



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“Evaluación del efecto antiviral *in vitro* del Propóleo de FESC y tres flavonoides comerciales sobre el virus de distemper canino”

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

MARÍA DE JESÚS GONZÁLEZ BÚRQUEZ

TUTOR:

**DR. SALVADOR FONSECA CORONADO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

**DRA. MARÍA MARGARITA CANALES MARTÍNEZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
DR. JOSÉ GUILLERMO PENIERES CARRILLO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

Cuatitlán Izcalli, Edo. de México

Diciembre, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Instituciones.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme formar parte de esta gran institución educativa y por la oportunidad de realizar un posgrado de alto nivel.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por permitirme una formación integral y ver culminado exitosamente mi formación profesional.

Al CONACYT (Núm. de beca: 423637) por el apoyo económico brindado durante mis estudios de posgrado.

Proyectos:

Proyecto UNAM DGAPA PAPIIT 200915

DESARROLLO DE PRODUCTOS CON PROPÓLEO PARA SU USO EN LA PASTEURELOSIS DEL CONEJO, DISTEMPER CANINO Y OTITIS CANINA.

Proyecto UNAM FESC PIAPI 1632

EVALUACIÓN DE PRODUCTOS SINTÉTICOS Y PROTOTIPOS FARMACEUTICOS A BASE DE PROPOLEO PARA SU APLICACIÓN EN LA SALUD ANIMAL.

Proyecto UNAM FESC PIAPI 1809.

EVALUACIÓN DE PRODUCTOS A BASE DE PROPÓLEO PARA SU APLICACIÓN EN LA SALUD ANIMAL.

Proyecto UNAM DGAPA PAPIME PE205717.

IMPLEMENTACIÓN DE LA ASIGNATURA DE BIOLOGÍA CELULAR, BIOLOGÍA MOLECULAR Y GENÓMICA ANIMAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO CON TÉCNICA DE USO COMÚN EN INVESTIGACIÓN COMO INDUCTORAS HACIA UNA CARRERA CIENTÍFICA EN ALUMNOS DE MVZ.

Proyecto UNAM FESC PIAPI 1829.

BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DE PROCESOS FISIOLÓGICOS Y DE RESPUESTA A INFECCIONES DE INTERÉS VETERINARIO.

Laboratorios:

Laboratorio número 4 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, campo 4 UNAM. Responsable. Dr. Carlos Gerardo García Tovar y Dr. Carlos Ignacio Soto Zárate.

En donde se llevaron a cabo los ensayos relacionados a cultivo celular, actividad antiviral, PCR punto final así como los ensayos de MTT.

Laboratorio número 6 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, campo 4 UNAM. Responsable. Dr. Tonatiuh Cruz Sánchez.

En donde se llevó a cabo el análisis general del propóleo de FESC.

Laboratorio número 17 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, campo 4 UNAM. Responsable. Dr. Salvador Fonseca Coronado.

Desarrollo de la técnica de RT-PCR tiempo real.

Laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, campo 1 UNAM. Responsable. Dr. José Guillermo Penieres Carrillo.

En donde se llevó a cabo la extracción del propóleo de FESC.

Laboratorio de Farmacognosia. Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO). Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. Responsable: Dra. Ma. Margarita Canales Martínez

En donde se realizó el perfil químico del propóleo mediante HPLC y CG-MS.

Académicos:

Dr. Salvador Fonseca Coronado, Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez, Dr. Carlos Ignacio Soto Zárate, Dr. Carlos Gerardo García Tovar, Dra. Margarita Canales Martínez, Dr. José Guillermo Penieres Carrillo, Dr. Liborio Carrillo Miranda.

Al Técnico Académico M. en C. Francisco Rodolfo González Díaz, por su apoyo en la aplicación de las Técnicas de Biología Molecular y Celular que se emplearon en el presente trabajo.

Al Técnico Académico MVZ José Luis Nieto Bordes, en el desarrollo de cultivos celulares.

RESUMEN

El Propóleo es una resina que las abejas elaboran (*Apis mellifera*), es una mezcla de ceras, exudados colectados de brotes, polen y enzimas. Ha sido empleado desde tiempo antiguos por el hombre por sus propiedades y acción biológica contra microorganismos patógenos, incluidos los patógenos virales. El presente trabajo se investigó la actividad antiviral *in vitro* de un Propóleo originario de México (FESC) y tres flavonoides comerciales (quercetina, naringenina y pinocembrina). Se realizaron diferentes tratamientos en tres momentos distintos; 1) Dos horas antes de la infección, 2) Simultáneo a la infección, 3) Dos horas después de la infección viral. La actividad antiviral se evaluó por medio de la inhibición de la expresión relativa del gen de la nucleoproteína del VDC (RT-qPCR tiempo real) y midiendo la viabilidad celular (ensayo colorimétrico MTT). El Propóleo aplicado 2 horas antes de la infección disminuyó la expresión viral y tuvo una correlación positiva con la viabilidad celular. Así mismo, la administración de los tres flavonoides en conjunto dos horas antes de la infección provocó una ligera disminución de la expresión viral, sin embargo, no mejoró la viabilidad celular. La quercetina aplicada simultáneamente a la infección indujo una disminución de la expresión viral y mejoró la viabilidad celular. Los flavonoides (pinocembrina y naringenina) no mostraron efecto antiviral en los tiempos evaluados. Finalmente, se demostró la actividad antiviral del Propóleo y la sinergia que existen entre los flavonoides estudiados sobre la disminución del efecto citopático y la expresión del gen de la nucleoproteína del CDV.

Palabras clave: Distemper/Propóleo/EEP/flavonoides/MTT /RT-PCR tiempo real.

ABSTRACT

Propolis is a resin that honey bees (*Apis mellifera*) produce by mixing wax, exudates collected from tree shoots, pollen, and enzymes. It has been used for its biological properties against pathogenic microorganisms including those of viral origin. In the present study, we demonstrate the antiviral effect of Mexican propolis, as well as of the three commercial flavonoids (quercetin, naringenin, and pinocembrin) present in its composition, in cell cultures infected with Canine Distemper Virus. The treatments were carried out with propolis, flavonoids individually and a mixture of the three flavonoids at three different times. Antiviral activity was evaluated by the inhibition of the relative expression of the virus nucleoprotein gene (Real-Time qPCR) and by the determination of cellular viability (MTT Assay). Propolis applied before infection, decreased viral expression (0.72 vs 1.0, 1.65, 1.75 relative expression) and correlated with increased cell viability (0.314 vs 0.215; 0.259; 0.237 Absorbance Unit (AU)). The administration of a flavonoid mixture containing the three commercial flavonoids before infection induces a slight decrease in viral expression (0.93 vs. 1; 1.42; 1.82 relative expressions), however, it does not improve cellular viability (0.255 vs. 0.247; 0.282; 0.245 AU). Quercetin administrated at the same time of infection decreases viral expression (0.90 vs 1.0; 3.25; 1.02 relative expression) and improves cellular viability (0.294 vs 0.240; 0.250; 0.245 AU). Pinocembrin and naringenin individually did not show any antiviral activity at the administration times evaluated in this study. The present work is the first *in vitro* study of the effect of propolis in Canine Distemper Virus and is demonstrated the antiviral activity of Mexican propolis, in addition to the synergy that exists between the three flavonoids on cell viability and the expression of the nucleoprotein virus gene.

Key words: Distemper/propolis/EEP/flavonoids/MTT /real time RT-PCR

CONTENIDO

1	INTRODUCCION	1
1.1	Propóleo	1
1.2	Composición de los Propóleos.....	2
1.2.1	Pinocembrina.....	5
1.2.2	Naringenina.....	6
1.2.3	Quercetina.....	7
1.3	Métodos de separación de los componentes del Propóleo	7
1.4	Propóleo en medicina veterinaria	8
1.4.1	Actividad antiviral del Propóleo	8
1.5	Virus del Distemper Canino	10
1.5.1	Generalidades del virus de distemper canino (VDC)	10
1.5.2	Organización genómica de VDC	11
1.5.3	Nucleocápside (N).....	13
1.5.4	Resistencia a agentes físicos y químicos	14
1.5.5	Patogenia.....	15
1.5.6	Diagnóstico	16
1.5.7	Tratamiento de la enfermedad causada por VDC.....	17
1.5.8	Control y prevención del VDC.....	18
2	JUSTIFICACION.....	19
3	HIPOTESIS	20
4	OBJETIVOS.....	21
5	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	22
6	MATERIALES Y METODOS.....	24
6.1	Recolección y obtención del extracto etanólico del propóleo	24
6.2	Caracterización organoléptica.	24
6.3	Rendimiento del Extracto.	25
6.4	Perfil Químico del Extracto etanólico del propóleo.	25
6.5	Cuantificación de fenoles y flavonoides.....	26
6.6	Preparación de EEP y productos comerciales.	26
6.7	Línea celular y virus.....	27
6.8	Evaluación del crecimiento.	27
6.9	Determinación de la concentración citotóxica media (CC₅₀).	28
6.10	Tratamientos antivirales.....	28
6.11	RT-PCR Cuantitativa de tiempo real.....	31
6.12	Análisis estadístico.....	36

7	RESULTADOS	37
7.1	Rendimiento del propóleo.....	37
7.2	Perfil químico del EEP mediante HPLC-UV.....	37
7.3	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS).....	39
7.4	Cuantificación de fenoles y flavonoides.....	40
7.5	Estandarización de la curva de crecimiento celular.....	40
7.6	Ensayos de citotoxicidad.....	41
7.7	Citotoxicidad del EEP.....	42
7.8	Citotoxicidad de los flavonoides comerciales.....	43
7.8.1	Quercetina.....	43
7.8.2	Pinocembrina.....	44
7.8.3	Naringenina.....	45
7.9	CC ₅₀ y concentraciones empleadas del EEP y de los flavonoides.....	46
7.10	Efecto citopático del VDC.....	47
7.11	Efecto del EEP sobre el VDC.....	49
7.12	Efecto de la Quercetina sobre el VDC.....	50
7.13	Efecto de la Pinocembrina sobre el VDC.....	51
7.14	Efecto de la Naringenina sobre el VDC.....	52
7.15	Efecto de la mezcla de los flavonoides comerciales sobre el VDC.....	53
7.16	Eficacia del tratamiento antiviral determinado por la viabilidad celular.....	54
7.17	RT- PCR punto final.....	56
7.18	RT- PCR tiempo real.....	57
7.19	Curva de amplificación del gen de la NP de VDC.....	58
7.21	Cambio en la expresión del gen de la nucleoproteína de VDC posterior al tratamiento con los compuestos mediante RT-qPCR relativa.....	59
7.22	Validación del método de Livak para cálculo de la expresión relativa.....	60
7.23	Eficacia del tratamiento antiviral evaluado por la expresión génica relativa.....	61
8	DISCUSION	63
9	CONCLUSIONES	66
10	PERSPECTIVAS DEL PROYECTO	67
11	REFERENCIAS	68
12	ANEXOS	78
12.1	Anexo 1. Perfil Químico HPLC-UV.....	78
12.2	Anexo 2. Cuantificación de fenoles.....	79
12.3	Anexo 3. Cuantificación de flavonoides.....	83
12.4	Anexo 4. Ensayo colorimétrico de MTT.....	86

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Composición general de los propóleos.....	3
Cuadro 2. Trabajos realizados empleando propóleo en virus animales.	9
Cuadro 3. Análisis por cromatografía de gases.....	40
Cuadro 4. CC_{50} y concentraciones finales utilizadas en los tratamientos experimentales....	47
Cuadro 5. Curva de calibración para cuantificación de fenoles.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la pinocembrina.....	5
Figura 2. Estructura química de la naringenina	6
Figura 3. Estructura química de la quercetina.....	7
Figura 4. Estructura del virus del distemper canino.....	11
Figura 5. Estructura y organización del VDC.....	13
Figura 6. Esquema del ciclo de la replicación de los paramixovirus.....	14
Figura 7. Esquema de la secuencia del gen de β -actina de perro.....	33
Figura 8. Esquema de la secuencia del gen de la NP del VDC.....	33
Figura 9. Esquema de las condiciones de corrida utilizadas en la amplificación de los genes de interés por pcr de punto final.....	34
Figura 10. Esquema de las condiciones de corrida que se utilizaron para realizar las curvas de amplificación y de disociación de los genes para pcr tiempo real.	35
Figura 11. Cromatograma del Propóleo de FESC.....	38
Figura 12. Estándar de pinocembrina espectro UV..	39
Figura 13. Curva de estandarización de células Vero.....	41
Figura 14. Citotoxicidad del DMSO.....	42
Figura 15. Citotoxicidad del EEP del Estado de México (FESC)..	43
Figura 16. Citotoxicidad de quercetina.....	44
Figura 17. Citotoxicidad de pinocembrina.....	45
Figura 18. Citotoxicidad de naringenina.....	46
Figura 19. Efecto citopático del VDC cepa Buzzel..	48
Figura 20. Efecto citopático inducido por el virus de VDC en los diferentes tiempos de tratamientos empleando propóleo.....	49
Figura 21. Efecto citopático inducido por el virus de VDC en los diferentes tiempos de tratamientos con quercetina.....	50
Figura 22. Efecto citopático inducido por el virus de VDC en los diferentes tiempos de tratamientos con pinocembrina.....	51
Figura 23. Efecto citopático inducido por el virus de VDC en los diferentes tiempos de tratamientos con naringenina.	52
Figura 24. Efecto citopático inducido por el virus de VDC en los diferentes tiempos de tratamientos con la mezcla de los tres flavonoides (naringenina-pinocembrina-quercetina).....	53
Figura 25. Evaluación del tratamiento antiviral mediante el ensayo colorimétrico MTT (UA595)..	55
Figura 26. Obtención del amplificado del gen de β actina y VDC por PCR punto final.....	56
Figura 27. Amplificación de gen endógeno de β actina.....	57

Figura 28. Amplificación del gen NP de VDC	58
Figura 29. Ejemplo de curvas de amplificación y disociación como resultado del tratamiento con propóleo.....	59
Figura 30. Comparación de pendientes. :	60
Figura 31. Niveles de expresión relativa del gen VDC-NP medido por qPCR en tiempo real después de la administración de los diferentes tratamientos.....	62
Figura 32 . Curva de calibración de ácido gálico.....	82
Figura 33. Curva de calibración de ácido gálico.	85

ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS

HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución.
HPLC-DAD	Cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos.
RT-HPLC.	Cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa
VHS-1	Virus Herpes Simple tipo 1.
VHS-2	Virus Herpes Simple tipo 2.
VEIB	Virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bursa.
VRA	Virus de Reovirus Aviar.
VNC	Virus de Newcastle.
PRV	Virus de Pseudorrabia.
EP1	Extracto de Propóleo 1.
EP2	Extracto de Propóleo 2.
VAC-2	Adenovirus Canino tipo 2.
VDVB	Virus de Diarrea Viral Bovina.
VCF	Virus de Calicivirus Felino.
PMA	Acetato de formol miristato.
IFN	Interferón.
LPS	Lipopolisacáridos.
VDC	Virus de Distemper Canino.
ARN	Ácido Ribonucleico.
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero.
SNC	Sistema Nervioso Central.
PGE2	Prostaglandina E ₂ .
LCE	Líquido cerebro espinal.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa.
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con Transcriptasa reversa.
VS	Virus del Sarampión.
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco.
DMSO	Dimetil Sulfóxido.
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.
EEP	Extracto Etanólico de Propóleo.
UA	Unidades de Absorbancia.
ECP	Efecto citopático.

1 INTRODUCCION

1.1 Propóleo

El propóleo es un material resinoso elaborado por las abejas (*Apis mellifera*) a partir de la cera y exudados de las plantas, mezcladas con polen y enzimas secretadas por las mismas (1). La palabra *propolis* se cree que fue dada por Aristóteles para señalar que el Propóleo se utilizaba para proteger y defender la colmena. Propóleo significa "antes de la ciudad" o "defensor de la ciudad" (del griego pro = en defensa de, y polis = ciudad). En el comienzo de la civilización griega, Aristóteles observó que el Propóleo tenía la capacidad de defender una ciudad con miles de habitantes, la colmena, tanto para la reparación estructural arquitectónica como para el mantenimiento de la especie mediante la preparación de lugares asépticos para el depósito de los huevos de la abeja reina (2). El propóleo es muy importante para las abejas ya que es un fuerte material adhesivo que generalmente lo usan como material de construcción para sellar las aberturas y grietas de la colmena (3), también se utiliza para suavizar las paredes internas (4), así como para proteger la colonia de enfermedades y cubrir los cadáveres de aquellos intrusos que murieron dentro de la colmena, evitando su descomposición (5). Se ha observado que las abejas recogen las resinas protectoras de las flores, hojas y capullos con sus mandíbulas y luego las llevan a la colmena en sus patas traseras, su color varía de verde a marrón rojizo dependiendo de su fuente botánica (2).

El propóleo se ha utilizado ampliamente desde la antigüedad. Los egipcios se beneficiaron de las propiedades anti-putrefacción de los Propóleos para embalsamar a sus muertos, y los médicos griegos y romanos lo utilizaron como agente antiséptico y cicatrizante (6). En las últimas décadas se han publicado gran número de artículos científicos que escriben sobre los diferentes aspectos de las propiedades biológicas del propóleo, sin embargo, en la mayoría, la información es limitada (6,7).

El propóleo se ha convertido en un ingrediente popular para complementar el cuidado de la salud, como producto natural en farmacéutica y para la preparación de alimentos (cápsulas, geles, polvos, enjuagues, cremas) (8). Entre las propiedades terapéuticas se ha estudiado su

acción antimicrobiana, antioxidante, antiviral, antimicótica, anti-inflamatoria, inmunomoduladora y anticancerosa (9,10).

1.2 Composición de los Propóleos

La composición del propóleo al igual que el de la miel varía por factores como; la fuente de los exudados, clima y condiciones ambientales (6,11). El propóleo suele ser una mezcla aromática debido a su contenido en aceites esenciales, y en función del origen botánico de la resina, época de recolección y edad, también difiere en color (de amarillo claro a castaño oscuro), sabor (amargo, ligeramente picante o insípido) y consistencia, ya que a temperaturas de 45 a 250° C es una sustancia suave, flexible y muy pegajosa, mientras que, por debajo de 15° C, se vuelve duro y quebradizo. Regularmente, es convertido en líquido entre 60 y 70° C, pero en algunas muestras el punto de fusión puede ser de 100° C (12). El propóleo crudo contiene impurezas tales como madera, cera, polen, incluso abejas muertas, de modo que es necesaria una observación macroscópica con el fin de eliminarlas y purificarlo antes de la preparación del extracto. Los solventes utilizados para la extracción en su mayoría son alcoholes como el metanol y etanol. El alcohol más utilizado es el etanol, el cual contiene diferentes porcentajes de agua, se ha encontrado que con un 70% de etanol es útil para extraer la mayor parte de los componentes activos del Propóleo, pero no las ceras (7,13).

Se ha señalado la presencia de al menos 300 compuestos (Cuadro 1). Dentro de las principales; resinas (50%), ceras (30%), aceites esenciales (10%), polen (5%) y otros compuestos orgánicos (5%) (14). Entre los compuestos orgánicos, es posible encontrar compuestos fenólicos y ésteres, flavonoides en todas sus formas (flavonoles, flavonas, flavononas, dihidroflavonoles y chalconas), terpenos, esteroides, beta-aldehídos aromáticos, alcoholes y estilbenos (15,16). La combinación de estos compuestos probablemente ha dado como resultado un efecto sinérgico, el cual es esencial para la actividad biológica del Propóleo (17). Debido a las diversas características en su composición, es difícil comparar los resultados obtenidos con diferentes estudios, la variación en el origen, estacionalidad,

extracción, y estandarización de los procesos, todo esto puede interferir con el perfil químico y las propiedades biológicas del mismo (7).

Cuadro 1. Composición general de los propóleos.

Clasificación del compuesto	Compuestos
Bálsamos: 40-70%	Fenólicos: Fenoles, ácidos fenólicos. Ésteres, flavonoides, dihidroxiflavononas, flavonas, flavonoles, chalconas, glicéridos fenólicos.
Ceras: 20-35 %	Componente de cera de abeja.
Aceites esenciales: 7%	Mono y sesquiterpenos
Otros: 5%	Minerales, polisacáridos, proteínas aminoácidos, aminas, amidas, trazas de carbohidratos, lactonas, quinonas, esteroides y vitaminas.

Fuente: (18).

Los compuestos derivados de las plantas son los más deseables debido a la posibilidad de efectos secundarios menores y su fácil accesibilidad desde la naturaleza. Los metabolitos secundarios, también llamados productos naturales, son compuestos químicos sintetizados por las plantas, característicos de un rango limitado de especies, éstos tienen un atractivo interés terapéutico, debido a que muchos tienen un efecto biológico sobre otros organismos (19). Entre estos compuestos derivados de las plantas, los flavonoides han recibido atención considerable como posibles fuentes de nuevas terapias para las infecciones virales (20). Los flavonoides son compuestos fenólicos (metabolitos secundarios) que se encuentran en muchas plantas (21,22). Existen estudios que reportan los efectos benéficos de los

flavonoides en la salud general, como sus actividades anti-oxidantes, antitumorales y antimicrobianas (23–27) . La actividad antiviral de los flavonoides se ha descrito en contra de diferentes virus (25,28–31). El estudio de estos metabolitos ha despertado gran interés ya que su estructura química es similar por lo que se sugiere que su actividad biológica está relacionada con la misma. Es decir, el esqueleto de éstos es un anillo bencénico con una cadena de tres carbonos que está unida a su vez a otro anillo bencénico (C6-C3-C6). Todos los flavonoides poseen las características de ser polifenólicos y solubles en agua. Dentro de los flavonoides se conocen siete clases principales, según los grupos funcionales que posean; las chalconas (implicadas en la estimulación de la polinización), las flavonas (que proporciona la coloración amarilla como la tricetina), los flavonoles (incoloros o amarillos, por ejemplo quercetina, miricetina, kaemferol), los flavandioles (leucocianidina, leucopelargonidina), las antocianinas (pigmentos rojos, azules y violetas), los taninos condensados (antocianidinas) y algunos autores consideran también a las auronas, a las cuales los integran en las (27,32).

1.2.1 Pinocembrina

La pinocembrina (5,7-dihidroxi-flavanona), (Figura 1) es un flavonoide del propóleo y generalmente es el componente más abundante del mismo(33,34). Se encuentra en los pinos, hojas de eucalipto y goma de acacia, puede ser obtenido por síntesis (35). Se ha demostrado que posee extensos efectos farmacológicos incluyendo actividad antimicrobiana (36,37), antioxidante (38), anti-mutagénica y anti-inflamatoria (33,39).

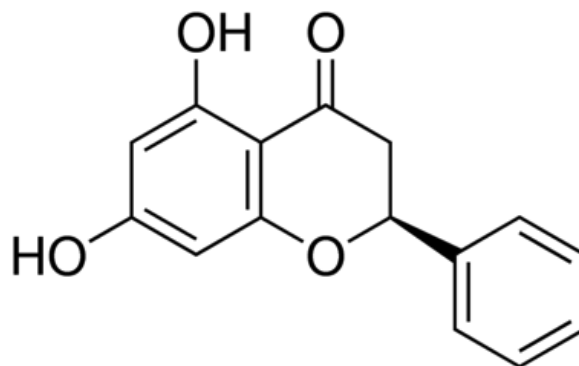


Figura 1. Estructura química de la Pinocembrina

1.2.2 Naringenina

La naringenina (4',5,7-trihidroxiflavanona) (figura 2), se ha demostrado que posee actividad antioxidante y antiviral en el virus del Dengue tipo 2, Herpes virus 1 y 2, la podemos encontrar en la piel de tomate, tomillo y algunas frutas como en la naranja (25,40–42).

