

UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PROPÓLEOS RECOLECTADOS EN LAS REGIONES DE CABORCA, URES Y PUEBLO DE ÁLAMOS, SONORA, SOBRE EL CRECIMIENTO *in vitro* DE TROFOZOÍTOS DE *Giardia lamblia*.

Tesis para Obtener el Grado de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Presenta:

Q.C.B. Gabriela de los Ángeles Díaz Reyes

Hermosillo, Sonora

Agosto 2010

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios por darme la vida y mantenerme con ánimos y fuerzas para salir adelante con cada prueba que se presenta a diario en esta vida. Gracias Dios por llenar mi vida de bendiciones y soluciones para cada una de mis peticiones. Gracias Dios porque cada día que me permites ver un nuevo día sé que estas conmigo y me ayudarás en todo.

A mis padres (William y Socorro) por apoyarme en todos mis retos, buenos y malos, les agradezco de todo corazón su amor cariñoso y su mucha, mucha comprensión. Gracias por que me dieron las bases para desenvolverme con esfuerzo y tenacidad. En todo momento los llevo conmigo.

A mis hermanos (Guillermo, Miguel y Adriana) por apoyarme y darme ánimos de que si se puede hacer más en la vida. Sé que cuento con cada uno de ustedes en cualquier momento.

Miguel y María de los Ángeles gracias por abrirme las puertas de sus hogares y hacerme parte de su familia.

A mi hijo Mario César gracias porque a pesar de que la vida ha sido difícil para ti, tienes las bases para ser un hombre grande, respetable y digno de admiración. Te quiero y te admiro.

A ti mi pequeña niña: Keisy Gabriela, que junto con Mario me dio la fuerza y el coraje para seguir preparándome y poder sacarlos a delante en esta vida. Mi niña te quiero mucho y sé que también vas a hacer grande, pues ya lo eres hoy. Te quiero.

A la Universidad de Sonora por ser mi segunda alma mater y creer en mí como profesionalista.

Al Dr. Carlos Velázquez: Gracias Doctor, por confiar en mí y ayudarme a salir adelante con mi formación profesional.

A mis sinodales: Dr. Humberto Astiazaran, Dr. Eduardo Bustos y Dr. Ramón Robles por su gran apoyo en la revisión y mejoramiento del trabajo.

Al CIAD en especial al Dr. Javier Hernández Martínez, Q.B. Karla Martínez Robinson, Q.B Rita Paz y Alma Campas por su gran apoyo en la realización de este trabajo.

A mis amigos: Por sufrir junto con migo cada *Lab Meeting* y *Journal Club*. Por compartir momentos de relax, apoyo y comprensión: Claudia, Pedro, Rafa, Martin, Marcos, Maggy, Glaus, Nubia, así mismo Anita, Jael, Paty, Caro, Carito y Pao, que Dios les permita cumplir con las metas que cada uno de ustedes se han trazado en esta vida.

Y a usted maestra Lucila, gracias por su cariño y comprensión que Dios le siga dando ese optimismo con que usted siempre nos recibía.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABLAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMEN.....	viii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES.....	3
Generalidades del Propóleo	3
Composición Química	5
Flavonoides.....	6
Origen Geográfico y Botánico de los Propóleos.....	7
Actividad Biológica de los Propóleos.....	11
Actividad Antiparasitaria de los Extractos de Propóleos.....	15
Giardiasis	18
Aspectos Clínicos.....	18
Taxonomía	19
Morfología	20
Ciclo de Vida	24
Sintomatología y Patogenia	26
Tratamiento	27
HIPOTESIS.....	29
OBJETIVO GENERAL	30
Objetivos Específicos.....	30
MATERIALES Y MÉTODOS	31
Estandarización del Ensayo de Actividad Antiproliferativa de Propóleos sobre los Trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	31
Cultivo de <i>G. lamblia</i>	31

Uso del DMSO como Disolvente de Propóleos.....	31
Uso de Albendazol como Control de Inhibición.....	32
Recolección y Obtención de los Propóleos Sonorenses	32
Obtención de Extractos Metanólicos	32
Evaluación de la Actividad Antiparasitaria de los Extractos Metanólicos de los Propóleos Sonorenses.	33
Evaluación de la Actividad Antiparasitaria del CAPE	35
Obtención del Extracto Hexánico, Etéreo y Acetato de Etilo de Caborca...35	
Evaluación de la Actividad Antiparasitaria de los Extractos de Acetato de Etilo y Etéreo de Caborca	37
Purificación del Extracto Hexánico y Etéreo de Caborca.....	37
Análisis Estadístico	37
RESULTADOS.....	38
Estandarización del Ensayo de Actividad Antiproliferativa de Propóleos Sobre Trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	38
Uso del DMSO como Disolvente de Propóleos.....	38
Uso de Albendazol como Control de Inhibición de la Proliferación de Trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	41
Evaluación de la Actividad Antiparasitaria de los Extractos Metanólicos de los Propóleos Sonorenses.	44
Cambios Morfológicos Inducidos por el Extracto Metanólico.....	44
Evaluación de la Actividad Antiparasitaria del CAPE	47
Evaluación de la Actividad Antiparasitaria de los Extractos de Acetato de Etilo y Etéreo de Caborca.....	47
DISCUSIÓN	51
CONCLUSIONES	54
BIBLIOGRAFÍA	55
ANEXOS	64
Anexo 1. Preparación del Cultivo de <i>G. lamblia</i>	64

Anexo 2. Evaluación de la Proliferación y Viabilidad Celular Utilizando Cámara de Neubauer	66
Anexo 3. Protocolo de la Suspensión de Trofozoítos para el Ensayo de Proliferación	70
Anexo 4. Preparación de los Extractos y Compuestos Aislados de Propóleos de la Región de Sonora.....	72
Anexo 5. Extractos Hexánico, Etéreo y Acetato de Etilo de Caborca	76
Anexo 6. Evaluación de la Actividad de los Extractos de Acetato de Etilo y Etéreo de Caborca	77
Anexo 7. Cromatografía en Columna (Sílica gel) del Extracto Hexánico de Caborca.....	78
Anexo 8. Fracciones por Cromatografía en Columna de Vidrio en Silica Gel del Extracto Etéreo de Caborca	80

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Principales compuestos de los propóleos sonorenses identificados mediante HPLC	13
II	Principales actividades biológicas y componentes de propóleos de diferentes partes del mundo	16
III	Características de los propóleos recolectados	39
IV	Resultados de la obtención de los extractos hexánico, etéreo y de acetato de etilo de Caborca	76
V	Resultados de las fracciones por cromatografía en columna del extracto hexánico de Caborca	78
VI	Resultados de las fracciones por cromatografía en columna del extracto etéreo de Caborca	80

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Abeja recolectora.	4
2	Estructura química básica de los flavonoides.	8
3	Clasificación química de los flavonoides.	9
4	Compuestos más abundantes recolectados en la región de Sonora.	12
5	Trofozoíto de <i>G. lamblia</i> .	21
6	Quiste de <i>G. lamblia</i> .	22
7	Ciclo biológico de <i>G. lamblia</i> .	25
8	Mapa de Sonora	34
9	Evaluación del CAPE sobre la línea celular M12.AK.C3F6	36
10	Efecto del DMSO en el crecimiento de <i>G. lamblia</i>	40
11	Uso del albendazol como control de inhibición de la proliferación de trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	42
12	Cambios morfológicos inducidos por albendazol sobre los trofozoítos de <i>G lamblia</i>	43
13	Evaluación de la actividad antiparasitaria de los extractos metanólicos de temporalización de Ures sobre los trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	45
14	Cambios morfológicos inducidos por la presencia del extracto metanólico de los propóleos sonorenses de Ures-Verano	46
15	Evaluación de la actividad antiparasitaria del extracto de Pueblo de Álamos	48
16	Evaluación de la actividad antiparasitaria del extracto metanólico de Caborca (EMC)	49
17	Evaluación de la actividad antiparasitaria del CAPE	50

18	Cámara de Neubauer o hematocitómetro	67
19	Evaluación de la actividad antiparasitaria de los extractos de Acetato de Etilo y Etéreo de Caborca Evaluación de la actividad antiparasitaria del CAPE	77
20	Placa cromatográfica de capa fina del extracto hexánico de Caborca	79

LISTA DE ABREVIATURAS

CAPE	Éster Fenético del Ácido Caféico
CIAD	Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo
DMSO	Dimetilsulfóxido
EMP	Extracto Metanólico de Propóleos
PC	Propóleo de Caborca
PPA	Propóleo de Pueblo de Álamos
PU	Propóleo de Ures
PUp	Propóleo de Ures-primavera
PUv	Propóleo de Ures-verano
PUo	Propóleo de Ures-otoño
PUi	Propóleo de Ures-invierno

RESUMEN

En los últimos años se ha probado la efectividad de los propóleos como agentes antibacterianos, anticancerígenos, antifúngicos, antivirales, antiinflamatorios, inmunomoduladores, antioxidantes y más recientemente como antiparasitarios. Las propiedades de los propóleos varían de región a región, dependiendo de la flora, el clima y las especies de abejas que lo procesan. Los propóleos de la región de Sonora han sido evaluados con anterioridad como antibacterianos, anticancerígenos y antioxidantes por lo que surge la inquietud de si estos también poseen espectro como antiparasitarios. El presente estudio se realizó con el objetivo de evaluar la actividad de los propóleos obtenidos de las regiones de Caborca, Ures y Pueblo de Álamos, Sonora, sobre el crecimiento *in vitro* de trofozoítos de *G. lamblia* (GS/M-H7). Adicionalmente, se evaluó el efecto de la temporalización de los propóleos en la actividad antiparasitaria de este producto natural. Se llevó a cabo la estandarización de un método *in vitro* para evaluar la actividad antiproliferativa de los propóleos sobre los trofozoítos de *G. lamblia*. Los propóleos fueron procesados como extractos metanólicos para después ser añadidos a cultivos axénicos de trofozoítos de *G. lamblia*. Como fármaco control de inhibición de crecimiento de trofozoítos en los ensayos se utilizó albendazol. Los propóleos sonorenses mostraron una actividad inhibitoria del crecimiento *in vitro* de *G. lamblia*. Los propóleos de la región de Ures, Sonora, recolectados durante la época de verano (PUV), tuvieron los porcentajes inhibitorios más altos (PU verano 92.25% > PU invierno 85.8% > PU otoño 71.> PPA 54.9% > PU primavera 53.6%). Un compuesto presente solamente en los extractos de Ures fue probado de forma aislada para determinar su actividad, el éster fenético del ácido caféico (CAPE) no presentó actividad antiparasitaria significativa (33.01%). En conclusión, nuestros resultados demuestran que los propóleos de la región de Ures (recolectados en verano) poseen una fuerte actividad antiparasitaria anti-*G. lamblia*. Este trabajo sienta las bases para el establecimiento de futuras investigaciones encaminadas a identificar y caracterizar la

composición química y los mecanismos de acción de los constituyentes de los propóleos sonorenses responsables de la actividad anti-*G. lamblia*.

