



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Determinación de la actividad antiviral de un propóleo de abejas nativas
frente al virus de Distemper canino.**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA
OLGA VALERIA DOMINGUEZ JIMENEZ

ASESOR: DRA. BETSABÉ RODRÍGUEZ PÉREZ
COASESOR: DR. CARLOS IGNACIO SOTO ZÁRATE
SEGUNDO COASESOR: DR. TONATIUH ALEJANDRO CRUZ SÁNCHEZ

Cuatitlán Izcalli, Edo. De México

2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



**UNAM
CUAUTITLÁN**

DEPARTAMENTO

**DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: DRA. MARIA DEL CARMEN VALDEERRAMANO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

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

Determinación de la actividad antiviral de un propóleo de abejas nativas frente al virus de Distemper canino.

Que presenta la pasante: **Olga Valeria Dominguez Jimenez**

Con número de cuenta: **310088776** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica.**

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 19 de Junio de 2023.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q.F.B. Brígida del Carmen Camacho Enriquez	
VOCAL	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
SECRETARIO	Dra. Betsabé Rodríguez Pérez	
1er. SUPLENTE	M. en C. Paola Edith Briseño Lugo	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. David Ladislao Sánchez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional

MCVB/cga*

*Si conocieras al Tiempo como yo,
no hablarías de emplearlo o perderlo.
Él es muy suyo.*

*Lewis Carroll
Alicia en el país de las maravillas*

Agradecimientos

A mis padres Olga y Salomón por impulsar mis sueños, por todo el apoyo que me han brindado todos estos años, por su sabiduría y por todo su amor incondicional.

A mis hermanos Gabriel y Claudia por siempre cuidar de mi, por toda su paciencia y el apoyo.

A mis abuelos Alfonso, Julia, Bersain y Celia por todo su amor y sabiduría.

A mi sobrino Dante por siempre hacerme reír y darme su amor.

A mis amigos Yareli, Mayahuel, Daniel, Alfredo, Eva, Lucio, Carolina, Rosario, Larisa, Iveth, Fernanda, Sergio, Monserrat, por acompañarme durante todos estos años, por su compañerismo, lealtad y amor, por estar conmigo en los momentos felices y por no soltar mi mano durante los malos.

A Pame por ser mi ángel, mi ELF favorita, por siempre darme su amor y amistad incondicional.

Agradecimientos

A la Dra. Betsabé Rodríguez Pérez por la paciencia, tiempo y ayuda que me ha brindado para la realización de este trabajo.

Al Dr. Carlos Ignacio Soto Zárate por confiar en mí, por ser mi guía durante el proyecto, por su enorme paciencia y por siempre alentarme.

Al Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez por todas sus atenciones durante el desarrollo de este proyecto, por su asesoramiento y por permitirme conocer el increíble mundo de las abejas.

Al MVZ José Luis Nieto Bordes por su asesoría técnica durante la realización de mi servicio social, por hacer de mi tiempo en el laboratorio más ameno y por todos sus consejos.

Al Dr. Carlos Gerardo García Tovar por todas sus atenciones durante el desarrollo de la investigación.

Al M. en C. Francisco Rodolfo González Díaz por su asesoría técnica durante la realización de la fase experimental del trabajo, por mostrarse siempre amable y atento.

Agradecimientos institucionales

Proyecto PAPIIT IN223719: Evaluación de la potencialidad antimicrobiana de propóleos de abejas sin aguijón de México.

PIAPI 2011. Investigación de propóleo de abejas nativas (abejas sin aguijón) para su aplicación en Medicina Veterinaria y Humana.2020

PIAPI 2050: Estudio de los eventos celulares y moleculares involucrados durante el desarrollo de procesos infecciosos en medicina veterinaria.

Proyecto PIAPIME ID 2.11.04.20: Comprensión del estudio de la biología celular mediante la discusión y análisis virtual de los resultados obtenidos en prácticas de laboratorio por parte de los estudiantes de la carrera de MVZ.

Convenio INANA, A.C. NÚMERO DE REGISTRO: 54271-3331-9-XI-18

Lugares de realización

Laboratorio número 4 “Morfología veterinaria y biología molecular” 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.

Laboratorio de Servicios de Análisis de propóleos (LASAP) de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 4, UNAM. Responsable Dr. Alejandro Tonatiuh Cruz Sánchez y Dra. Betsabé Rodríguez Pérez.

Durante la realización de este trabajo se logró la publicación del artículo: Evaluation of the Antiviral Activity of Propolis from Native Bees (*Plebeia frontalis*) against Canine Distemper Virus, el 31 de Diciembre del 2020.

Disponible en: <https://www.scirp.org/journal/ojvm>



Open Journal of Veterinary Medicine, 2020, 10, 207-218
<https://www.scirp.org/journal/ojvm>
ISSN Online: 2165-3364
ISSN Print: 2165-3356

Evaluation of the Antiviral Activity of Propolis from Native Bees (*Plebeia frontalis*) against Canine Distemper Virus

Olga Valeria Domínguez Jiménez¹, Betsabé Rodríguez Pérez², Tonatihu Alejandro Cruz Sánchez², Carlos Gerardo García Tovar¹, José Luis Nieto Bordes¹, Carlos Ignacio Soto Zárate^{1*}

¹Laboratorio 4 de Morfología Veterinaria y Biología Celular, Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, Cuautitlán Izcalli, México

²Laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica, Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, Cuautitlán Izcalli, México
Email: *cisz2012@gmail.com

How to cite this paper: Jiménez, O.V.D., Pérez, B.R., Sánchez, T.A.C., Tovar, C.G.G., Bordes, J.L.N. and Zárate, C.I.S. (2020) Evaluation of the Antiviral Activity of Propolis from Native Bees (*Plebeia frontalis*) against Canine Distemper Virus. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 10, 207-218. <https://doi.org/10.4236/ojvm.2020.1012018>

Received: October 14, 2020

Accepted: December 28, 2020

Published: December 31, 2020

Copyright © 2020 by author(s) and Scientific Research Publishing Inc. This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0). <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Abstract

Propolis is a natural substance made from resins collected from trees and plants, and which bees combine with pollen, wax, and their own enzymes. It has a complex chemical composition that varies with the harvest season, vegetation type, bee species, and geographical region. Thanks to its components, it has valuable biological properties such as antifungal, antibacterial, anti-cancer, antiviral, and immunomodulatory activity. For this study, a sample of propolis harvested in April 2019 was used, which came from a bee native to Mexico (*Plebeia frontalis*) in whose geographical environment there are seven other native species. Canine distemper virus is an RNA virus that causes a systemic infection with high fatality rates in guests without protective immunity. In this work, the antiviral effect of *Plebeia frontalis* propolis on canine distemper virus was tested, administering it one hour before and simultaneously to infection. The antiviral effect was evaluated by determining cellular viability with the MTT assay. The results obtained show that this propolis has a statistically significant antiviral effect on both treatments, although it is slightly better when applied one hour before viral infection, so we can recommend it as an antiviral treatment in both domestic animals and human beings. There are currently few studies of the antiviral effect of propolis, this being the first study of a melliponium propolis in veterinary medicine.

Keywords

Propolis, Vero Cells, Antiviral Effect, Meliponines

Ciencias
Químicas



3er Lugar

Concurso
de
Carteles

No. Reconocimiento: 69-CET-2020. No. serie: 1



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Otorgan la presente **RECONOCIMIENTO** a:

Olga Valeria Domínguez Jiménez, Betsabé Rodríguez Pérez, Carlos Ignacio Soto Zárate,
Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez

Por su trabajo **DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE UN PROPÓLEO
DE ABEJAS NATIVAS FRENTE AL VIRUS DE DISTEMPER CANINO**

El cual obtuvo el **Tercer Lugar** en el concurso de carteles

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli a 11 de diciembre del 2020

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



LASAP

Laboratorio de Servicios de
Análisis de Propóleos, FES-UNAM

Índice

Abreviaturas	3
Índice de figuras	3
Índice de gráficas	4
Índice de tablas	4
Glosario	4
Resumen	5
Introducción	6
Propóleo	6
Composición química del propóleo	7
Abejas nativas sin aguijón (<i>Meliponinos</i> o <i>Meliponini</i>)	8
Plebeia	10
Compuestos fenólicos y flavonoides	10
Virus de Distemper Canino (VDC)	12
Epidemiología	13
Patogenia	13
Replicación Viral	13
Ensayo de citotoxicidad	16
Justificación	17
Hipótesis	17
Objetivo general:	17
Objetivos particulares:	17

Metodología experimental	18
Materiales y métodos	19
Extracto Etanólico de Propóleo	19
Características organolépticas del extracto blando de propóleo	19
Prueba cualitativa de flavonoides	20
Prueba cualitativa de fenoles	20
Cuantificación de compuestos fenólicos totales	20
Método de Folin-Ciocalteu.	20
Cuantificación de flavonoides	21
Línea celular y virus	21
Efecto citopático e identificación del VDC por inmunofluorescencia	21
Ensayo de citotoxicidad	22
Evaluación de la actividad antiviral	22
Análisis estadístico	23
Resultados	23
Características organolépticas del extracto etanólico de propóleo	23
Prueba cualitativa de fenoles y flavonoides	24
Cuantificación de fenoles y flavonoides	25
Efecto citopático del propóleo	25
Identificación del VDC	26
Ensayo de citotoxicidad del EEP	27
Evaluación antiviral del EEP	28
Discusión	29
Conclusiones	31
Prospectivas	31
Trabajos citados	32

Abreviaturas

CC₅₀. Concentración Citotóxica media.

CD150/ SLAMF1. Molécula de activación linfocítica de señalización 1

DAPI. 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMEM. Medio Eagle Modificado de Dulbecco.

DMSO. Dimetilsulfóxido.

EEP. Extracto Etanólico de Propóleo.

F. Proteína de fusión

H. Hemaglutinina viral

hpi. Horas post infección.

L. Proteína grande

m.s.n.m. Metros sobre nivel del mar

M. Proteína de matriz

µL. Microlitro

mL. Mililitro

mm. Milímetro

MTT. Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.

N. Nucleoproteína

P. fosfoproteína

RNA. Ácido ribonucleico.

RNA_m. Ácido ribonucleico mensajero.

VDC. Virus de *Distemper Canino*.

Índice de figuras

Figura 1. Geopropóleos en greña.

Figura 2. Propóleos de *Apis mellifera*.

Figura 3. Agrupación jerárquica de las abejas.

Figura 4. *Plebeia frontalis*.

Figura 5. Estructura básica de los fenoles.

Figura 6. Morfología del virón del virus de *Distemper canino*.

Figura 7. Esquemización del virus de *Distemper canino*.

Figura 8. Reducción enzimática de la molécula de MTT a formazán.

Figura 9. Extracto Blando del propóleo.

Figura 10. Prueba cualitativa de fenoles y flavonoides.

Figura 11. Monocapas de células vero.

Figura 12. Determinación del virus de *Distemper canino* por inmunofluorescencia.

Índice de gráficas

Grafica 1. Curva de citotoxicidad del extracto etanólico de propóleo.

Grafica 2. Evaluación antiviral del EEP.

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica del virus de *Distemper canino*.

Tabla 2. Diluciones seriadas de propóleo.

Tabla 3. Tratamiento de evaluación antiviral.

Tabla 4. Propiedades organolépticas del Extracto blando de propóleo.

Tabla 5. Contenido de fenoles y flavonoides en el extracto de propóleo.