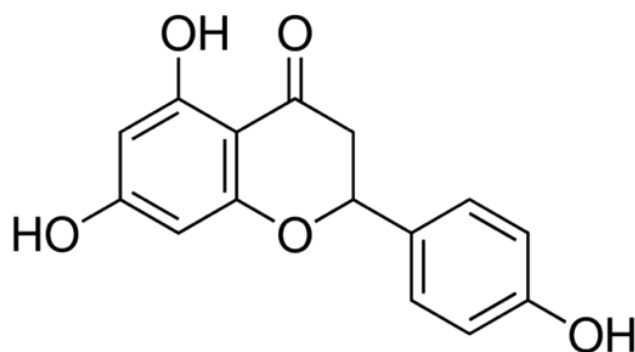


Figura 2. Estructura química de la naringenina

1.2.3 Quercetina

Es un flavonoide polifenólico (3,3',4',5,6-Pentahidroxi flavona) (43), está presente en diversas plantas, siendo uno de los más potentes antioxidantes de origen vegetal (44). Posee un amplio rango de beneficios terapéuticos incluidos: los antivirales (31,45), antidiabéticos (46), anti-inflamatorios (26) y neuroprotectores (47).

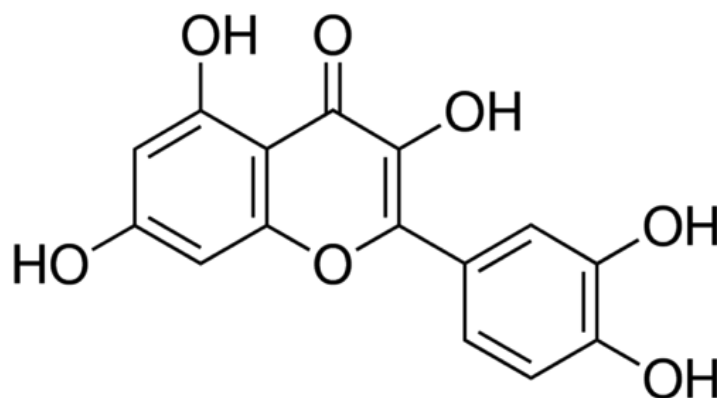


Figura 3. Estructura química de la Quercetina

1.3 Métodos de separación de los componentes del Propóleo

La composición precisa del Propóleo se puede determinar mediante su análisis químico por HPLC (48). Recientemente, un amplio grupo de estudios indicó que el uso y las técnicas de HPLC acopladas, especialmente a DAD y EM, son un enfoque poderoso para la rápida identificación de los componentes de las plantas medicinales y sus preparados (49), coincidiendo en que la RT- HPLC (RT- High-performance Liquid Chromatography) es la técnica más conveniente y completa para el análisis de compuestos fenólicos, extractos crudos de Propóleo y separación de los flavonoides (50,51).

1.4 Propóleo en medicina veterinaria

El Propóleo ha sido un atractivo objeto de estudio debido a sus propiedades biológicas activas (1,5), se ha empleado en la terapéutica veterinaria en diversos campos y especies animales, como en la aplicación de soluciones para la prevención y control de enfermedades podales en ovinos (18), infusiones mamarias para el tratamiento de mastitis en bovinos (52), polvos antidiarréicos, bolos y soluciones inyectables, en enfermedades del sistema genitourinario como las endometritis, como colirios y ungüentos para las queratitis y queratoconjuntivitis infecciosas (18); tinturas y pomadas en heridas, soluciones desinfectantes y repelentes para la terapia de la onfalitis del ternero (52). También se ha empleado *in vitro* en contra de *Pasteurella multocida* aislada de conejos (53).

1.4.1 Actividad antiviral del Propóleo

El Propóleo tiene la capacidad de inhibir la propagación viral. La mayor parte de los estudios reportados son con virus humanos, ya que existen pocos trabajos en virus de interés en medicina veterinaria (Cuadro 2). Estudios *in vitro* demuestran los efectos del Propóleo sobre el DNA y RNA de diferentes virus. Los efectos observados involucran una reducción en la multiplicación viral e incluso una acción viricida (54). Los flavonoides, como quercetina y Rutina, que se encuentran en la miel y el propóleo (55) están relacionados con la inhibición de la polimerasa viral y la inhibición de la unión del ácido nucleico viral o las proteínas de la cápside viral. Algunos autores mencionan el efecto sinérgico de la apigenina y campherol en virus herpes simple tipo 1 (VHS). Cabe destacar que estos componentes de manera independiente tienen un menor efecto, y al ser mezclados muestran un efecto sinérgico, lo que explicaría el hecho de que la miel y el Propóleo presentan una mayor actividad antiviral que sus componentes individuales (54). La actividad antiviral del propóleo ha sido demostrada, con resultados prometedores, en contra de algunos virus patógenos para el hombre herpes virus simple tipo 1 (56) y los animales (57); VHS-1 (56,58) y VHS-2 (59), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (60) y el de la influenza aviar (57).

Dentro de las pruebas que se han realizado con virus de origen animal se tienen virus en aves como el de la enfermedad infecciosa de la bursa (VEIB) y reovirus aviar (VRA) (24,28,29). Autores refieren el uso de propóleo en contra del virus de la enfermedad de Newcastle (VNC), mediante un estudio mezclando el Propóleo con otros componentes empleados en medicina tradicional china (61). En bovinos emplearon el Propóleo en terneros con síndrome diarreico infeccioso debido a la presencia de *Escherichia coli* enterotoxigénica, *Cryptosporidium sp.* y rotavirus, observando resultados favorables (62). Otro estudio realizado con el propóleo de Brasil empleando ganado con Herpesvirus bovino-5 (BoHV-5) probó su eficacia como inmunomodulador (63). También se ha probado experimentalmente que el extracto etanólico del propóleo del Estado de México (Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán) (64) en cultivos celulares infectados con el virus de pseudorrabia (PRV) afecto al virus. Por otra parte, se determinó la actividad antiviral de dos extractos etanólicos de Propóleos (EP1 y EP2) de dos fuentes distintas contra el virus del calicivirus felino (VCF), adenovirus canino tipo 2 (VAC-2) y el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) (65).

Cuadro 2. Trabajos realizados empleando Propóleo en virus animales.

Especie	Virus	Tipo de evidencia	Referencias
Aves	Reovirus	<i>In vitro</i>	(28)
	Virus de la Enfermedad de la Bursa	<i>In vitro</i>	(28)
	Newcastle	<i>In vitro</i>	(24)
Bovinos	Rotavirus	<i>In vitro</i>	(62)
Cerdos	Herpes virus tipo I	<i>In vitro</i>	(64)
	Herpes virus tipo 1	<i>In vitro</i>	(17)
Perro	Adenovirus canino	<i>In vitro</i>	(65)
Gato	Calicivirus felino	<i>In vitro</i>	(65)

1.5 Virus del Distemper Canino

El Distemper Canino (VDC) es una enfermedad viral multisistémica grave de los perros y otros carnívoros, el agente etiológico está muy relacionado con el virus del sarampión (VS), el virus de la peste bovina, virus de la peste de los pequeños rumiantes, virus del distemper de la foca y virus del distemper del delfín. Todos son clasificados como Morbilivirus dentro de la familia *Paramixoviridae*. El VDC tiene un periodo de incubación de 3-7 días, es altamente contagioso en perros jóvenes (3-6 meses de edad) y cursa con alta morbilidad y mortalidad. Esta enfermedad se caracteriza por presentar, inicialmente, una fiebre difásica, rinitis aguda, y continúa con una bronquitis, neumonía catarral, gastroenteritis severa y signos nerviosos severos (66).

1.5.1 Generalidades del virus de distemper canino (VDC)

El Distemper Canino (VDC) es una enfermedad viral multisistémica grave de los perros y otros carnívoros, el agente etiológico está muy relacionado con el virus del sarampión (VS), el virus de la peste bovina, virus de la peste de los pequeños rumiantes, virus del distemper de la foca y virus del distemper del delfín. Todos son clasificados como Morbilivirus dentro de la familia *Paramixoviridae*. El VDC tiene un periodo de incubación de 3-7 días, es altamente contagioso en perros jóvenes (3-6 meses de edad) y cursa con alta morbilidad y mortalidad. Esta enfermedad se caracteriza por presentar, inicialmente, una fiebre difásica, rinitis aguda, y continúa con una bronquitis, neumonía catarral, gastroenteritis severa y signos neurológicos severos (66).

1.5.2 Organización genómica de VDC

El VDC pertenece a la familia *Paramyxoviridae*, la subfamilia *Paramyxovirinae* y al género *Morbillivirus* (67). Es un virus relativamente grande (150-250 nm) con RNA de polaridad negativa y RNA polimerasa, con filamento único enrollado en simetría helicoidal no segmentado, que comprende aproximadamente 16 kilobases (kb) (68), está rodeado por una envoltura de lipoproteína derivada de glucoproteínas del virus incorporadas en la membrana celular (69), seis genes codifican para una sola proteína de la envoltura (M), dos glicoproteínas de la hemaglutinina (H y la proteína de fusión F), dos proteínas de la transcriptasa-asociada (la fosfoproteína P y la proteína grande L), y la proteína de la nucleocápside (N) que encapsula al RNA viral. La disposición lineal y la posición del genoma de los seis genes en VDC son respectivamente: N, P, M, F, H y L (68).

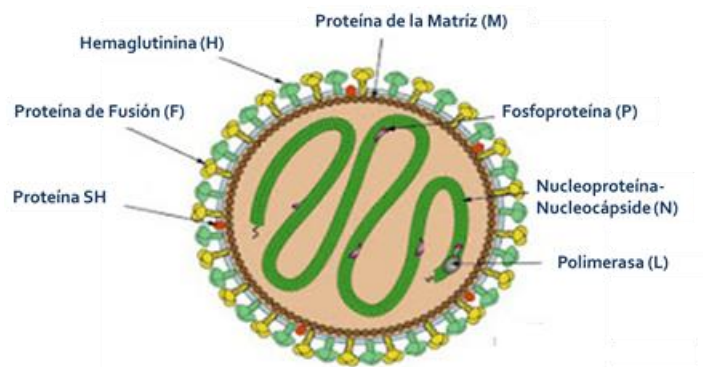


Figura 4. Estructura del virus del Distemper Canino. Se señala la localización de las siete proteínas del virus que intervienen en el reconocimiento y fusión del VDC a la célula huésped (67).

La proteína del gen H la utiliza para la unión a los receptores en la célula durante la primera etapa de la infección, una respuesta inmune del huésped adecuada contra la proteína H puede prevenir la infección por VDC. Después de la unión, la proteína F promueve la fusión de la envoltura viral con las membranas de la célula huésped, y también promueve la fusión de membranas entre las células huésped para la formación

de sincitios (70). La proteína M enlaza ribonucleoproteínas con proteínas de la envoltura durante el ensamblaje del virión, y el gen que codifica para la proteína P tiene dos marcos abiertos de lectura que codifican para las dos proteínas no estructurales V y C (71), que regulan la transcripción, replicación y la eficiencia con la que la nucleoproteína ensambla a la nucleocápside (72) y se ha estudiado que estas proteínas están implicadas en la supresión de la respuesta inmune del huésped, son prescindibles para la replicación del virus *in vitro*, sin embargo son necesarias durante las infecciones *in vivo* (73). Hasta el momento se han identificado cuatro cepas del virus del distemper canino: Ledeerle, Onderspoort, Rockborn y Buzzel, las cuales son empleadas para el estudio de este virus.

El gen de la nucleocápside se considera una región conservada entre las diferentes cepas de VDC, mientras el gen H se somete a una mayor variación genética y antigénica que otros genes del VDC, la secuencia de aminoácidos varía en aproximadamente un 10% entre las diferentes cepas del VDC (74). Las proteínas H y F inducen la producción de anticuerpos neutralizantes (75).

La cadena negativa de RNA se transcribe para producir un molde de cadena positiva para la replicación y producción de ARN negativo genómico adicional. El genoma de ARN se cubre con la nucleoproteína viral N, P y L para formar un complejo de replicación de ribonucleoproteína (RNP) (76).

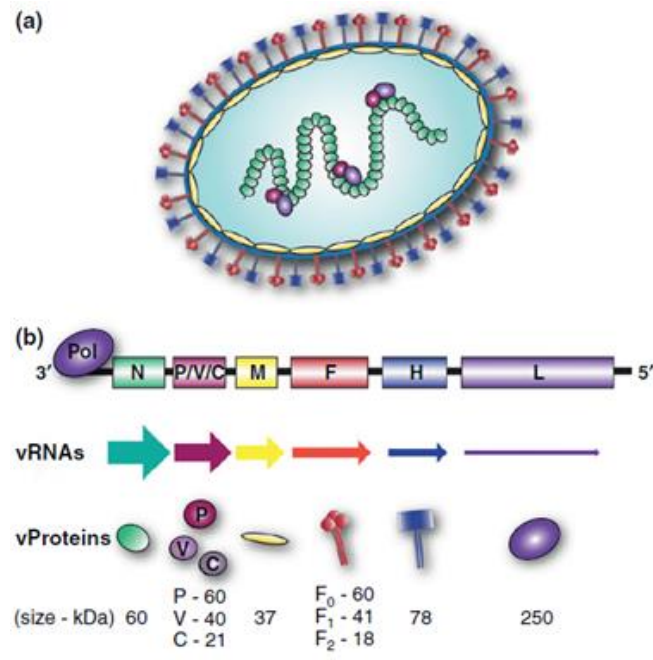


Figura 5. Estructura y organización del VDC. Esquema de la estructura y proteínas víricas de los morbilivirus (77).

1.5.3 Nucleocápside (N)

La proteína de la nucleocápside (N) es un gen de 1683 nucleótidos, es altamente conservado aunque se ha reportado que nuevos aislados del VDC presentan un cierto grado de diversidad genética entre las regiones que codifican para los dominios N´- y C´-terminal (78). La proteína de la nucleocápside (N) es codificada por el gen N´ y presenta 525 aminoácidos (aa). La proteína N juega un papel importante en el ensamblaje del virus, replicación, transcripción y también en la persistencia de la infección. El gen N es un candidato para el diagnóstico molecular del VDC (79).

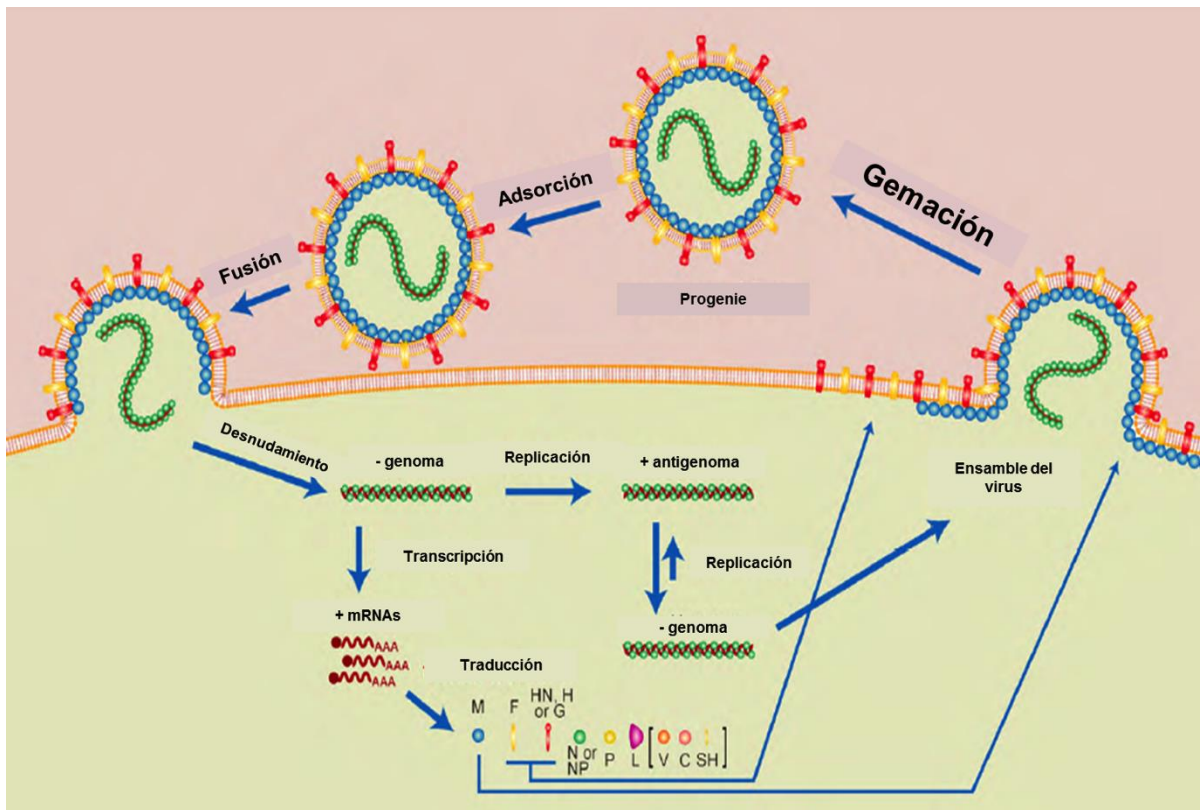


Figura 6. Esquema del ciclo de la replicación de los paramixovirus. La transcripción viral y la replicación del genoma se realiza en el citoplasma (80).

1.5.4 Resistencia a agentes físicos y químicos

El VDC es muy susceptible al calor y se inactiva por el tratamiento a temperaturas entre 50 y 60° C durante 30 minutos. Es también susceptible a la luz ultravioleta (75). En tejidos extraídos de perros con VDC el virus sobrevive por lo menos una hora a 37° C y tres horas a 20° C o 24° C (temperatura ambiente) (66). En climas tropicales el virus no se mantiene viable en las perreras luego de ser eliminado desde los perros infectados. La supervivencia del virus es mucho mayor a temperaturas frías,

sobreviviendo en el ambiente durante semanas a temperaturas de 0° C a 4° C. En el laboratorio en congeladores con temperaturas de -70° C o -192° C (nitrógeno líquido) se mantiene infectivo durante varios años. La liofilización, obtenida a bajas temperaturas y en alto grado de vacío, es un medio excelente para preservar la estabilidad y, por lo tanto, la antigenicidad del virus. En cuanto al pH, el virus es estable entre 4,5 y 9,0. El VDC es un virus envuelto y por lo tanto es susceptible al éter y cloroformo, soluciones de formalina diluida (0,5%), fenol (0,75%) y desinfectantes de amonio cuaternario (0,3%). La supervivencia del virus se ha visto hasta de 30 minutos a 60°C pero no por una hora, tiene diferentes tiempos de supervivencia dependiendo el tipo de muestra y de las condiciones del mismo. Es resistente a pH de 4.5, siendo el pH de 7,0 ideal para mantener su supervivencia (66).

1.5.5 Patogenia

El desarrollo de la patogenicidad del virus es la siguiente: Durante el primer día, se produce la infección de los macrófagos tisulares de las vías respiratorias altas; del día 2-4, la infección se extiende a los tejidos linfoides de las tonsilas palatinas y de los nódulos linfáticos retrofaríngeos y traqueobronquiales; del 4-6, se extiende a los tejidos linfoides sistémicos y al hígado, bazo, nódulos linfáticos de la cavidad abdominal y a la lámina propia del tracto gastrointestinal. Durante este proceso se observa un pico de fiebre transitoria y el inicio de una leucopenia producida por el daño que está ocasionando a los linfocitos T y B. Entre los días 6-9 del transcurso de la enfermedad se produce la viremia; del 8 al 9, el virus se disemina a los tejidos epiteliales (epiteliotropismo) y al sistema nervioso central (neurotropismo); del día 9-14, la evolución varía dependiendo de la respuesta inmunológica del huésped, y puede incluir recuperación, enfermedad clínica multisistémica grave o localización en el sistema nervioso central (SNC). Otra situación que participa en el agravamiento del cuadro clínico del virus del distemper canino es la similitud con el virus del Sarampión, el cual produce estados de inmunodeficiencia, pues se replica en tejido

linfoide (células T CD4 y CD8, y macrófagos). Esto provoca además la liberación de factores inmunosupresores, como la prostaglandina E₂ (PGE₂) que suprime la actividad de los linfocitos T cooperadores e inhiben la liberación de sustancias que estimulan a las células T como la interleucina 2 o incrementan la actividad de leucotrienos. A esto se debe que a pesar de la vacunación siempre hay casos fatales (81).

Si la respuesta inmunológica es rápida y eficaz, la infección es subclínica con una recuperación completa y la eliminación del virus sin enfermedad clínica (en el día 14 después de la infección). Se estima que más del 50% de las infecciones son subclínicas. Si el desarrollo de la respuesta inmunológica falla de los días 9-14, el resultado es una diseminación rápida y generalizada del virus a los tejidos epiteliales, al tracto respiratorio, al tracto gastrointestinal y al SNC que produce signos multisistémicos, un segundo pico de fiebre y un porcentaje de mortalidad elevado. Si la respuesta inmunológica es tardía o débil, se evitan los signos multisistémicos, pero la localización en el SNC puede originar encefalomiелitis crónica con retraso en la aparición de los signos neurológicos.

1.5.6 Diagnóstico

El diagnóstico del VDC se basa principalmente en la sospecha clínica, apoyada por el antecedente característico de un cachorro de 3-6 meses de edad no vacunado o con vacunación inadecuada y posiblemente expuesto al virus. Los perros con afección grave casi siempre tienen signos clínicos bastante característicos para establecer el diagnóstico presuntivo (66,69,82,83). En los casos sospechosos, suele ser útil el hemograma completo para evaluar la respuesta de los leucocitos. La linfopenia y trombocitopenia son anormalidades constantes (84). La presencia de anticuerpos específicos contra el virus de VDC en líquido cerebroespinal (LCE) sirve para hacer el diagnóstico, pero no se encuentra en todos los casos. En ocasiones pueden detectarse

cuerpos de inclusión virales en linfocitos y células epiteliales. También se puede identificar el antígeno viral por inmunofluorescencia en las células sanguíneas, LCE, muestras citológicas y muestras congeladas de tejido. El aislamiento del virus se realiza mejor en tejidos postmortem (66). El aislamiento del virus en líneas celulares a partir de muestras clínicas es complicado. El ensayo de ELISA puede detectar altos títulos de anticuerpos frente al VDC durante varios meses después de la vacunación o después de la infección subclínica o clínica. La detección de IgG tiene poco valor, ya que no distingue la infección actual de la vacunación o de una exposición previa, en tanto que la detección de anticuerpos IgM sugieren una infección reciente o vacunación (66,69,75,82) convirtiendo los resultados en falsos positivos. Recientemente se han utilizado las pruebas moleculares como RT-PCR obteniendo una mayor sensibilidad y especificidad que las pruebas de detección de antígeno viral o anticuerpos (85), aunque se han obtenido mejores resultados realizándola en combinación con una PCR anidada (83). La infección subclínica del VDC contribuye a la propagación de la enfermedad, solicitando el desarrollo de una técnica de diagnóstico más sensible para la detección temprana y la cuantificación en animales asintomáticos y en aquellos con infección subclínica. La técnica de PCR en tiempo real cuantitativa se ha utilizado para la detección y cuantificación del VDC en muestras de sangre, hisopados de conjuntiva, orina y tejidos en los perros que muestran signos clínicos de la enfermedad, y también en células vero infectadas (86).

1.5.7 Tratamiento de la enfermedad causada por VDC

El tratamiento de esta enfermedad es inespecífico y de sostén. Las infecciones del tracto gastrointestinal y respiratorio son comunes y se deben tratar con antibióticos apropiados. La administración de corticosteroides puede ser de provecho en perros con infección crónica, pero está contraindicada en casos agudos (84).

1.5.8 Control y prevención del VDC

La lipoproteína de la envoltura es fácilmente destruida por los solventes lipídicos y de este modo el virus pierde su capacidad infectiva. Los perros infectados son la principal fuente de diseminación del virus por lo que deben ser separados de otros caninos. El programa de vacunación de cachorros contra el VDC debería incluir una combinación de virus modificados de tipo heterotípico VS-VDC (virus de sarampión-virus de distemper canino), a las 8 semanas de edad. Luego, dos revacunaciones con VDC, separadas por 4 semanas y una revacunación anual, ya que puede haber pérdida de anticuerpos debido a variaciones de las vacunas o del huésped. Cualquier vacuna del tipo modificado puede ser fatal para otros animales salvajes y de zoológico (por ejemplo; pandas rojos o hurones de patas negras). Los cachorros que no han ingerido calostro no deben vacunarse con vacunas que contengan virus vivo modificado antes de las 4 semanas de edad, ya que puede producir encefalitis post-vacunal, así como en ciertos animales salvajes y algunas especies de zoológico. Para estas especies deben utilizarse vacunas de virus inactivado. También existen vacunas recombinantes y vacunas de ADN (ejemplo de vectores son; vaccinia, poxvirus de canario, adenovirus o baculovirus) que son adecuadas en perros. Como insertos se utilizan los genes que codifican para las proteínas H y F, que producen una inmunidad protectora (87).