INTRODUCCIÓN

Las abejas (*Apis mellifera*) utilizan sus mandíbulas para recolectar partículas resinosas de las yemas, brotes y pecíolos de las hojas de distintas plantas cercanas a la colmena y las mezclan con cera y secreciones salivales para formar lo que se conoce como propóleo (Bedascarrasbure y col., 2000). Las resinas son activamente secretadas y exudadas por las plantas para ser recolectadas nuevamente por las abejas (Bankova y col. 2000). El propóleo ya elaborado es utilizado principalmente para el mantenimiento y reparación de la colmena (Russo y col., 2004; Uzel y col., 2005). Para las abejas, los propóleos representan el arma química más importante de protección para la colmena contra microorganismos ya que impiden su proliferación; así mismo, los propóleos bloquean el paso de pequeños insectos y animales que pudieran invadir la colmena y transformarse en un peligro para su comunidad (Burdock, 1998; Bedascarrasbure y col., 2000; Bankova, 2005).

Existe evidencia histórica que data del año 300 a. C. en donde se menciona que los Griegos y los Romanos utilizaban propóleos con fines medicinales (Russo y col., 2004; Uzel y col., 2005; Hellner y col., 2008). Actualmente se les atribuye un amplio espectro de actividades biológicas entre las cuales se encuentra su capacidad antifúngica (*Candida albicans*), antiviral (Virus de *avian influenza*), y antibacteriana (*Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*), antiinflamatoria, inmunomoduladora, antioxidante, antitumoral (Paulino y col., 2003; Uzel y col., 2005) y antiparasitaria (Barbosa da Silva-Cunha y col., 2004). A raíz de este conocimiento, se ha profundizado el estudio de los propóleos en todo el mundo, principalmente de los propóleos europeos, asiáticos, brasileños, y africanos (Burdock, 1998). En México, la investigación a en este rubro es aún incipiente, pocos son los trabajos publicados sobre la evaluación de actividades biológicas de propóleos Mexicanos (Lotti y col., 2010).

En países como Brasil se ha comprobado la actividad antiparasitaria de los propóleos empleando los extractos metanólicos contra cepas *in vitro* de *Trypanosoma cruzi* (Barbosa da Silva-Cunha y col., 2004), diferentes especies de *Leishmania* (Machado y col., 2007), así como en el crecimiento y adherencia de *G. lamblia* en donde se ha encontrado un alto grado de actividad biológica (Freitas y col., 2004). Actualmente, el grupo representado por el Dr. Javier Hernández del Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo AC. (C.I.A.D) y el Dr. Carlos Velázquez de la Universidad de Sonora (UNISON) tiene el interés de estudiar la actividad antiparasitaria anti-*G. lamblia* de los propóleos obtenidos en las diferentes regiones del estado de Sonora, ya que en México, ocupa uno de los primeros lugares en incidencia de giardiasis intestinal (S.S.A. 2003), enfermedad causada por el protozooario flagelado *G. lamblia* (*G. duodenalis* o *G. intestinalis*) que infecta al hombre provocándole una sintomatología variada la cual incluye dolor abdominal, náusea, vómito, en algunos casos, se puede presentar diarrea severa, estados de malnutrición y pérdida de peso. Sin embargo, un alto porcentaje de personas cursan con giardiasis asintomática (Adam, 2001; Eckmann y col., 2001; Syed y col., 2003). Tomando en cuenta todo lo anterior, se dispone este trabajo, para evaluar el efecto de los propóleos sonorenses sobre el crecimiento *in vitro* de *G. lamblia*.

ANTECEDENTES

Generalidades del Propóleo

El propóleo es un material resinoso que las abejas elaboran a partir de exudados y resinas de árboles, plantas y flores, es utilizado por las abejas para la construcción y el mantenimiento de la colmena: tapando grietas o hendiduras evitando así la entrada de viento frío o la pérdida de calor, ayudando a consolidar los componentes de la colmena y aislando las partículas extrañas dentro de la colonia para evitar su descomposición (Burdock, 1998; Paulino y col., 2003; Bankova, 2005), creando un ambiente de asepsia a la colmena, de allí el origen de la palabra “propolis” que en griego significa defensor de la ciudad (Burdock, 1998; Bedascarrasbure y col., 2000; Bankova, 2005).

Las abejas recolectoras (pecoreadoras) (figura 1) extraen el propóleo de las yemas valiéndose de sus mandíbulas y de su primer par de patas, así como la secreción de sus glándulas mandibulares (ácido 10-hidroxidecenoico) lo cual permite su ablandamiento y trituración para ser transportado a la colmena. Al entrar a la misma, las propolizadoras toman pequeñas cantidades de esa sustancia completando el propolizado (Bedascarrasbure y col., 2000).

El propóleo es una sustancia resinosa, balsámica, de color verde pardo, castaño o incluso casi negro. Por lo que la composición de los propóleos estará dada tanto por los exudados recolectados, como por las sustancias secretadas como parte del metabolismo de la abeja y de los materiales que son agregados durante la elaboración del propóleo (Paulino y col., 2003) (Bankova, 200; Uzel y col., 2005). Por lo tanto, la composición de los propóleos dependerá tanto de la vegetación, clima, época del año, así como de la especie de abeja que lo haya recolectado (Paulino y col., 2003; Bankova, 2005; Uzel y col., 2005).



Figura 1. Abeja recolectora “pecoreadora” cuya función es la de recolectar el néctar de las flores, polen, propóleo, de las yemas de árboles (Bedascarrasbure, y col 2000). Fuente: University of California, Harry H. Laidlaw Jr. (2009) Honey Bee Research Facility.

<http://beebiology.ucdavis.edu/> (Julio 27, 2010)

Existe evidencia histórica que data del año 300 a. C. sobre el uso de los propóleos con fines medicinales (Russo y col., 2004; Uzel y col., 2005). Los antiguos egipcios lo utilizaban para embalsamar a sus momias, los griegos para aliviar diferentes padecimientos: Hipócrates (460 - 377 a. C.) lo administró para el tratamiento de úlceras en piel y Aristóteles (384 - 322 a. C.) para el tratamiento de abscesos y heridas. Los Incas lo utilizaban para disminuir la fiebre (Castaldo y col., 2002). En la actualidad es utilizado por algunas culturas de los estados europeos (Balcánicos) como tratamiento para heridas, quemaduras, faringitis y úlcera estomacal (Bankova, 2005). La administración de este producto se ha mantenido durante siglos hasta llegar a nuestros tiempos, en los que se están realizando investigaciones científicas sobre el empleo de preparados a base de propóleos en los campos de la biología y la medicina humana.

La investigación sobre la industria farmacéutica ha dado popularidad al comercio de los propóleos en Estados Unidos, la Unión Europea y en Japón ya que están presentes en los biocosméticos y son utilizados como medicinas alternativas, así como complementos dietéticos, que mejoran la salud y previenen enfermedades (Bankova, y col., 2000; Weinstein y col., 2005). Japón, es el líder de importación de propóleos teniendo preferencia por el brasileño (Salatino y col., 2005). En el año 2002, México produjo 3.3 toneladas de propóleo (Ortega-Rivas y col., 2004).

Composición Química

La composición de los propóleos es bastante compleja y variada ya que depende de la flora y de las condiciones geográficas y climáticas donde se elabora el producto (Bosio y col., 2003). Las abejas recolectan las resinas en un perímetro de 1-2 Km alrededor de la colmena (Espinoza, 2004; Castillo, 2002) y su composición dependerá de la vegetación circundante y de la preferencia de la abeja por un determinado tipo de flores, según su color, aroma, forma y floración, (Bankova, 2005).

Por su consistencia y estructura, los propóleos pueden clasificarse en dos grupos: 1) Los de naturaleza fluida y 2) Los balsámicos-oleo-resinosos. Los primeros presentan una fracción importante de agentes volátiles, mientras que en los balsámicos predomina la consistencia densa, con bajo contenido de volátiles, susceptible de polimerización y con frecuencia se percibe el aroma de las plantas en forma concentrada; en general son sustancias viscosas, semisólidas y cauchosas. Dependiendo de su origen y condiciones térmicas; se presentan como un material duro a los 15°C y se torna más maleable a medida que aumenta la temperatura. Su punto de fusión varía entre 60 a 70°C, llegando en algunos casos hasta 100°C (Salamanca y col., 2007).

Se han identificado más de 300 constituyentes de los propóleos, dentro de los cuales una amplia variedad son compuestos fenólicos, principalmente de tipo flavonoide, siendo estos, a los que se les ha atribuido parte de las propiedades biológicas de los propóleos (Paulino y col., 2003). También se han identificado otros constituyentes como ácidos orgánicos, ésteres, alcoholes, aldehídos y terpenos (Silici y col., 2005; Uzel y col., 2005; Sahinler y col., 2005). De manera general, la composición de los propóleos se basa en resinas y aceites volátiles en un 50%, cera en un 30%, aceites aromáticos en un 10%, polen 5% y el 5% restante está constituido por otras sustancias y detritos orgánicos. También se encuentran pequeñas cantidades de vitamina B, azúcares, hierro zinc, oro, plata y potasio (Farré y col., 2004).

Flavonoides

Son pigmentos naturales presentes en los vegetales, que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes como los rayos ultravioletas, la contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. El organismo humano no es apto para producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. De forma natural están ampliamente distribuidos en plantas, frutas, verduras y en diversas bebidas y representan

componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana (Martínez-Flórez, 2002; Aherne, y col., 2002). Estos compuestos están también involucrados en mecanismos de foto sensibilización y de transferencia de energía, regulando así las reacciones de crecimiento, de control de la respiración, la fotosíntesis, la morfogénesis, la determinación sexual y la defensa contra infecciones (Cushnie, 2005).