Glosario

Antiviral: sustancia virostática utilizada en el tratamiento de infecciones virales. Los antivirales actúan bloqueando un paso específico en el ciclo replicativo.

Citopático: virus que produce un daño celular visible como efecto del proceso de replicación en células infectadas.

Efecto citopático: daño celular producido por una infección viral. Efectos de la infección viral que son detectados en microscopia de luz o bajo visualización directa.

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

Línea celular: células que tienen origen común (órgano o tejido) y unas características de diferenciación que les permite conformar una herramienta de replicación de virus.

Lítico: virus que durante el ciclo replicativo causa la ruptura de la membrana plasmática.

Monocapa: capa delgada de células que crecen y se adhieren a una superficie sólida de un envase específico para cultivo de tejidos.

Polaridad o sentido: organización de la secuencia de nucleótidos en una cadena de material genómico. Polaridad positiva (+) se refiere a las moléculas que contienen la misma secuencia del ARNm. Polaridad negativa (-) se refiere a las moléculas que contienen la secuencia complementaria a las positivas.

Sincitio: masa de citoplasma con una única envoltura que contiene varios núcleos separados y es el resultante de la fusión de células individuales.

Virión: partícula viral completa y con capacidad infectante.

Resumen

En el presente trabajo se evaluó la actividad antiviral del propóleo producido por la abeja *Plebeia spp.* (abeja nativa sin aguijón), este propóleo provino del Estado de Veracruz. La evaluación se realizó sobre el Virus de *Distemper canino* en un modelo *in vitro* utilizando cultivos de la línea celular VERO (células renales de mono verde africano). Inicialmente, se determinaron las propiedades organolépticas (color, olor, sabor y consistencia) del extracto de propóleo. Después, se realizó la evaluación cualitativa y cuantitativa del contenido de compuestos fenólicos y flavonoides, ya que dichos componentes son los responsables de la actividad biológica del propóleo. El virus de *Distemper canino* fue identificado por inmunofluorescencia directa utilizando un anticuerpo monoclonal, también se observaron y documentaron los cambios morfológicos inducidos en las células por la presencia de este virus a las 72 horas post-infección. Posteriormente se determinó la concentración citotóxica media (CC₅₀) y la concentración experimental, dichas concentraciones fueron determinadas por medio del método de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), obteniendo una concentración citotóxica media de 0.5 mg/mL y una concentración experimental de 0.3 mg/mL de propóleo. Para evaluar el efecto antiviral del propóleo se utilizaron dos tratamientos: A) Extracto Etanólico de propóleo aplicado una hora antes de la infección viral y B) Extracto Etanólico de propóleo aplicado simultáneamente a la infección. Los resultados obtenidos en este estudio permiten señalar que el extracto etanólico de propóleo de *Plebeia spp.* presenta un efecto antiviral estadísticamente significativo en ambos tratamientos frente al virus de *Distemper canino*.

Introducción

Propóleo

El propóleo es un término usado para denominar el material resinoso y balsámico colectado y procesado por las abejas, que colectan de diferentes resinas de la vegetación circundante como ocurre con la especie *Apis mellifera* (figura 2); pero existen otras abejas llamadas nativas sin aguijón, que mezclan las resinas con ceras, arcillas (barro), tierra, excremento de animales, polen, entre otros y que es llamado geopropóleo (figura 1), por lo que la composición química es variable, se han identificado bálsamos vegetales, ceras, aceites esenciales, vitaminas, entre otros (Arnold, Vásquez, Zepeda, & Aldasoro, 2018). Dentro de sus componentes los de mayor importancia, por su actividad biológica, son los flavonoides, ácidos aromáticos y sus ésteres (ácido caféico, cinámico y otros), y aldehídos aromáticos (Petit, 2004).



Figura 1. Geopropóleos en greña. Fotos: M. en C. Margarita Medina Camacho

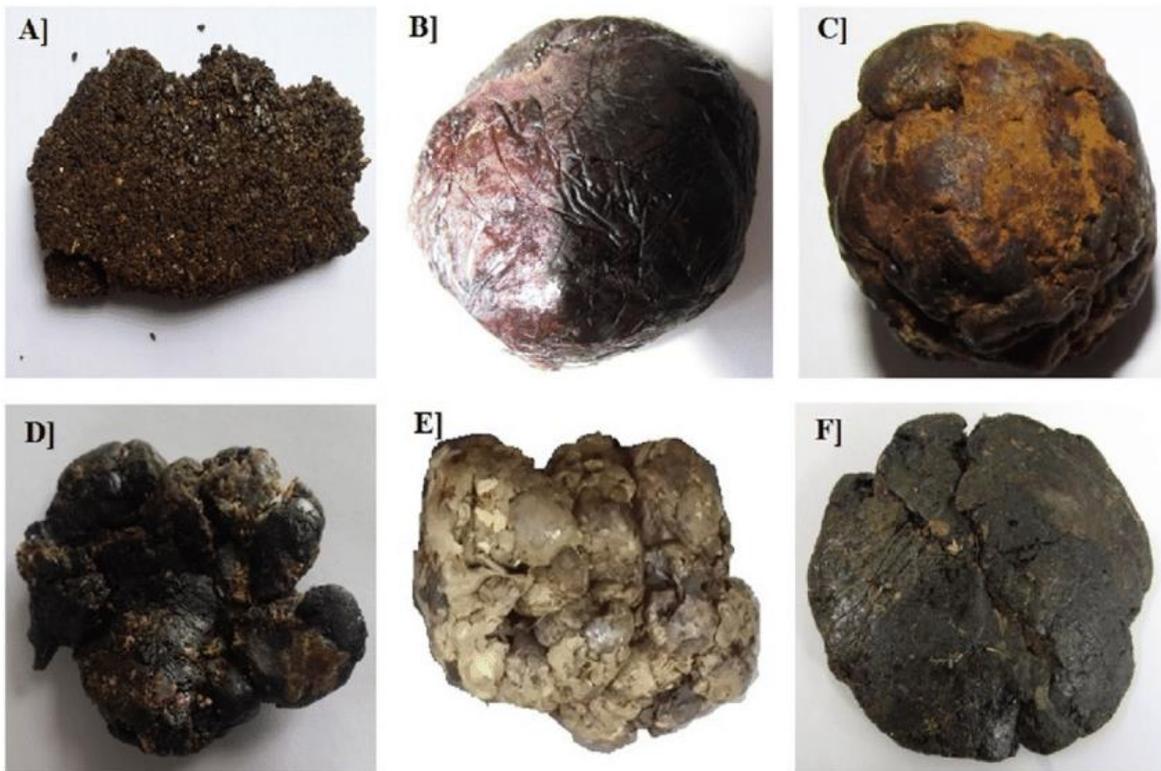


Figura 2. Propóleos de *A. mellifera* de diferentes colores que se encuentran en la India: (A) marrón, (B) rojo, (C) rojo-marrón, (D) marrón oscuro, (E) verde y (F) verde-marrón. (Kasote, 2017)

Composición química del propóleo

Las investigaciones realizadas en las últimas décadas, orientadas a determinar la composición química del propóleo a nivel mundial, han permitido establecer que los flavonoides no son los marcadores químicos principales, pues existen otros componentes novedosos como los triterpenos. El primer identificado fue el triterpeno acíclico, escualeno, precursor de los triterpenos tetracíclicos y pentacíclicos. (Bracho Pérez , Rodríguez Best, & Llanes, 2009)

La presencia de triterpenos pentacíclicos en propóleos de países tropicales constituye una característica importante de la composición química vinculada a su actividad antiinflamatoria, anticancerígena y antiviral. Por tal razón algunas investigaciones se han dirigido a estudiar la capacidad antiviral de ciertas estructuras de triterpenos pentacíclicos como el ácido betulínico, ácido morónico, ácido betulónico y meliferonas que presentan una importante acción antiviral contra el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (Ito J, 2001).

Abejas nativas sin aguijón (*Meliponinos* o *Meliponini*)

Es un grupo de abejas sin aguijón o nativas porque nidifican en gran variedad de sustratos. Se han reportado un aproximado de 400 especies en el mundo (Nates, 2005) y, en México, se reportan 46 especies distribuidas en Oaxaca, Chiapas, Veracruz y Quintana Roo (Arnold, Vásquez, Zepeda, & Aldasoro, 2018).

La crianza de estas abejas tiene y ha tenido una presencia importante; desde tiempos prehispánicos se pueden encontrar vestigios de meliponicultura en casi todo el continente, desde México y Centroamérica, hasta Brasil y Paraguay, en Sudamérica (Arnold, Vásquez, Zepeda, & Aldasoro, 2018).

A pesar del conocimiento presente sobre las propiedades medicinales de los productos de la colmena de las abejas nativas, son pocos los meliponicultores que aprovechan su utilidad, lo que convierte principalmente al propóleo en un área potencial de desarrollo. Entre los testimonios colectados de sus funciones biológicas están, principalmente; la cicatrización y, su actividad como antimicrobiano y antifúngico; así como otros usos no medicinales como los de protector de madera, repelente de plagas en hortalizas, entre otras (Arnold, Vásquez, Zepeda, & Aldasoro, 2018).

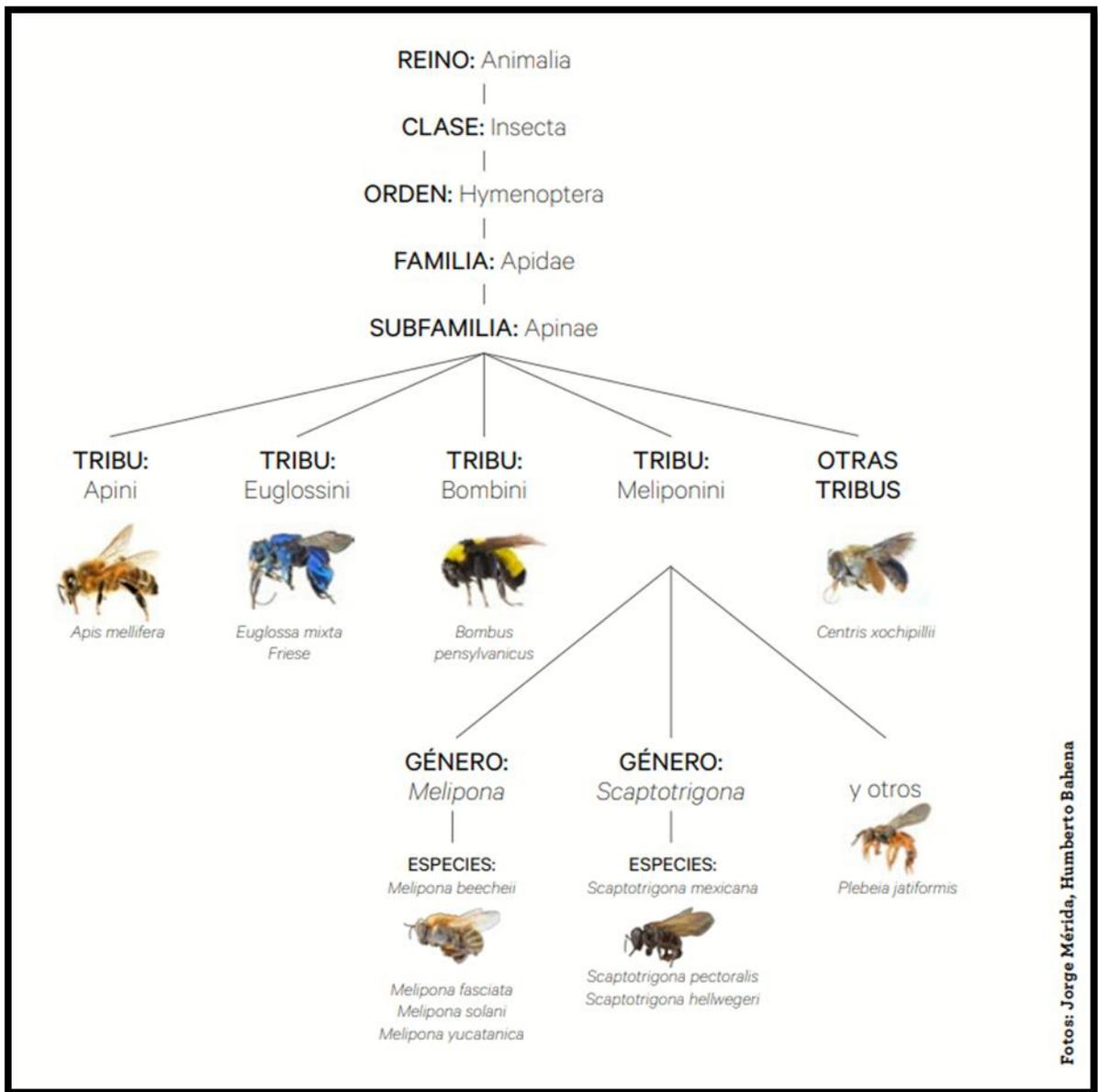


Figura 3. Agrupación jerárquica de las abejas. (Arnold, Catálogo de especies de abejas sin aguijón de Oaxaca, México, 2019)