2 JUSTIFICACION

La composición química de los Propóleos que se producen en México actualmente comienza a tener una relevante importancia, debido a que no se cuenta con la suficiente información de esta, por lo anterior, es de vital importancia ir conociendo esta composición para determinar sus efectos sobre algunas de las enfermedades de los animales domésticos. Por otro lado, la enfermedad del Distemper Canino, es una de las afecciones principales y frecuentes en esta especie y actualmente los tratamientos utilizados para ésta son sintomáticos, una parte importante para la prevención de esta enfermedad es poder identificar posibles tratamientos alternativos que puedan favorecer la recuperación de los pacientes afectados por este padecimiento, por lo cual al estudiar el efecto del propóleo y de algunos de sus componentes químicos sobre el virus que la produce, generaría la información necesaria para complementar un tratamiento adecuado sobre la misma.

3 HIPOTESIS

La información acerca de los componentes químicos de los Propóleos mexicanos que presentan actividad antiviral es casi inexistente. El extracto etanólico del propóleo proveniente de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán tendrá un alto contenido de fenoles y flavonoides por lo cual tendrá un efecto antiviral *in vitro* contra el virus de distemper canino.

4 OBJETIVOS

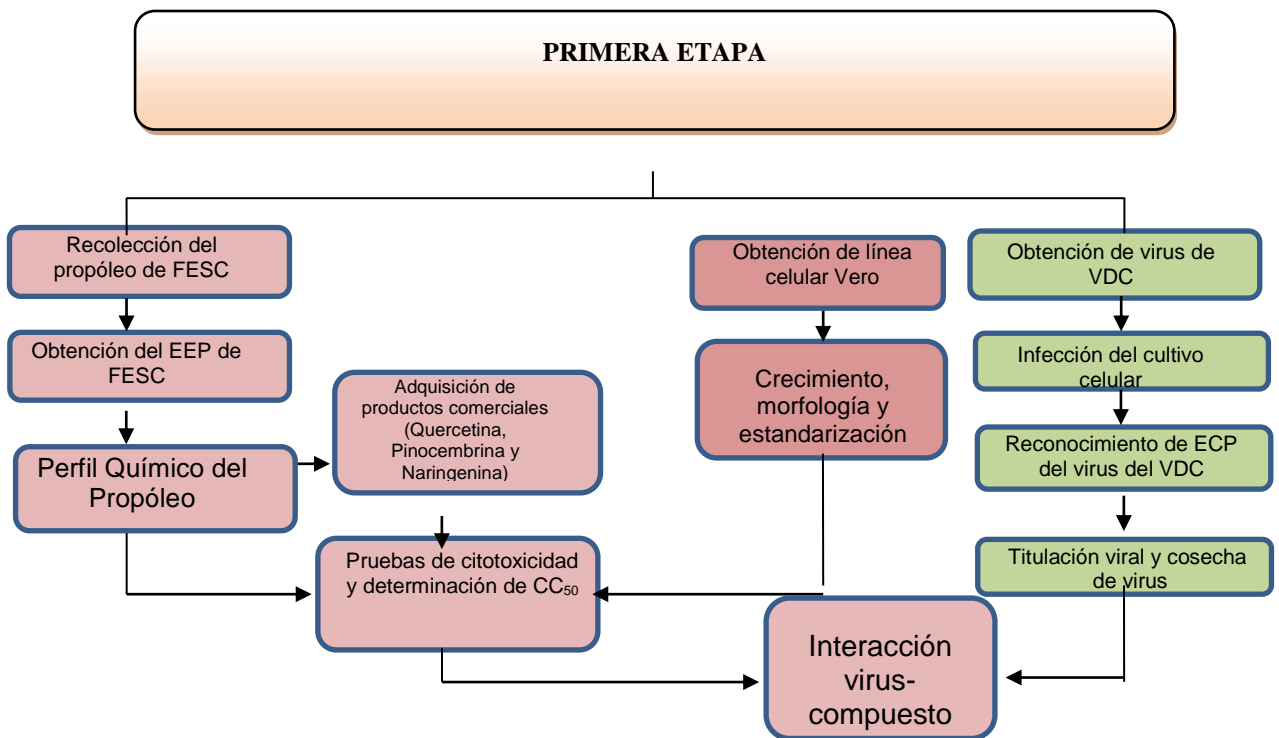
4.1 Objetivo general

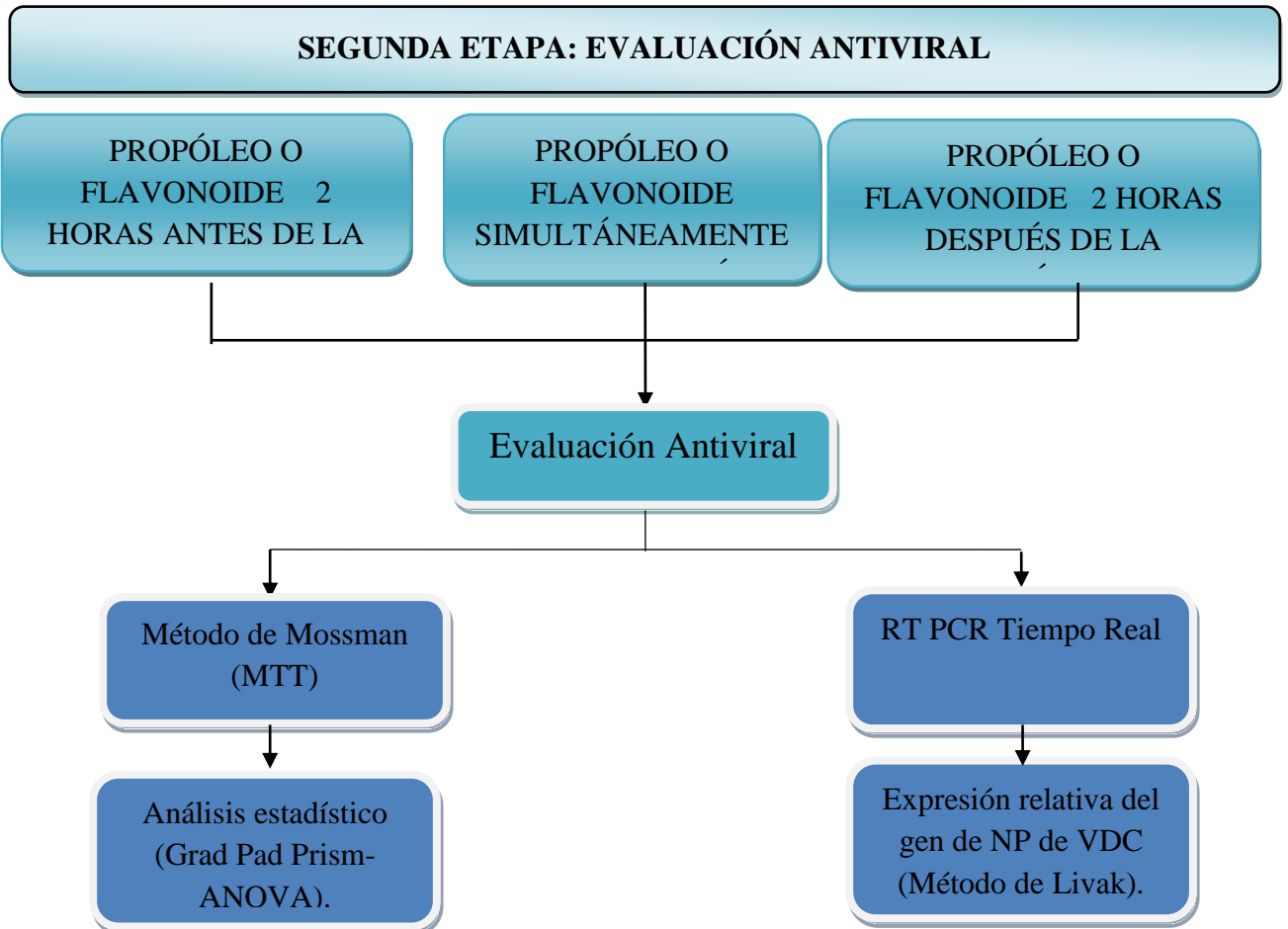
Evaluar la actividad antiviral del Propóleo del Estado de México (Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán) *in vitro* y de tres flavonoides comerciales contra el virus de distemper canino.

4.2 Objetivos particulares

1. Determinar el perfil químico del propóleo de FESC.
2. Determinar la Concentración Citotóxica media (CC₅₀) del extracto etanólico del Propóleo (EEP).
3. Determinar la CC₅₀ de quercetina, pinocembrina, naringenina y la combinación de los tres flavonoides comerciales.
4. Determinar el título viral e identificar el efecto citopático del virus de distemper canino en células vero.
6. Evaluar la actividad antiviral del EEP FESC aplicado dos horas antes de la infección viral, de forma simultánea a la infección y dos horas después de la infección mediante la medición de la viabilidad del cultivo celular y la expresión relativa del gen de la nucleoproteína viral.
7. Evaluar la actividad antiviral de los tres flavonoides comerciales por separado y combinados en las tres condiciones experimentales antes descritas.

5 DISEÑO EXPERIMENTAL





6 MATERIALES Y METODOS

6.1 Recolección y obtención del extracto etanólico del propóleo

El propóleo cosecha octubre 2014 en greña fue colectado del apiario de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC) UNAM localizada en el municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México a una latitud de 19° 40' 50'' N, longitud 99 grados 12'25'' O, altitud 2,260 msnm. El material colectado fue limpiado de contaminantes físicos como astillas, plásticos, restos de abejas, entre otros, después fue fraccionado en trozos pequeños posteriormente, a 200 gramos de Propóleo se le adicionaron 800 ml de etanol al 70% y se mantuvo 15 días en un frasco ámbar, durante este periodo, diariamente fue sometido a una ligera agitación, una vez transcurrido este tiempo, se filtró empleando papel Whatman Cat No. 1444 110 y finalmente, se realizó la destilación del solvente en el laboratorio de Química orgánica de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán con un rotavapor Büchi R-205 B-490 con unas constantes de 85 revoluciones de rotación, a una temperatura de vapor de 27 °C y una temperatura de 55° C, posteriormente, el extracto se mantuvo en refrigeración a 4° C. El rendimiento del EEP se determinó por la diferencia de peso con relación al peso inicial de la muestra.

6.2 Caracterización organoléptica.

Impurezas visibles. De la muestra de EEP se retiró todo material ajeno al objeto de estudio como son madera, restos de abejas, plásticos, insectos externos, etcétera.

Color. El color de la muestra del EEP de FESC se determinó con ayuda de un microscopio estereoscópico.

Olor y sabor. Para evaluar el olor y el sabor de la muestra se retiró una porción de esta del envase para que no interfiriera en la percepción olfativa y posteriormente se colocó en la parte media de la lengua percibiendo los atributos que mejor lo distinguían.

Consistencia y textura a temperatura ambiente. Se colocó una porción de la muestra en un vidrio de reloj y se procedió al tacto de esta.

6.3 Rendimiento del Extracto.

El rendimiento del EEP se determinó por la diferencia de peso con relación al peso inicial de la muestra (53). Para realizar el cálculo correspondiente se emplea la siguiente ecuación.

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{\text{Peso del extracto (g)}}{\text{Peso inicial de la muestra (g)}} \times 100$$

6.4 Perfil Químico del Extracto etanólico del propóleo.

El estudio cromatográfico se realizó en el laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución marca Hewlett Packard, Agilent Technologies series 1100 con un detector de arreglo de diodos (DAD, por sus siglas en inglés) y equipado con el software Agilent Chem-Station for LC and LC/MS systems. Se utilizó una columna Allsphere ODS-1, de 250 x 4.6 mm, tamaño de partícula de 5 µm. Corrida isocrática con mezcla de MeOH-acetonitrilo-agua y H_3PO_4 (25-25-50; 0.1%), flujo de 1 mL/min. Detector de arreglo de diodos (DAD a longitud de onda de 280 nm con barrido completo de 200-400 nm). Se inyectaron 30 µL y entran al aparato 20 µL (flop 20 µL).

Se empleó un Cromatógrafo de Gases Agilent Technologist 6850 acoplado a un Espectrómetro de Masas Modelo 5975 C. Para el cromatógrafo, las condiciones empleadas fueron: Columna RTX 30 m. de largo por 0.25 mm de diámetro interno por 25 micras de película, bajo las siguientes condiciones de corrida:

- Temperatura del inyector: 250°C.
- Modo de inyección: Split.
- Radio: 33.5:1
- Flujo del Split: 29.9 ml/mn.
- Flujo de corrida: 35 cm/seg

Las condiciones del horno fueron las siguientes:

- Temperatura inicial: 70°C
- Rampa de calentamiento: 8°C por minuto hasta 270°C, segunda rampa: 10°C por minuto hasta 290°C, se mantiene 6 min.
- Tiempo de corrida total: 35 minutos.
- Línea de transferencia: 290°C.

6.5 Cuantificación de fenoles y flavonoides.

Para determinar la presencia y cuantificación de flavonoides y fenoles se realizó la metodología propuesta por la Norma Argentina IRAM-INTA 15935-2. La quercetina (Sigma-Aldrich catálogo Q4951) se utilizó como referencia para la determinación de la concentración de los flavonoides, la cual se hizo mediante una curva de calibración con concentraciones de 1 a 90 mg/mL. Para la cuantificación de fenoles se realizó una curva de calibración empleando ácido gálico (0-10, 20 µg/mL) como referencia, la concentración que se utilizó para cada extracto fue de 0.02 mg/ml y las absorbancias se interpolaron en la curva de calibración correspondientes a cada compuesto (88).

6.6 Preparación de EEP y productos comerciales.

Con la finalidad de obtener las dosis exactas aplicadas en el diseño experimental, se preparó una dilución principal del EEP de 100 mg/mL en sulfóxido de dimetilo (DMSO)

(Amresco, cat. 67-68-5) y, posteriormente se le agregó DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) para obtener la concentración final requerida. Los productos comerciales; quercetina (Q49519), pinocembrina (P5239) y naringenina (N5893) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. Al igual que en el caso del EEP, los compuestos se disolvieron en DMSO a una concentración principal de 30 mg/mL y mantenidos en refrigeración a 4° C; posteriormente de esta solución se tomó la cantidad necesaria para obtener la concentración deseada los componentes fueron diluidos en DMEM al momento de utilizarse.

6.7 Línea celular y virus.

Se emplearon células VERO (riñón de mono verde, ATCC CCL-81) mantenidas en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con suero fetal bovino al 10% (Gibco, USA) y antibiótico (penicilina-estreptomicina, Gibco, USA) en una incubadora a 37° C bajo una atmosfera húmeda del 95% y 5% de CO₂. Se utilizó la cepa Buzzell del virus de distemper canino donado por la Dra. Rosa Elena Miranda de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM y la dosis infectiva se determinó de acuerdo con el método de Reed and Muench (89); la solución viral original tenía un título viral de 10⁵ TCID₅₀/mL.

6.8 Evaluación del crecimiento.

Con la finalidad de conocer si existe una relación entre el crecimiento celular y un incremento entre las unidades de absorbancia se procedió a realizar una curva de crecimiento celular mediante el siguiente procedimiento. Las células Vero se sembraron en una caja de 96 pozos en concentraciones que fueron de 3,000 hasta 50,000 células por pozo. Se dejaron incubando bajo las condiciones estándares descritas anteriormente, al término del periodo de incubación se evaluó la viabilidad celular por el método colorimétrico MTT reportado por (90).

Los resultados se muestran en la figura 13 en donde se observó que existe una alta correlación ($R^2=0.95$) entre la cantidad de células y las unidades de absorbancia, es decir, a mayor cantidad de células mayor es el valor de las unidades de absorbancia.

6.9 Determinación de la concentración citotóxica media (CC₅₀).

La citotoxicidad del DMSO, EEP, quercetina, pinocembrina y naringenina fue evaluada por observación al microscopio de campo claro y por medio de la determinación de la viabilidad celular con el método colorimétrico del MTT (90), por ambos métodos se establecieron las CC₅₀ y las concentraciones a administrar del EEP y de cada uno de los compuestos comerciales empleando como criterio el 70% de viabilidad celular (Cuadro 1). El procedimiento a seguir fue el siguiente: las células fueron sembradas a una densidad de 25,000 células/pozo en microplacas de 96 pozos e incubadas durante 24 horas a 37° C bajo las condiciones de crecimiento previamente descritas, posteriormente se agregaron a los cultivos concentraciones crecientes de cada uno de los flavonoides y se incubaron por 24 horas adicionales, una vez terminado ésta incubación se agregaron 10 µl de MTT (0.5mg/mL) por pozo, en donde permanecieron por otras 4 horas, al término de la misma, se retiró el contenido de los pozos y se agregaron 100 µL de DMSO para solubilizar las sales de formazán, se dejó reposar en la oscuridad por 15 minutos a temperatura ambiente y, a continuación se la placa se introdujo en un lector de microplacas (BIO RAD, Mod. 550) a una longitud de onda de 595 nm. Todos los ensayos se hicieron por triplicado y como control negativo se utilizaron pozos a los que sólo se les agregó DMEM (200 µL). Como control positivo para la destrucción total de las células, se aplicó peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 30% para todos los ensayos. (91).

6.10 Tratamientos antivirales.

La capacidad antiviral del EEP se evaluó *in vitro* y se comparó con el efecto mostrado por cada uno de los flavonoides comerciales previamente descritos y con una mezcla de los

tres. La efectividad de los tratamientos se determinó mediante dos métodos: el método colorimétrico de MTT y la RT-PCR de Tiempo Real. Para evaluar el efecto antiviral por medio del MTT las células Vero se sembraron en cajas de cultivo con 96 pozos, a una concentración de 25×10^3 células por pozo, en DMEM con 10% de SFB, durante 24 horas bajo las condiciones de cultivo previamente descritas. Se diseñaron los siguientes tratamientos experimentales: 1) Las células Vero se incubaron en ausencia del VDC, EEP y de los flavonoides en 150 μL de DMEM enriquecido con 5% de SFB; 2) Las células Vero se incubaron simultáneamente en presencia de 50 μL de EEP o flavonoides separados o mezclados, más 100 μL de DMEM suplementado con 5% de SFB; 3) Las células Vero se incubaron con la presencia del virus del VDC, cada pozo fue inculado con 50 μL de la suspensión viral más 100 μL de DMEM suplementado con 5% de SFB y sin la presencia del EEP o flavonoides; 4) Las células Vero se incubaron durante 2 h con la presencia de 50 μL del EEP o los flavonoides separados o mezclados, al término de la incubación se retiró el medio que contiene el tratamiento y se infectaron con 50 μL de la suspensión viral más 100 μL de DMEM suplementado con 5% de SFB; 5) Las células Vero se incubaron simultáneamente con la presencia de 50 μL del EEP o los flavonoides separados o mezclados más 50 μL de la suspensión viral más 100 μL de DMEM suplementado con 5% de SFB y 6) Las células Vero se incubaron con la presencia del VDC durante 2 h, a cada pozo se le inoculó con 50 μL de la suspensión viral, al término de la incubación se retiró el virus y se le agregaron 50 μL del EEP o los flavonoides separados o mezclados más 100 μL de DMEM suplementado con 5% de SFB.

La evaluación del efecto antiviral por medio de la RT-PCR en Tiempo Real, se llevo de la siguiente manera: se sembraron células Vero en cajas de cultivo (100 mm x 20 mm) con medio DMEM suplementado con 5 % de SFB hasta obtener un 90% de confluencia. Se diseñaron cuatro condiciones experimentales con tres tiempos de administración del EEP y los flavonoides de manera individual o mezclados: 1) Las células Vero se incubaron con la presencia del VDC, inoculando la caja con 300 μL de la suspensión viral mas 10 mL de DMEM suplementado con 5% de SFB sin la presencia de EEP o los flavonoides de forma individual o mezclados; 2) Las células Vero se incubaron en presencia de 10 mL del EEP o

los flavonoides de forma individual o mezclados durante 2 h, al término de la incubación se retiró el medio de cultivo con los compuestos y se agregaron 10 mL DMEM suplementado con 5% de SFB más 300 μ L de la suspensión viral; 3) Las células Vero se incubaron en 10 mL DMEM suplementado con 5% de SFB con la presencia del EEP o los flavonoides de forma individual o mezclados más 300 μ L de la suspensión viral y 4) Las células Vero se incubaron en presencia del VDC durante 2 h, al medio DMEM suplementado con 5% de SFB, se le agregaron 300 μ L de la suspensión viral para inocular a las células, al término de la incubación se retiró el medio con el virus y se les agregaron 10 mL de DMEM suplementado con 5% de SFB con EEP o los flavonoides de forma individual o mezclados. El tiempo de incubación para todas las condiciones experimentales fue de 48 h. Las dosis empleadas del EEP y los flavonoides para los tratamientos experimentales se localizan en el cuadro 4.

6.11 RT-PCR Cuantitativa de tiempo real.

La RT-PCR se realizó por medio del siguiente procedimiento: Las células Vero fueron sembradas en cajas para cultivo de 100 mm x 200 mm en DMEM suplementado con 5% de SFB, el ARN se aisló a partir de los cultivos celulares infectados y de los diferentes tratamientos tanto controles como tratados con cada uno de los compuestos, utilizando el Kit GeneJET (Thermo Scientific, cat. K0731). La retrotranscripción se realizó (RT) con 2 µg de ARN. Los componentes de la mezcla de reacción fueron: 4 µL de retrotranscriptasa del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV RT, Invitrogen), 0.5 µL de cada iniciador (25 pmoles), 4 µL de dNTPs (250 µM cada uno), 8 µL de amortiguador RT 5×, 2 µL de DTT 20 mM y agua libre de ARNasa para completar el volumen final de 40 µL. Posteriormente se determinó la pureza y concentración del cDNA en un espectrofotómetro. Para normalizar todas las muestras, el cDNA proveniente de cada muestra, se cuantificó y diluyó para obtener una concentración de 50 ng/µL. Este cDNA fue empleado como templado para llevar a cabo la PCR en Tiempo Real.

La PCR de Tiempo Real se realizó mediante el siguiente procedimiento: En primer lugar, se diseñaron un juego de iniciadores basados en el gen de la NP del VDC de acuerdo a la secuencia reportada en GenBank acceso EF418783.1 La secuencia Forward para la NP-VDC fue 5´AGCTTCCATCTTGGCTCAA3´ y la secuencia Reverse para la NP-VDC fue 5´CCATGAATCGCCTCAAAGAT´3, dando como resultado un amplicon de 200 pb. Asimismo, se emplearon iniciadores para el gen de referencia (β -actina) de acuerdo a la secuencia reportada de *Canis familiaris* GenBank acceso U67202, la secuencia Forward para este gen fue 5´GTGTGACGTTGACATCCGCA3´ y la secuencia Reverse del mismo fue 5´TCCACACAGAGTACTTGCGC´3, (Nuncio, 2013). Los iniciadores de ambos genes fueron diseñados empleando el programa Primer3 versión 4.

La mezcla de reacción para la PCR de Tiempo Real para ambos genes se integró por los siguientes compuestos: 9 µl de agua grado PCR, 0.5 µL de cada iniciador (10 pmol), 2 µL

de cDNA y 5 μ L del kit PCR-mix Roche. La PCR en tiempo real fue realizada en un equipo QPCR Agilent MX 3005P. Los ensayos se realizaron por triplicado por cada experimento. Las condiciones programadas en el termociclador fueron; desnaturalización inicial a 95°C por 10 min, seguida de 35 ciclos con las siguientes condiciones; desnaturalización 95°C por 10 segundos, alineamiento a 53°C por 30 segundos y elongación a 72°C por 10 segundos, por último, se realizó una fase de polimerización final a 72°C por 10 min. La curva de disociación se obtuvo en el mismo equipo bajo las siguientes condiciones de corrida: 95°C por 1 segundo, 60°C por 1 segundo y 95°C por 10 segundos siendo únicas para cada amplicón confirmando la especificidad de los productos. Las reacciones fueron estandarizadas a las mismas condiciones de temperatura y número de ciclos para ambos genes.