Químicamente, son compuestos de bajo peso molecular, polifenólicos derivados de la benzo- γ -pirona los cuales están ampliamente distribuidos en el reino vegetal (López Luengo, 2002). Parten de un esqueleto común de difenilpiranos o fenilbenzopironas (C6-C3-C6), compuesto de dos anillos bencénicos (anillos A y B) unidos mediante un anillo heterocíclico de pirano o pirona (anillo C) (López y col., 2006). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8 y los anillos B desde el 2' al 6' (Figura 2). De acuerdo a los sustituyentes presentes en estas tres estructuras cíclicas, se subdividen en función de la presencia o ausencia de un doble enlace entre los carbonos 4 y 5 del anillo C, de la presencia o ausencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo C, y de la presencia de grupos hidroxilo en el anillo B (Narayana y col., 2001). Se han descrito más de 4000 distintos flavonoides (Bylka y col., 2004) que por sus diferencias químicas pueden clasificarse en seis grupos: flavonoles, flavanos, flavanonas, flavonas, flavanonoles y antocianidinas. (Figura 3) (Havsteen, 2002).

Origen Geográfico y Botánico de los Propóleos

La biodiversidad de propóleos a nivel mundial es inmensa, en cada región se pueden encontrar diferentes compuestos, por ejemplo, en los propóleos europeos, se han encontrado flavanones, flavones, ácido fenólico y sus ésteres, así como ácido caféico, ácido ferúlico, los cuales se han recolectado en zonas templadas de los brotes de álamos (*populus nigra*) (Simões y col., 2004).

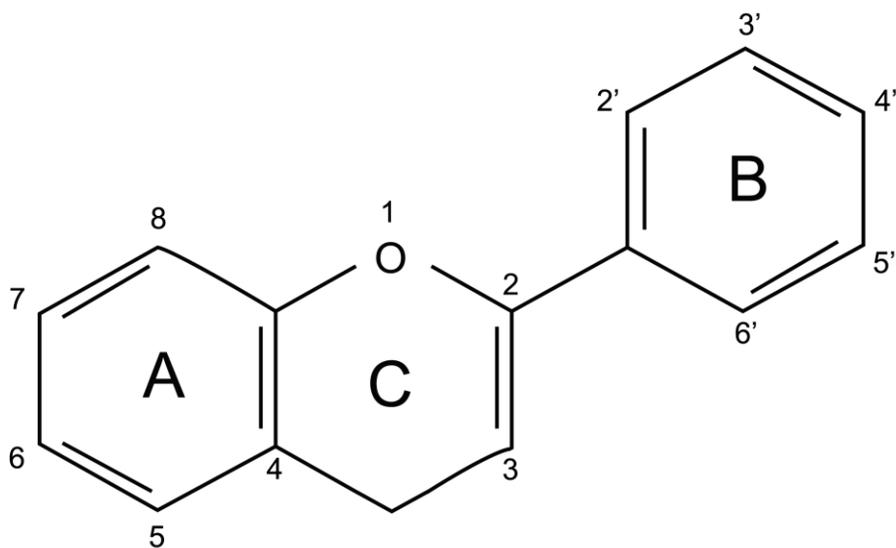


Figura 2. Estructura química básica de los flavonoides. Son compuestos fenólicos diaril-propánicos, es decir, su estructura es del tipo C6-C3-C6, con dos anillos aromáticos (bencénicos) unidos entre sí por una cadena de 3 carbonos ciclada a través de un oxígeno. (López y col., 2006).

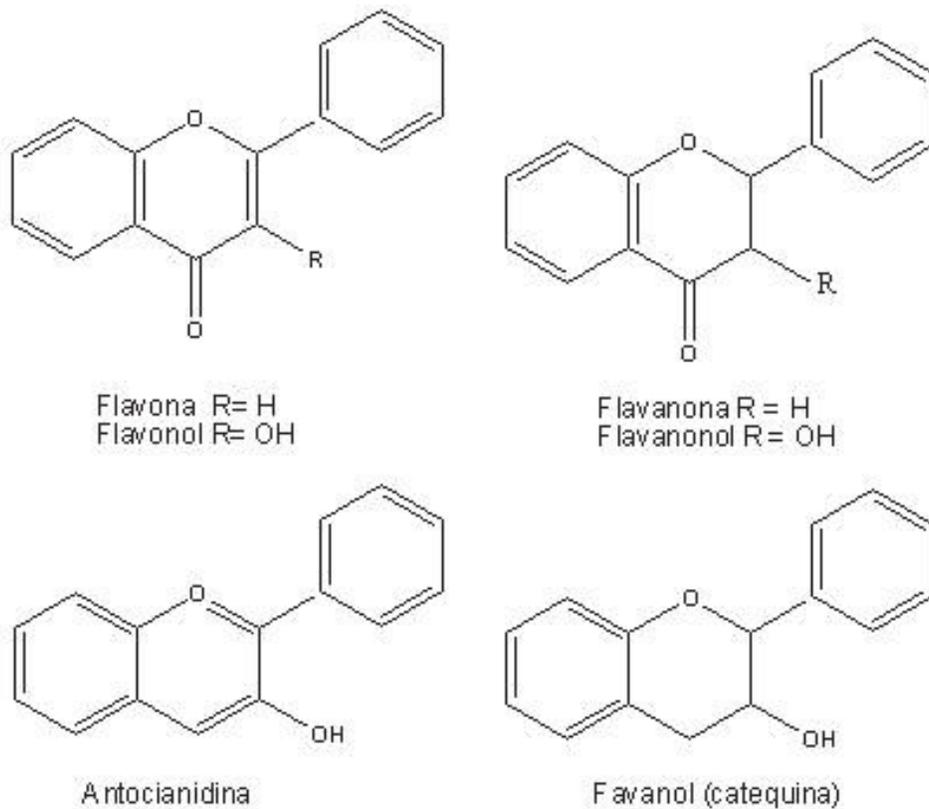


Figura 3. Clasificación química de los flavonoides. Se muestran las estructuras básicas de los seis grupos de flavonoides, dependiendo del radical que se añade a la estructura. (López Luengo, 2002).

En Brasil abundan la *Baccharis dracunculifolia*, los álamos y una mezcla de plantas tropicales y en sus propóleos han sido encontrados flavonoides (rutina, quercetin, galangina etc.) y éster fenético del ácido caféico (CAPE) (Simões y col., 2004).

Dentro de los propóleos de Cuba se han encontrado prenilados y benzopironas mayormente en aquellos que contienen resinas de *Clusia rosea* (Bankova 2005). En la región de Chile la flora predominante se compone de *Asteraceae*, *Anacardiaceae*, *Rosaceae*, *Rhamnaceae*, *Monimiaceae* y *Lauraceae* (Valcic y col., 1998). En los propóleos de Taiwán se encontraron prenilados y benzopironas (Bankova 2005).

La Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (S.A.R.H.) en México, divide al país en cuatro regiones apícolas determinadas por la diversidad de vegetación, clima, suelos, orografía y altitudes. Estas regiones son: **a) Zona centro.** Guanajuato, Querétaro, Estado de México, Morelos, Tlaxcala, Puebla y Distrito Federal. **b) Zona del pacífico.** Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Jalisco, Colima, Nayarit, y Sinaloa la constituyen. **c) Zona del sureste o peninsular.** Tabasco, Veracruz, Campeche, Yucatán y Quintana Roo. **d) Zona norte.** Baja California Norte y Sur, Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Durango, Zacatecas, y Aguascalientes (S.A.H.R., 2004). En el estado de Campeche, las pruebas analíticas mostraron que los constituyentes de los propóleos son lactonas, flavonoides, fenoles y triterpenos (Tolosa y col., 2002).

Estudios recientes en México han encontrado la presencia de tres nuevos componentes (1-(3',4'-dihidroxi-2'-metoxifenil)-3-(fenil) propano, (Z)-1-(2'-metoxi-4',5'-dihidroxiopropil)-2-(3-fenil)propeno y 3-hidroxi-5,6-dimetoxiflavan) además de siete flavonones conocidos, isoflavonas y pterocarpanos. (Lotti y col., 2010).

En Sonora se han recolectados propóleos de las regiones de Caborca, Ures y Pueblo de Álamos en donde se encuentra una gran diversidad de plantas tales como *Olneya tesota*, *Prosopis velutina*, *Populus fremonti*, *Ambrosia deltoidea* entre otras. Los propóleos recolectado de estas regiones han sido estudiados e identificado por HPLC-MS permitiendo caracterizar 13 compuestos entre los más abundantes

constituyentes son: pinocembrina, 3-O-acetato de pinobanksina, Crisina y galangina (Figura 4) (Tabla I) (Hernández y col., 2007).

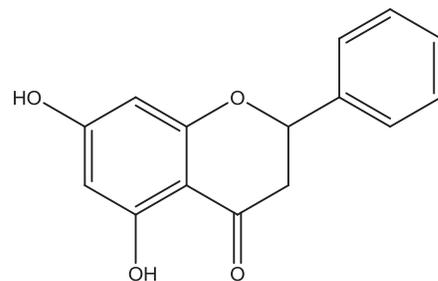
Actividad Biológica de los Propóleos

Debido a la gran cantidad de flavonoides contenidos en los propóleos, se les atribuyen un amplio espectro de actividades biológicas: Antifúngica (*Candida albicans*), antiviral (Virus de *avian influenza*), y antibacteriana (*Staphilococcus aureusy Escherichia coli*), antiinflamatoria, inmunomoduladora, antioxidante, anticancerígena (Paulino y col., 2003; Uzel y col., 2005; Hernández y col., 2007) y antiparasitaria (Barbosa da Silva-Cunha y col., 2004). Este conocimiento ha servido como piedra angular para el desarrollo de investigaciones a nivel mundial que buscan conocer más acerca de sus propiedades curativas.

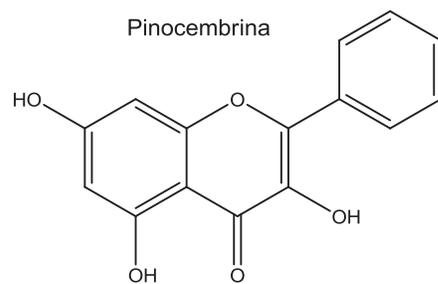
Ensayos realizados en Bulgaria han reportado los efectos de los extractos etanólicos de esa región como analgésicos, antiinflamatorios (Paulino y col., 2003) y antiparasitarios (Machado y col., 2007).