Plebeia

Las abejas plebeias se encuentran entre las más pequeñas en el grupo de abejas nativas sin aguijón (después de las trigonas). En general poseen líneas amarillas que flanquean la espalda, lo cual es característico de estas especies. Las abejas *Plebeia frontalis* poseen un tamaño entre 3.5-4.4 mm, son de color negro con dibujos amarillos en el tórax (espalda) y cara, tiene rodillas amarillas en los miembros posteriores. Anidan en huecos de árboles, las entradas tienen agregación de mezcla de cera, lodo y resinas, formando una entrada ovalada, redonda o de forma de arco (figura 4) (Arnold, Catálogo de especies de abejas sin aguijón de Oaxaca, México, 2019).

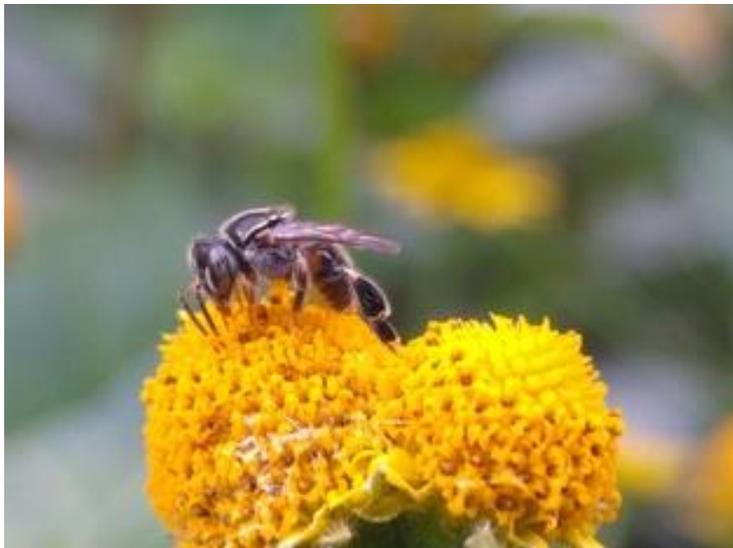


Figura 4. *Plebeia frontalis*. Foto: Carlos G Velazco-Maias

Compuestos fenólicos y flavonoides

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios vegetales ampliamente distribuidos entre las especies vegetales y son objeto de gran interés científico por sus propiedades farmacológicas y valor terapéutico. El nombre de esta clase de compuestos se deriva de “Feno” una antigua designación del benceno. En los fenoles se encuentran uno o varios grupos -OH unidos directamente al núcleo aromático (figura 5) (Beyer & Walter, 1987).

Los fenoles se oxidan formando quinonas (ciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona), cuyas propiedades redox son cruciales en el funcionamiento celular, donde los compuestos llamados ubiquinonas (coenzimas Q) actúan como agentes oxidantes

bioquímicos para mediar el proceso de transferencia de electrones involucrado en la producción de energía. (McMurry, 2012)

Los flavonoides son sustancias de naturaleza fenólica y se caracterizan por poseer dos anillos aromáticos bencénicos unidos por un puente de tres átomos de carbono, con estructura general C6- C3- C6, los cuales pueden formar o no un tercer anillo (figura 5).

Son importantes para el desarrollo normal de las plantas; estos se encuentran localizados en la membrana del tilacoide de los cloroplastos, son utilizados en la vía de expresión de dos enzimas multigénicas: la fenilalanina amonio liasa y la chalcona sintasa y constituyen un grupo de sustancias colorantes importantes en las plantas. (Cartaya & Reynaldo, 2001)

Las funciones de los flavonoides en las plantas se pueden resumir en tres grupos: defensa, señal química y efecto sobre enzimas. Los flavonoides son fácilmente oxidados, este proceso está acompañado por la apertura del anillo α pironas.

La capacidad de los flavonoides de transportar electrones puede explicar su interferencia con la acción de las oxidorreductasas, por ejemplo, la aldosa reductasa y la prolina hidroxilasa.

Los flavonoides son capaces de suprimir la formación de radicales libres por enlace con iones de metales pesados los cuales catalizan muchos procesos conllevando a la aparición de radicales libres. (Hertong & Van Poppel, 1997)

Se ha demostrado la actividad antiviral de flavonoides como quercetina contra *Adenovirus 3* (AdV-3), virus del herpes simple (HSV) y el virus de influenza (Choi, 2009) (Thapa, 2011), morina contra herpesvirus equino tipo 1 (EHV-1) (Gravina, 2011). Además se conocen los efectos antivirales de los ácidos fenólicos contra el dengue (DENV), EHV-1 y el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Gravina, 2011) (Ichimura, 1999) (Rees, 2008).

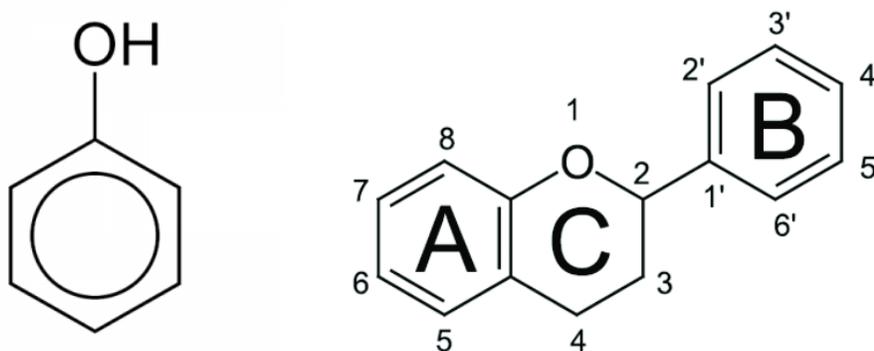


Figura 5. Estructura básica de los fenoles (izquierda), estructura básica de los flavonoides (derecha). (Cartaya & Reynaldo, 2001)

Virus de Distemper Canino (VDC)

El *Distemper canino*, también conocido como moquillo o enfermedad de Carre, es una enfermedad altamente contagiosa que afecta principalmente a animales jóvenes (S., 2001). Es producida por un virus RNA, del grupo de *Paramixovirus* (tabla 1) y mide de 115-160 nanómetros.

Tabla 1. Clasificación taxonómica del Virus de *Distemper Canino*

Familia	<i>Paramixovirus</i>
Subfamilia	<i>Orhoparamyxovirinae</i>
Genero	<i>Morbillivirus</i>
Virus	<i>Distemper Canino</i>

El virión posee una proteína de matriz (M), proteína de fusión (F), hemaglutinina (H), fosfoproteína (P), nucleoproteína (N), polimerasa (L) (figura 6).

El virus se va a localizar, en el punto álgido de la enfermedad, en el fluido oculonasal, en la sangre (con el primer aumento de temperatura); en el contenido de las vesículas y pústulas moquillosas, en las vías respiratorias y en el bazo que es muy infectante durante el periodo inicial (Figuroa, Varga, & Orlando, 1984).

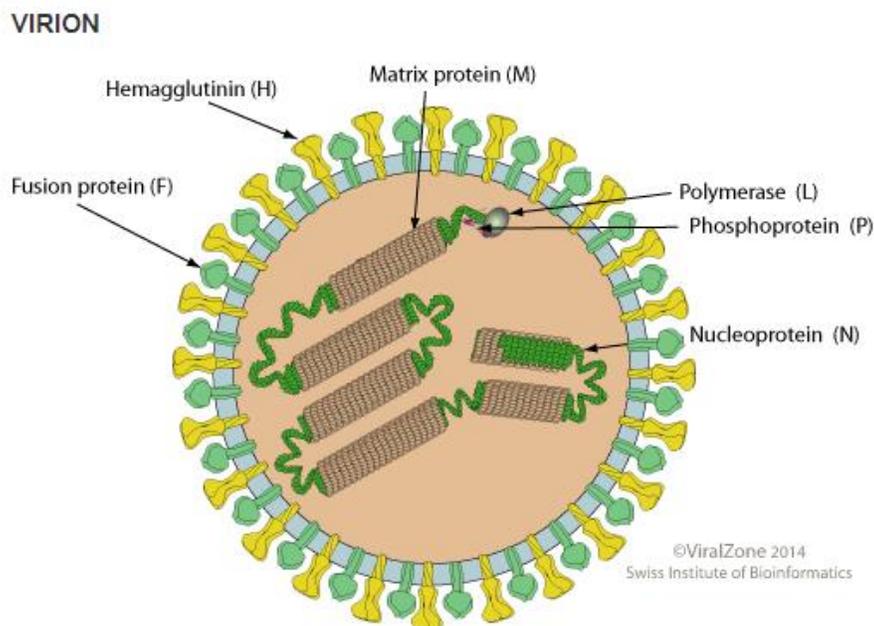


Figura 6. Morfología del virión del Virus de Distemper Canino. Estructura de la cápside, Proteína de matriz (M), Proteína de fusión (F), Hemaglutinina (H), Fosfoproteína (P), Nucleoproteína (N), Polimerasa (L). Imagen tomada de ViralZone <https://viralzone.expasy.org/>

Epidemiología

La enfermedad afecta a varias especies en el mundo animal. Se ha certificado la presencia de Distemper en pinnípedos, mustélidos como el hurón, cánidos silvestres y domésticos, felinos salvajes, úrsidos (osos), prociónidos como el mapache, primates japoneses y algunos cetáceos. (Rentamal, Abalos , & Fredes, 2010)

Patogenia

La incubación es de 7 a 30 días y luego el virus inicia su replicación en los tejidos faríngeos y linfonódulos bronquiales aproximadamente a los 2 a 5 días de la infección. La entrada al paciente se produce por inhalación o ingesta de secreciones y orina contaminada desde el medio ambiente. Posteriormente, el virus puede encontrarse en sangre (viremia), lo cual puede concordar con un estado febril alto de 40 °C a 41 °C. Esta viremia puede presentarse a los seis ó nueve días post infección.

Cuando la infección se presenta en epitelios respiratorios y digestivos, los signos son: tos, rinitis serosa, conjuntivitis serosa o mucopurulenta, diarrea y vómito.