La curva de calibración se realizó mediante diluciones logarítmicas de cDNA, desde 10^{-2} hasta 10^{-9} ng/ μ L. Por medio de esta manera se evaluó la eficacia del sistema y se determinó el tipo de cuantificación. A continuación, se identificó el ciclo umbral (CT) con el propósito de determinar la expresión relativa presente en cada tratamiento. La cuantificación del gen NP de VDC se obtuvo en relación con la expresión del gen de β -actina.

La expresión relativa del gen de la NP del VDC se determinó empleando el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, con respecto a controles sin tratamiento. La fórmula implica una relación entre los valores obtenidos de C_t , en relación al control sin tratamiento, esto es: $\text{Ratio} = 2^{-(\Delta C_t \text{ de la muestra} - \Delta C_t \text{ del control})}$ (Método de Livak) (92).

```
1  CCATCATGAAGTGTGACGTTGACATCCGCAAGGACCTCTATGCCAACACAGTGCTGTCTG
   >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
61  GTGGAACCACCATGTACCCTGGCATCGCTGACAGGATGCAGAAGGAGATCACTGCCCTGG
121 CACCCAGCACAAATGAAGATCAAGATCATCGCACCCCCTGAGCGCAAGTACTCTGTGTGGA
    <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
181 TT
```

Figura 7. Esquema de la secuencia del gen de β -actina de perro. Se muestran las posiciones de alineamiento de los iniciadores para la amplificación del fragmento del gen de β -actina de perro.

```
481  GAAGTTGATGATGCTGAGCAATTCAATATATTACTAGCTTCCATCTTGGCTCAAATTTGG
    >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
541  ATCCTGCTAGCTAAAGCGGTGACTGCTCCTGATACTGCAGCCGACTCGGAGATGAGAAGG
601  TGGATTAAGTATACCCAGCAAAGACGTGTGGTCGGAGAATTTAGAATGAACAAAATCTGG
661  CTTGATATTGTTAGAAACAGGATTGCTGAGGACCTATCTTTGAGGCGATTGCTGGTGGCA
    <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
721  CTCATTTTGGACATCAAAGATCCCCAGGGAACAAGCCTAGAATTGCTGAAATGATTTGT
```

Figura 8. Esquema de la secuencia del gen de la NP del VDC. Se muestran las posiciones de alineamiento de los iniciadores para la amplificación del gen de la NP del VDC.

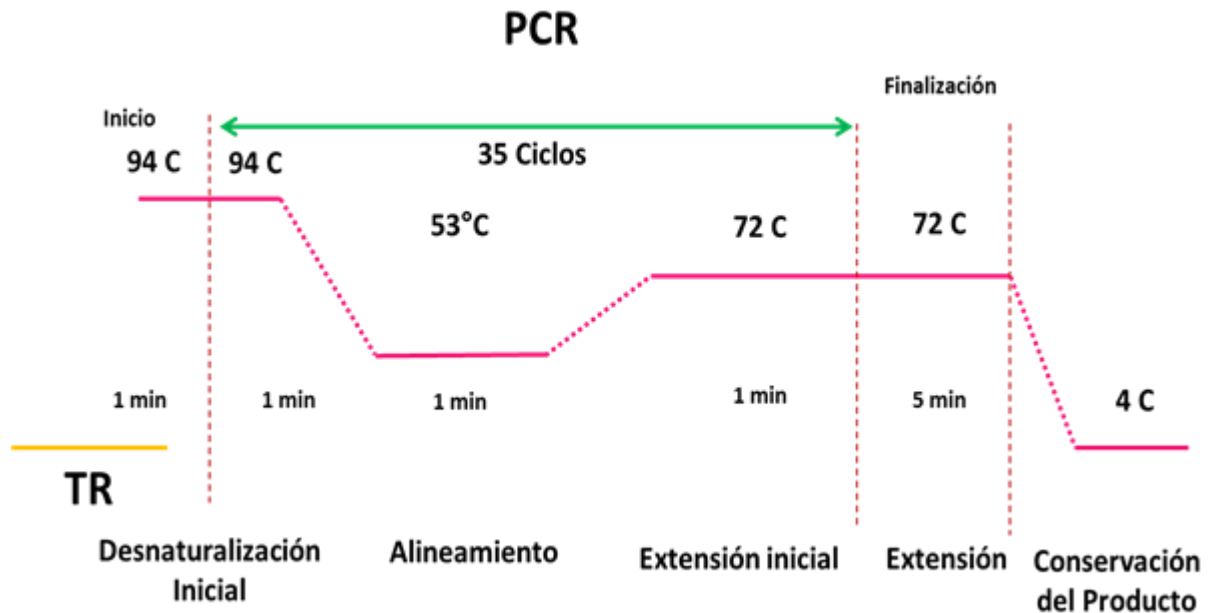


Figura 9. Esquema de las condiciones de corrida utilizadas en la amplificación de los genes de interés por PCR de punto final.

Finalmente, Por último, para corroborar la amplificación de la secuencia blanco se realizó la electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1.5 %, teñidos con bromuro de etidio (BrE) bajo las siguientes condiciones de corrida: 70 volts durante 90 minutos, al término de la corrida los geles se visualizaron en un transiluminador para observar la presencia de los amplicones (93) .

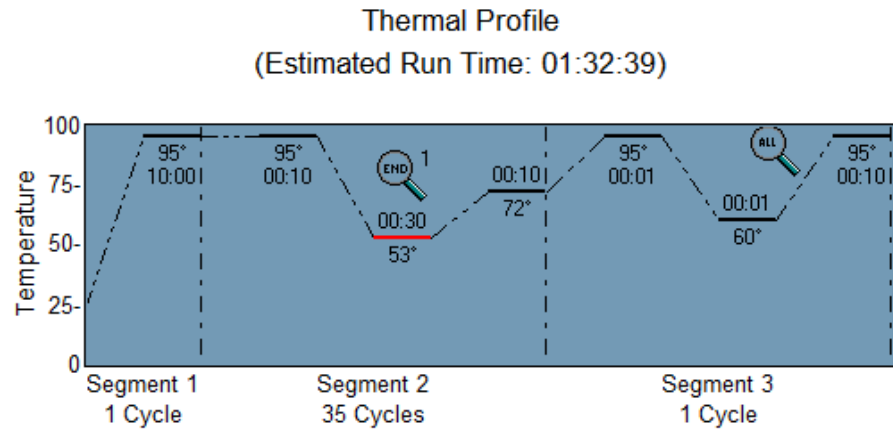


Figura 10. Esquema de las condiciones de corrida que se utilizaron para realizar las curvas de amplificación y de disociación de los genes para PCR tiempo real.

6.12 Análisis estadístico.

Ensayo de MTT.

La viabilidad celular de los cultivos se evaluó mediante la obtención del promedio de las unidades de absorbancia producidas por el efecto citolítico del VDC en cada uno de los tratamientos (cultivo sin tratamiento y virus, cultivo infectado con VDC, cultivo con tratamiento dos horas antes de la infección, tratamiento simultáneo a la infección y tratamiento dos horas después de la infección viral). Los promedios de los datos obtenidos se analizaron por la prueba de ANOVA utilizando el programa Graph Pad Prism versión 4.

7 RESULTADOS

7.1 Rendimiento del Propóleo.

El rendimiento obtenido del Propóleo del Estado de México-Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán fue del 50.2%.

7.2 Perfil químico del EEP mediante HPLC-UV.

La identificación de algunos de los compuestos del EEP se realizó mediante HPLC UV y fue posible identificar 6 compuestos con base a su tiempo de retención (TR) y espectro UV, en la figura 11 se muestra el cromatograma resultante, en donde se aprecian los tiempos de retención (T.R), Área (Porcentaje total) y el nombre de cada compuesto propuesto por la base de datos que tiene el equipo.

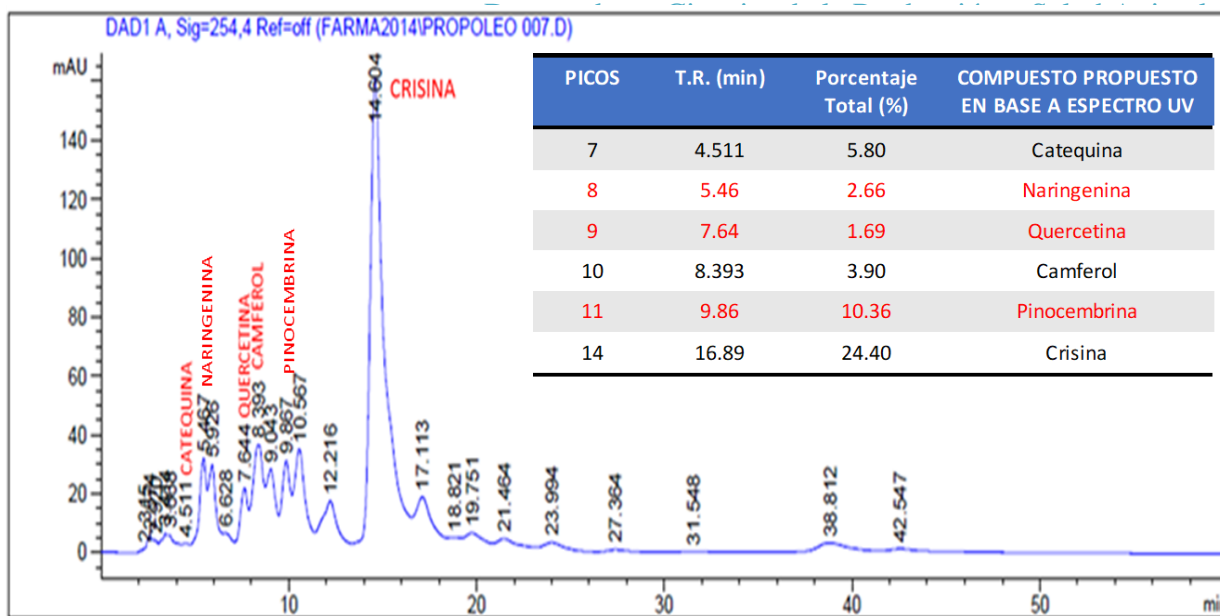


Figura 11. Cromatograma del propóleo de FESC. En el recuadro se muestran los nombres de los compuestos más abundantes y sus picos correspondientes en tiempo de retención en minutos (eje X) y abundancia (eje Y). Tabla 5. Análisis HPLC UV. Se muestran los nombres de los compuestos del propóleo de FESC, el tiempo de retención (minutos) de cada uno y porcentaje de abundancia.

Con la finalidad de identificar planamente la presencia de pinocebrina en el Propóleo de la FESC y de acuerdo con el resultado del cromatograma (figura 11), se realizó la cromatografía de un estándar de pinocebrina y se observó que los tiempos de retención y el espectro de absorción con luz UV son similares al interpolar las gráficas resultantes con el producto propuesto como pinocebrina encontrado en el propóleo de la FESC (Figura 12).

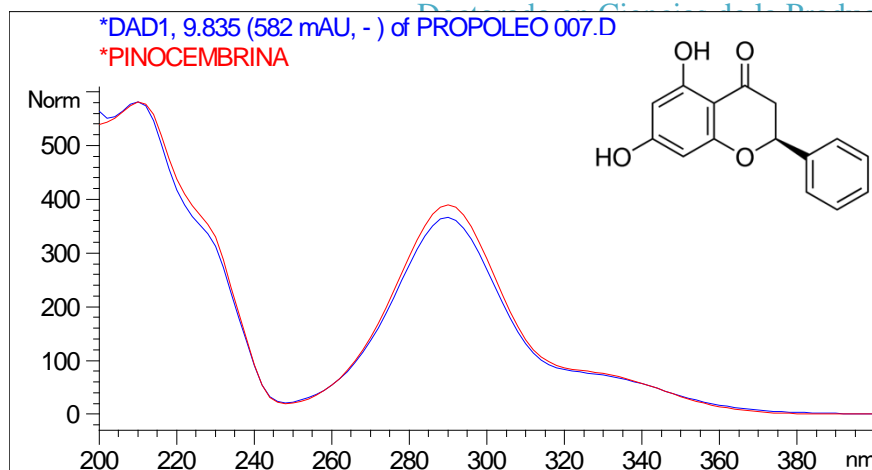


Figura 12. Estándar de pinocembrina espectro UV. Sobreposición de las gráficas del estándar de pinocembrina dado por el equipo de HPLC-UV y el producto propuesto como pinocembrina en el Propóleo de la FESC.

7.3 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS).

El análisis del EEP de FESC mediante la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS) permitió complementar el análisis químico, en donde se identificaron 9 compuestos: fenol, 2-hidroxibenzaldeído, 3-metil-4-isopropilfenol, 1-deceno, 2,4-diterbutilfenol, hexadecanoato de metilo, hexadecanoato de etilo, 2-nonadecanona y Oleato de etilo (cis-9-octadecenoato de etilo) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Análisis por cromatografía de gases. Tiempos de retención, porcentajes y propuesta de los compuestos para el Propóleo de FESC de acuerdo con la base de datos presente en el equipo.

#	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	COMPUESTO PROPUESTO POR LA BASE DE DATOS	ABUNDANCIA %
1	7.29	Fenol	8.83
2	8.82	2-Hidroxibenzaldeído	0.33
3	13.33	3-Metil-4-isopropilfenol	15.56
4	13.53	1-Deceno,	1.48
5	16.98	2,4-diterbutilfenol	0.92
6	23.72	Hexadecanoato de metilo	0.29
7	23.72	Hexadecanoato de etilo	1.33
8	25.11	2-Nonadecanona	0.81
9	25.81	Oleato de etilo (<i>cis</i> -9- octadecenoato de etilo).	0.81

7.4 Cuantificación de fenoles y flavonoides.

La concentración de fenoles medida por espectrofotometría en base a la reacción colorimétrica de óxido-reducción indica que la muestra de Propóleo de FESC contiene el 35% de fenoles totales, mientras que la concentración de flavonoides presentes en la muestra fue del 11.2% de flavonoides totales.

7.5 Estandarización de la curva de crecimiento celular.

Los resultados se muestran en la figura 13 en donde se observó que existe una alta correlación ($R^2=0.95$) entre la cantidad de células y las unidades de absorbancia, es decir, a mayor cantidad de células mayor es el valor de las unidades de absorbancia.

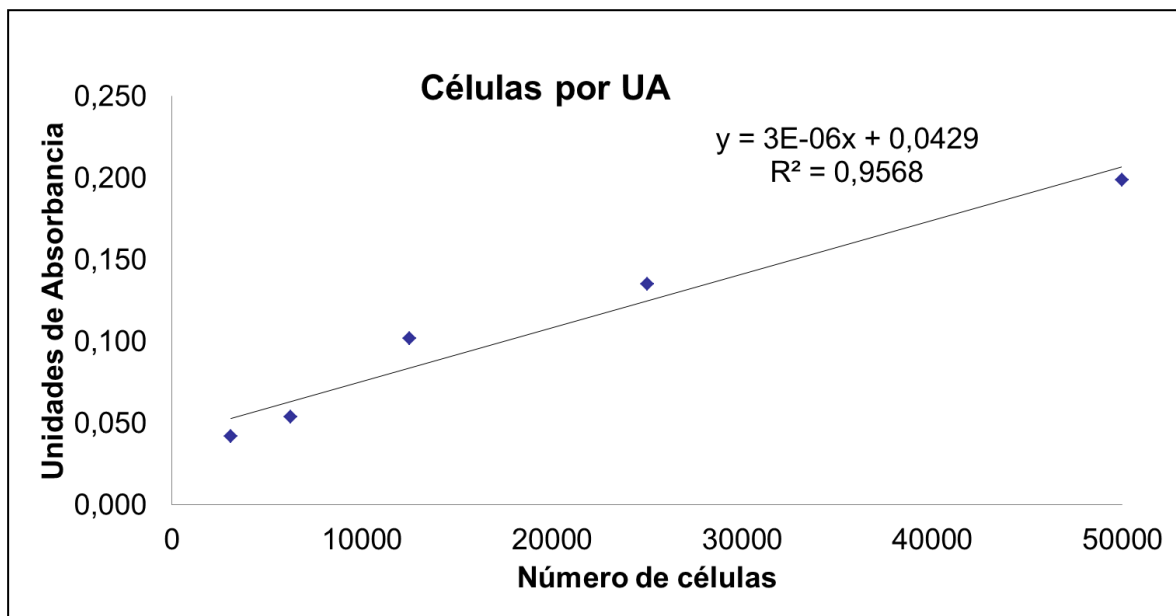


Figura 13. Curva de estandarización de células Vero. En el eje de las Y se muestran las unidades de absorbancia y en el eje de las X la cantidad de células por pozo.

7.6 Ensayos de citotoxicidad.

Los resultados de la evaluación de la citotoxicidad del DMSO, vehículo en donde van disueltos el EEP y los flavonoides comerciales, se muestran en la figura 14, en donde se obtuvo la CC_{50} , la cual fue de 4.3 $\mu\text{L/ml}$ de DMSO, y determinar que esta concentración no afecta la viabilidad celular.

Citotoxicidad DMSO

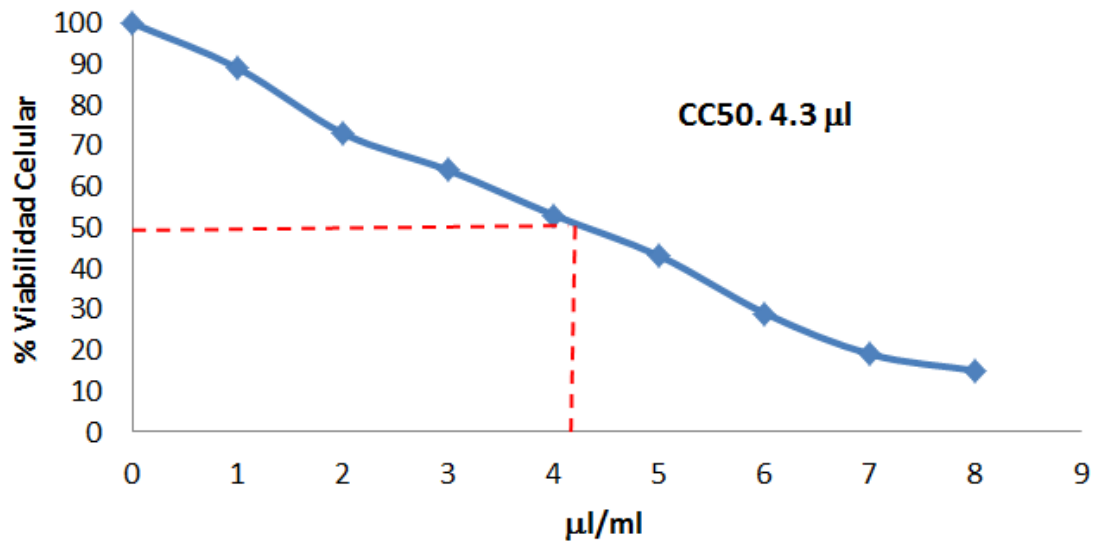


Figura 14. Citotoxicidad de DMSO. Se muestran en $\mu\text{l}/\text{mL}$ de DMSO (eje X) en relación con el porcentaje de viabilidad celular (eje Y), ($R^2 = 0.96$). Se determinó una CC_{50} de $4.3 \mu\text{l}/\text{mL}$.

7.7 Citotoxicidad del EEP.

Los resultados del efecto citotóxico del EEP se muestran en la figura 15, para obtener la CC_{50} se realizó una curva de citotoxicidad y se observó que la concentración de $750 \mu\text{g}/\text{mL}$ del EEP mantiene la viabilidad celular del 50% del cultivo y la concentración de $250 \mu\text{g}/\text{mL}$ es la que mantiene el 70% de la viabilidad celular del cultivo, siendo ésta concentración la seleccionada para ser utilizada en el diseño experimental, concentraciones mayores a $1 \text{ mg}/\text{mL}$ del EEP resultan tóxicas para las células, ocasionando muerte celular y cambio en su morfología.

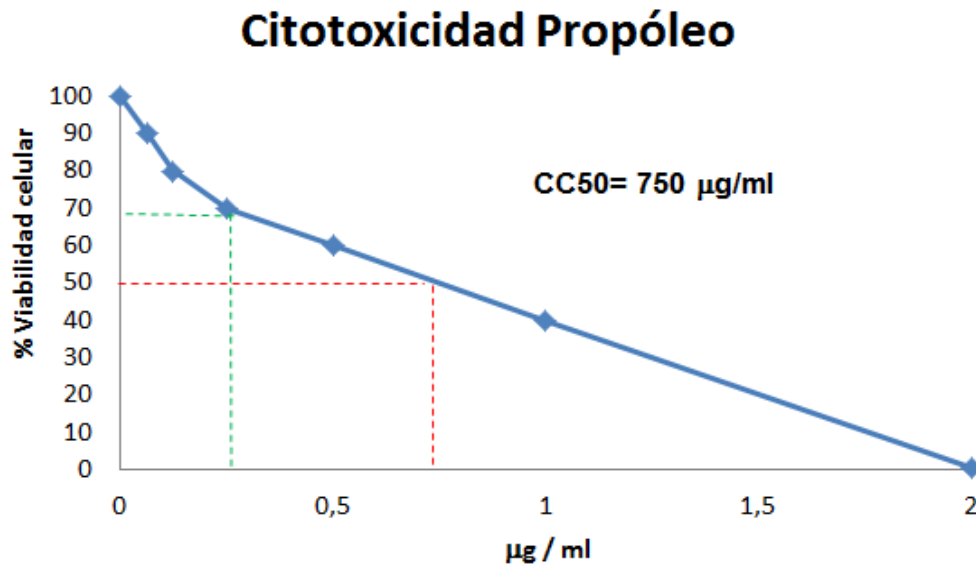


Figura 15. Citotoxicidad del EEP del Estado de México (FESC). Se muestran las concentraciones de Propóleo (eje X) en relación con el porcentaje de viabilidad celular (eje Y), ($R^2 = 0.96$). Determinando la CC_{50} (línea roja) y concentración empleada (línea verde).

7.8 Citotoxicidad de los flavonoides comerciales.

7.8.1 Quercetina.

Los resultados del efecto citotóxico de la quercetina se muestran en la figura 16, para obtener la CC_{50} se realizó una curva de citotoxicidad, con el objetivo de conocer la CC_{50} y la concentración a utilizar para el presente estudio. La CC_{50} para quercetina fue de 8.5 $\mu\text{g/mL}$, concentraciones mayores presentan un efecto tóxico sobre el cultivo, reflejando una disminución en la viabilidad celular. La dosis en donde se observó una viabilidad del 70% fue de 2.5 $\mu\text{g/mL}$, la cual fue utilizada en los diseños experimentales.