Los propóleos alemanes fueron probados en quemaduras, heridas y problemas de artritis (Hellner y col., 2008). En Turquía fueron evaluadas la actividad antimicrobiana (*K.pneumonia, M.morganii*) y antifúngica (*C. albicans*) (Katircioglu y col., 2006).

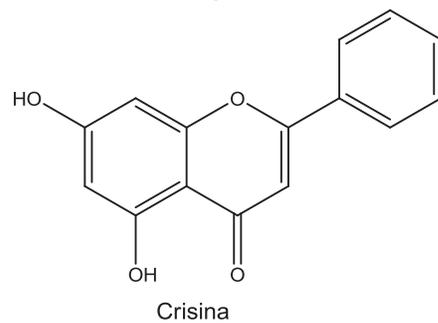
En Egipto, los propóleos regionales han sido probados como antivirales, antimicrobianos y antioxidantes (Faten, y col., 200; Hegazi y col., 2002). Los extractos taiwaneses mostraron actividad como citotóxicos (Chen y col., 2003). Esta misma actividad se ha estudiado en Cuba, utilizando células HeLa de carcinoma humano de cérvix (Cuesta-Rubio y col., 2001).



Pinocembrina



Galengina



Crisina

Figura 4. Compuestos más abundantes recolectados en la región de Sonora. Los compuestos fueron identificados por HPLC-MS: Pinocembrina, 3-O-acetato de pinobanksina, crisina y galangina.

Tabla I. Principales compuestos de los propóleos sonorenses identificados mediante HPLC (Hernández y col., 2007).

No. de Pico	Tiempo de Retención (min)	Compuesto	Propóleos		
			PU	PPA	PC
1	10.8	λ 296,344 nm ^a	-	-	+
2	13.7	λ 290,340 nm ^a	-	-	+
3	20.5	λ 258,292 nm ^a	-	-	+
4	22.1	Rutina	-	+	-
5	27.1	λ 274,294, 324 nm ^a	+	-	-
6	29.8	Pinobanksina	+	+	+
7	30.9	Naringenina	-	+	-
8	33.1	Hesperetina	-	+	-
9	36.0	λ 260, 290, 334 nm ^a	-	+	-
10	37.0	λ 256,292 nm ^a	-	+	-
11	42.2	3'-demethoxysudachitin	-	-	+
12	43.3	λ 236, 266, 310, 346 nm ^a	+	-	-
13	43.9	λ 296,344 nm ^a	-	-	+
14	44.3	λ 266,296, 350 nm ^a	+	+	-
15	45.9	λ 254,270, 288, 256 nm ^a	-	+	-
16	46.7	Pinocembrina	+	+	+
17	48.6	3-Acetato de Pinobanksina	+	+	+
18	52.3	Caféico	+	-	-
19	53.0	Xantomicrol	-	+	+
20	54.0	Crisina	+	+	+
21	55.0	Galangina	+	+	+
22	57.1	Acecetina	+	+	-
23	58.2	λ 240,288, 226 nm ^a	-	+	-
24	60.2	λ 294,340 nm ^a	+	+	+
25	61.5	λ 294,312 nm ^a	+	-	+
26	66.5	λ 292,340 nm ^a	+	+	+

^a Compuestos no identificados. Se presenta solo su máximo de absorción en el espectro UV.

(+) Presente pero no cuantificado

(-) No detectado

En las regiones templadas de Chile central, se investigó la actividad antioxidante y antiproliferativa en donde la muestra de propóleo demostró la capacidad de eliminar radicales libres e inhibir el crecimiento de células tumorales (Russo y col., 2004).

En Argentina es utilizado para prevenir problemas bucales y gastrointestinales al mezclarlo con un poco de miel y leche y también como antimicrobiano principalmente contra *S. aureus* y *E. faecalis* (Moreno y col., 1999).

En Brasil se ha estudiado su actividad citotóxica (Banskota y col., 1998), antibacterial (Santos y col., 2002) y antioxidante (Teixeira y col., 2008). Brasil se destaca por tener una amplia biodiversidad en su territorio lo cual permite tener una variedad de propóleos. Los extractos brasileños son clasificados como verdes y rojos siendo los verdes, los que cuentan con mayor preferencia en el mercado debido a su alta actividad biológica. Los extractos brasileños verdes son recolectados de las especies *Baccharis dracunculifolia*, *Araucariaangustifolia* y *eucalyptus citriodora* (Salatino y col., 2005)

En el estado de Campeche, en México, se ha evaluado la actividad microbicida de los propóleos regionales contra *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* y *S. typhi* (Tolosa y col., 2002). En el estado de Campeche, en México, se ha evaluado la actividad microbicida de los propóleos regionales contra *S. aureus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* y *S. typhi* (Tolosa y col., 2002). En Sonora se ha evaluado su actividad como agente antiproliferativo en el modelo murino, anticancerígeno en líneas celulares humanas, su capacidad para inducir apoptosis (Hernández y col., 2007), su actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, y también se determinó que los extractos de esta región poseen una fuerte actividad antioxidante (Velázquez y col., 2007).

El esquema realizado por Bankova en el 2005 donde se hace referencia a los principales compuestos de propóleos y sus actividades biológicas, ha sido modificado con el fin de añadir los resultados obtenidos de estudios realizados en Sonora y hacer

una comparación de las actividades biológicas que tienen los propóleos sonorenses a las del mundo, con el fin de abrir nuevos campos de investigación (Tabla II).

Actividad Antiparasitaria de los Extractos de Propóleos

En Egipto, un grupo de investigadores utilizó extracto de propóleos contra *Schistosoma mansoni* en estudios *in vivo* con ratones albinos; se administraron dosis de 250 mg/kg/día las cuales redujeron en un 58.5% la proliferación de los parásitos (Ragaa, 2007).

En Adana, Turquía, se investigaron los efectos de un extracto etanólico sobre el crecimiento *in vitro* de *Leishmania trópica*, se determinó que las concentraciones estadísticamente significativas eran de 250, 500, y 750 µg/ml. Después de comparar con el grupo control ($p < 0.05$), los resultados demostraron que el extracto etanólico de Adana reduce la proliferación de forma significativa de *L. trópica* (Duran G. y col. 2008). La *Leishmania*, causa manifestaciones clínicas como úlceras en la piel, inflamación al hígado y bazo, desnutrición, anemia e incluso la muerte, afecta a casi 12 millones de personas en 88 países del mundo tanto en regiones tropicales como subtropicales. No hay vacunas y los tratamientos son largos y muy costosos por lo que los propóleos representan una buena alternativa a considerar (Machado y col., 2007). Los propóleos de Brasil y Bulgaria fueron evaluados contra este mismo parásito (*L. major*, *L. amazonas*, *L. braziliensis*, *L. chagasi*). El ensayo se realizó de manera *in vitro* en placas de 96 pozos, con una incubación de 26 °C y un tiempo de monitoreo a las 24 horas en concentraciones de 0.5 a 500 µg/mL.

Los resultados de este estudio demostraron que los extractos de Bulgaria tienen un potencial de inhibición mayor que los de Brasil, esto, atribuido a la mayor cantidad de flavonoides contenida en los extractos de Bulgaria (Kumasawa y col., 2003; Machado y col., 2007).

Tabla II. Principales actividades biológicas y componentes de propóleos en el mundo.

Actividad	Propóleos			
	Europa	Brasil	Cuba	México/Sonora
Antibacteriana (ab)	Flavononas, flavonas, ácidos fenólicos y sus ésteres	Ácido p-cumárico prenilado, diterpenos	Benzofenonas preniladas	Éster Fenético del ácido caféico (CAPE)
Antiinflamatoria (ai)	Flavononas, flavonas, ácidos fenólicos y sus ésteres.	No identificados	No evaluado	No evaluado
Anticancerígena (ac)	CAPE	Ácido p-cumárico prenilado, diterpenos, benzofuranos	Benzofenonas preniladas	CAPE, xanthomicrol, galangina, acacentina crisina
Antioxidante (ao)	Flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres	Ácidos p-cumárico prenilados, flavonoides	No evaluado	Rutina, CAPE Galangina, Uresin
Antiproliferativa (ap)	Galangina, flavonoides y ácido cinámico	No evaluado	No evaluado	Pinocembrina, 3-oac-pinobankcina crisina (uresin)
Antimicrobiana (am)	Flavonoides	Prenilados y benzopironas	Isoflavonoides	Pinocembrina
Antiparasitaria (ap)	No evaluado	Fenil propanoindes-prenilados, Pinobakcina CAPE	No evaluado	No evaluado

Modificado de Bankova, 2005.

*Europa ap (Banskota y col., 2002) (Bestwick y col., 2006) am (Pavilionis, y col., 2008)

*Brasil am (Castro y col., 2009)

*Cuba am (Rubio, y col., 1999)

Investigadores de Brasil evaluaron el uso de extractos de propóleo contra *Trypanosoma cruzi*, causante de la Enfermedad de Chagas, patología endémica en Latinoamérica con cerca de 16 millones de casos reportados; los resultados de esta investigación podrían ofrecer una alternativa profiláctica para esta enfermedad. Se realizó una evaluación *in vitro* donde fueron utilizados 15 extractos metanólicos de propóleos de la región. El extracto 136-Et100 presentó la mayor bioactividad contra *T. cruzi* siendo comparado con: 110-Et100, 12-Et100, 118-Et100, 124-Et100 y 125-Et100 (Barbosa da Silva-Cunha y col., 2004).

En Bulgaria fueron administrados extractos etanólicos (Et-Blg) por vía oral en dosis de 25 a 100 mg/kg a ratones de experimentación (suizos) infectados por *T. cruzi*, el tratamiento con 50 mg de Et-Blg/kg de peso corporal / día, dio lugar a una disminución en la proliferación de los parásitos sin ocasionar efectos secundarios sobre el ratón (Dantas y col., 2005).

Adicionalmente, los propóleos de Brasil fueron evaluados contra trofozoítos de *G. lamblia* con respecto a su adherencia y crecimiento *in vitro*. La investigación reporta una disminución en la adherencia a la superficie del tubo y así, mismo la proliferación celular (Freitas y col., 2004).

La giardiasis es considerada como un problema de salud a nivel mundial, afecta a casi 280 millones de personas, y predomina en los países subdesarrollados y en vías de desarrollo, donde las infecciones se encuentran asociadas a las malas condiciones sanitarias. La giardiasis causa enfermedades diarreicas y puede transmitirse a través del contacto fecal-oral y a través del agua contaminada por las heces, puede afectar a cualquiera sin embargo, es más común en niños pequeños, adultos de 20 a 40 años de edad, y viajeros.