También se observa afección ocular con uveítis anterior o posterior (iridociclitis y corioentinitis, respectivamente), lesiones tegumentarias muy frecuentes como hiperqueratosis plantar y nasal, signos muy altamente asociados a lesiones neurológicas. Se pueden observar ya en menor frecuencia clínica, afecciones del sistema urogenital, cardíaco (miopatía viral por Distemper) y dermatológicas como disqueratosis (presencia de caspa).

El virus afecta exclusivamente al sistema nervioso central, no evidenciándose aún tropismo del virus por estructuras nerviosas del sistema nervioso periférico. La enfermedad neurológica se produce por una afección fundamentalmente citopática. Posteriormente se desarrolla una afección de tipo autoinmune generalmente fatal para el paciente.

El virus ingresa, utilizando plaquetas, macrófagos y linfocitos, fundamentalmente a través de los plexos coroideos, estructuras ependimales o del tejido meníngeo de la médula oblonga y médula espinal. (Rentamal, Abalos , & Fredes, 2010)

Replicación Viral

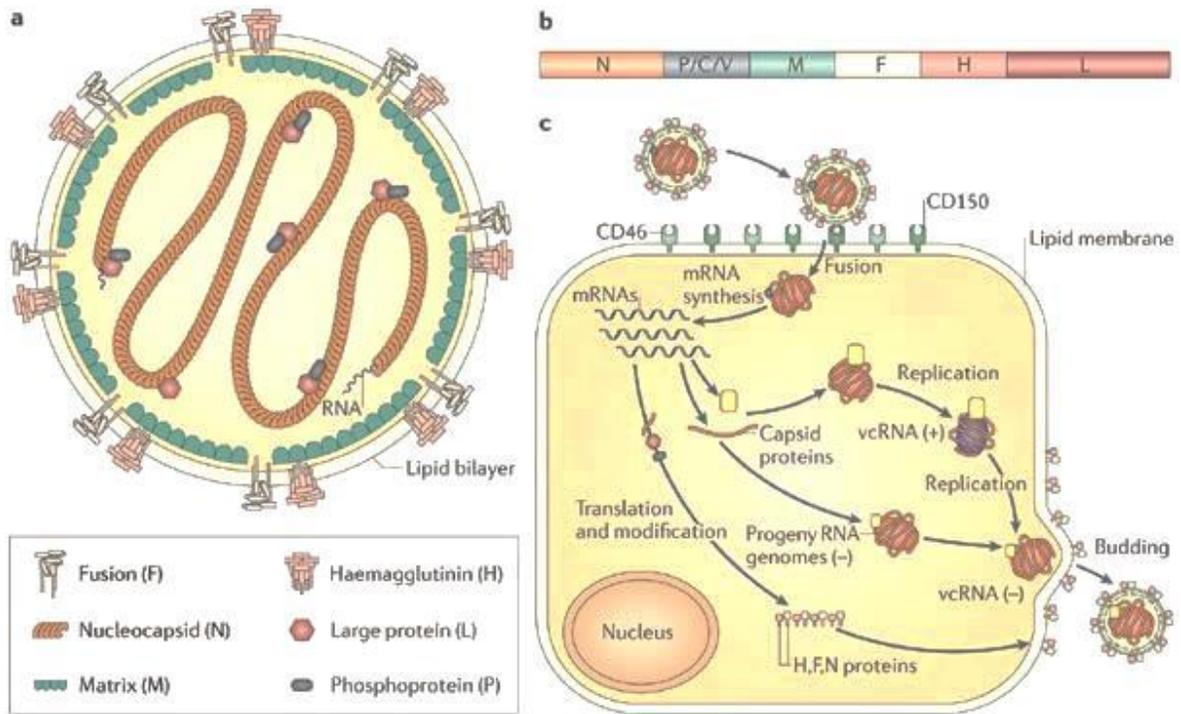
La replicación se lleva a cabo en el citoplasma, por medio de la hemaglutinina viral (H), glicoproteína de la envoltura lipídica que reconoce y se une al receptor CD150/SLAM del linfocito (figura 7c). (Von Messling V, 2001)

Inmediatamente después actúa la proteína de Fusión (F), generando la fusión del VDC con la membrana plasmática del huésped y libera el material genético viral al citoplasma. El material genético viral es liberado en el citoplasma de la célula donde se llevará a cabo la replicación, es en este punto donde se utiliza como hebra molde la Nucleoproteína (N). El RNA tiene sentido negativo y debe de ser transcrito a un

RNAm de sentido positivo complementario antes de que las proteínas puedan ser sintetizadas, las cadenas recién sintetizadas pueden servir a su vez como plantillas para la duplicación del material genético, para la transcripción. (Collier L, 1998)

La proteína Grande (L) sirve como co-factor a la N para ayudar a catalizar la síntesis del genoma, y en compañía de la Fosfoproteína forman el complejo de la polimerasa. La secuencia guía 3' del RNA (figura 7 b), provee el punto de entrada para la RNA polimerasa depende del RNA, dando como resultado un RNA monocistrónico unido al extremo 5' y con el extremo 3' poliadenilado por el complejo de la polimerasa. (Stettler M, 1997) Posteriormente se detiene la polimerasa y se reinicia la síntesis del RNAm de cada gen hasta completar la longitud del genoma. Las subsecuentes síntesis de cadenas de sentido negativo y positivo dependerán de la disponibilidad de la N. Además, la traducción de los transcritos primarios, permite la acumulación de las proteínas virales y funciona como interruptor de la transcripción.

Posteriormente se da el ensamblaje viral, interviniendo la N y la proteína de matriz, proteína asociada a la envoltura, y por su característica hidrofóbica, se encuentra en la superficie interna de la membrana del virión. Se conoce que la expresión restringida o nula de las proteínas M y F puede ocasionar bajos niveles de antígeno viral, lo que la facilita la persistencia del VDC. (Danielle E, 2008).



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Microbiology

Figura 7. Esquematización del virus de Distemper Canino y su ciclo de replicación. (Moss & Griffin, 2006)

Ensayo de citotoxicidad

Existen diferentes métodos para realizar ensayos de citotoxicidad *in vitro*. Primero, el uso de colorantes tales como cristal violeta y sulforrodamina B, segundo, los detectores de liberación de componentes constitutivos celulares, que miden la actividad de enzimas y, finalmente, aquellos que miden la función metabólica de las células usando las sales de tetrazolio.

El método más empleado es la reducción metabólica de MTT, también llamado método de Mossman, basado en la reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Este colorante amarillo pálido, soluble en agua, es reducido tempranamente en células viables, por componentes de la cadena respiratoria, a formazán (figura 8) (cristales azul violeta, insoluble en agua), fundamentalmente por la respiración (deshidrogenasas mitocondriales) y su flujo de electrones, lo cual es intrínsecamente tóxico para las células. (Escobar , Rivera , & Aristizábal , 2010)

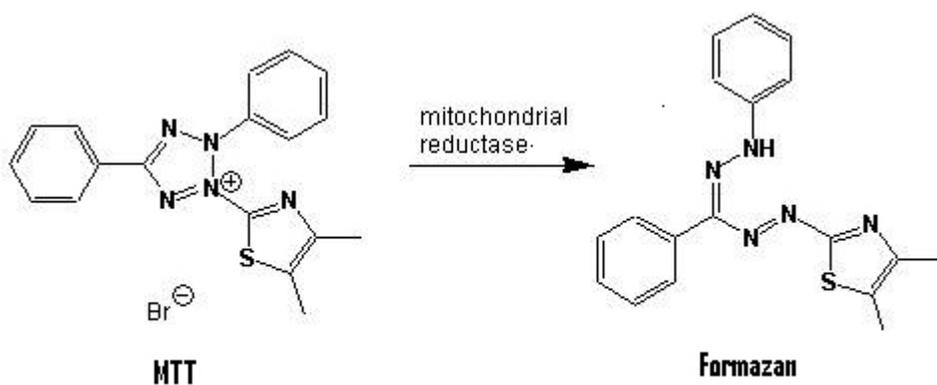


Figura 8. Reducción enzimática de la molécula de MTT a formazán. Facultad de Farmacia Universidad Complutense de Madrid

Justificación

Está bien documentado que el propóleo producido por *Apis mellifera* posee un efecto antiviral consistente, sin embargo, en el caso de los propóleos provenientes de las abejas nativas (abejas sin aguijón) aún no se han realizado los estudios pertinentes, el presente trabajo es pionero en este nuevo campo de estudio que permitirá conocer las propiedades biológicas de los propóleos provenientes de las abejas nativas.

Hipótesis

Se ha señalado que la actividad antiviral del propóleo de *Apis mellifera* se relaciona de manera directa con la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides, de tal forma que es factible esperar que el propóleo de abejas nativas también contenga fenoles y flavonoides, y en consecuencia presentará actividad antiviral ante el virus de *Distemper Canino*.

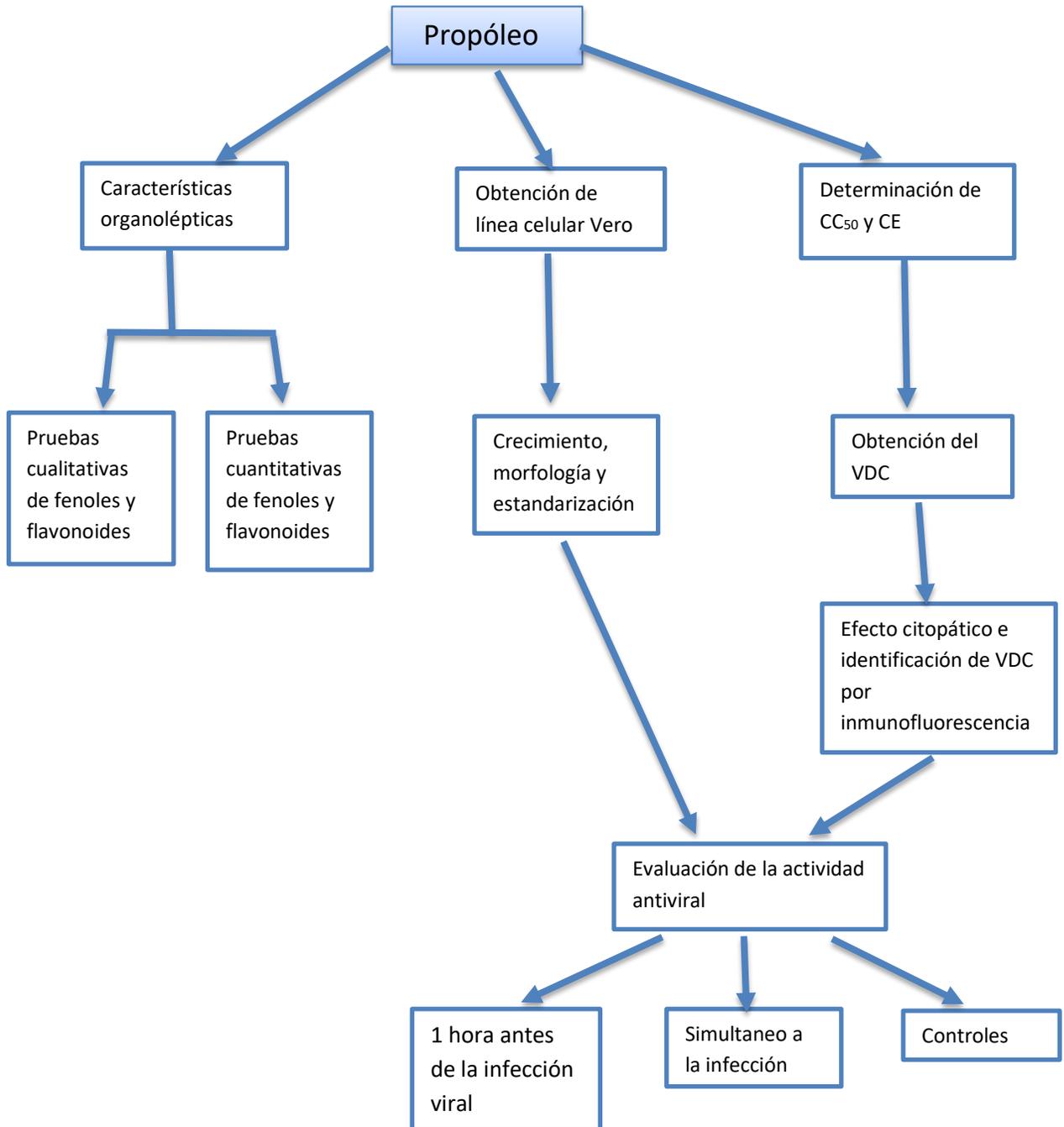
Objetivo general:

Evaluar el efecto antiviral de extracto etanólico de propóleo de abejas nativas sin aguijón frente al virus de *Distemper Canino* por medio del método de Mossman para su posterior uso en la medicina veterinaria.

