propóleo en el Municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). *Rev. Fac. Nat. Agr. Medellín*, 63(1), 5373-5383.
- **Quiñones M.**, Miguel M. & A. Aleixandre. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular Hospitalaria. CODEN NUHOEQ S.V.R. 27(1):76-89
- **Reed J. & Muench H.** (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg*, 27 (3), 493-497.
- **Rodríguez B.** (2015). Perfil químico de propóleos mexicanos para su aplicación en Medicina Veterinaria. Tesis Profesional, FES Cuautitlán, UNAM.
- **Reyes J., Santos G.**, Hernández J., Espinoza B., Borraz M., Ramírez H., Vallejo V. & Zenteno E. (2002). Mecanismos moleculares de la patogenia viral: Estudios con el *Rubulavirus porcino*. Mensaje Bioquímico, 25, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- **Salatino A.**, Teixeira E., Negri G. & Message D. (2005). Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evidence based Complementary and Alternative Medicine*, 2, 33–38.
- **Saxena M., & Pradhan A.** (2012). Flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 16(2); nº 28, 130-134
- **Saskia A.**, van Accker & Bast A. (1998). Structural Aspects of Antioxidant Activity of Flavonoids. En: *Flavonoids in health and Disease*. Ed Marcel Dekker, 9, 221-251.
- **Sforcin J.** (2007) Propolis and the Immune System: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 113, 1-14.
- **Sforcin J. & Bankova V.** (2011). Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? Department of Microbiology and Immunology, Biosciences Institute, *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 253–260



- **Soler, A.** (2009). Estudio de la capacidad de antioxidante y la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del aceite de oliva. Universidad de Lleida.
- **Sousa J.** Mascota saludable (2017). Cuáles son los síntomas del Moquillo Canino y Cómo tratarlo. Recuperado el 2 de febrero del 2017 <http://mascotafiel.com/cuales-son-los-sintomas-del-moquillo-canino-y-como-tratarlo>)
- **Summers B. & Appel M.** (1994). Aspects of canine distemper virus and measles virus encephalomyelitis. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 20, 525-534.
- **Vandeveld M.** (1995). The pathogenesis of nervous distemper. *Veterinary Microbiology*, 44, 271-280.
- **Vinardell M.** (2007). Alternativas a la experimentación animal en toxicología: situación actual. *Acta Bioethica*13, (1),41
- **Von Messling V**, Zimmer G., Herrler G., Haas L. & Cattaneo R. (2003). The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. *Journal Virology*, 75, 6418-6427.
- **Vries R.**, Duprex P. & Swart, R., (2015) Morbillivirus Infections: An Introduction. *Revista Viruses*. (Boston University School of Medicine). 7, 699-706
- **Zavaleta, J**; Muñoz A; Blanco, T; Alvarado- Ortiz, B. & Loja (2005) Capacidad antioxidante y principales ácidos fenólicos y flavonoides de algunos alimentos. *Acta Médica San Martiniana*, 1 (1), 81-85