La prevalencia de giardiasis en México, oscila entre 7.4-68.5 % (SSA, 2010). Según el Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENEVACE), durante el mes de enero de 2010, el estado de Sinaloa presentó el

primer lugar de giardiasis a nivel nacional, seguido por el Distrito Federal, Chiapas, Estado de México, Oaxaca y Sonora.

Tomando en cuenta la prevalencia de giardiasis en el estado y los resultados obtenidos en estudios similares en Brasil, se han procesado propóleos provenientes de las regiones de Caborca, Ures y Pueblo de Álamos, Sonora, México, como extractos metanólicos, para ser evaluar su actividad antiproliferativa *in vitro* sobre los trofozoítos de *G. lamblia*.

Giardiasis

Aspectos Clínicos

G. lamblia es un protozooario binucleado y flagelado comúnmente identificado en el tracto gastrointestinal del ser humano y otros mamíferos. Es considerado el agente causal de la giardiasis intestinal, enfermedad cosmopolita que puede presentarse de forma asintomática, aguda o crónica. Generalmente presenta manifestaciones gastrointestinales asociadas a diarreas crónicas y mala absorción (Lujan 2006) Se presenta tanto en los países desarrollados como en los subdesarrollados y en vías de desarrollo, afecta a alrededor de 280 millones de personas a nivel mundial y se reportan 500,000 nuevos casos sintomáticos cada año (WHO, 1996) afectando principalmente a los viajeros y a la población infantil, siendo esta ultima la más vulnerable (Lane y col., 2002; Ali y col., 2003; Ankarkle y col., 2010).

La prevalencia de giardiasis en México varía dependiendo de la región pero se encuentra entre 7.4 % y 68.5 %, la variabilidad se encuentra directamente relacionada con las condiciones sanitarias y socioeconómicas de la región (Uribarren, 2010) (SSA, 2010). En el estado de Sonora, diversos estudios han informado de la presencia de infecciones por *G. lamblia*, tanto en población urbana como rural. Uno de los vectores evaluados en esta región ha sido el agua para consumo humano, encontrándose

concentraciones de 5 quistes/mL en la ciudad de Hermosillo y de 17 quistes/mL en la de Ciudad Obregón (Díaz y col., 2002). Según la Dirección de Epidemiología de la Secretaría de Salud, Sonora ocupa actualmente uno de los primeros lugares a nivel nacional (SSA, 2010).

Taxonomía

Este flagelado fue el primer protozoo humano observado al microscopio; visto por primera vez en 1681 por el científico holandés Anton van Leeuwenhoek quien lo encontró observando sus propias heces. En 1859 Vilém Lambl lo denominó como *Cercomonas intestinalis*; sin embargo, fue el parasitólogo norteamericano Charles Wardell Stiles quien, en el año de 1915, propuso la denominación *G. lamblia*, en honor al profesor A. Giard de Paris y del doctor V. Lambl de Praga (Adam, 2001).

Se han descrito alrededor de 40 especies de *Giardia*, en las que la clasificación depende del tipo de huésped que infecta. Vilem Lambl publicó una detallada descripción morfológica y propuso tres especies de *Giardia* basado en las diferencias de los cuerpos medianos que eran identificables por el microscopio óptico. Existen dos especies adicionales que son indistinguibles de *G. lamblia* por el microscopio de luz: *G. ardeae* (de garzas) y *G. psittaci* (de pericos), pero que han sido identificadas a partir de las diferencias morfológicas en estudios por microscopía electrónica. Otra especie, *G. microti*, ha sido descrita a partir de la especificidad de hospederos en ciertas especies de roedores (*Microtus* spp. y *Ondatra zibethicus*), las diferencias entre los quistes por microscopía electrónica (Adam, 2001) y en las secuencias de la pequeña subunidad ribosomal 18S comparandose con *G. lamblia* de origen humano (van Keulen y col., 2002).

G. lamblia ha sido ubicado taxonómicamente según la clasificación ampliamente aceptada de Levine (1980), como se refiere a continuación:

- Reino: *Protista*.
- Subreino: *Protozoa*.
- Phylum: *Sarcomastigophora*.
- Subphylum: *Mastigophora*.
- Clase: *Zoomastigophorea*.
- Orden: *Diplomonadida*.
- Familia: *Hexamitidae*.
- Género: *Giardia*.
- Especie: *lamblia*.

En tiempos recientes, la taxonomía de los protozoos parásitos propios del hombre ha sufrido importantes modificaciones, pues los flagelados, que antes se clasificaban en un sólo phylum: *Sarcomastigophora*, ahora se dividen en cuatro phylla: *Parabasalia*, *Percolozoa*, *Euglenozoa* y *Metamonoda*. La especie *G. lamblia* se ubica precisamente en este último phylum, *Metamonoda* (Nuñez 2004).

Morfología

G. lamblia tiene dos estadios: 1) El trofozoíto (forma vegetativa) cuyo hábitat es el intestino delgado donde actúa como agente causal de manifestaciones gastrointestinales y 2) el quiste, una forma resistente al medio externo y responsable de la propagación del parásito (Figuras 5 y 6).

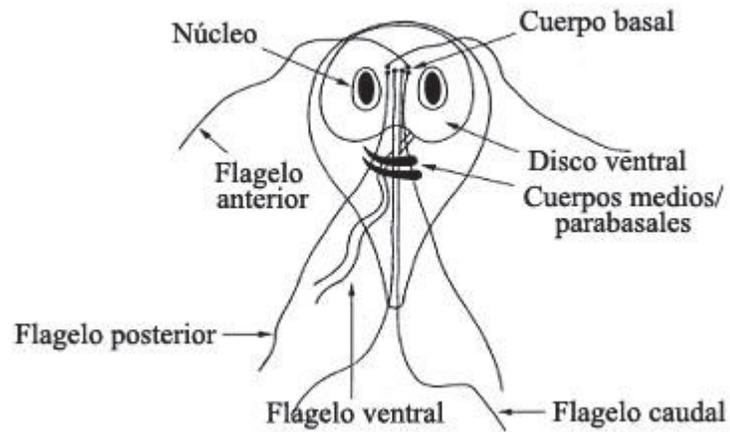


Figura 5. Trofozoíto de *G. lamblia*. Las flechas señalan los elementos que conforman el trofozoíto: Núcleo, cuerpo basal, flagelos, disco ventral y cuerpos medios. Tomado y traducido de Faubert, G., 2000.

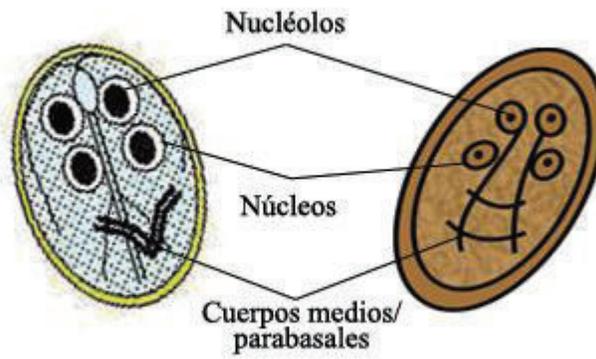


Figura 6. Quiste de *G. lamblia*. Comparación esquemática de un quiste de *G. lamblia*, basado en *American Society of Microbiology* (<http://www.microbelibrary.org>)

Los quistes poseen una forma ligeramente ovalada, miden de 8 a 14 μm de largo por 5 a 8 μm de ancho. Posee un citoplasma granular fino rodeado por una pared quística de 0.3 μm de un espesor que lo mantiene adosado a la membrana plasmática del parásito. La pared del quiste es retráctil y en su porción externa presenta una estructura fibrilar compuesta por 7 a 20 filamentos, la porción interna es membranosa y ambas están separadas por el espacio periplásmico.

Estudios por espectrometría de masas, cromatografía gaseosa y análisis enzimático de la pared del quiste, revelan que el azúcar mayoritario es la galactosamina en forma de N- acetilgalactosamina (GalNAc) (Adam, 2001; Lujan 2009). Se han observado axonemas y cuerpos medios en el citoplasma del quiste; en ejemplares inmaduros o recién formados se pueden encontrar dos núcleos mientras que los quistes maduros son tetra nucleados. Tanto en el caso de quistes recién formados como en los maduros se aprecia ausencia de mitocondrias, aparato de Golgi y retículo endoplásmico rugoso (Adam, 2001; Ankarklev y col., 2010). Los quistes, tienen la capacidad de mantenerse viables por periodos considerables de tiempo en condiciones ambientales normales y aún más expuestos a bajas temperaturas; tienen un alto grado de resistencia a los procedimientos de cloración y de ahí la gran habilidad de este parásito para mantenerse vivo y producir grandes epidemias originadas por el consumo de agua contaminada (Adam, 2001).

El trofozoíto posee una estructura piriforme, mide de 10 a 12 μm de largo por 5 a 7 μm de ancho, es convexo dorsalmente y con una concavidad ventral en la cual se encuentra el disco succionario o ventral. Posee cuatro pares de flagelos: dos anterolaterales y dos posterolaterales, dos ventrales y un par caudal, todos tienen su origen en ocho cuerpos parabasales colocados simétricamente en la línea media a la altura del borde superior de los dos núcleos idénticos (ambos ovoides y con el endosoma central bien diferenciado). (Adam, 2001).

Estos protozoos contienen cinco cromosomas y son poliploides y estructuras como las mitocondrias, el retículo endoplásmico rugoso y los nucléolos no han sido identificadas en ellos, lo que conforma la hipótesis de que este microorganismo evoluciono a partir de un eucariota primitivo (Adam, 2001). Su metabolismo anaerobio similar al de los procariotas hace que sea sensibles a algunos fármacos antibacterianos que actúan mediante la activación de radicales tóxicos, como es el caso de los nitroimidazoles (Upcroft y col., 2006).

Ciclo de Vida

La infección por *G. lamblia* ocurre por la ingesta de quistes contenidos en agua contaminada, por contacto directo de persona a persona o por higiene deficiente (transmisión fecal-oral). La transmisión por alimentos es menos común. En estudios de laboratorio se ha demostrado que la infección puede establecerse con tan solo 10 quistes (Lauwaet y col., 2007). El ciclo de vida está compuesto de dos estadios fundamentales: el quiste y el trofozoíto (estado vegetativo) (Figura 7).