Objetivos particulares:

- Cuantificar los compuestos fenólicos y flavonoides presentes en un extracto etanólico de propóleo (EEP) elaborado por abeja *Plebeia frontalis* proveniente de Coatepec, Veracruz.
- Identificar el efecto citopático del virus de Distemper canino en células Vero.
- Determinar la concentración citotóxica media (CC₅₀) del EEP.
- Determinar la actividad antiviral del EEP mediante la determinación de la viabilidad celular por método de Mossman (MTT) evaluando dos tratamientos, antes y simultánea a la infección viral.
- Realizar el análisis estadístico para la interpretación de resultados.

Metodología experimental



Materiales y métodos

Extracto Etanólico de Propóleo

El propóleo en greña fue obtenido de un meliponario ubicado en Coatepec Veracruz mediante la colaboración con INANA, A.C y la muestra de extracto etanólico de propóleo utilizada para esta investigación fue proporcionada por el Laboratorio de Servicios de Análisis de Propóleo (LASAP) a cargo del Dr. Tonatiuh A. Cruz Sánchez, posterior a la realización de la evaluación de las características organolépticas y cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides como lo establece la NOM-003-SAG/GAN-2017.

El meliponario se localiza en la zona montañosa central del Estado, en las coordenadas 19° 27' latitud norte y 96° 58' longitud oeste, a una altura de 1200 m s.n.m. Su clima es templado-húmedo-regular con una temperatura promedio de 19.2 °C. Su suelo es de tipo andosol que se caracteriza porque se ha formado con cenizas volcánicas, es muy susceptible a la erosión. En mediano porcentaje es utilizado para la agricultura. El ecosistema en el municipio es el de bosque mesófilo de montaña con especies como el alamillo, palo de baqueta, palo barranco, álamo, cedro y ocozote. (H. Ayuntamiento de Coatepec., 2020)

Características organolépticas del extracto blando de propóleo

Las características organolépticas del extracto blando de propóleo se determinaron tomando una porción de la muestra y analizándola según la **NOM-003-SAG/GAN-2017**.

- **Determinación del color:** En un ambiente con buena iluminación se procedió a colocar la muestra sobre una superficie blanca y se comparó con una escala de colores. Posteriormente se utilizó un microscopio estereoscópico para visualizar definitivamente los colores presentes en la muestra.
- **Determinación del aroma:** Se retiró una porción de la muestra a fin de que el envase no interfiera en la percepción olfativa.
- **Determinación del sabor:** Se colocó una porción de la muestra en la parte media de la lengua y se analizó mediante la comparación de sus atributos de sabor con los que mejor lo distinguieron.
- **Consistencia a temperatura ambiente:** Se procedió a retirar una porción de la muestra y colocarla en un vidrio de reloj, hasta que alcanzó la temperatura ambiente. Posteriormente se determinó la consistencia tocándola con la yema de los dedos y comparándola con el atributo que mejor la describía.

Prueba cualitativa de flavonoides

Esta prueba fue realizada siguiendo la metodología de la **NOM-003-SAG/GAN-2017**.

La detección de flavonoides se realizó utilizando 200 mg de la muestra en 1 mL de etanol al 70 %, a continuación se agregó una gota de NaOH al 20%, posteriormente se observó el cambio de coloración.

Prueba cualitativa de fenoles

La detección de fenoles se realizó según la **NOM-003- SAG/GAN-2017**, por lo que se colocaron 200 mg de la muestra y se le añadió 1 mL de etanol al 70%, posteriormente se mezcló y se le agregó una gota de la solución de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ al 1%, posteriormente se observó el desarrollo del color.

Cuantificación de compuestos fenólicos totales

Método de Folin-Ciocalteu.

La concentración de fenoles totales (CFT) se midió por espectrofotometría de absorción UV-Vis con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción, para ello el agente oxidante que se utilizó es el reactivo de Folin-Ciocalteu (FC), $3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 13\text{WO}_3 \cdot 5\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (mezcla de ácido fosfotúngstico/fosfomolibdico hexavalente).

Se realizó una curva de calibración a partir de una solución estándar de ácido gálico de 0.2 mg/mL, la cual fue diluida para obtener las siguientes concentraciones seriadas: (0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.2 mg/mL).

La muestra de propóleo a una concentración de 0.05mg/mL.

Al tener los sistemas preparados se tomó 1 mL de cada concentración y se añadieron 6 mL de agua destilada, a continuación se agregaron 500 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu, se dejó reaccionar por 5 minutos.

Eventualmente se adicionaron 1.5 mL de la solución de Na_2CO_3 y se aforó con agua destilada hasta un volumen de 10 mL, con lo que se observó un cambio de color a azul.

Los sistemas se dejaron en reposo 2 h a temperatura ambiente, para que la reacción se desarrollará, finalmente se determinó la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro de absorción UV-VIS para elaborar la curva patrón de ácido gálico. Los resultados de las muestras se expresaron como porcentaje (%). (Diario Oficial de la Federación, 2017)

Cuantificación de flavonoides

El principio básico del método colorimétrico de cloruro de aluminio, es la formación de complejos estables de ácidos con el grupo cetona en C-4 o bien el grupo hidroxilo en C-3 o C-5 de flavonas y flavonoles. Además, también forma complejos lábiles ácidos con los grupos hidroxilo en el anillo A o B de los flavonoides.

Se preparó una solución estándar de quercetina de 1 mg/mL y se prepararon diluciones seriadas para tener las concentraciones de 1 a 90 µg/mL. La muestra se preparó a una concentración de 0.05 mg/mL.

Al tener todos los sistemas anteriores preparados, se procedió de la siguiente manera: se adicionó a cada tubo, 3 mL de la solución de $AlCl_3$, se dejó reposar por 10 min para que se llevara a cabo la reacción y se determinó la absorbancia a 415 nm por espectrofotometría de absorción UV-VIS. Se realizó la gráfica de concentración contra absorbancia, para obtener la curva patrón de quercetina y el contenido total de flavonoides se expresó como porcentaje (%). (Diario Oficial de la Federación, 2017)

Línea celular y virus

Se utilizaron monocapas de células Vero (Riñón de mono verde africano) mantenidas en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con suero fetal bovino al 7% y antibiótico (penicilina-estreptomina 500µL/ 100mL) a 37°C bajo una atmosfera humidificada de 95% de aire y 5% de CO_2 .

Se utilizó la cepa *Buzzel* del virus de *Distemper canino* con título viral de $10^{12.16}$ ($TCID_{50} = 10^{12.16}$) previamente identificado y conservado a -20°C. (González Búrquez, y otros, 2018)

Efecto citopático e identificación del VDC por inmunofluorescencia

Se cultivaron células VERO en cubreobjetos previamente esterilizados, identificándolos en dos grupos: control negativo (sin infectar) y control positivo, el cual se infectó con 100 µL de stock viral, ambos grupos fueron incubados por 72 horas adicionales.

Posteriormente se retiró el DMEM y se fijaron las células en formalina acuosa al 10% en PBS por 20 min., se realizaron lavados con PBS y se permeabilizaron con tritón-X-100 (0.5 %) por 5 min. A continuación, se realizaron lavados con PBS y se bloqueó con albúmina sérica bovina (1% en PBS) por 20 min, después se lavaron con PBS e incubaron con el anticuerpo Canine Distemper Virus Mab (VMRD, cat. CJ-F-CDV-MAB-1ML), por 12 h a 4°C. Finalmente se realizaron lavados con PBS y, finalmente, con agua bidestilada. Los cubreobjetos se montaron con solución de montaje (UltraCruz Mounting Medium for fluorescence with DAPI, Santa Cruz Biotechnology, cat. sc-24941), se sellaron los bordes y se conservaron en

refrigeración. Finalmente fueron observados en un microscopio de fluorescencia (Carl Seizz, mod. axioscope).

Ensayo de citotoxicidad

Se evaluó por el método colorimétrico de MTT, sembrando placas de 96 pozos con células VERO a una confluencia de 2.5×10^4 células/ pozo las cuales se incubaron 24 horas.

Posteriormente, se preparó un stock de la muestra de propóleo (2 mg/mL) el cual se diluyó en una solución DMEM- Acetona (1 mL DMEM/30 μ L Acetona), después se realizaron soluciones dobles seriadas obteniendo las siguientes concentraciones; 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 mg/mL (tabla 2), se incubaron por 72 horas, y pasado el tiempo de incubación, se agregaron a cada pozo 10 μ L de MMT dejando incubar por 4 h en ausencia de luz, finalizado este tiempo se retiró el medio, y se agregaron 100 μ L de Dimetilsulfóxido (DMSO), se incubaron por otros 15 min para realizar la lectura en un lector de ELISA a una longitud de onda de 595nm.

Tabla 2. Diluciones seriadas de propóleo.

Stock de propóleo	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4
30 μ L de acetona	500 μ L de Stock	500 μ L de solución tubo 1	500 μ L de solución tubo 2	500 μ L de solución tubo 3
970 μ L de DMEM	500 μ L de DMEM	500 μ L de DMEM	500 μ L de DMEM	500 μ L de DMEM
2 mg/mL propóleo	1 mg/mL propóleo	0.5 mg/mL propóleo	0.25 mg/ mL propóleo	0.125 mg/mL Propóleo

Evaluación de la actividad antiviral

La actividad antiviral del extracto se evaluó *in vitro* empleando monocapas de células VERO (2.5×10^4 células/pozo) en placas estériles de 96 pozos, aplicando en dos diferentes tiempos (tabla3):

- **Tratamiento 1 una hora antes de la infección viral:**

A cada pozo se le agregaran 170 μ L de propóleo (0.3 mg EEP/ mL DMEM 7 %) y transcurrido una hora se adicionan 30 μ L de suspensión viral.

- **Tratamiento 2 simultáneo a la infección viral:**

A cada pozo se le adicionaron simultáneamente 170 μ L de propóleo (0.3 mg EEP/ mL DMEM 7 %) y 30 μ L de suspensión viral.

- **Control negativo** células VERO.