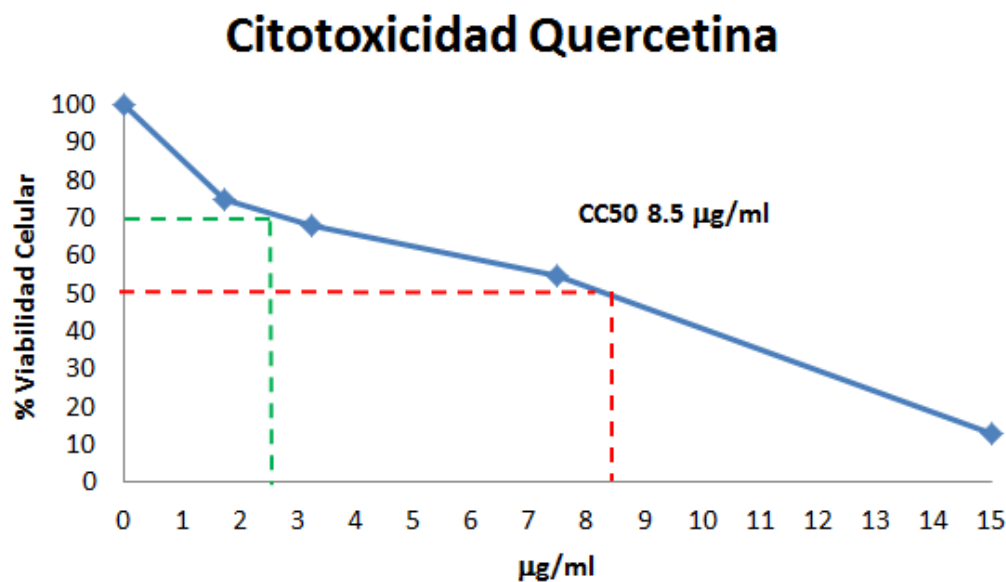


Figura 16. Citotoxicidad de quercetina. Concentraciones de quercetina (eje X) en relación con el porcentaje de viabilidad celular (eje Y), ($R^2 = 0.94$). La CC_{50} (línea roja) y la concentración empleada (línea verde).

7.8.2 Pinocembrina.

Los resultados del efecto citotóxico de la pinocembrina se muestran en la figura 17, este flavonoide al compararlo con el EEP y la quercetina mostró una CC_{50} más alta. La CC_{50} para pinocembrina fue de 50 µg/ml, concentraciones mayores presentan un efecto tóxico sobre el cultivo, reflejando una disminución en la viabilidad celular. La dosis en donde se observó una viabilidad del 70% fue de 40 µg/mL, la cual fue utilizada en los diseños experimentales.

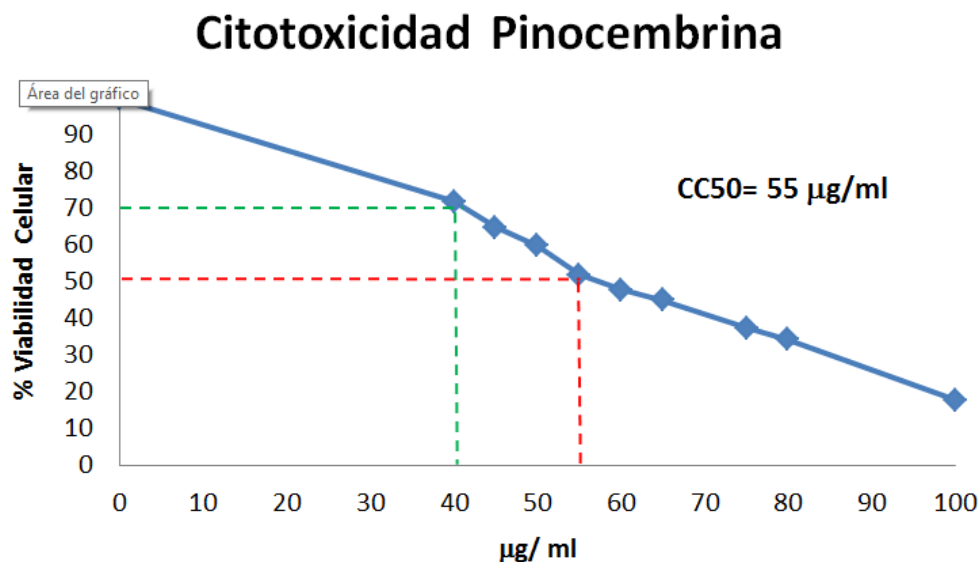


Figura 17. Citotoxicidad de pinocembrina. Las concentraciones de pinocembrina (eje X) en relación con el porcentaje de viabilidad celular (eje Y), ($R^2 = 0.96$). Determinando la CC_{50} (línea roja) y concentración empleada (línea verde).

7.8.3 Naringenina.

Los resultados del efecto citotóxico de la naringenina se muestran en la figura 18, este flavonoide presentó una citotoxicidad a los cultivos celulares semejante a pinocembrina, en este caso la CC_{50} fue de 55 $\mu\text{g/ml}$ y la concentración que mantiene el 70% de la viabilidad celular fue de 40 $\mu\text{g/ml}$ siendo ésta concentración la seleccionada para los ensayos posteriores, concentraciones mayores a la CC_{50} resultan ser tóxicos para las células reflejándose en una disminución del porcentaje de viabilidad de los cultivos.

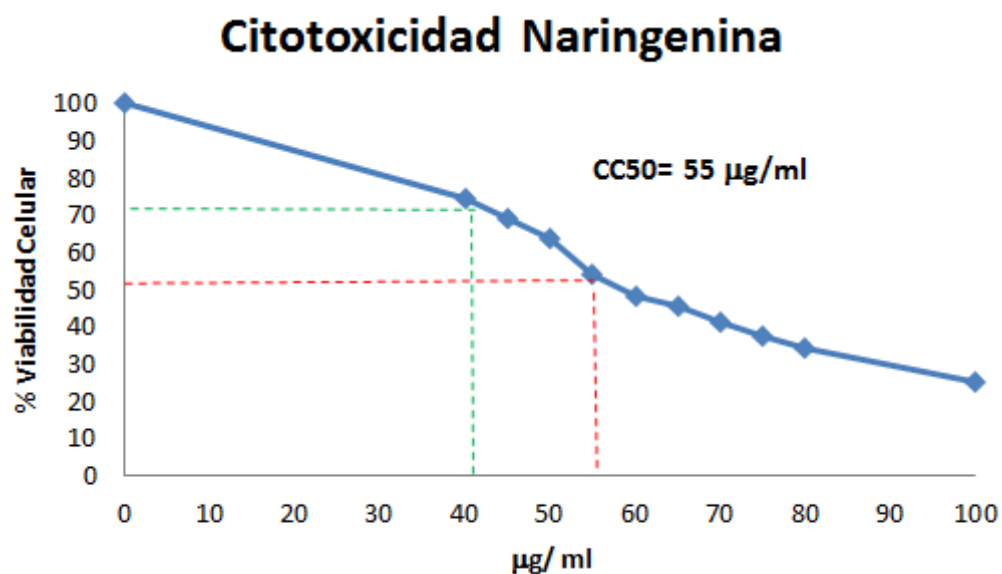


Figura 18. Citotoxicidad de naringenina. Las concentraciones de naringenina (eje X) en relación con el porcentaje de viabilidad celular (eje Y), ($R^2 = 0.95$). Determinando la CC_{50} (línea roja) y concentración empleada (línea verde).

7.9 CC_{50} y concentraciones empleadas del EEP y de los flavonoides.

En el cuadro 4 se muestran los resultados de las curvas de la citotoxicidad del EEP y de cada uno de los flavonoides comerciales, en donde se muestra la CC_{50} de cada compuesto y la dosis a la cual se utilizó en cada uno de los ensayos experimentales.

Cuadro 4. CC₅₀ y concentraciones finales utilizadas en los tratamientos experimentales. Se muestra la CC₅₀ y la concentración empleada (µg/ml) en cada uno de los compuestos

COMPUESTO	CC₅₀	CONCENTRACION UTILIZADA
	µg/mL	µ/mL
PROPÓLEO	750	250
QUERCETINA	8.4	2.5
PINOCEMBRINA	55	40
NARINGENINA	55	40

7.10 Efecto citopático del VDC.

La evaluación del efecto citopático del VDC sobre las células Vero se realizó mediante la observación al microscopio de campo claro de los cultivos celulares confluentes, los cuales se infectaron con la cepa Buzzel de VDC. El periodo de incubación de los cultivos infectados fue de 24, 48 y 72 horas, en donde se observó un efecto citopático claro a partir de las 24 horas, demostrando así la presencia y la virulencia de este, es decir, a partir de las 24 horas se observó la formación de sincitios, vacuolas y redondeamiento celular, a las 48 horas presencia de placas líticas (focos líticos localizados) y a las 72 horas se observó lisis total del cultivo (figura 19).

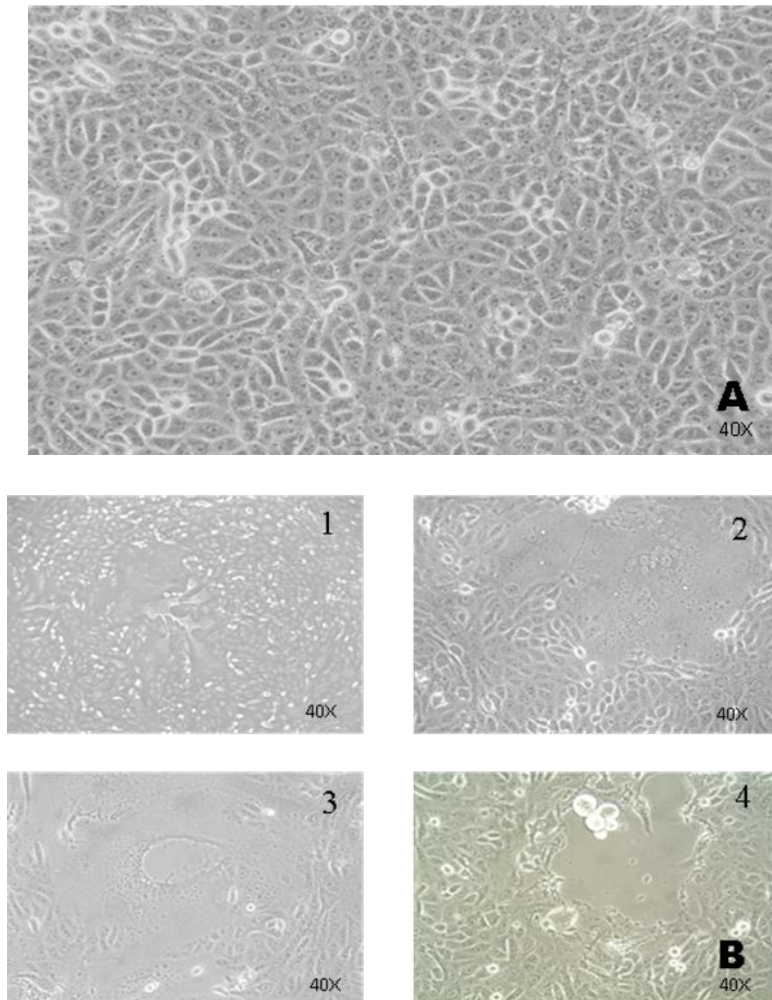


Figura 19. Efecto citopático del VDC cepa Buzzel. A. Cultivo celular sin infección. B. Cultivos celulares infectados con VDC en donde se muestra el efecto citopático característico con formación de sincitios, vacuolización y redondeamiento celular a las 24 horas (1 y 2) y la formación de placas líticas a las 48 horas (3 y 4).

7.11 Efecto del EEP sobre el VDC

De igual manera que en los ensayos de citotoxicidad los cultivos fueron observados y evaluados a las 48 horas post tratamiento, observándose una reducción en la presencia de placas líticas cuando se aplica el tratamiento antes de la infección viral (D) en comparación con los cultivos simultáneo y tratamiento post infección (E y F).

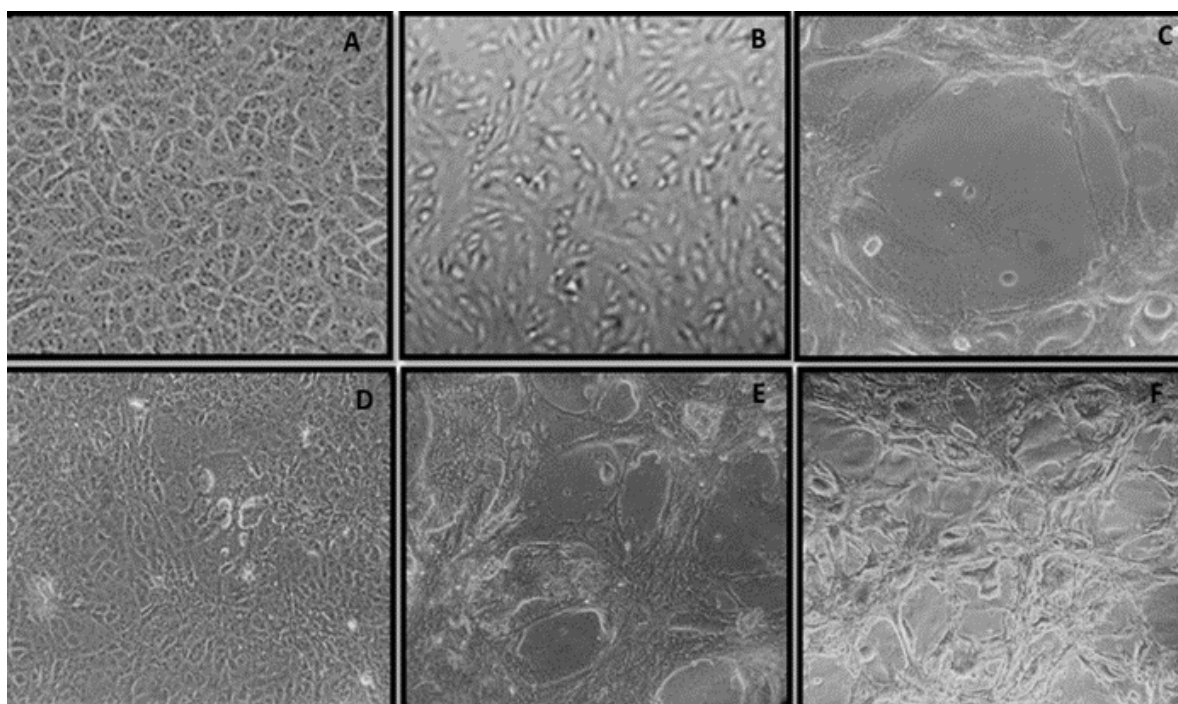


Figura 20. Efecto citopático inducido por el virus de VDC en los diferentes tiempos de tratamientos empleando propóleo. Fotomicrografías de microscopio invertido (40x). A. Células Vero sin infección (48 hrs). B. Control de propóleo. C. Control positivo. D. Propóleo dos horas antes de la infección. E. Propóleo simultáneo a la infección. F. Propóleo dos horas después de la infección viral.

7.12 Efecto de la quercetina sobre el VDC.

Los cultivos celulares fueron observados al microscopio en los tiempos descritos anteriormente, observándose una mayor cantidad de células y un mejor mantenimiento de la morfología celular correlacionándose con los resultados obtenidos por el ensayo de Mosmann, en las imágenes podemos observar una mejor morfología celular cuando el tratamiento con Quercetina es aplicado simultáneamente a la infección viral (E).

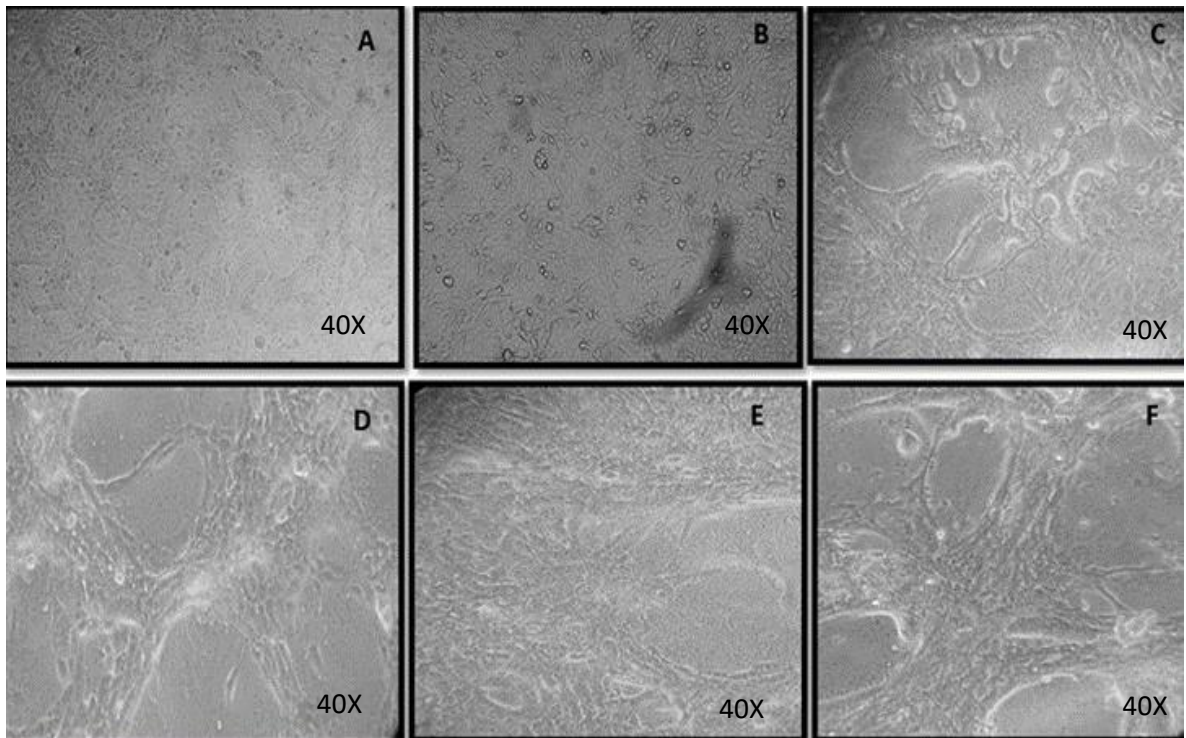


Figura 21. Efecto citopático inducido por el virus de VDC en los diferentes tiempos de tratamientos con quercetina. Fotomicrografías de microscopio invertido (40x). A. Células Vero sin infección (48 hrs). B. Control de quercetina. C. Control positivo. D. Quercetina dos horas antes de la infección. E. Quercetina simultánea a la infección. F. Quercetina dos horas después de la infección viral.

7.13 Efecto de la pinocembrina sobre el VDC.

La pinocembrina muestra que se mantiene la morfología celular cuando los cultivos son observados al microscopio, los cultivos en donde se aplicó antes y posterior al tratamiento presentan mayor daño morfológico y estructural, observándose mayor evidencia de efecto citopático ocasionado por VDC.

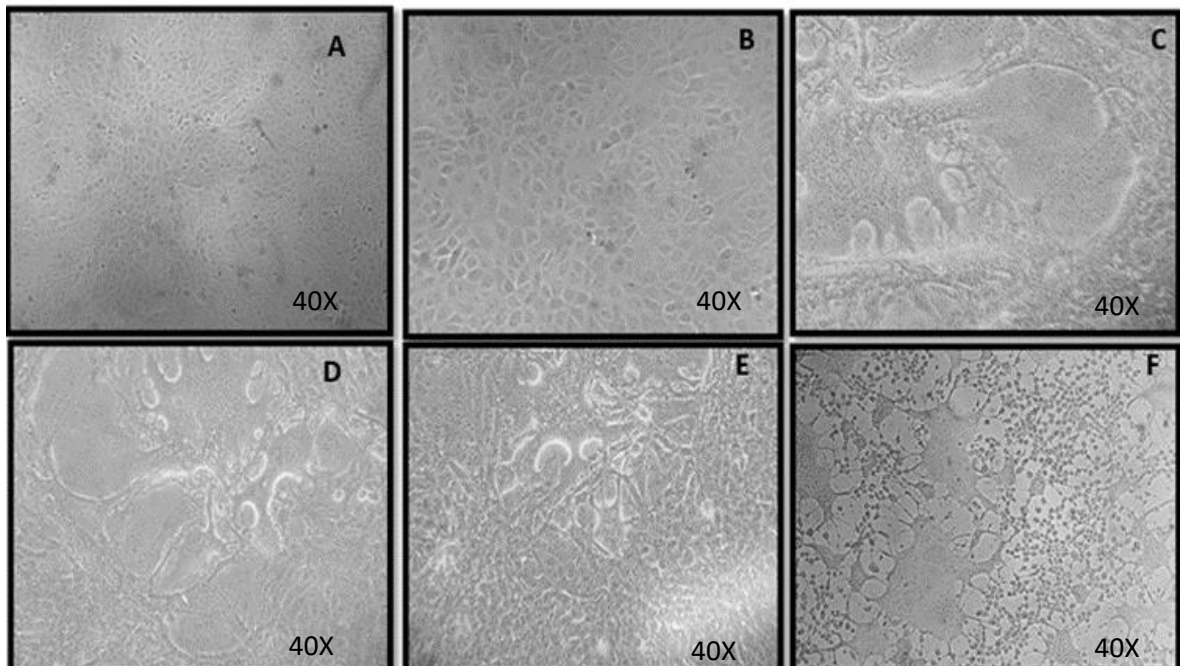


Figura 22. Efecto citopático inducido por el virus de VDC en los diferentes tiempos de tratamientos con pinocembrina. Fotomicrografías de microscopio invertido (40x). A. Células Vero sin infección (48 hrs). B. Control de pinocembrina. C. Control positivo. D. Pinocembrina dos horas antes de la infección. E. Pinocembrina simultánea a la infección. F. Pinocembrina dos horas después de la infección viral.

7.14 Efecto de la naringenina sobre el VDC.

Los cultivos celulares fueron observados antes y después de realizar los tratamientos con naringenina, observándose que el tratamiento aplicado de manera simultánea a la infección viral demuestra una mayor conservación de la morfología celular (E), los cultivos (D) y (F) en donde se aplicó el tratamiento antes y posterior a la infección viral no muestran una diferencia significativa con el grupo control positivo (infectado).

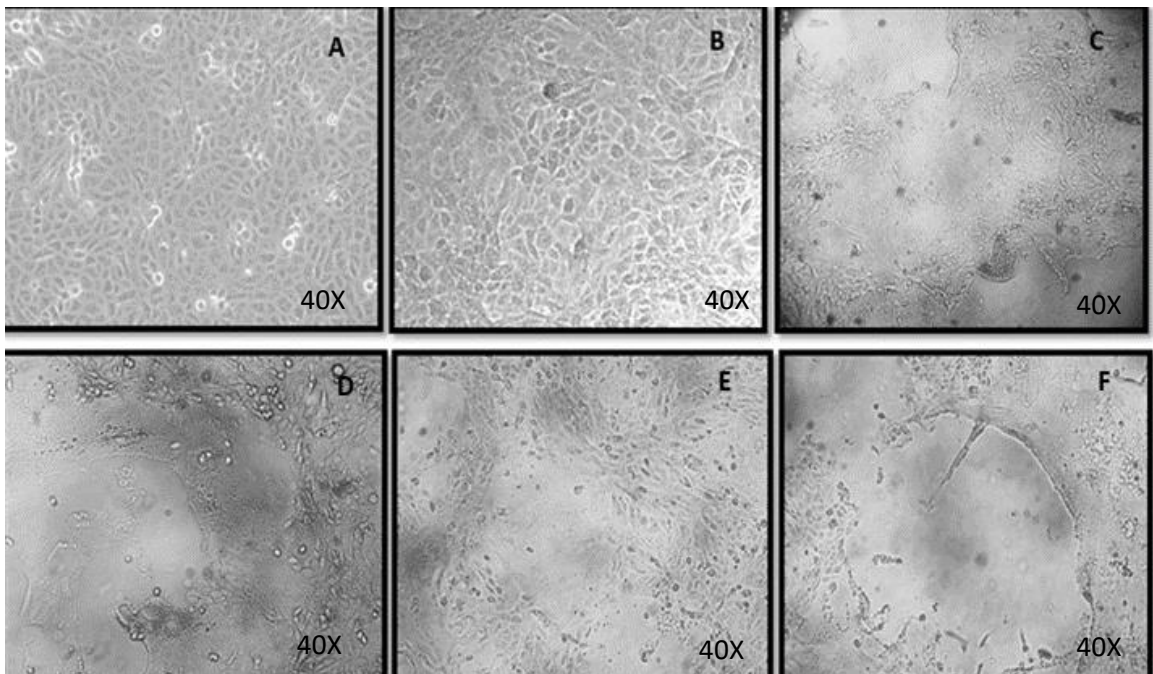


Figura 23. Efecto citopático inducido por el virus de VDC en los diferentes tiempos de tratamientos con Naringenina. Fotomicrografías de microscopio invertido (40x). A. Células Vero sin infección (48 hrs). B. Control de Naringenina. C. Control positivo. D. Naringenina dos horas antes de la infección. E. Naringenina simultánea a la infección. F. Naringenina dos horas después de la infección viral.