Los quistes ingeridos llegan hasta el estómago y debido al contenido ácido del estómago se ven forzados a liberarse de la pared del quiste y emergen como trofozoítos, los cuales se replican de forma asexual por fisión binaria longitudinal. Los trofozoítos, colonizan el intestino delgado superior y se adhieren a la superficie del epitelio intestinal mediante su disco ventral o de adhesión (Lujan, 2006)

El cambio de pH, la disminución del colesterol, la adición de sales biliares y ácidos gástricos por parte del huésped, preparan al trofozoíto para la formación del quiste (enquistación) provocando cambios morfológicos y bioquímicos importantes, permitiendo una producción subsecuente de organelos (secretorios, de síntesis, de empaque, transporte y liberación de materiales) necesarios para la construcción de la

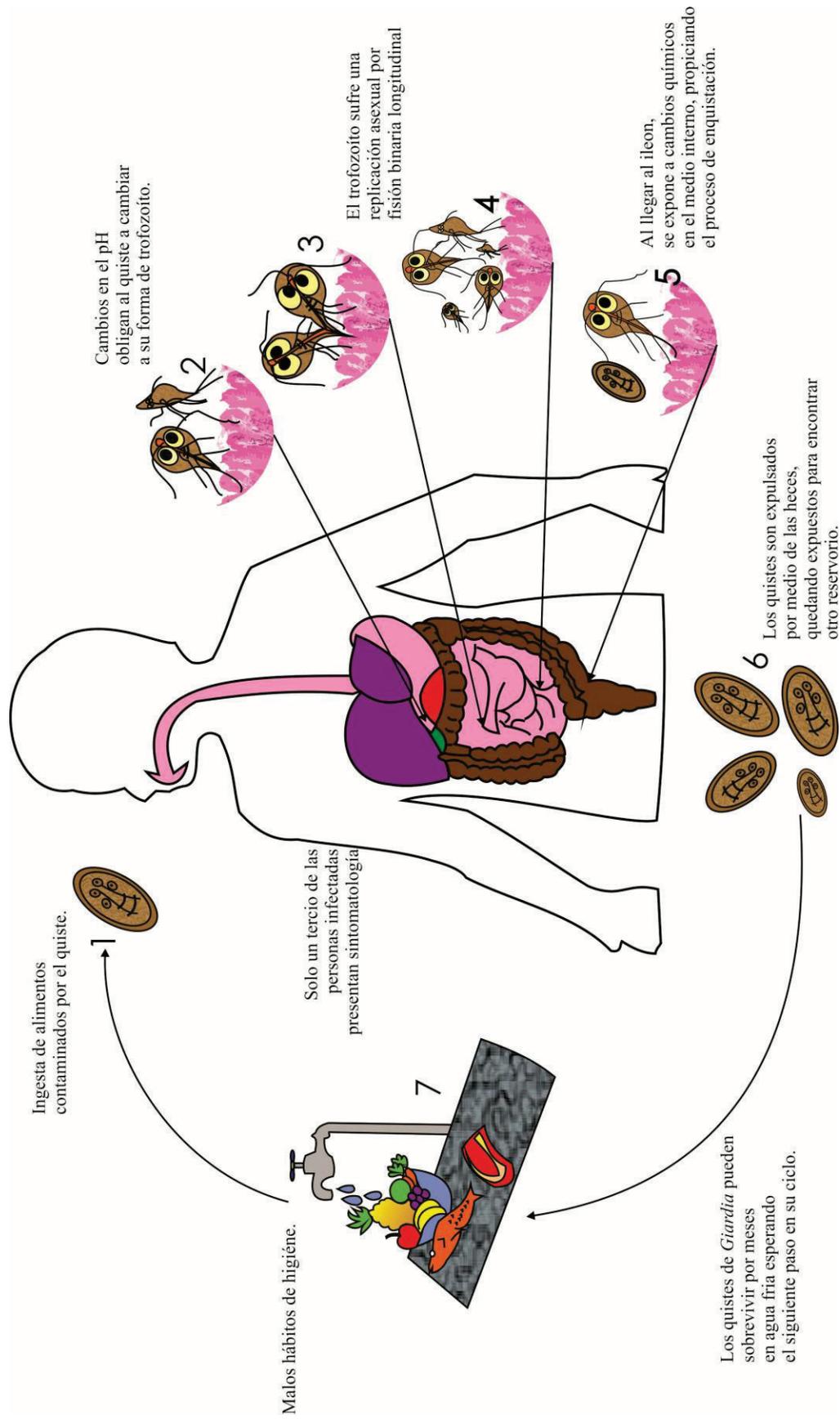


Figura 7. Ciclo biológico de *G. lamblia*.

pared quística (Adam, 2001) (Lujan, 2006; Prucca y col., 2009). Este proceso es llevado a cabo en el colon, donde se retraen los flagelos en los axonemas, el citoplasma se condensa y se liberan las proteínas necesarias para la construcción del quiste. Los quistes son expulsados del huésped a través de las heces, éstos representarán una amenaza potencial de infección para un nuevo huésped ya sea de forma inmediata por contacto fecal-oral o a largo plazo mientras se mantiene en el medio externo en su forma de quiste listo para iniciar un nuevo ciclo de infección (Adam, 2001; Lujan, 2006; Prucca y col., 2009).

Sintomatología y Patogenia

Las manifestaciones clínicas de la giardiasis son muy variadas e inespecíficas: dolor abdominal, náusea, vómito, en algunos casos, se puede presentar diarrea severa, estados de malnutrición y pérdida de peso, sin embargo, un alto porcentaje de personas cursan con giardiasis de forma asintomática (Adam, 2001; Syed, y col., 2003; Prucca y col., 2009). Los síntomas regularmente se presentan entre los 6-15 días después de la infección. En más del 85 % de los pacientes que cursan con giardiasis, la infección es un proceso autolimitado, indicando que el hospedero cuenta con mecanismos de defensa efectivos contra este parásito (Eckmann y col., 2001).

Los factores que podrían contribuir a la variabilidad de manifestaciones clínicas de la giardiasis incluyen la carga parasitaria ingerida, la virulencia de la cepa de *G. lamblia*, la edad del hospedero así como el estado de inmunocompetencia del mismo al momento de la infección (Faubert, 2000). En los casos sintomáticos, se ha observado aplanamiento de las microvellosidades intestinales, infiltración linfocitaria y malabsorción. En ocasiones, este acortamiento de las microvellosidades simula al presente en la enfermedad celíaca, sobre todo en individuos con hipogammaglobulinemia; sin embargo, no se ha observado invasión hística y a veces se

encuentra un gran número de trofozoítos en las criptas duodenales sin evidencias de trastornos patológicos (Núñez, 2004).

Otros mecanismos propuestos que podrían afectar la variabilidad de síntomas incluyen la disrupción del borde en cepillo causada por procesos inmunopatológicos, además, se plantea la interferencia mecánica por efecto de tapizado, que pueden producir los trofozoítos adheridos al duodeno, acompañados de la inflamación consecuente (Núñez, 2004). El papel protector de la microflora puede estar relacionado con la competencia por sustratos nutricionales, la competencia específica por sitios receptores en la mucosa intestinal, la producción de compuestos antimicrobianos y metabólicos que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos, y la amplificación de la respuesta inmune (Nash, 2002; Núñez, 2004).

Tratamiento

Actualmente los medicamentos más utilizados en el tratamiento de la giardiasis son los derivados de los 5-nitroimidazoles como: Tinidazol, ornidazol, secnidazol y nitazoxanida, así mismo el **metronidazol**; estos grupos de medicamentos presentan serios efectos secundarios que han motivado la búsqueda de tratamientos alternativos a esta parasitosis. Los benzimidazoles tales como el **albendazol** y mebendazol se han utilizado en cultivos de trofozoítos de *G. lamblia* reportando escasos efectos colaterales (Villalobos y col., 2001). Existen trabajos publicados donde el albendazol ha sido evaluado como anti giardiasico en guarderías y preescolares siendo administrado en dosis de 400 mg diarios durante tres a cinco días, demostrando una eficacia que va del 30 % al 97 % (Rodríguez-García y col., 1996). Las alteraciones encontradas en estudios *in vitro* por efecto del albendazol en los trofozoítos incluyen inhibición del crecimiento y la producción de grandes cambios morfológicos que ocasionan desprendimiento total de la pared del tubo de cultivo y por lo tanto pérdida de la viabilidad (Mayer y col., 2005). En estudios por microscopia de barrido se ha observado que este fármaco provoca

alteraciones importantes y grotescas en la forma celular del trofozoíto así como en el disco adhesivo. La observación al microscopio electrónico de transmisión muestra diversos grados de fragmentación del disco adhesivo, con una dispersión de los microtúbulos y de las microcintas en el citoplasma. El efecto de los benzimidazoles se debe entonces a las alteraciones que provocan en el citoesqueleto uniéndose a los microtúbulos cuyo componente principal es la β -tubulina (Mayer y col., 2005).

Otro fármaco que se ha sido utilizado en el tratamiento de la giardiasis es la cloroquina, tanto en estudios *in vitro* como en casos clínicos, mostrando buenos resultados pero estando solamente indicada por la FDA para tratamientos donde este contraindicado el metronidazol u otro nitroimidazol o cuando no se disponga de ellos (Brunton y col., 2009).

Dentro de las opciones terapéuticas potenciales se incluyen las combinaciones de intervenciones nutricionales y fitoterapia (Hawrelak., 2003) permitiéndonos tener en cuenta los efectos colaterales de algunos medicamentos y la posible presencia de cepas resistentes a los fármacos más utilizados (Upcroft y col., 2006). Se entiende pues, que el consumo de algunos productos fitoterapéuticos podría presentarse como una alternativa útil a aquellos fármacos con importantes efectos nocivos o tóxicos y que son utilizados tradicionalmente para mejorar los síntomas y eliminar la infección (Hawrelak 2003).

En la actualidad se profundizan los estudios en los productos de origen natural como los propóleos con el fin de buscar compuestos, fracciones eficaces, con pocas reacciones colaterales y que puedan, ser efectivas en dosis únicas.

HIPOTESIS

Los propóleos provenientes de las regiones de Caborca, Ures y Pueblo de Álamos, Sonora, poseen actividad antiparasitaria en el crecimiento *in vitro* de trofozoítos de *G. lamblia*.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad de propóleos obtenidos de las regiones de Caborca, Ures y Pueblo de Álamos, Sonora, sobre el crecimiento *in vitro* de trofozoítos de *G. lamblia*.