- **Control positivo**, células VERO infectadas con 30 μL de virus *Distemper canino*.
- **Control de propóleo** (0.3 mg EEP/ mL DMEM).
- **Control de peróxido de hidrógeno** (20 μL H_2O_2 / mL DMEM).

En todos los tratamientos los cultivos se evaluarán a las 72 horas post infección mediante el ensayo colorimétrico de MTT.

Tabla 3. Tratamiento de evaluación antiviral

Control (-)	Control (+)	Antes	Simultáneo	Propóleo	H_2O_2
200 μL DMEM	170 μL DMEM	170 μL Propóleo	170 μL Propóleo	200 μL Propóleo	200 μL
	30 μL Virus	30 μL Virus	30 μL Virus		

Análisis estadístico

Para evaluar el efecto antiviral del propóleo se analizaron las absorbancias obtenidas en cada uno de los tratamientos y controles, estos datos fueron procesados mediante el programa Minitab versión 18 en español, utilizando la prueba de ANOVA con 0.05 de significancia.

Resultados

Características organolépticas del extracto etanólico de propóleo

Las características organolépticas del extracto etanólico de propóleo estudiado se determinaron mediante pruebas sensoriales. El EEP de color marrón con tonalidades verdes, de olor balsámico y sabor amargo de consistencia a temperatura ambiente maleable (figura 9).

Tabla 4. Propiedades organolépticas del Extracto Blando de Propóleo.

Parámetros	Características
Color	Ámbar
Aroma	Balsámico
Sabor	Amargo
Consistencia	Maleable



Figura 9. Extracto blando de propóleo

Prueba cualitativa de fenoles y flavonoides

Con el propósito de conocer los componentes presentes en la muestra se realizó la determinación cualitativa de fenoles y flavonoides presentes en EEP, en la detección de flavonoides se utiliza hidróxido de sodio (NaOH) al 20%, la presencia de flavonoides se evidencia por el desarrollo de una coloración amarilla tenue. La detección de fenoles se realizó utilizando una solución de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ al 1%, dicha reacción revela la presencia de fenoles al generar una coloración amarilla intensa como se muestra en la figura 10.

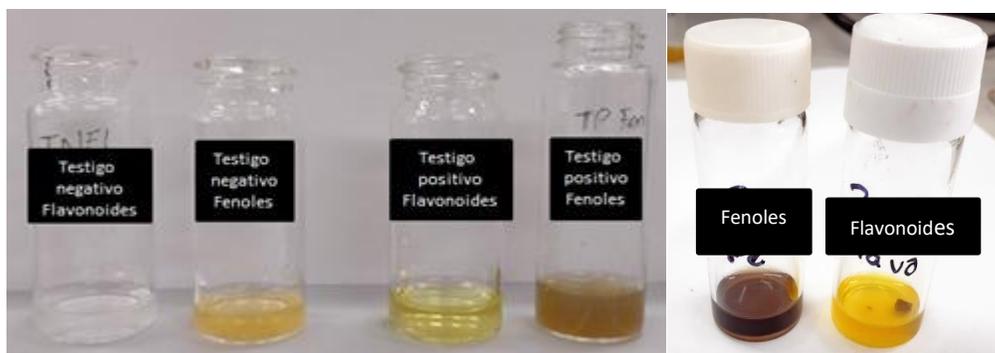


Figura 10. Controles y prueba cualitativa de fenoles y flavonoides.

Cuantificación de fenoles y flavonoides

Por medio del método de Folin-Ciocalteu se determinó la concentración de fenoles totales (CFT) y se obtuvo un 5.34%. Asimismo, se realizó la determinación de flavonoides por el método colorimétrico de cloruro de aluminio, con el que se determinó una concentración de 3.5% (tabla 5).

Tabla 5. Contenido de fenoles y flavonoides en el extracto de propóleo.

Fenoles totales (%)	Flavonoides (%)
5.34	3.5

Efecto citopático del propóleo

Con la finalidad de evaluar el efecto citopático se infectó con 100 μ L de la solución stock del VDC al cultivo de células Vero con confluencia del 80 %, se dejó adsorber por una hora y, posteriormente, se retiró y se agregó medio nuevo. Las células se evaluaron a las 72 h post-infección (hpi); en el cultivo no infectado las células mostraron una morfología y crecimiento normal, observándose una monocapa con una confluencia mayor al 80 % (figura 11A). Por su parte, en el cultivo infectado se observaron restos celulares, pérdida de adhesión y una menor densidad (figura 11B), lo cual corresponde al efecto citopático del virus.

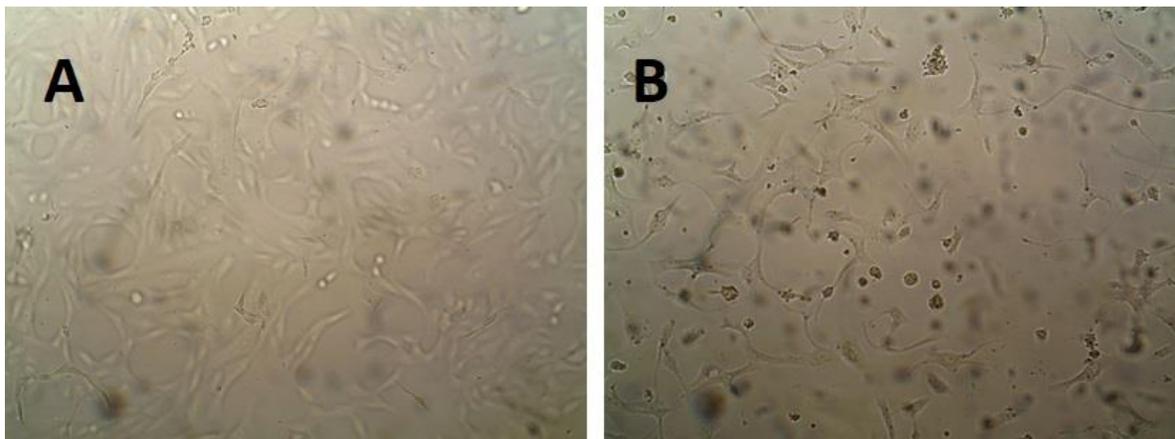


Figura 11. Monocapas de células Vero. A. Cultivo no infectado. **B.** Cultivo infectado con el virus de distemper canino (100 μ L de la solución stock viral) 72 hpi. Microscopio invertido, 200x.

Identificación del VDC

Con el fin de determinar de manera específica la presencia del virus de distemper canino en los cultivos infectados se realizó una inmunofluorescencia directa. La observación al microscopio de fluorescencia permitió corroborar la presencia de áreas con emisión verde producto del marcaje de los anticuerpos anti-VDC con fluoresceína (FITC), mientras que en el cultivo no infectado no se encontró dicha emisión (figura 12.A y C). Con el fin de evidenciar la presencia de los núcleos de ambos cultivos, éstos fueron marcados con DAPI (color azul) (figura 12.B y D). Al comparar los cultivos se observan núcleos pleomórficos en las células infectadas, debido al daño celular causado por el VDC.

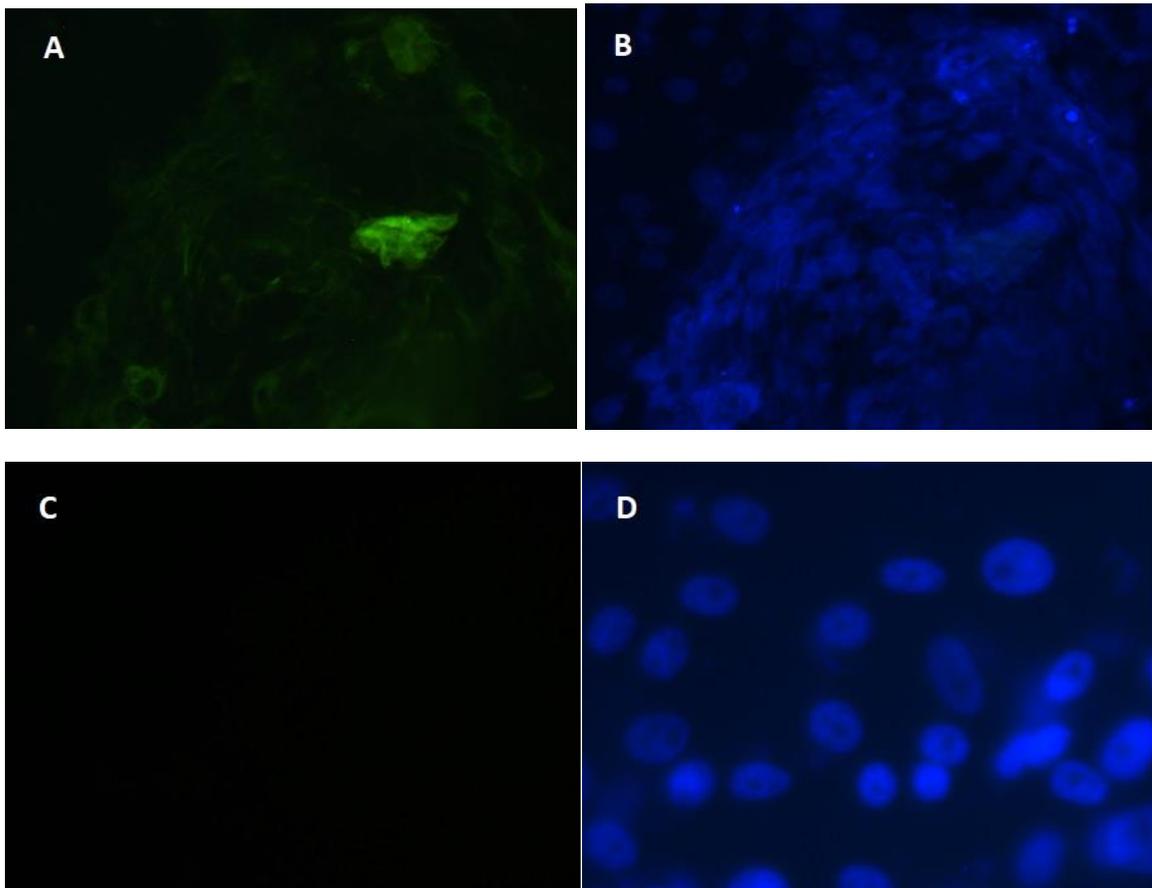


Figura 12. Detección del virus de *Distemper canino* por inmunofluorescencia. **A.** Células vero infectadas y expuestas al anticuerpo anti-VDC. Se puede apreciar la señal fluorescente positiva. **B.** Mismas células expuestas a luz UV para evidenciar la presencia de células mediante la tinción del núcleo con DAPI. **C.** Células Vero no infectadas. Nótese la ausencia de señal fluorescente. **D.** Mismas células teñidas con DAPI para comprobar la presencia de células. Microscopio de fluorescencia, 400x.