La naringenina mantuvo un comportamiento semejante a pinocembrina, dado que cuando se aplica a los cultivos de manera simultánea a la infección viral se observa un mantenimiento de la viabilidad celular en comparación con el grupo infectado con VDC,

los grupos tratados dos horas antes de la infección y dos horas posteriores a la infección no presentan diferencia significativa con el control positivo.

7.15 Efecto de la mezcla de los flavonoides comerciales sobre el VDC.

Los cultivos celulares tratados con la mezcla de flavonoides en los diferentes tiempos mostraron una alteración morfológica en los tres tiempos (D, E y F) y no fue tan evidente el mantenimiento de la morfología celular, sin embargo, lo observado en el microscopio no tuvo una relación directa en lo observado en el ensayo de Mosmann (90).

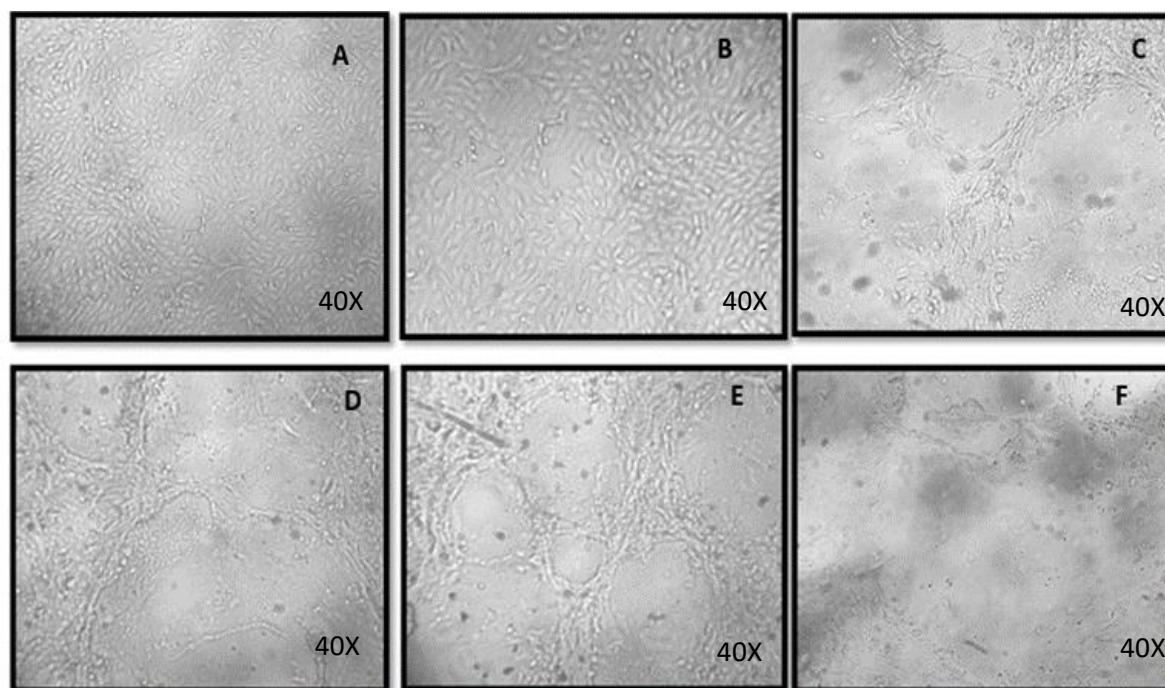


Figura 24. Efecto citopático inducido por el virus de VDC en los diferentes tiempos de tratamientos con la mezcla de los tres flavonoides (naringenina-pinocembrina-quercetina). Fotomicrografías de microscopio invertido (40x). A. Células Vero sin infección (48 hrs). B. Control de flavonoides en conjunto. C. Control positivo. D. Flavonoides dos horas antes de la infección. E. Flavonoides simultáneos a la infección. F. Flavonoides dos horas después de la infección viral.

7.16 Eficacia del tratamiento antiviral determinado por la viabilidad celular.

Con el propósito de determinar el efecto antiviral del EEP y los flavonoides comerciales en el cultivo celular infectado con VDC, la viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo colorimétrico del MTT (90). Cuando el EEP se aplica al cultivo celular en tres momentos diferentes (antes, durante y después de la infección), se observa una reducción en el efecto lítico producido por el virus, mejorando así la viabilidad celular (figura 25, A). Cuando el EEP se administró dos horas antes de que la infección viral mostró una mejor viabilidad celular en comparación con las células infectadas sin tratamiento y los otros dos tratamientos usados (figura 25.A-4 vs. A-3, A-5 y A-6), en donde se observaron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.01$). La quercetina (figura 25, B) mostró un mejor efecto cuando se administró al mismo tiempo que la infección (figura 25, B-5). Hay un efecto mayor que el del EEP cuando se comparan en el mismo tiempo de tratamiento (figura 25; B-5 vs. 1, A-5). pinocembrina (figura 25, C) mantuvo la viabilidad celular cuando se administró antes y durante la infección viral (figura 25, C-4 y C-5), sin embargo, cuando se aplicó pinocembrina después de la infección viral, hubo una disminución en la viabilidad celular, presentándose diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.01$), entre este tratamiento y los otros dos usados (figura 25, C-6 vs. C-4 y C-5), no se observaron diferencias significativas ($P > 0.01$) en comparación con el control positivo (figura 25, C-6 vs. C-3). Por otro lado, la naringenina mantuvo la viabilidad celular solo cuando se administró al mismo tiempo que la infección, como lo muestra la diferencia estadísticamente significativa con el control positivo (células infectadas con el virus) y los otros dos tratamientos utilizados (figura 25, D-5 vs. D-4 y D-6). Además, se realizó un tratamiento donde se utilizó una mezcla de flavonoides (pinocembrina, naringenina y quercetina), a las concentraciones y tiempos ya mencionados (figura 25, E). En esta condición experimental, se observó una mejor viabilidad celular cuando el tratamiento se aplicó al mismo tiempo que la infección viral en comparación con las células infectadas sin tratamiento, y los otros dos tratamientos utilizados (figura 25, E-5 vs. E-3, E-4 y E-6) observándose diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.01$).

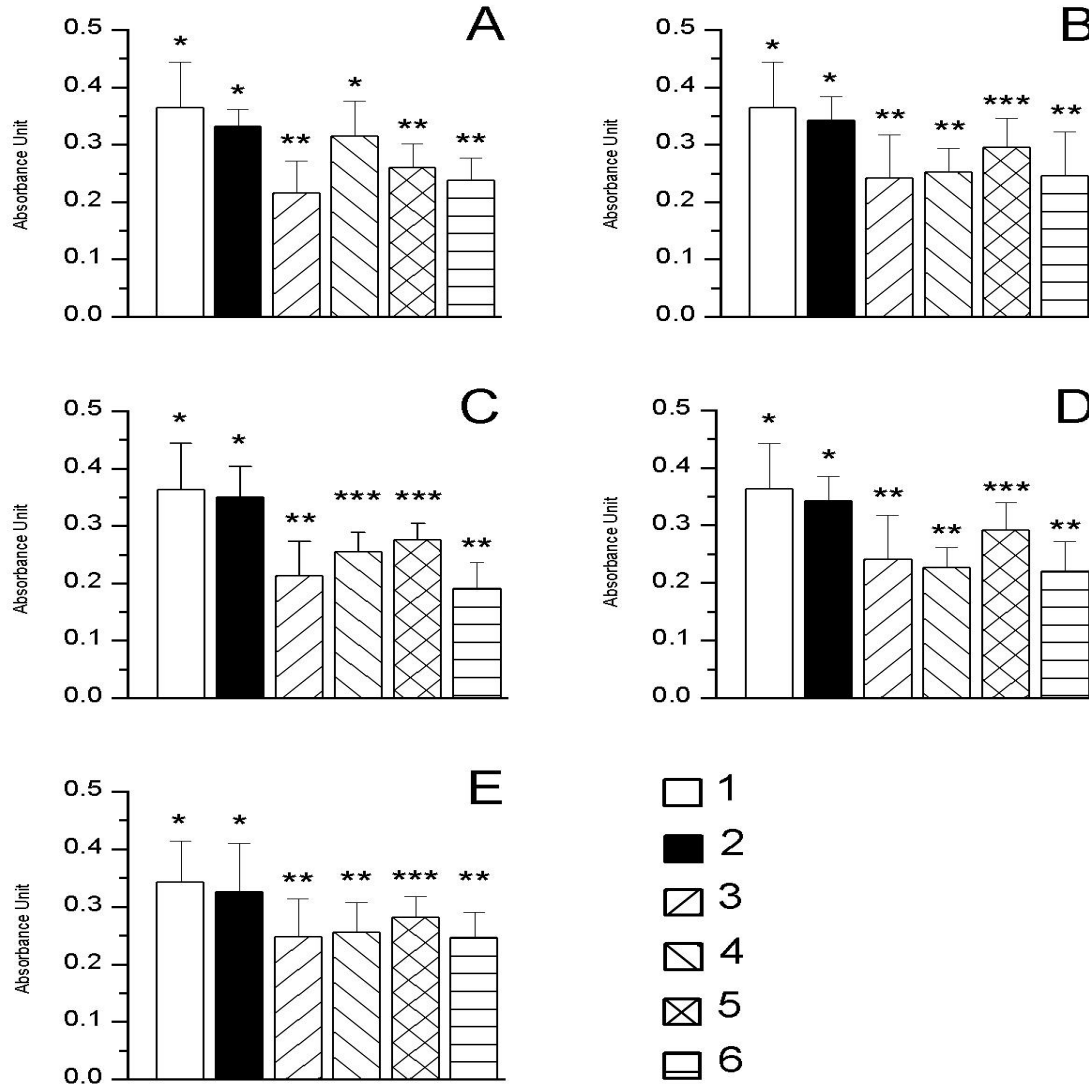


Figura 25. Evaluación del tratamiento antiviral mediante el ensayo colorimétrico MTT (UA595). Los resultados se expresan como la media de las tres determinaciones de cada grupo (n = 48). A) Propóleo, B) Quercetina, C) Pinocembrina, D) Naringenina, E) Mezcla de flavonoides. Se comparan los diferentes momentos en que se implementaron los tratamientos; 1) Células sin tratamiento e infección por virus, 2) Células con tratamiento sin infección por virus, 3) Células infectadas con virus sin tratamiento, 4) Células tratadas durante 2 horas, luego extraídas e infectadas con el virus, 5) Células infectadas y tratadas en el mismo tiempo, 6) Células infectadas por 2 h con el virus. Se eliminó y se aplicó el tratamiento. Las diferencias en el número de asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos (p < 0,01).

7.17 RT- PCR punto final.

Para corroborar la presencia del VDC se diseñaron primers para el gen de β -actina y para el gen de la nucleoproteína de VDC y se llevó a cabo la técnica de RT- PCR punto final elaborando un gel de agarosa, observándose una banda de 170 pb para β -actina y de 200 pb para VDC (Figura 26).

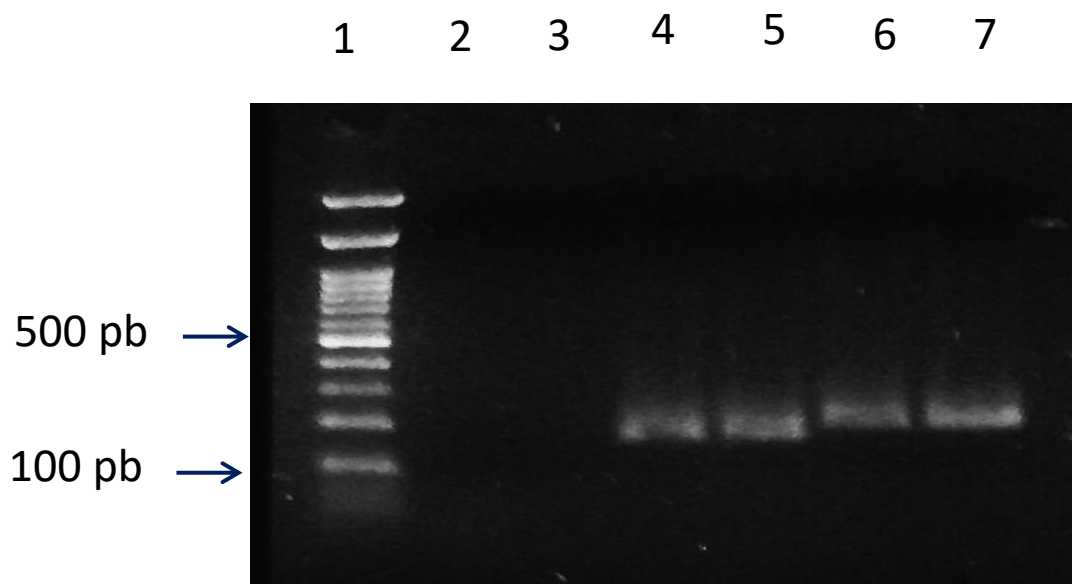


Figura 26. Obtención del amplificado del gen de β actina y VDC por PCR punto final. Carriles 1. Marcador de peso molecular, 2 y 3. Negativos. 4 y 5. Amplicón correspondiente a β actina de 170 pb. 6 y 7. Amplicón correspondiente a VDC de 200 pb. Gel de Agarosa al 1.5%.

7.18 RT- PCR tiempo real.

La eficacia de la PCR fue determinada usando una curva estándar y la PCR tiempo real fue representada por el coeficiente de correlación ($R= 0.99$). el amplicón específico del gen de interés (endógeno o gen blanco) fue confirmado por el análisis de las curvas. Obteniendo así un amplicón de 170 pb para β - actina, indicando que los iniciadores usados en el estudio fueron específicos para cada gen (Figura 27).

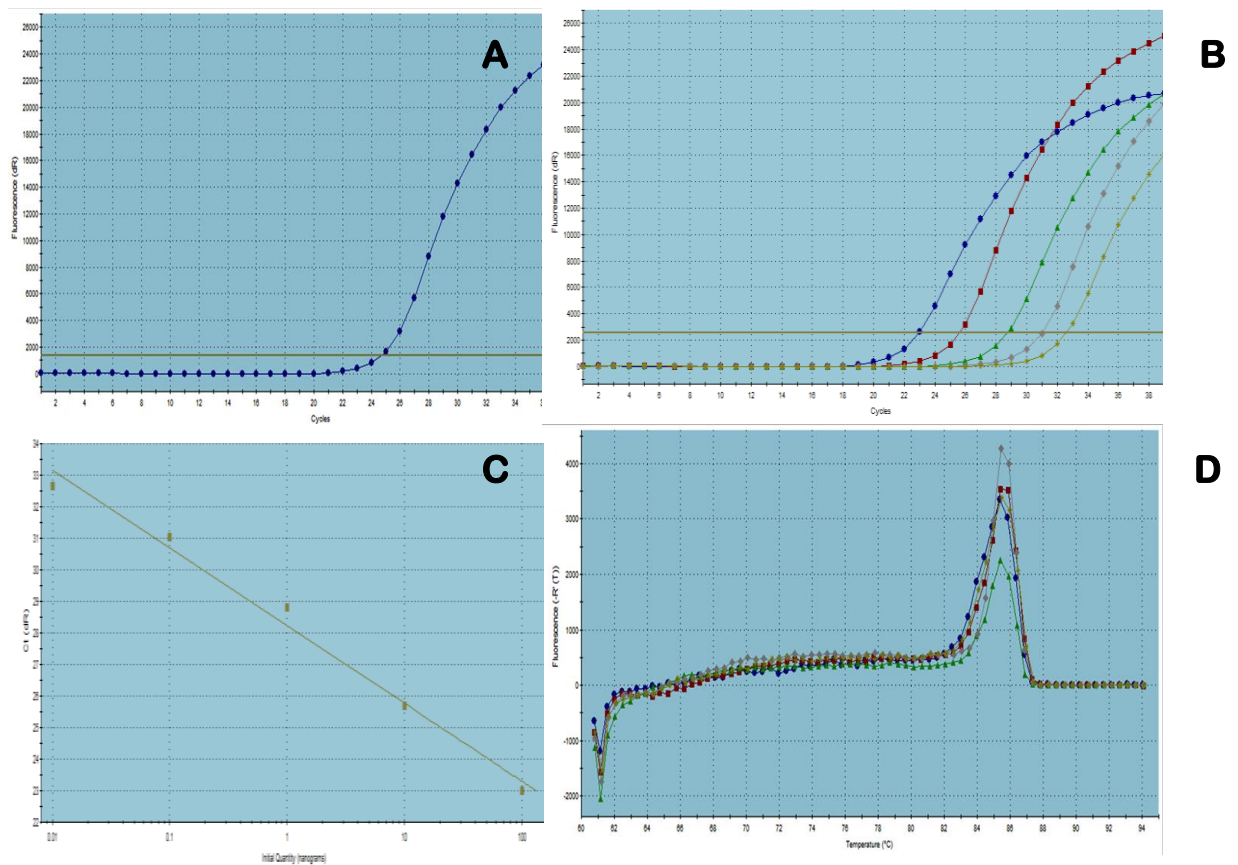


Figura 27. Amplificación de gen endógeno de β actina. A. Curva de amplificación. B. Curva de diluciones. C. Curva estándar ($RSq\ 0.98$, $Y= - 2.4*\text{LOG}(x)+ 28.23$). D. Curva de disociación (170 pb).

7.19 Curva de amplificación del gen de la NP del VDC.

De igual manera fueron diseñados los iniciadores específicos para el gen de la nucleoproteína de VDC, obteniendo la curva de amplificación y la curva de disociación para el producto esperado de 200 pb (Figura 28).

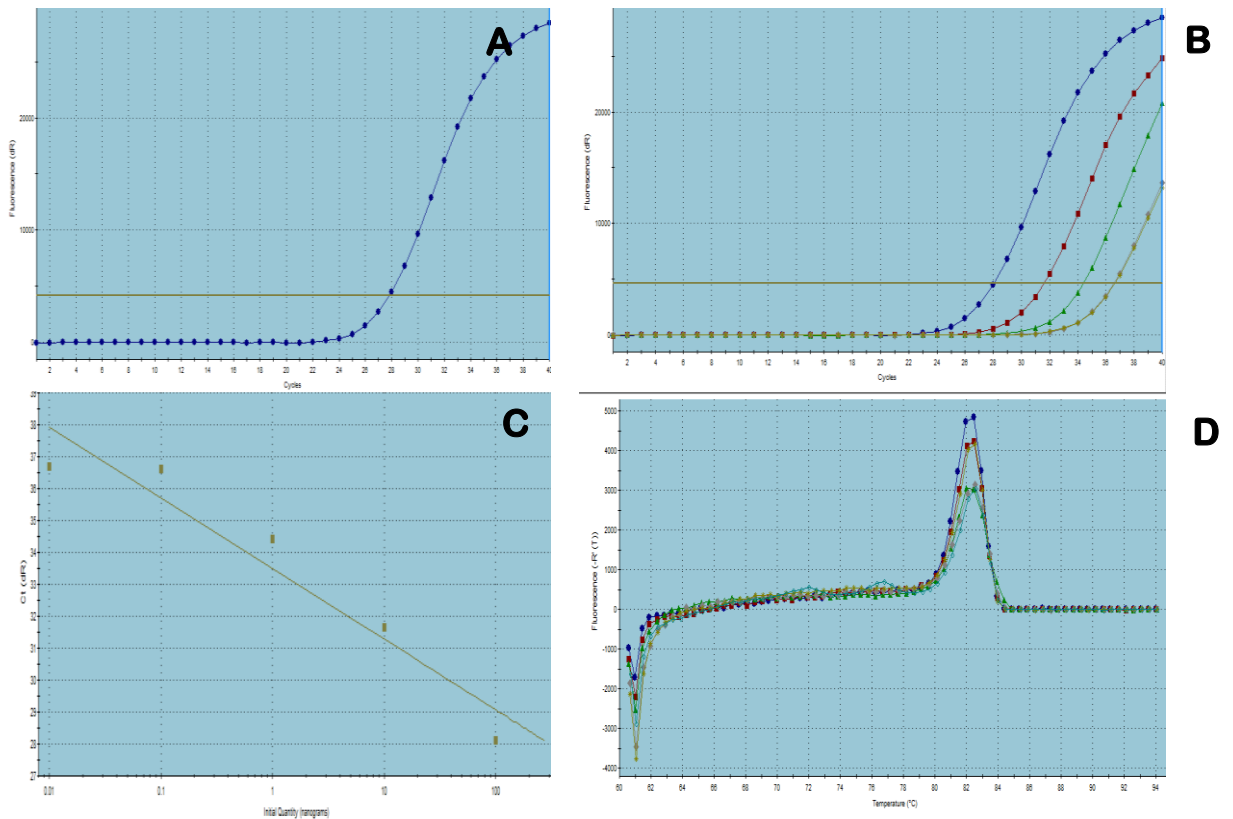


Figura 28. Amplificación del gen NP de VDC. A. Curva de amplificación. B. Curva de diluciones. C. Curva estándar (RSq 0.92, Y= - 2.2* LOG (X)+ 33.50). D. Curva de disociación (200 pb).

7.20

7.21 Cambio en la expresión del gen de la nucleoproteína de VDC posterior al tratamiento con los compuestos mediante RT-qPCR relativa.

Se observan las gráficas obtenidas después de la aplicación de cada uno de los tratamientos (Propóleo o flavonoide individual o en conjunto), mostrando las curvas de amplificación y las curvas de disociación para el gen endógeno y el gen de interés (NP de VDC, Figura 29).

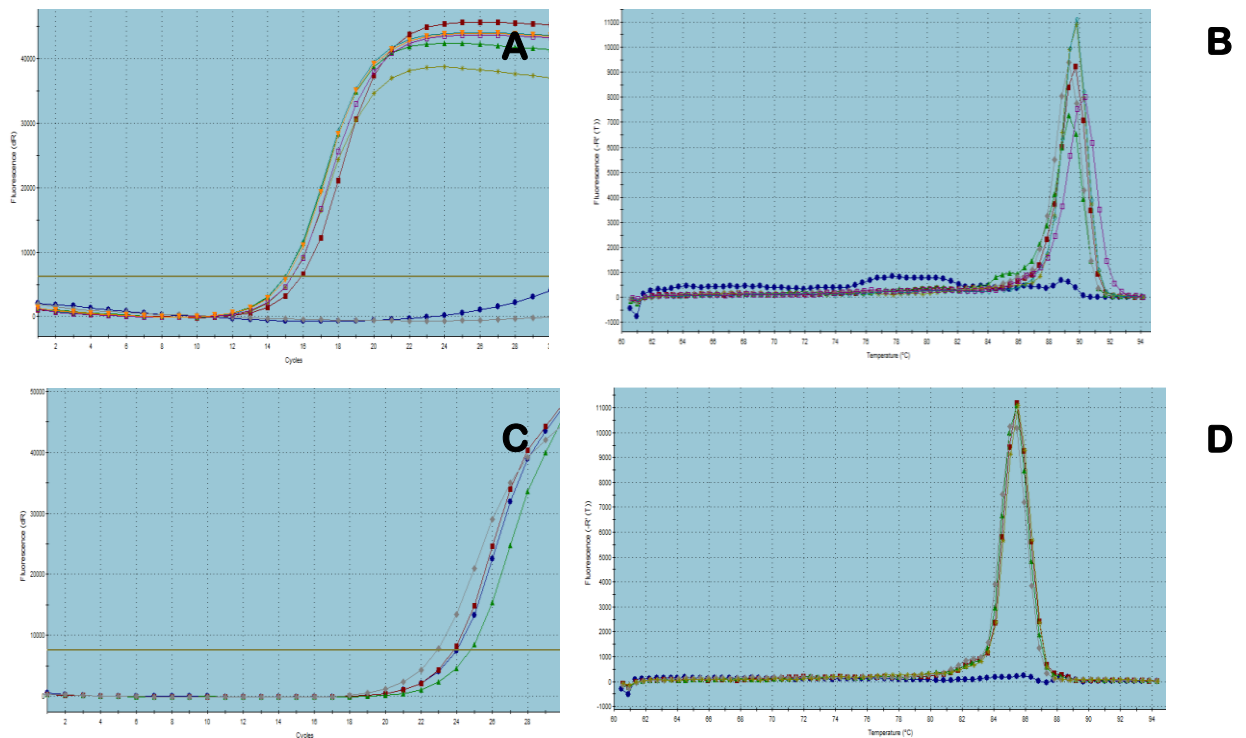


Figura 29. Ejemplo de curvas de amplificación y disociación como resultado del tratamiento con Propóleo. A. Curva de Amplificación. B. Curva de disociación de β actina. C. Curva de amplificación de VDC. D. Curva de disociación para VDC.