Objetivos Específicos

1. Estandarizar un ensayo *in vitro* para la evaluación de actividad antiproliferativa de propóleos sobre los trofozoítos de *G. lamblia*.
2. Evaluar la actividad de propóleos obtenidos de las regiones Sonorenses (PC, PU y PPÁ) sobre el crecimiento *in vitro* de trofozoítos de *G. lamblia*
3. Evaluar la actividad de propóleos de Ures recolectados en diferentes temporadas (invierno, primavera, verano y otoño) sobre el crecimiento *in vitro* de trofozoítos de *G. lamblia*.
4. Analizar la actividad del CAPE (éster fenetílico del ácido caféico), sobre el crecimiento *in vitro* de trofozoítos de *G. lamblia*.
5. Evaluar la actividad de extractos de propóleos (hexánico, etéreo y de acetato de etilo) de Caborca sobre el crecimiento *in vitro* de trofozoítos de *G. lamblia*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estandarización del Ensayo de Actividad Antiproliferativa de Propóleos sobre los Trofozoítos de *G. lamblia*

Cultivo de *G. lamblia*

Para la realización del presente trabajo, se utilizaron trofozoítos de *G. lamblia* cepa GS/M-83-H7 (ATCC50581), los cuales se mantuvieron en medio de cultivo de TYI-S33 suplementado con suero de ternera recién nacida (NBCS. GIBCO. Invitrogen) al 10 %, a 37° C, Ceftriaxona 100 µg/mL y en condiciones microaerofilicas (Anexo 1) (Keister, 1983; Núñez Fernández, 2004).

Uso del DMSO como Disolvente de Propóleos

Para poder evaluar la actividad antiparasitaria de los propóleos fue necesario el uso de un solvente. Se eligió utilizar dimetil sulfóxido (DMSO) ya que ha sido probada su utilidad como disolvente de propóleos. Se establecieron las concentraciones óptimas de DMSO para el desarrollo y crecimiento del cultivo a experimentar. Para ello se realizaron ensayos de proliferación por triplicado a diferentes concentraciones seriadas en tubos de 2 mL de vidrio con tapadera de rosca (FISHER 03-339-21A) en medio de TYI-S33. Se utilizó una concentración de 1×10^5 trofozoítos/mL (2 mL) y se observó el crecimiento del cultivo durante 48 horas. Al término de este tiempo se evaluó la viabilidad celular utilizando un hematocitómetro mediante el colorante de azul de tripán (Sigma. St. Louis MO) (Anexo 2).

Uso de Albendazol como Control de Inhibición

Para evaluar el ensayo de proliferación de los trofozoítos de *G. lamblia* fue necesario utilizar una droga anti-giardiasica para funcionar como grupo control de inhibición. Se seleccionó albendazol, un antiparasitario con eficacia probada sobre *G. lamblia*. Se realizaron ensayos de proliferación celular por triplicado a diferentes concentraciones seriadas en tubos de 2 mL de vidrio con tapadera de rosca (Wheaton 224881) en medio de TYI-S33 con una concentración de 1×10^5 trofozoítos/mL (2 mL) y con seguimiento de 48 horas.

Recolección y Obtención de los Propóleos Sonorenses

Los propóleos se recolectaron durante los meses de junio del 2001 a febrero del 2003, a partir de varias colmenas colocadas en los alrededores de Pueblo de Álamos (N29°15'W109°59'). El propóleo de Caborca (N30°46'W112°05'), fue recolectado entre marzo y junio del 2006 mientras que en Ures (N29°27'W110°22'), la recolección se realizó por temporadas, entre los meses de marzo del 2008 y marzo del 2009 (Figura 8) siendo almacenados a -20°C hasta su uso.

Obtención de Extractos Metanólicos

Se registró el peso total de cada uno de los propóleos recolectados (Tabla 3) y se procedió a molerlos hasta obtener una mezcla dispersa, a la cual se le adicionaron 300 mL de metanol grado reactivo (MeOH Sigma, proporción 1:9) y se mantuvo en agitación durante 4 horas para posteriormente ser conservada en reposo, en ausencia de luz y a temperatura ambiente por 24 h. Después del tiempo en reposo, se retiró el contenido que fue soluble en metanol y se colocó en un agitador mecánico durante 6 horas, para después pasar a reposo en oscuridad y a temperatura ambiente por 18 horas. Este proceso de agitación se repitió por 5 días consecutivos. Posteriormente, la solución

se filtró sobre una tela de algodón con la finalidad de eliminar restos sólidos como madera, tallos y piedras y enseguida se filtró con papel whatman de poro grueso para eliminar partículas de polvo. El filtrado se concentró en un Rotavapor-Buchi y un baño Rotavapor-Buchi-Heating-bath (B-490) a 56°C bajo presión reducida durante 30 minutos. Este procedimiento se repitió 3 veces hasta obtener el extracto metanólico con una consistencia viscosa de color café claro, con olor característico y sabor amargo. Al finalizar la extracción se almacena en frascos de 10 mL protegido de la luz envuelto en papel aluminio a temperatura ambiente.

Evaluación de la Actividad Antiparasitaria de los Extractos Metanólicos de los Propóleos Sonorenses

Para evaluar la actividad antiparasitaria de los extractos de los propóleos MeOH se utilizaron trofozoítos de *G. lamblia* cepa GS/M-H7 (ATCC50581). Se realizaron soluciones en medio de cultivo TYI-S33 para obtener diluciones en concentraciones de 200, 100, 50 y 25 µg/mL de cada uno de los extractos. El ensayo se realizó en tubos de 2 mL con 1×10^5 trofozoítos/mL, incubados a 37 °C por 12 horas en medio de cultivo TYI-S33. Los tubos fueron agrupados en conjuntos de 3 para facilitar su manejo, de tal forma que existía un set de 3 tubos para cada concentración de extracto. Se tomaron 100 µL de cada una de las concentraciones y se adicionaron por triplicado. A otro conjunto de estos tubos se les adicionó albendazol como control de inhibición. Así mismo se trabajó otro conjunto con DMSO como control de referencia y un último conjunto como control de crecimiento normal. Una vez adicionados, se incubaron a 37 °C por 72 horas siendo monitoreados cada 24 horas. Una vez cumplido el tiempo de incubación, fueron colocados en agua con hielo por un periodo de 20 minutos para lograr el desprendimiento de los trofozoítos de la pared del tubo para posteriormente ser evaluados utilizando una cámara de Neubauer. Los resultados fueron graficados en el programa Microsoft Excel 2007.

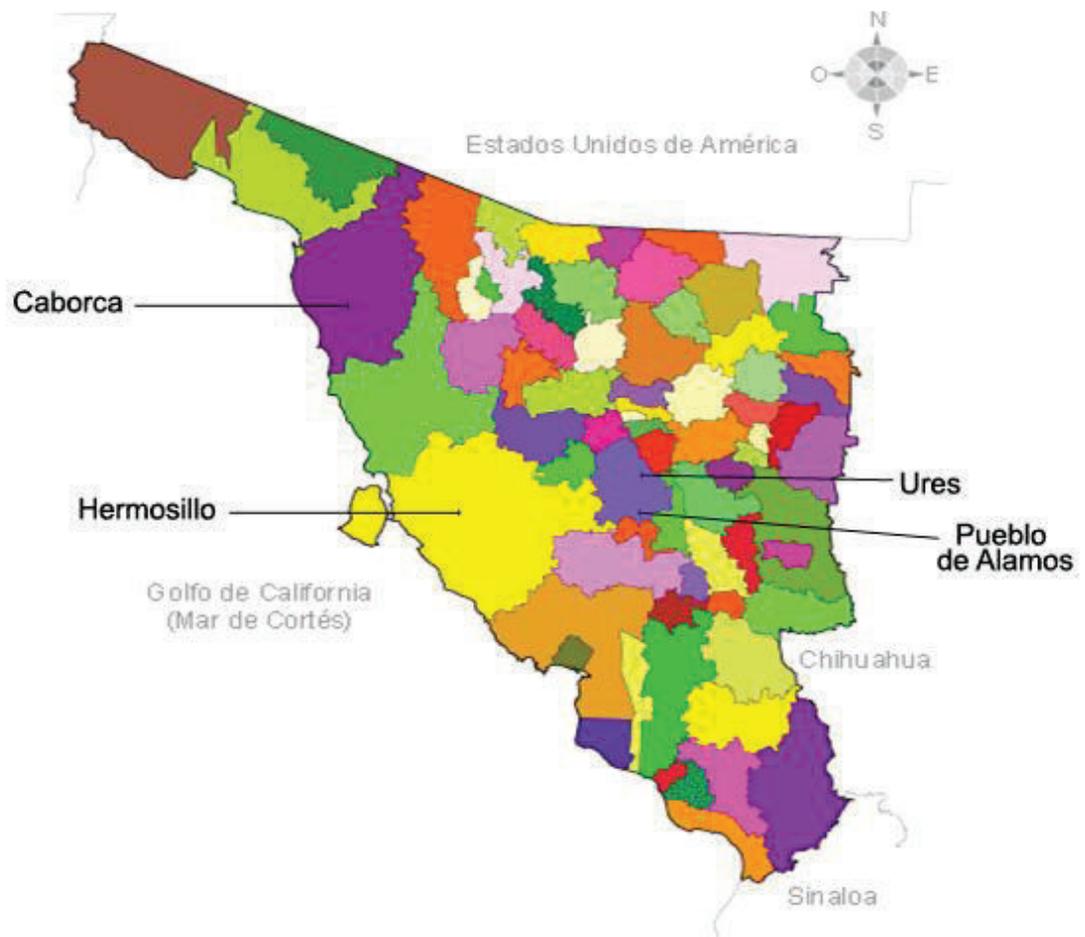


Figura 8. Mapa de Sonora. Lugar de recolección en las regiones de Caborca, Pueblo de Álamos y Ures. Fuente: INEGI. Marco Geoestadístico municipal 2005

Evaluación de la actividad antiparasitaria del CAPE

Uno de los constituyentes encontrados en los propóleos de Ures conocido como éster fenético del ácido caféico (CAPE, sintetizado por el laboratorio de biopolímeros del CIAD A. C.), ha sido probado por su actividad antiproliferativa ante las células de M12.A^K-C3F6, los resultados (Figura 9) demuestran que el CAPE posee actividad antiproliferativa. Por tal motivo se ha determinado conocer si el CAPE es capaz de inhibir la proliferación celular de los trofozoítos de *G. lamblia*. Para ellos se realizaron ensayos de proliferación celular en cultivos axénicos de trofozoítos de *G. lamblia* haciendo uso de la misma técnica utilizada para los extractos metanólicos pero a concentraciones de 75, 150, 300 y 600 µM.