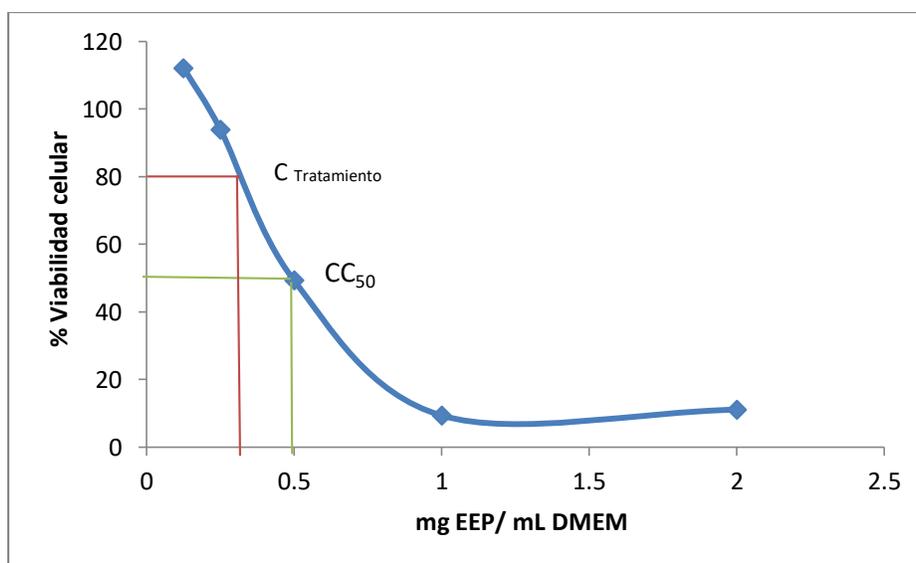
Ensayo de citotoxicidad del EEP

Los ensayos de citotoxicidad son capaces de detectar los efectos adversos de interferencia con estructuras celulares tales como membrana, citoesqueleto, y las propiedades esenciales para la supervivencia celular como metabolismo y proliferación. Por lo cual es importante determinar la citotoxicidad del propóleo en las células Vero, para ello se empleó el método de MTT, posteriormente se puede determinar la concentración citotóxica media (CC_{50}) y la concentración a utilizar como tratamiento experimental (tabla 6).

Tabla 6. Concentración citotóxica media y concentración a emplear del EEP.

Propóleo	CC_{50} (mg/mL)	CTratamiento (mg/mL)
EEP de Veracruz	0.5 mg/mL	0.3 mg/mL

La concentración citotóxica media (CC_{50}) fue de 0.5 mg/mL. El ensayo de citotoxicidad demuestra que el EEP es un compuesto citotóxico ya que al utilizar concentraciones superiores a 0.5 mg/mL induce cambios en la morfología celular y muerte celular.



Grafica 1. Curva de citotoxicidad del extracto etanólico de propóleo

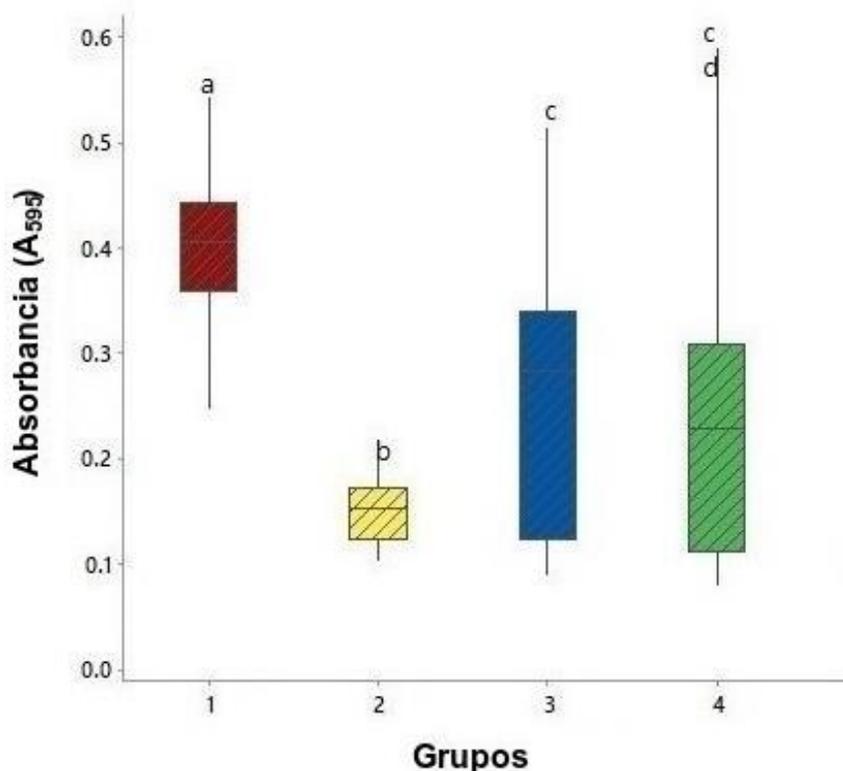
Extracto etanólico de propóleo a 72 h de exposición en células VERO. Concentraciones de propóleo (mg/mL) (eje x) en relación con el porcentaje de viabilidad celular (eje Y).

Evaluación antiviral del EEP

Para determinar el efecto antiviral de un compuesto es necesario evaluar la capacidad de éste para reducir o anular el efecto citopático del virus. Por lo cual la actividad antiviral del EEP se evaluó como la capacidad de reducir la muerte celular en el cultivo infectado después de colocar los diferentes tratamientos por medio del ensayo de MTT.

Los tratamientos utilizados en este trabajo; una hora antes de la infección y simultáneo a la infección, se realizaron en varias ocasiones (n= 15). Los resultados obtenidos se ordenaron y se aplicó el análisis estadístico de ANOVA $p=0.05$. Se obtuvo una media de 0.426 para las células sin infectar y 0.156 para las células infectadas, en contraste con los tratamientos donde se obtuvo 0.288 para el tratamiento administrado una hora antes de la infección y 0.258 para el administrado simultáneamente a la infección.

Estos resultados presentes en la gráfica 3 nos permiten señalar que los tratamientos administrados presentaron un efecto antiviral estadísticamente significativo.



Gráfica 3. Resultados de la evaluación antiviral del EEP. Análisis de la varianza con un factor (ANOVA) de cada tratamiento. a) Control negativo, b) Control positivo,

c) Tratamiento una hora antes de la infección, d) Tratamiento simultáneo a la infección.

Discusión

La composición química de los propóleos es muy variable, así los compuestos específicos y las cantidades de cada uno de ellos están directamente relacionados con la vegetación y clima del lugar, y la preferencia de las abejas al momento de la recolecta, por lo que, el propóleo es diferente por su sitio de origen y temporada del año, asimismo, es importante considerar la especie de abeja involucrada (González Búrquez M. D., 2013).

Otros factores importantes para la presencia de compuestos activos son; método de recolección y manejo post-cosecha. Dado que los componentes biológicamente activos del propóleos son principalmente compuestos polifenólicos, aromáticos y flavonoides, el uso de solventes de mayor polaridad es una buena manera de lograr mejores rendimientos, lo que resulta en una actividad antioxidante superior (Park, 2015).

Varios autores señalan las propiedades del propóleo a nivel terapéutico tales como actividad antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antioxidante, inmunomoduladora, entre otras, señalado que dicha actividad está determinada por la presencia de fenoles y flavonoides, por lo que se ha relacionado a estos compuestos con la actividad biológica del propóleo (Delgado Aceves, Andrade Ortega, & Ramírez Barragán, 2015) (Rodríguez, 2015).

Los compuestos fenólicos dentro de los que están los flavonoides representan un índice de calidad de los propóleos, cuanto mayor sea su contenido, mayor la pureza y calidad del propóleo (Rodríguez, 2015). Por esto es importante determinar el contenido de fenoles y flavonoides, en el propóleo utilizado en este trabajo se realizó la prueba cualitativa de fenoles obteniendo una coloración amarilla la cual indicaría la presencia de fenoles con la capacidad de oxidarse con el NaOH a quinona, tal es el caso de la hidroquinona. De igual forma se realizó la prueba cualitativa de flavonoides obteniendo una color amarilla paja lo cual indica la presencia de dichos compuestos. Con la aplicación de las pruebas cuantitativas se determinó un contenido para fenoles de 5.34% y para flavonoides de 3.5% (tabla 5), en comparación con lo reportado por otros autores para propóleos de *Apis mellifera* que en promedio tienen un contenido de 23.6% para fenoles y de 6.7% para flavonoides (González Búrquez, y otros, 2018) (Martinez Bistrain, 2017), con estos resultados se puede señalar que el propóleo de *Plebeia frontalis* presenta un

contenido menor de fenoles y flavonoides, sin embargo, al comparar su actividad antiviral se puede mencionar que los resultados obtenidos son equivalentes. Por lo que es necesario realizar estudios de cromatografía para identificar los compuestos presentes en esta muestra estudiada.

A pesar de que en la mayoría de cepas del VDC como Ledeerle, Rockborn y Onderstepoort no se reporta el desarrollo de lisis en células Vero, en este trabajo se logró que la cepa Buzzel, después de varios pases, formara sincitios a las 24 h post infección y placas líticas a las 48 h post infección en dicha línea celular. En este trabajo se documenta un efecto citopático evidente a las 72 h post infección (Figura 1b), que evidencia el hecho de que esta cepa termina su infección con lisis celular (Reyes, y otros, 2002). Esto permitió implementar el ensayo colorimétrico de MTT para evaluar el desempeño de los tratamientos aplicados mediante la determinación de la viabilidad celular.

Con el fin de evaluar la actividad antiviral del propóleo, en los ensayos de infección, es decir, durante la interacción entre virus, células y propóleo, se utilizaron dos diferentes momentos para administrar los tratamientos; una hora antes y simultáneamente a la infección, en ambos casos, la evaluación se realizó a las 72 h post infección por el ensayo de MTT. De acuerdo con los resultados encontrados se puede señalar que el propóleo presenta un efecto antiviral estadísticamente significativo, el cual es ligeramente superior cuando se aplica una hora antes de la infección viral, aunque también se muestra una diferencia significativa en los cultivos tratados con propóleo cuando se aplica simultáneamente a la infección en comparación con el control positivo.

Estos resultados concuerdan con lo señalado por varios autores (Nolkemper , Reichling, Heinz Sensch, & Schnitzler, 2010), (Bankova, 2014), (Hochheim, y otros, 2019), (Carvalho, 2013) quienes señalan que la actividad antiviral del propóleo se debe principalmente a la interferencia con las estructuras superficiales del virión (glucoproteínas) y con los receptores celulares durante las primeras etapas de la infección viral, evitando la adsorción, unión y penetración de los virus a las células.

Lo anterior demuestra que cuando se aplica el propóleo dos horas post-infección, se aprecia sólo un ligero efecto antiviral (González Búrquez, y otros, 2018), aunque habrá que corroborar este resultado con el propóleo de *Plebeia frontalis*.

Adicionalmente se ha demostrado que los flavonoides también son capaces de inhibir a la polimerasa viral e interferir con la síntesis del ácido nucleico (Formica, 1995) (Cushine, 2005) (Gallina L., 2011).

Actualmente existen pocos estudios del efecto antiviral de los propóleos, siendo este el primer estudio de un propóleo de meliponinos en el área veterinaria. Los resultados obtenidos permiten señalar que el EEP de abejas nativas mexicanas *Plebeia frontalis* en específico, puede ser una opción importante al implementar un tratamiento antiviral tanto en animales domésticos como en el ser humano. Sin embargo, con el fin de caracterizar mejor este efecto antiviral es necesario realizar estudios adicionales, como podrían ser; determinar los compuestos específicos que intervienen en el efecto antiviral y, sobre todo, seguir evaluando la actividad antiviral en otros virus de importancia en salud animal y humana.

Conclusiones

El extracto de propóleo de *Plebeia frontalis* mostró un evidente efecto antiviral en cultivos de células Vero infectadas con el virus de *Distemper canino in vitro*, reduciendo el efecto citopático sin importar si el propóleo es agregado al cultivo celular una hora antes o simultáneamente a la infección.