7.22 Validación del método de Livak (92) para el cálculo de la expresión relativa.

Con el fin de validar el método a emplear para llevar a cabo la PCR tiempo real se llevó a cabo una comparación de pendientes y se observó que no tenían prácticamente diferencias por lo que con estos datos se procedió a aplicar el método de Livak y obtener resultados adecuados de expresión relativa (Figura 30).

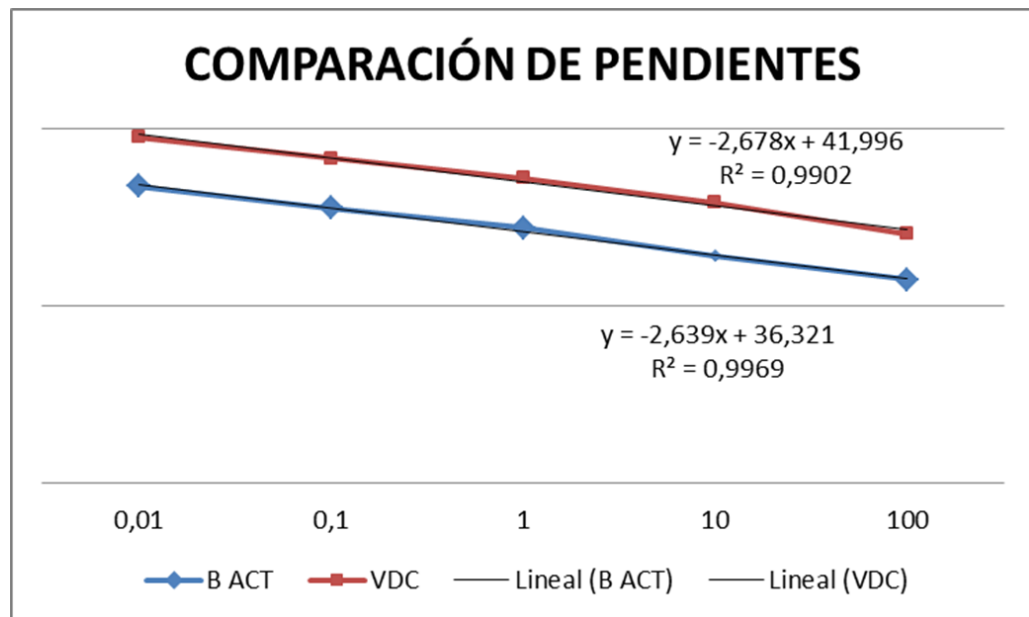


Figura 30. Comparación de pendientes. Se muestran las pendientes del gen endógeno (β actina) y del gen problema (VDC) con sus respectivas R².

7.23 Eficacia del tratamiento antiviral evaluado por la expresión génica relativa.

El efecto antiviral del EEP y los flavonoides comerciales se evaluó mediante la reducción en la expresión relativa del gen del NP-VDC, que se determinó mediante qPCR en tiempo real. Una disminución más pronunciada en la expresión relativa del gen NP-VDC se encontró cuando el EEP se aplicó antes de la infección viral (figura 31, A-2), esta disminución no fue tan evidente con los tratamientos aplicados después (figura 31, A-3) y al mismo tiempo de la infección (figura 31, A-4). Cuando se administró quercetina al mismo tiempo que la infección viral (figura 3, B-3), se observó una pequeña reducción en la expresión relativa del gen de la nucleoproteína del virus. Por otro lado, pinocembrina (figura 31, C) y naringenina (figura 31, D), cuando se administraron en cualquiera de los tres tiempos establecidos, no indujeron ningún cambio en la expresión relativa del gen NP-VDC. El tratamiento con la mezcla de flavonoides (figura 31, E), aplicado antes de la infección viral (figura 31, E-2), produjo una reducción más marcada de la expresión relativa del gen NP-VDC que la observada cuando el tratamiento se implementó al mismo tiempo y después de la infección viral.

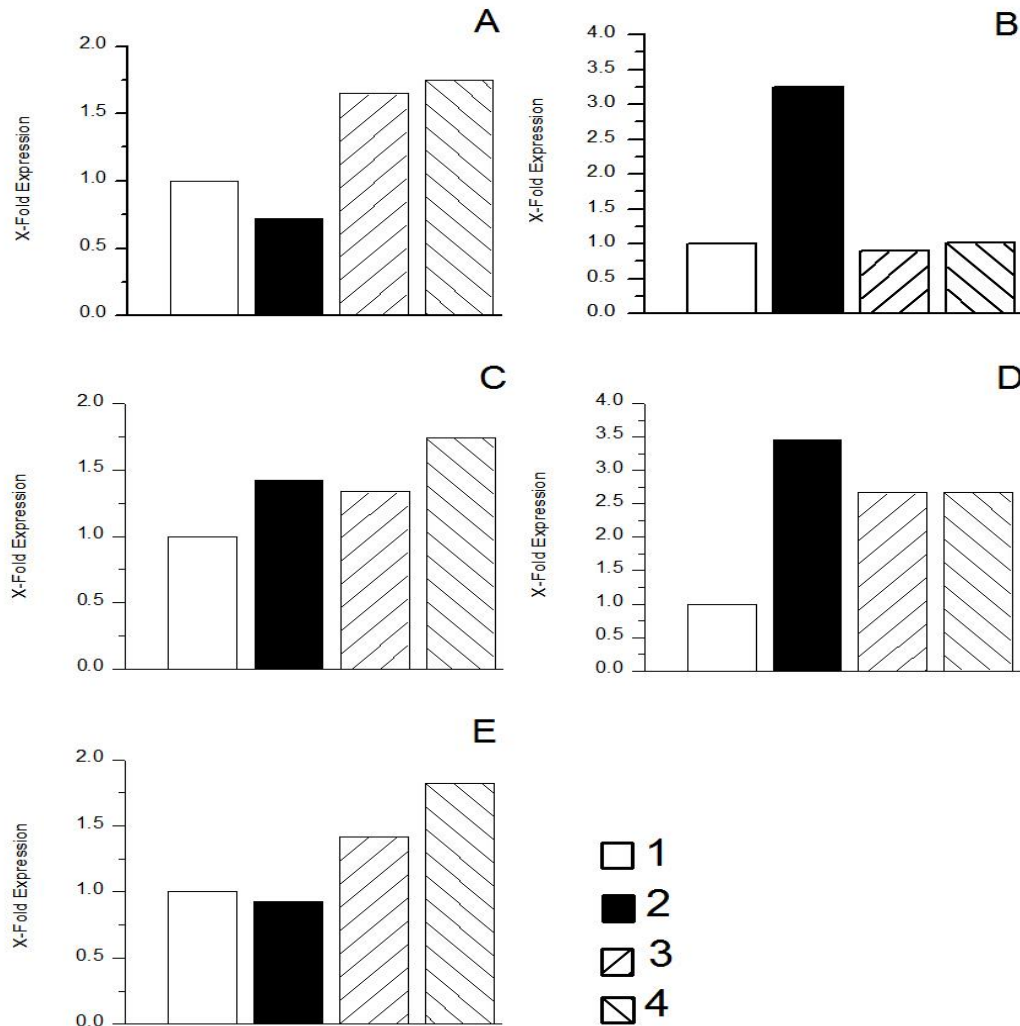


Figura 31. Niveles de expresión relativa del gen VDC-NP medido por qPCR en tiempo real después de la administración de los diferentes tratamientos. Los datos se presentan como tiempos de expresión génica sobre el control no tratado infectado con el VDC, que a su vez se estableció como 1.0 y se estandarizó con el gen de referencia (β -actina). A) Propóleo, B) Quercetina, C) Pinocembrina, D) Naringenina y E) Mezcla de flavonoides. 1) Células infectadas con el virus sin tratamiento, 2) Células tratadas durante 2 h, luego se eliminaron e infectaron con el virus, 3) Células infectadas y

tratadas al mismo tiempo y 4) Células infectadas durante 2 h con el virus, esto se eliminó y el tratamiento fue aplicado.

8 DISCUSION

En el propóleo mexicano, haciendo uso de un método analítico, fue posible identificar varios compuestos fenólicos; entre ellos, los flavonoides que representan una forma de establecer un índice de calidad. Cuanto mayor es el porcentaje de estos compuestos en cualquier propóleo, mejor es su pureza y calidad (55). El propóleo FESC cosechado durante octubre de 2014 presentó un mayor contenido de flavonoides y fenoles que el de otros propóleos recolectados en el mismo lugar (88), indicando que la variación de factores como la vegetación, la floración y las condiciones climáticas del lugar afectan la composición química del propóleo directamente y, por lo tanto, sus propiedades biológicas. Por esta razón, se podía esperar que el EEP-FESC 2014 muestre actividad biológica intensa, dado su alto contenido de flavonoides y fenoles.

La concentración citotóxica media (CC50) y las concentraciones empleadas del EEP, quercetina y naringenina, utilizadas durante el presente estudio, son inferiores a las mencionadas por otros autores (31), mientras que la concentración de pinocembrina utilizada es similar a la informada en otros artículos (33).

La variabilidad en las concentraciones puede atribuirse a varios factores: el uso de diferentes líneas celulares, el lugar de origen del propóleos y, por lo tanto, su composición, los tiempos establecidos para cada tratamiento y el tipo de extracto de propóleo (hidrosoluble o etanólico).

Con el propósito de evaluar si los tiempos de administración de los tratamientos con propóleos y flavonoides comerciales influyeron en el desarrollo de la infección viral, se establecieron tres momentos diferentes de administración del tratamiento (dos horas antes, durante y dos horas después de la infección viral). De esta forma, se observó que se logró una mayor eficacia del EEP cuando se administró antes de la infección viral, lo que sugiere que EEP interactúa directamente con las células huésped al interferir con el reconocimiento adecuado entre los receptores celulares (64) y las proteínas virales, evitando así la

internalización del virus y una mayor replicación. Por lo tanto, observando un efecto citopático menor sobre las células en el cultivo (59,94,95).

La quercetina administrada al mismo tiempo de infección aumenta la viabilidad celular y disminuye la expresión génica viral. Este flavonoide ha sido objeto de varios estudios porque generalmente se encuentra en todos los propóleos (31,56); muchos flavonoides, entre ellos la quercetina, han demostrado presentar actividad antiviral contra VDC (31). Teniendo en cuenta que la quercetina muestra un mayor efecto antiviral cuando se administra al mismo tiempo que la infección, se tiene la hipótesis de que actúa inhibiendo la fase intracelular del ciclo de replicación del VDC, gracias a su capacidad de inhibir la polimerasa viral e interferir con la síntesis viral de ácidos nucleicos (60,95). Además, su actividad antiviral se ha asociado con su capacidad para unir proteínas virales y bloquear la síntesis de proteínas celulares (95,96). Se sugiere que si la concentración de este flavonoide aumenta, su actividad biológica puede mejorarse, sin embargo, se debe considerar el rango de citotoxicidad de la quercetina en el cultivo celular para evitar el daño celular, causando pérdida de viabilidad celular y por lo tanto alteraciones en los resultados.

La pinocembrina es el flavonoide más abundante en el propóleo FESC 2014, a la cual se le atribuyen propiedades biológicas importantes, como las antivirales, como lo demuestra su actividad contra el virus del herpes simple (56). Se ha determinado que este flavonoide actúa inhibiendo el ciclo de replicación viral a través de la interferencia específica con la ADN polimerasa viral (59). Su actividad antiviral contra el virus del dengue, cuando ha habido una interacción previa directa entre esta sustancia y el virus seguido de la inoculación del cultivo, también se ha informado, siendo importante destacar que la concentración es muy similar a la utilizada en este estudio (33). No obstante, en el presente estudio, cuando se usaron pinocembrina y naringenina individualmente, independientemente del momento en el que se administraron, no se observó reducción de la expresión viral lo que indica que ninguno de estos compuestos afecta la replicación del VDC.

La aplicación del tratamiento con la mezcla de flavonoides (pinocembrina, naringenina y quercetina) antes de la infección viral mostró un patrón similar al observado para EEP, es decir, manteniendo la viabilidad celular y disminuyendo la expresión del gen VDC-NP, demostrando así la existencia de un efecto sinérgico entre tres compuestos, dado el hecho de que, cuando se usan individualmente, los resultados obtenidos para cada flavonoide son diferentes. Varios autores han mencionado el efecto sinérgico entre algunos flavonoides, incluso cuando interactúan con otro tipo de agentes antivirales (95), lo que explica el hecho de que tanto la miel como el propóleo exhiben una mayor actividad antiviral que sus componentes por separado (94). Dentro de la investigación sobre el uso del propóleo *in vitro*, cabe destacar que es un modelo probado en el que se sugiere continuar con el análisis específico de la actividad biológica de cada uno de los compuestos y la sinergia entre ellos. Se cree que en el futuro es posible implementar un modelo animal, pero no antes de estandarizar las concentraciones específicas de cada uno de los componentes. Dado que debemos considerar que cada propóleo presenta cambios en su composición y efectividad, de acuerdo con nuestros resultados podemos señalar que el propóleo administrado como complemento o preventivo de la enfermedad del Distemper Canino podría ser favorable.

9 CONCLUSIONES

La evaluación química del propóleo FESC cosecha 2014 presentó diferencias en su composición con otros propóleos cosechados en años distintos, lo que sugiere que la efectividad del mismo va a depender de esta situación.

Con los presentes resultados se demuestra la actividad antiviral del extracto etanólico del propóleo mexicano, como lo es la reducción en el efecto citopático evaluado mediante viabilidad celular y el nivel de expresión del gen de la nucleoproteína del VDC.

Es importante destacar que la presencia del propóleo disminuye el efecto citopático del VDC siendo éste uno de los primeros trabajos que reporta este fenómeno, así como el efecto sinérgico que existe entre los flavonoides estudiados.

La determinación de las dosis mínimas empleadas en el presente trabajo permitirá que puedan ser utilizadas en trabajos de investigación con cualquier tipo de microorganismo patógeno de las especies domésticas en un sistema *in vitro*.

Por último, estos resultados abren nuevas perspectivas que pueden generar conocimiento más específico sobre los efectos biológicos del Propóleo y sus componentes en estudios *in vitro* de cualquier tipo de infección viral.

10 PERSPECTIVAS DEL PROYECTO

1. Realizar estudios considerando los flavonoides más representativos del propóleo de FESC utilizándolos de manera individual y en conjunto para seguir profundizando sobre su actividad biológica y verificar la presencia de sinergia entre ellos.
2. Implementar el estudio de la actividad antiviral del propóleo con otros virus de interés veterinario.
3. Realizar estudios de microscopía electrónica con el fin de evaluar a nivel estructural los cambios inducidos por el propóleo en células y virus.
4. Desarrollar un modelo experimental que permita evaluar la actividad antiviral del propóleo en un modelo *in vivo*.

11 REFERENCIAS

1. Yuan J, Liu J, Hu YL, Fan Y, Wang D, Guo L, et al. The immunological activity of propolis flavonoids liposome on the immune response against ND vaccine. *Int J Biol Macromol*. 2012;51(4):400–5.
2. Kuropatnicki AK, Szliszka E, Krol W. Historical aspects of propolis research in modern times. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2013;2013.
3. Bankova V, Popova M, Bogdanov S, Sabatini AG. Chemical composition of European propolis: Expected and unexpected results. *Zeitschrift fur Naturforsch - Sect C J Biosci*. 2002;
4. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol*. 1998;36(4):347–63.
5. Bankova VS, Castro SL de, Marcucci MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* [Internet]. 2000 Jan;31(1):3–15. Available from: <https://doi.org/10.1051/apido:2000102>
6. Sforcin JM, Bankova V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol*. 2011;133(2):253–60.
7. Rocha BA, Bueno PCP, Vaz MMDOLL, Nascimento AP, Ferreira NU, Moreno GDP, et al. Evaluation of a Propolis Water Extract Using a Reliable RP-HPLC Methodology and In Vitro and In Vivo Efficacy and Safety Characterisation. *Evidence-Based Complement Altern Med* [Internet]. 2013;2013:1–11. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/670451/>
8. Castaldo S, Capasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*. 2002;73(SUPPL. 1):1–6.
9. Monzote L, Cuesta-Rubio O, Fernandez MC, Hernandez IM, Fraga J, P??rez K, et al. In vitro antimicrobial assessment of Cuban propolis extracts. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(8):978–84.
10. Chan GCF, Cheung KW, Sze DMY. The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2013;44(3):262–73.
11. Cheng PC, Wong G. Honey bee propolis: prospects in medicine. *Bee World*

- [Internet]. 1996 Jan 1;77(1):8–15. Available from: <https://doi.org/10.1080/0005772X.1996.11099278>
12. Vargas-Sánchez RD, Torrescano-Urrutia GR, Sánchez-Escalante A. El propóleo: Conservador potencial para la industria alimentaria. *Interciencia*. 2013;38(10):705–11.
 13. Bankova V, Christoy R, Stoev G, Popov S. Determination of phenolics from propolis by capillary gas chromatography. *J Chromatogr A* [Internet]. 1992 Aug 21 [cited 2018 Nov 12];607(1):150–3. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/002196739287067I>
 14. Gómez-Caravaca AM, Gómez-Romero M, Arráez-Román D, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharm Biomed Anal*. 2006;41(4):1220–34.
 15. Aga H, Shibuya T, Sugimoto T, Kurimoto M NS. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1994;58:945–6.
 16. Russo A, Longo R, Vanella A. Antioxidant activity of propolis: Role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia*. 2002;73(SUPPL. 1):21–9.
 17. Fischer G, Cleff MB, Dummer LA, Paulino N, Paulino AS, Vilela C de O, et al. Adjuvant effect of green propolis on humoral immune response of bovines immunized with bovine herpesvirus type 5. *Vet Immunol Immunopathol*. 2007;116(1–2):79–84.
 18. Bogdanov S. Propolis : Composition , Health , Medicine : A Review. *Bee Prod Sci* [Internet]. 2017;1–44. Available from: <http://www.bee-hexagon.net/>
 19. Hanson JR, Abel EW, Davies AG, Phillips D, Woollins JD. Natural Products [Internet]. The Royal Society of Chemistry; 2003. 1-4 p. (Tutorial Chemistry Texts). Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/9781847551535>
 20. Zhang, B., Wang, D., Kong, X., Hu Y. Studies on immunoenhancement of propolis flavone. *Yangzhou Daxue Xuebao, Nongye Yu Shengming Kexueban*. 2006;27:20–2.
 21. King-Díaz B, Granados-Pineda J, Bah M, Rivero-Cruz JF, Lotina-Hennsen B.

- Mexican propolis flavonoids affect photosynthesis and seedling growth. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2015;151:213–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.08.019>
22. Tapas A, Sakarkar D, Kakde R. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Trop J Pharm Res* [Internet]. 2008;7(3):2018. Available from: <http://www.ajol.info/index.php/tjpr/article/view/14693>
 23. Cushnie, T.P., Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents*. 2005;26(5):343–56.
 24. Abd El-Hady FK, Hegazi AG, Wollenweber E. Effect of Egyptian propolis on the susceptibility of LDL to oxidative modification and its antiviral activity with special emphasis on chemical composition. *Zeitschrift fur Naturforsch - Sect C J Biosci*. 2007;
 25. Orhan DD, Ozçelik B, Ozgen S, Ergun F. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiol Res*. 2010;165(6):496–504.
 26. Rotelli AE, Guardia T, Juárez AO, De La Rocha NE, Pelzer LE. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacol Res*. 2003;48(6):601–6.
 27. Groot H, Rauen U. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam Clin Pharmacol* [Internet]. 1998;12(3):249–55. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-8206.1998.tb00951.x>
 28. Hegazi AG, Farghaly AA, Abd El Hady FK. Antiviral activity and chemical composition of European and Egyptian propolis. *Egypt J Vet Sci*. 2004;38(November):11–22.
 29. Abd El Hady FK, Hegazi AG. Egyptian propolis: 2. Chemical composition, antiviral and antimicrobial activities of East Nile Delta propolis. *Zeitschrift fur Naturforsch - Sect C J Biosci*. 2002;57(3–4):386–94.

30. Amoros M, Simões CMO, Girre L, Sauvager F, Cormier M. Synergistic Effect of Flavones and Flavonols Against Herpes Simplex Virus Type 1 in Cell Culture. Comparison with the Antiviral Activity of Propolis. *J Nat Prod* [Internet]. 1992 Dec 1;55(12):1732–40. Available from: <https://doi.org/10.1021/np50090a003>
31. Carvalho O V., Botelho C V., Ferreira CGT, Ferreira HCC, Santos MR, Diaz MAN, et al. In vitro inhibition of canine distemper virus by flavonoids and phenolic acids: Implications of structural differences for antiviral design. *Res Vet Sci* [Internet]. 2013;95(2):717–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.04.013>
32. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*. 2000;63(7):1035–42.
33. Liu R, Gao M, Yang ZH, Du GH. Pinocembrin protects rat brain against oxidation and apoptosis induced by ischemia-reperfusion both in vivo and in vitro. *Brain Res*. 2008;1216:104–15.
34. Bankova, V.S., Popov, S.S., Marekov N. High-performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. *J Chromatogr*. 1982;242:135–43.
35. Medić-Sarić, M., Rastija, V., Bojić M. Recent advances in the application of high performance liquid chromatography in the analysis of polyphenols in wine and propolis. *J AOAC Int*. 2011;94(1):32–42.
36. Pepeljnjak, S., Jalsenjak, I., Maysinger D. Flavonoid content in propolis extracts and growth inhibition of *Bacillus subtilis*. *Pharmazie*. 1985;40(2):122–3.
37. Del Rayo Camacho M, Sanchez B, Quiroz H, Contreras JL, Mata R. Pinocembrine: A bioactive flavanone from *Teloxys graveolens*. *J Ethnopharmacol*. 1991;31(3):383–9.
38. Santos, A.C., Uyemura, S.A., Lopes, J.L., Bazon, J.N., Mingatto, F.E., Curti C. Effect of naturally occurring flavonoids on lipid peroxidation and membrane permeability transition in mitochondria. 1998;24(9):1455–61.
39. Sala A, Recio MC, Schinella GR, Máñez S, Giner RM, Cerdá-Nicolás M, et al. Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2003 Feb 7 [cited 2018 Nov 14];461(1):53–61. Available from:

- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299902029539?via%3Dihub>
40. Muhamad M, Kee LY, Rahman NA, Yusof R. Antiviral actions of flavanoid-derived compounds on dengue virus type-2. 2010;6(3):294–302.
 41. Paredes A, Alzuru M, Mendez J, Rodríguez-Ortega M. Anti-Sindbis Activity of Flavanones Hesperetin and Naringenin. *Biol Pharm Bull* [Internet]. 2003;26(1):108–9. Available from: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/bpb/26.108?from=CrossRef>
 42. Lyu S-Y, Rhim J-Y, Park W-B. Antiherpetic activities of flavonoids against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in vitro. *Arch Pharm Res*. 2005 Nov;28(11):1293–301.
 43. Mittal AK, Kumar S, Banerjee UC. Quercetin and gallic acid mediated synthesis of bimetallic (silver and selenium) nanoparticles and their antitumor and antimicrobial potential. *J Colloid Interface Sci* [Internet]. 2014;431:194–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2014.06.030>
 44. Egert S, Wolfram S, Bosy-Westphal A, Boesch-Saadatmandi C, Wagner AE, Frank J, et al. Daily Quercetin Supplementation Dose-Dependently Increases Plasma Quercetin Concentrations in Healthy Humans. *J Nutr* [Internet]. 2008;138(9):1615–21. Available from: <https://academic.oup.com/jn/article/138/9/1615-1621/4750827>
 45. Ohnishi E, Bannai H. Quercetin potentiates TNF-induced antiviral activity. *Antiviral Res*. 1993;22(4):327–31.
 46. Vessal, M., Hemmat, I. M., Vasei M. Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2003;135c(3):357–64.
 47. Dok-Go H, Lee KH, Kim HJ, Lee EH, Lee J, Song YS, et al. Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Brain Res*. 2003;965(1–2):130–6.
 48. De Castro SL. Propolis: Biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product. *Annu Rev Biomed Sci*. 2001;3(January 2001):49–83.