Prospectivas

Realizar el análisis de propóleo por medio de técnicas de cromatografía para conocer los componentes presentes en propóleos de meliponinos, para proponer un posible mecanismo de acción.

Evaluar la actividad antiviral del propóleo de meliponinos frente a otros virus de interés clínico.

Desarrollar un modelo experimental (*in vivo*) que permita evaluar clínicamente el efecto antiviral del propóleo.

Trabajos citados

1. Appel, M., Yates, R., Foley, G., Bernstein, J., Santinelli, S., Spelman, L., y otros. (1994). Canine distemper epizootic in lions, tigers, and leopards in North America. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 277-288.
2. Escobar, L., Rivera, A., & Aristizábal, F. (2010). Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad. *VITAE*, 67-74.
3. Freitas dos Santos, H., Ferreira Campos, J., Miranda dos Santos, C., Perrella Balestieri, J. B., Brentan Silva, D., Alexandre Carollo, C., y otros. (2017). Chemical Profile and Antioxidant, Anti-Inflammatory, Antimutagenic and Antimicrobial Activities of Geopropolis from the Stingless Bee *Melipona orbignyi*. *International Journal of Molecular Sciences*, 1-19.
4. Hochheim, S., Guedes, A., Faccin Galhardi, L., Zandrini Rechenchoski, D., Nozawa, C., Linhares, R. E., y otros. (2019). Determination of phenolic profile by HPLC–ESI-MS/MS, antioxidant activity, in vitro cytotoxicity and anti-herpetic activity of propolis from the Brazilian native bee *Melipona quadrifasciata*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 339-350.
5. Joya, M., Gil, M., & Bastidas Pacheco, G. (2017). Actividad fungistática y fungicida de extractos etanólicos de propóleos sobre el crecimiento in vitro de cepas del género *Candida*. *Tecnología en Marcha*, 3-11.
6. Shimizu, T., Takeshita, Y., Takamori, Y., Kai, H., Sawamura, R., Yoshida, H., y otros. (2011). Efficacy of Brazilian Propolis against Herpes Simplex Virus Type 1 Infection in Mice and Their Modes of Antiherpetic Efficacies. *Hindawi Publishing Corporation*, 9.
7. Summers, B., & Appel, M. (1994). Aspects of canine distemper virus and measles virus encephalomyelitis. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 525-534.
8. Amini Sarteshnizi, N., Mobini Dehkordi, M., Khosravi Farsani, S., & Teimori, H. (2015). Activity of ethanolic extract of propolis on AGS cell line. *J HerbMed Pharmacol*, 29-34.
9. Amini-Sarteshnizi N, M.-D. M.-F. (2015). activity of ethanolic extract of propolis on AGS cell line. *J HerbMed Pharmacol*, 29-34.
10. Amoros M, L. E. (1994). Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-but-2-enyl caffeate. *Journal of Natural Products*, 644-647.

11. Amoros M, S. C. (1992). Synergistic effect of flavones and flavonols against Herpes Simplex virus Type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *Journal of Natural Products*, 1732-1740.
12. Amoros M, S. F. (1992). In vitro antiviral activity of propolis. *Apidologie* (23), 231-240.
13. Arnold, N. (2019). *Catálogo de especies de abejas sin aguijón de Oaxaca, México*. México: CONABIO.
14. Arnold, N., Vásquez, M., Zepeda, R., & Aldasoro, M. (2018). *Las abejas sin aguijón y su cultivo en Oaxaca, México con catálogo de especies*. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
15. Bankova, V. G. (2014). Chemical composition of Propolis Extract ACF and activity against herpes simplex virus. *Phytomedicine*, 21(11), 1432-1438.
16. Beyer, H., & Walter, W. (1987). *Manual de química orgánica*. México: Reverte.
17. Bracho Pérez , J. C., Rodríguez Best, C., & Llanes, F. (2009). Triterpenos pentacíclicos en propóleo . *Sociedad Química del Perú* , 439-452.
18. Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001). Reseña bibliográfica, Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 5-14.
19. Carvalho, B. F. (2013). In vitro inhibition of Distemper canine virus by flavonoids and phenolic acids. Implications of structural differences for antiviral design. *Veterinary Science*, 717-724.
20. Challenger, A. (1998). *Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México. Pasado, presente y futuro*. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad .
21. Choi, H. K. (2009). Antiviral activity of quercetin 7 -rhamnoside against porcine epidemic. *Antiviral Research*, 77-80.
22. Collier L, B. A. (1998). Microbiology and Microbial Infections. Paramyxoviruses. *Virology*, 1.
23. Cushine, T. &. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 343-356.

24. Danielle E, M. A. (2008). Region between the Canine Distemper Virus M and F genes modulates virulence by controlling Fusion protein expression. *Journal of Virology*, 10150-10518.
25. Delgado Aceves, M. d., Andrade Ortega, J. Á., & Ramírez Barragán, C. A. (2015). Caracterización fisicoquímica de propóleos colectados en el Bosque La Primavera Zapopan, Jalisco. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 6(28), 74-87.
26. Diario Oficial de la Federación. (2017). *NORMA Oficial Mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017, Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento*. México: Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (Sagarpa).
27. Figueroa, M., Varga, L., & Orlando, A. (1984). *Enfermedades infecciosas de los animales domésticos en Centroamerica*. San José: EUNED.
28. Formica, J. R. (1995). Review of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology*, 1061-1080.
29. Gallina L., P. F. (2011). Inhibition of viral RNA synthesis in canine Distemper virus infection by proanthocyanidin A2. *Antiviral Research* , 447-452.
30. González Búrquez, M. D. (2013). *Evaluación antiviral del propóleo Mexicano en cultivo celular infectado con el virus de Aujeszky*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
31. González Búrquez, M. D., González Díaz, F. R., García Tovar, C. G., Carrillo Miranda, L., Soto Zárate, C. I., Canales Martínez, M. M., y otros. (2018). Comparison between In Vitro Antiviral Effect of Mexican Propolis and Three Commercial Flavonoids against Canine Distemper Virus. *Hindawi*, 9.
32. Gravina, H. T. (2011). In vitro assessment of the antiviral potencial of transcinamic acid, quercetin and morin against equid herpesvirus 1 . *Research in Veterinary Science* , 158-162.
33. Gutiérrez, H. (2011). *Actividad Antimicrobiana and Perfil Químico de Propóleos Mexicanos Sobre Cepas de Pasteurella Multocida Aisladas de Conejos*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
34. H. Ayuntamiento de Coatepec. (06 de Febrero de 2020). *Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones De México. Estado de Veracruz*. Recuperado el 06 de Febrero de 2020, de Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones

De México. Estado de Veracruz:

<http://siglo.inafed.gob.mx/enciclopedia/EMM30veracruz/municipios/30038a.html>

35. Hernández Zarate, M., Abraham Juárez, M., Cerón García, A., Gutiérrez Chávez, A., Gutiérrez Arenas, D., & Avila Ramos, F. (2017). Contenido de flavonoides, fenoles y actividad antioxidante de propóleos colectados en Guanajuato, México. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 607-612.
36. Hertong, M., & Van Poppel, G. y. (1997). Potentially anticarcinogenic secondary metabolites from fruit and vegetables. *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*, 319-329.
37. Ichimura, T. O. (1999). HIV-1 protease inhibition and anti- HIV effect and natural and synthetic water- soluble lignin- like substances. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2202-2204.
38. Ito J, C. F. (2001). Anti-AIDS Agents. 48.1 Anti-HIV Activity of Moronic Acid Derivatives and the New Melliferone-Related Triterpenoid Isolated from Brazilian Propolis. *J. Nat. Prod.* 2001, 1278-1281.
39. Joya, M., Gil, M., & Bastidas-Pacheco, G. (2017). Actividad fungistática y fungicida de extractos etanólicos de propóleos sobre el crecimiento in vitro de cepas del género *Candida*. *Tecnología en Marcha.*, 3-11.
40. Kasote, D. (2017). Propolis: A Neglected Product of Value in the Indian Beekeeping Sector. *Bee Word*, 80-83.
41. Kujumgiev A, T. I. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol.*, 64, 235-240.
42. Martella, V., Elia, G., & Buonavoglia, C. (2008). Canine Distemper Virus. *Veterinary Clinics Small Animal Practice*, 787-797.
43. Martínez Bistrain, Y. (2017). *Evaluación invitro de la actividad antiviral de dos propóleos del Estado de México contra el virus del Distemper canino*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
44. McMurry, J. (2012). *Química orgánica*. México: CENGAGE Learning.
45. Moss, W., & Griffin, D. (2006). Global measles elimination. *Nature Reviews Microbiology*, 900-908.

46. Muñoz, L. L. (2011). Propiedades del propóleo como un aditivo funcional en la nutrición animal. *Biosaliud*, 101-111.
47. Nates, G. P. (2005). *Guía para la cría y manejo de la Abeja Angelita o Virginita Tetragonisca angustula Illiger*. Bogotá: Convenio Andres Bello.
48. Nolkemper, S., Reichling, J., Heinz Sensch, K., & Schnitzler, P. (2010). Mechanism of herpes simplex virus type 2 suppression by propolis extracts. *Elsevier*, 132-138.
49. Park, H. B.-S. (2015). Lipase-mediated lipid removal from propolis extract and its antiradical and antimicrobial activity. *J. Science Food and Agriculture*, 95(5), 1697-1705.
50. Petit, J. (2004). Propóleo para cuidar frutales. . *La fertilidad de la Tierra: revista de agricultura ecológica* 15, 13-15.
51. Rees, C. C. (2008). In vitro inhibition of dengue virus entry by p-sulfoxy-cinnamic acid and structurally related combinatorial chemistries. *Antiviral Research*, 135-142.
52. Rentamal, P., Abalos, P., & Fredes, F. (2010). *Enfermedades animales producidas por agentes biológicos*. Santiago de Chile: Editorial Universitaria.
53. Reyes, J., Santos, G., J. H., Espinoza, B., Borraz, M., Ramírez, H., y otros. (2002). Mecanismos moleculares de la patogenia viral: Estudios con el Rubulavirus porcino. *Mensaje Bioquímico*, 26, 99-125.
54. Rodríguez Pérez, B., Canales Martínez, M. M., Penieres Carrillo, J. G., & Cruz Sánchez, T. A. (2019). Composición química, propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana de propóleos mexicanos. *Acta Universitaria*, 30.
55. Rodríguez, B. (2015). *Perfil Químico de propóleos mexicanos para su aplicación en medicina veterinaria*. México: UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO.
56. Rzedowski, J. (2005). *Vegetación de México*. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
57. S., F. F. (2001). *Manual De Medicina Veterinaria Homeopática*. Barcelona: B. Jain Publishers,.

58. Sidhu, M. S. (1993). Canine Distemper Terminal and Intergenic Non-protein Coding Nucleotide Sequences: Completion of the Entire CDV Genome Sequence. *Virology*, 66-72.
59. Stettler M, B. K. (1997). Determinants of persistence in canine distemper viruses. . *Veterinary Microbiology*, 83-93.
60. Thapa, M. K. (2011). Synthesis and antiviral activity of substituted quercetins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 353-356.
61. Von Messling V, Z. G. (2001). The hemagglutinin of canine distemper virus tropism and cytopathogenicity. *Journal of Virology*, 75(14), 6418-6427.
62. Zavaleta, J., Muñoz, A., Blanco, T., & Loja, A. B. (2005). Capacidad antioxidante y principios ácidos fénolicos y flavonoides de algunos alimentos. *Acta Médica San Martiniana*, 1(1), 81-85.