49. Chang M, Cheng ZH, Chen DF. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids in *Sophora tonkinensis* by LC/MS and HPLC. *Chin J Nat Med* [Internet]. 2013;11(6):690–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1875-5364\(13\)60081-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1875-5364(13)60081-3)
50. Wei MC, Yang YC, Chiu HF, Hong SJ. Development of a hyphenated procedure of heat-reflux and ultrasound-assisted extraction followed by RP-HPLC separation for the determination of three flavonoids content in *Scutellaria barbata* D. Don. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* [Internet]. 2013;940:126–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.09.015>
51. Qiao X, Yang W, Ye DG and M. Extraction, Separation, Detection, and Structural Analysis of Flavonoids [Internet]. Vol. 15, *Current Organic Chemistry*. 2011. p. 2541–66. Available from: <http://www.eurekaselect.com/node/74614/article>
52. Gonzalez, G.A., Méndez R. Propóleos: un camino hacia la salud. Firts. Día EC, editor. La Habana, Cuba; 1997. 131 p.
53. Gutierrez E. Actividad antibacteriana y perfil químico de propóleos mexicanos sobre cepas de *Pasteurella multocida* aisladas de conejos. Universidad Nacional Autonom de Mexico; 2011.
54. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J Food Sci*. 2008;73(9):117–24.
55. Yao L, Jiang Y, D’Arcy B, Singanusong R, Datta N, Caffin N, et al. Quantitative High-Performance Liquid Chromatography Analyses of Flavonoids in Australian Eucalyptus Honeys. *J Agric Food Chem*. 2004;52(2):210–4.
56. Amoros, M., Simoes, C.M.O., Girre L. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *J Nat Prod*. 1992;55:1732–40.
57. Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol*. 1999;64(3):235–40.
58. Huleihel M, Isanu V. Anti-herpes simplex virus effect of an aqueous extract of

- propolis. *Isr Med Assoc J*. 2002;4(11 SUPPL.):923–7.
59. Schnitzler P, Neuner A, Nolkemper S, Zundel C, Nowack H, Sensch KH, et al. Antiviral Activity and Mode of Action of Propolis Extracts and Selected Compounds. *Phyther Res* [Internet]. 2010;24(S1):S20–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ptr.2868>
 60. Gekker G, Hu S, Spivak M, Lokensgard JR, Peterson PK. Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4+ lymphocyte and microglial cell cultures. *J Ethnopharmacol*. 2005;102(2):158–63.
 61. Kong XF, Hu YL, Yin YL, Wu GY, Rui R, Wang DY, et al. Chinese herbal ingredients are effective immune stimulators for chickens infected with the newcastle disease virus. *Poult Sci*. 2006;85(12):2169–75.
 62. Bernal M, González A MC. Circulación de agentes patógenos y uso de Propóleo en el tratamiento del síndrome diarreico infeccioso del ternero. Estudio comparativo. La Habana, Cuba: I Taller Internacional sobre Apiterapeuticos, II Simposio de Apiterapia, III Simposio sobre Propóleos; 1991.
 63. Fischer G, Conceição FR, Leite FPL, Dummer LA, Vargas GDA, Hübner S de O, et al. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. *Vaccine*. 2007;25(7):1250–6.
 64. Burquez M, Mosqueda M, Mendoza H, Zarate C, Miranda L, Sanchez T. Protective effect of a mexican propolis on MDBK cells exposed to Aujeszky's disease virus (Pseudorabies virus). *African J Tradit Complement Altern Med* [Internet]. 2015;12(4):106. Available from: <http://www.ajol.info/index.php/ajtcam/article/view/120262>
 65. Cueto AP, Alves SH, Pilau M, Weiblen R, Kubiça TF, Lovato LT. Atividade antiviral do extrato de própolis contra o calicivírus felino, adenovírus canino 2 e vírus da diarreia viral bovina. *Ciência Rural* [Internet]. 2011;41(10):1800–6. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782011001000021&lng=pt&tlng=pt
 66. Birchard, S., Sharding R. Manual clínico de procedimientos en pequeñas especies. 2nd ed. Birchard, Stephen J., Sharding RG, editor. McGraw-Hill Interamericana;

2002. 123-126 p.
67. Murphy, F., Gibbs, E., Horzinek, M., Studdert M. *Veterinary Virology*. 3rd ed. San Diego, California; 2002. 629 p.
 68. Del Puerto HL, Vasconcelos AC, Moro L, Alves F, Braz GF, Martins AS. Canine distemper virus detection in asymptomatic and non vaccinated dogs. *Pesqui Vet Bras*. 2010;30(2):139–44.
 69. Greene CE. *Enfermedades infecciosas en perros y gatos* [Internet]. McGraw-Hill Interamericana; 2000. Available from: <https://books.google.com.mx/books?id=oMcLuAEACAAJ>
 70. Lamb RA, Paterson RG, Jardetzky TS. Paramyxovirus membrane fusion: Lessons from the F and HN atomic structures. *Virology*. 2006;344(1):30–7.
 71. Patterson JB, Thomas D, Lewicki H, Billeter MA, Oldstone MBA. V and C proteins of measles virus function as virulence factors in vivo. *Virology*. 2000;267(1):80–9.
 72. Moss WJ, Griffin DE. Global measles elimination. *Nat Rev Microbiol*. 2006;4(12):900–8.
 73. Scagliarini A, Battilani M, Ciulli S, Prosperi S, Morganti L. Molecular analysis of the NP gene of Italian CDV isolates. *Vet Res Commun*. 2003;27(SUPPL. 1):355–7.
 74. Martella V, Elia G, Buonavoglia C. Canine Distemper Virus. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract*. 2008;38(4):787–97.
 75. Schaer, M., Gaschen F. *Clinical medicine of the dog and cat*. Third. Schaer, M., Gaschen F, editor. Boca Raton Florida, USA: CRC Press; 2003. 1160 p.
 76. von Messling V, Milosevic D, Devaux P, Cattaneo R. Canine distemper virus and measles virus fusion glycoprotein trimers: partial membrane-proximal ectodomain cleavage enhances function. *J Virol* [Internet]. 2004;78(15):7894–903. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15254162%5Cnhttp://pubmedcentralcanada.ca/picrender.cgi?accid=PMC446110&blobtype=pdf
 77. Delpeut S, Noyce RS, Siu RW, Richardson CD. Host factors and measles virus replication. *Curr Opin Virol* [Internet]. 2012;2(6):767–77. Available from:

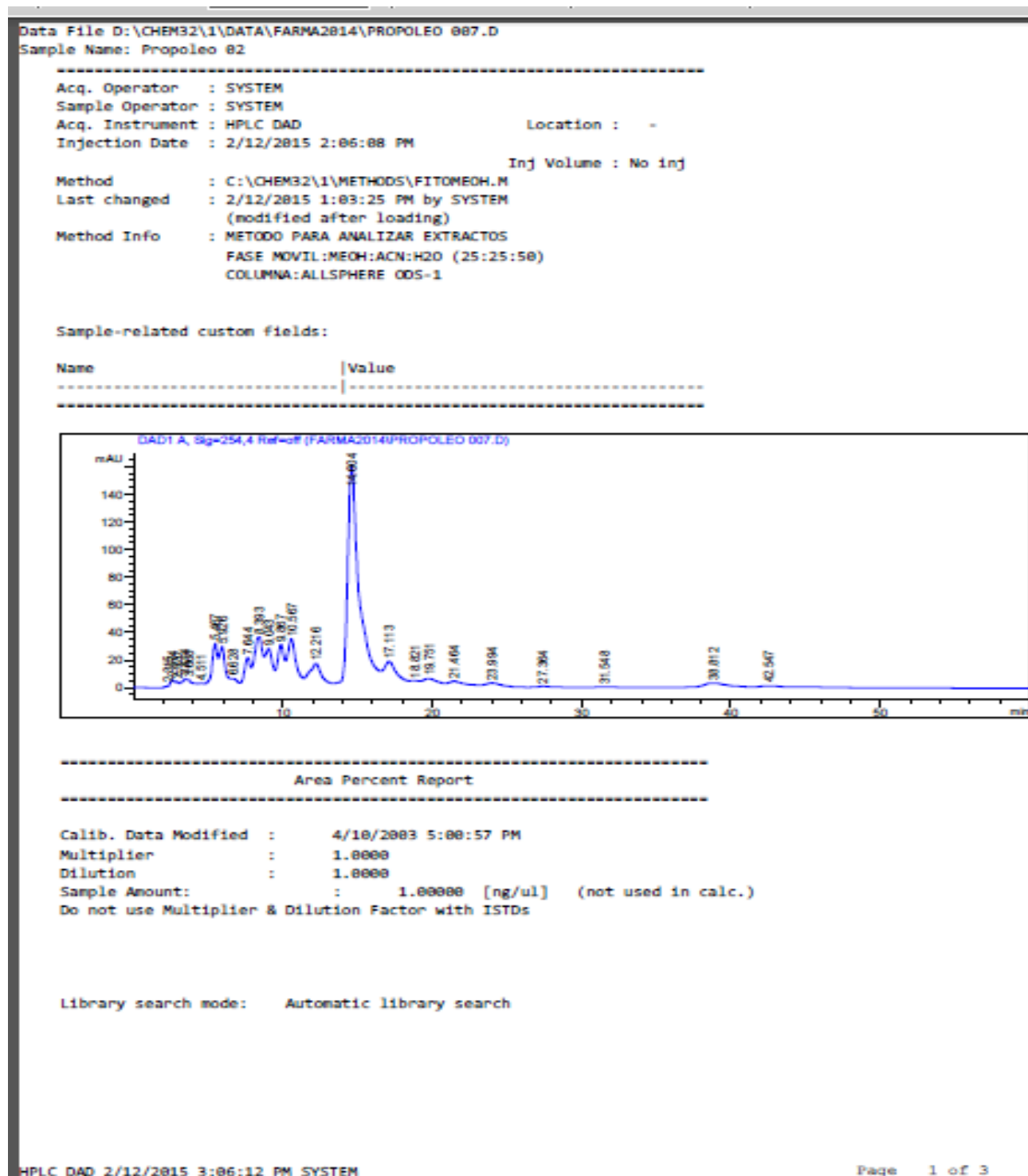
<http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2012.10.008>

78. Keawcharoen J, Theamboonlers A, Jantaradsamee P, Rungsipipat A, Poovorawan Y, Oraveerakul K. Nucleotide sequence analysis of nucleocapsid protein gene of canine distemper virus isolates in Thailand. *Vet Microbiol.* 2005;105(2):137–42.
79. Simon-Martínez J, Ulloa-Arvizu R, Soriano VE, Fajardo R. Identification of a genetic variant of canine distemper virus from clinical cases in two vaccinated dogs in Mexico. *Vet J.* 2008;175(3):423–6.
80. Harrison MS, Sakaguchi T, Schmitt AP. Paramyxovirus assembly and budding: Building particles that transmit infections. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2010;42(9):1416–29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2010.04.005>
81. Delgado, S., Ramirez, R., Zuñiga E. Caracterización del virus del Distemper (moquillo canino) en cultivos celulares, aislado de animales clínicamente enfermos. *Vet México.* 1993;24(1):15–9.
82. Céspedes PF, Cruz P, Navarro CO. Modulación de la respuesta inmune durante la infección por virus distemper canino: Implicancias terapéuticas y en el desarrollo de vacunas. *Arch Med Vet.* 2010;42(2):15–28.
83. Kim YH, Cho KW, Youn HY, Yoo HS, Han HR. Detection of canine distemper virus (CDV) through one step RT-PCR combined with nested PCR. *J Vet Sci (Suwon-si, Korea).* 2001;2(1):59–63.
84. Nelson R. *Medicina Interna de animales pequeños.* 2nd ed. Buenos Aires, Arentina: Intermedica; 2000. 1490 p.
85. Ettinger, S., Feldman E. *Tratado de medicina interna veterinaria: enfermedades del perro y el gato* / Stephen J. Ettinger. Third. Ettinger, S., Feldman E, editor. Buenos Aires, Arentina: Inter-Médica; 2005. 2568 p.
86. Elia G, Decaro N, Martella V, Cirone F, Lucente MS, Lorusso E, et al. Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *J Virol Methods.* 2006;136(1–2):171–6.
87. Appel MJG, Summers BA, Baker JA. Distemper canino: estado actual. *Int Vet Inf Serv* (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA [Internet]. 2002; Available from: http://www.ivis.org/advances/infect_dis_carmichael/appel_es/ivis.pdf?iframe=true&

88. Rodriguez B. Perfil Químico de propóleos mexicanos para su aplicación en medicina veterinaria. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO; 2015.
89. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Epidemiol* [Internet]. 1938;27(3):493–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
90. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1–2):55–63.
91. Nolkemper S, Reichling J, Sensch KH, Schnitzler P. Mechanism of herpes simplex virus type 2 suppression by propolis extracts. *Phytomedicine*. 2010;17(2):132–8.
92. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* [Internet]. 2001 Dec 1 [cited 2018 Nov 21];25(4):402–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202301912629?via%3Dihub>
93. Tamay de Dios, L., Ibarra, C., Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investig en Discapac*. 2013;2(1):70–8.
94. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *The Scientific World Journal*. 2013.
95. Kim Y, Narayanan S, Chang KO. Inhibition of influenza virus replication by plant-derived isoquercetin. *Antiviral Res* [Internet]. 2010;88(2):227–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2010.08.016>
96. Formica JV V., Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 1995;33(12):1061–80. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0278691595000771>
97. Kiranmai M, Mahendra Kumar CB, Ibrahim M. Comparison of total flavanoid content of *Azadirachta indica* root bark extracts prepared by different methods of extraction. *Res J Pharm Biol Chem Sci*. 2011;2(3):254–61.

12 ANEXOS

12.1 Anexo 1. Perfil Químico HPLC-UV

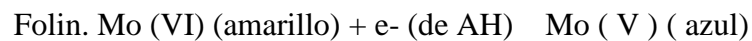


12.2 Anexo 2. Cuantificación de fenoles.

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), el método mide la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes.

El reactivo contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfolibdato y fosfotungstato (coloración amarilla) La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico y fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, siendo proporcional este color al número de grupos hidróxilo de la molécula.



La absorbancia del color azul desarrollado se mide a una longitud de onda de 795nm. Los resultados se expresan en mg de ácido gálico por g de muestra.

Material

- ✚ Gradillas
- ✚ Micropipetas de volumen variable.
- ✚ Puntas para micropipetas.
- ✚ Piseta.
- ✚ Pipeta graduada de 2 ml
- ✚ Espátula
- ✚ Espectrofotómetro UV-VIS
- ✚ Matríz aforado de 100 ml
- ✚ Matraz aforado de 1000 ml
- ✚ Tubos de ensayo
- ✚ 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- Ciocalteau
- ✚ Carbonato de sodio anhidro (Na_2CO_3)

Preparación de reactivos.

- ✚ 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 gramos por L). Disolver 200 g de carbonato de sodio anhidro de 700 ml de agua caliente. Dejar enfriar y aforar a 1000 ml con agua destilada.

Procedimiento.

Curva de calibración.

- ✚ A partir de la solución stock, preparar las siguientes concentraciones 0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.2 mg por ml.

Preparación de las muestras.

- ✚ Preparar una solución estándar de 0.02 mg por ml de cada muestra de Propóleo.

Curva de calibración

El ácido gálico es una 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.

Cuadro 5. Curva de calibración para cuantificación de fenoles.

	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 gálico (µl).	968.5	937.5	875	750	500	---
Concentración gálico (mg/ml).	0.00625	0.0125	0.025	0.05	0.1	0.2
Dilución	1.32	1.16	1.8	1.4	1.2	---

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 6ml de agua destilada.

2. Adicionar 500 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu y esperar 5 minutos, se observará un cambio de color a verde.
3. Adicionar 1.5 ml de Na₂CO₃ (200 g/l) y completar con agua destilada hasta un volumen de 10 ml, se observará un cambio de color a 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 la prueba por triplicado y considerar el promedio.
6. Con los resultados obtenidos se grafica la concentración del ácido gálico contra la absorbancia, realizar un análisis de regresión lineal e interpolar la absorbancia de la muestra a evaluar .
7. Los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico o en porcentaje.

Concentración de ácido gálico (mg/mL)	Absorbancia (nm)
0,00	0,000
0,0063	0,049
0,0125	0,102
0,0250	0,227
0,0500	0,469
0,1000	0,889
0,2000	1,713

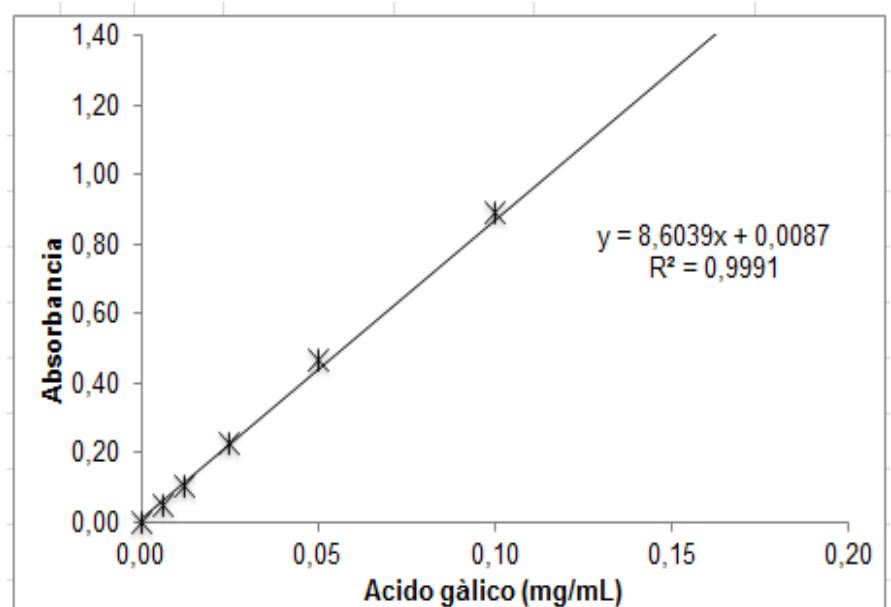


Figura 32 . Curva de calibración de ácido gálico.

12.3 Anexo 3. Cuantificación de flavonoides

Fundamento

El principio básico es la formación de complejos estables de ácidos con el grupo ceto C-4 y 7O C-3 o C-5 del grupo hidroxilo de las flavonas y flavonoles, así como complejos lábiles ácidos con los grupos orthodihidroxi en el anillo A o B de los flavonoides. La Quercetina es la más adecuada para la construcción de la curva de calibración (97).

Material

- | | |
|-------------------------------------|---|
| ✚ Gradillas | ✚ Matríz aforado de 100 ml |
| ✚ Micropipetas de volumen variable. | ✚ Matraz aforado de 1000 ml |
| ✚ Puntas para micropipeta. | ✚ Tubos de ensaye de 12 x 75 mm |
| ✚ Piseta. | ✚ Vaso de precipitados de 50 ml |
| ✚ Pipeta graduada de 2 ml. | ✚ Celdas de cuarzo o placas de ELISA de fondo plano |
| ✚ Espátula. | ✚ Cronómetro |
| ✚ Espectrofotómetro UV-VIS. | ✚ Balanza analítica. |

Reactivos.

- + Agua destilada
- + Estándar puro de Quercetina.
- + Cloruro de aluminio.
- + Metanol, grado HPLC.

Preparación de reactivos.

- + Solución stock de Quercetina (1 mg/7ml). Disolver 10 mg de Quercetina en MeOH y aforar a 10 ml. Conservar en la oscuridad y refrigerada.
- + Tricloruro de aluminio 2 por ciento. Disolver 2 g de cloruro de aluminio en agua destilada y 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/7ml, tomar las alícuotas correspondientes para obtener las concentraciones seriadas como se muestran.

Procedimiento.

1. Adicionar 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 de metanol.
3. Con los resultados obtenidos se grafica la concentración de Quercetina contra la absorbancia, realizando un análisis de regresión lineal e interpolando la absorbancia de la muestra a evaluar.

4. El contenido total de flavonoides se expresa como μg de equivalentes de Quercetina 7 gramo de extracto.

Cuadro . Concentración de quercetina para la elaboración de la curva de calibración para cuantificación de fenoles.

Concentración Quercetina ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia (nm)
0	0,000
1	0,037
2	0,070
3	0,076
4	0,124
5	0,158
6	0,223
7	0,230
8	0,309
9	0,316
10	0,363
20	0,726

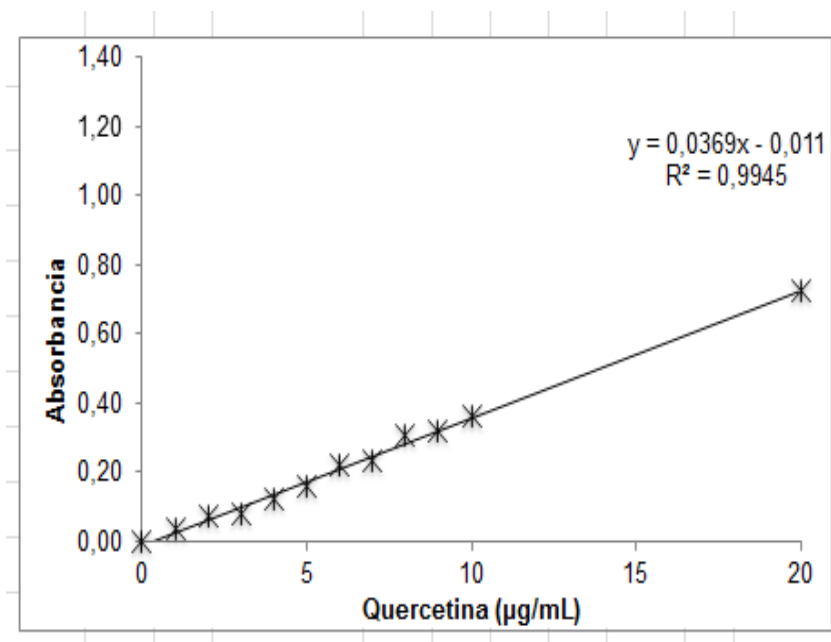


Figura 33. Curva de calibración de ácido gálico.

12.4 Anexo 4. Ensayo colorimétrico de MTT.

El ensayo colorimétrico con Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol (MTT) es un método de mayor sensibilidad y confianza que determina la proliferación, viabilidad y activación celular. Fue desarrollado por Mosmann en 1983, siendo modificado en 1986 por Francois Denizot y Rita Lang. Este análisis se basa en la conversión de la sal de MTT, un sustrato de color amarillo claro, a cristales de formazán, un producto de color purpura. La reacción de reducción celular implica los cofactores de nucleótidos de piridina $NAD^+/NADPH$ y la enzima mitocondrial deshidrogenasa, que solo ocurre en las células vivas. El producto de formazán es impermeable a la membrana celular, acumulándose dentro de la célula. Los cristales de formazán salen de la célula cuando se agregan a un agente lisante (DMSO), permitiendo la cuantificación del producto formado. La intensidad máxima del producto medido a 550–620 nm es directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo, esta intensidad se compara con la de las células sin tratar (control). La actividad citotóxica se expresó como la concentración del compuesto evaluado, en la cual disminuyó el 50% de la viabilidad celular (TC50) comparada con el control, mediante una curva dosis respuesta