Obtención del Extracto Hexánico, Etéreo y de Acetato de Etilo de Caborca

Para obtener el extracto hexánico se tomaron 7.1 gr del extracto metanólico y se trataron con 100 mL de hexano manteniéndose en agitación constante durante 12 horas, tiempo tras el cual se almacenó en una campana de extracción y en oscuridad por 12 horas para después ser agitado nuevamente; este procedimiento se repitió en 3 ocasiones. La parte soluble se filtró sobre papel whatman de poro grueso utilizando una bomba de vacío. Un vez filtrado, se concentró en un Rotavapor-Buchi bajo presión reducida a una temperatura aproximada de 40 ° C en donde se obtuvieron 0.4 gr de un sólido amarillo viscoso que fue etiquetado como Extracto Hexánico (EH).

La parte insoluble en hexano se disolvió en éter etílico y se procesó de la misma forma que los demás extractos. Como resultado se obtuvieron 4.9 gr de extracto etéreo (EE). La porción insoluble en éter etílico se disolvió en acetato de etilo y se obtuvieron 0.6 gr de extracto de acetato de etilo (ATOE).

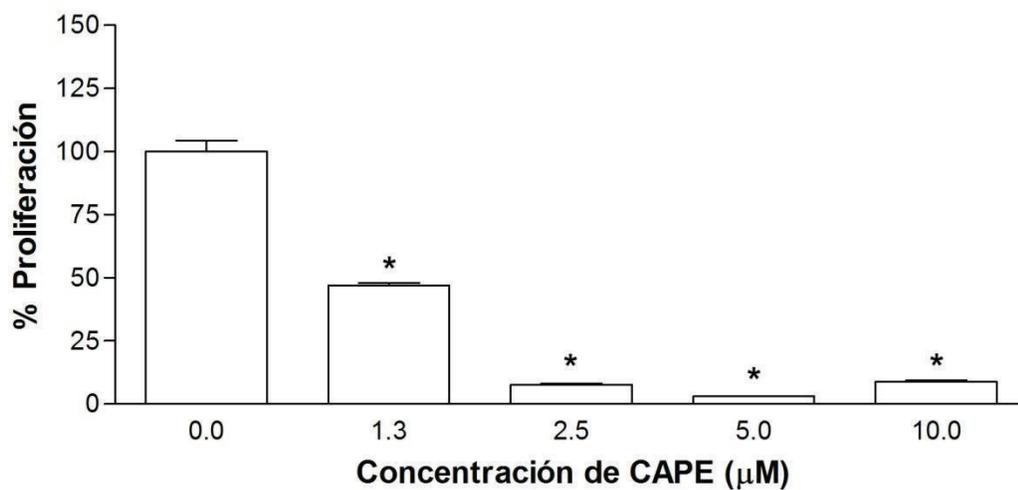


Figura 9. Evaluación del CAPE sobre la línea celular M12.A^K.C3F6. La proliferación celular se evaluó a las 48 horas posteriores a la adición del solvente al cultivo celular. Como cultivo control (0) se utilizaron cultivos celulares en presencia de la máxima concentración del disolvente requerido para los compuestos (0.5 % de DMSO). Datos proporcionados por Q.B. Jesús Efraín Alday Noriega

Evaluación de la Actividad Antiparasitaria de los Extractos de Acetato de Etilo y Etéreo de Caborca

La evaluación de la actividad antiparasitaria de los extractos de acetato de etilo y etéreo de Caborca se llevó a cabo utilizando el mismo procedimiento que se utilizó con los extractos metanólicos, trabajando siempre por triplicado.

Purificación del Extracto Hexánico y Etéreo de Caborca

Se sometieron 0.5 gr de extracto hexánico de Caborca a un estudio por cromatografía en columna de vidrio (65 x 3 cm), con una fase estacionaria de sílica gel 60, con tamaño de partícula 0.04-0.063 mm, en la fase móvil se añadieron una mezcla de hexano/acetato de etilo en gradientes 95:5 y soluciones sucesivas de la misma mezcla de: 90:10, 80:20, hasta 100% de acetato de etilo.

El avance en la purificación se evaluó por cromatografía en capa fina, usando cromatófilos de sílica gel 60 (0.2 mm grosor), F-254 (1x5 cm), los cuales fueron observados con luz UV de 254 y 365 nm, y revelados mediante exposición a vapores de yodo o soluciones de ácido sulfúrico al 10 %. Los compuestos se concentraron en viales de vidrio de 60 mL y fueron evaporados al vacío a 40 °C.

Análisis Estadístico

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) utilizando las pruebas de comparación múltiple de Duncan y Turkey-Kramer utilizando el paquete estadístico Number Cruncher Statistical Software (NCSS 2000).

RESULTADOS

Para cumplir con los objetivos del proyecto fue necesaria la recolección de muestras de propóleos de diferentes regiones del estado de Sonora: Caborca (PC), Pueblo de Álamos (PPA) y Ures (PU), haciendo en este último, una recolección por estaciones. En estudios anteriores sobre los propóleos regionales, realizados en esta misma institución, se encontró que los propóleos provenientes de la región de Ures, Sonora, poseían una importante actividad antiproliferativa sobre líneas celulares, por lo que actualmente se llevan a cabo investigaciones para determinar si la composición de los propóleos y si ésta, varía dependiendo de la época del año en que son recoletados y como estos cambios afectan a la actividad antiproliferativa (Acosta, 2007; Hernández, 2007) Con este conocimiento y la disponibilidad de los extractos, se decidió probar también los extractos de temporalización de Ures sobre los trofozoítos de *G. lamblia* (GS/M-H7). En la Tabla III se muestran los datos finales de la recolección de propóleos.

Estandarización del Ensayo de Actividad Antiproliferativa de Propóleos Sobre Trofozoítos de *G. lamblia*

Uso del DMSO como disolvente de propóleos

Con el fin de establecer un ensayo *in vitro* para evaluar la actividad antiproliferativa de los propóleos sobre los trofozoítos *G. lamblia*, fue necesario estandarizar la concentración óptima del disolvente de los propóleos, dimetil sulfoxido (DMSO). Se evaluaron diferentes concentraciones de DMSO (0.0-0.5%) para el ensayo de antiproliferación de *G. lamblia*. En la figura 10 se observa el efecto del DMSO sobre la proliferación del cultivo del parásito. A partir de una concentración de 0.06 % de DMSO

Tabla III. Datos de la recolección de los propóleos sonorenses utilizados en esta investigación.

Propóleos	Coordenadas (Área de Recolección)	Fecha de Recolección	Cantidad de muestra	Cantidad de extracto metanólico	Rendimiento
Caborca	30° 46' 844" N; 112° 05' 441" W	-	54.8 gr	22.52 gr	41.09 %
Pueblo de Álamos	29° 07' 129" N; 110° 07' 760" W	Nov 2003 a Mar 2004	138.5 gr	27.226 gr	19.65 %
Úres	29° 27' 197" N; 110° 23' 523" W				
▪ Primavera		21/Mar/08 a 22/Jun/08	236 gr	164 gr	69
▪ Verano		23/Jun/08 a 23/Sept/08	60 gr	39.5 gr	65.8
▪ Otoño		24/Sept/08 a 21/Dic/08	8 gr	3.9 gr	48.7
▪ Invierno		22/Dic/08 a 21/Mar/09	45 gr	27 gr	60

La recolección inicia con la colocación de mallas sobre las colmenas de abejas. Las mallas permanecen en la colmena durante el plazo de recolección, posteriormente es retirada y almacenada a bajas temperaturas. El propóleo ya congelado es retirado de la malla y se procesa en el laboratorio para la obtención de extractos.

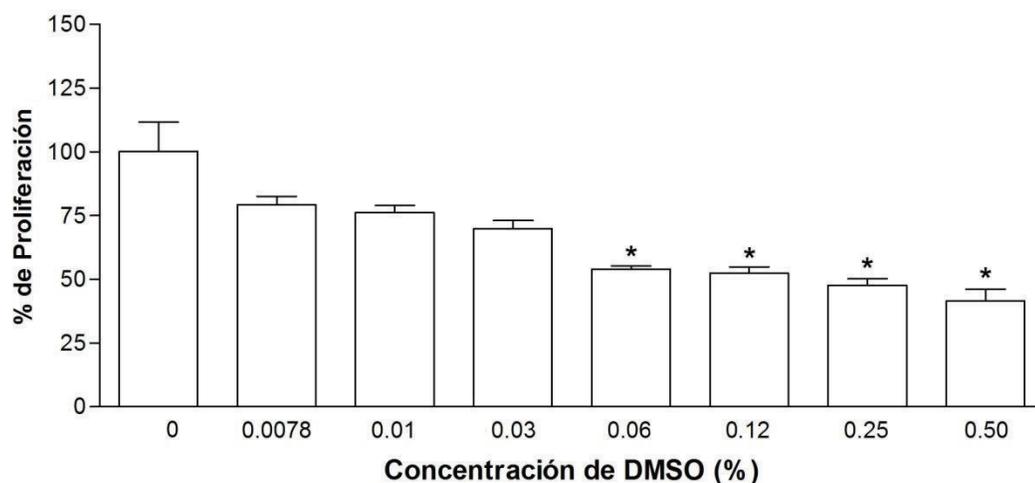


Figura 10. Efecto del DMSO en el crecimiento de *G. lamblia*. La proliferación celular se evaluó a las 72 h. posteriores a la adición del solvente al cultivo celular. Como cultivo control (0) se utilizaron cultivos normales en crecimiento en fase logarítmica en medio TYI- S33, todos los ensayos se realizaron por triplicado ($\bar{X}+DE$). Los asteriscos muestran diferencias significativas con respecto al cultivo control.

sobre la proliferación del cultivo del parásito. A partir de una concentración de 0.06% de DMSO en los cultivos de *G. lamblia*, se observó una inhibición significativa (35% de inhibición) en la proliferación de los trofozoítos.

Uso de Albendazol como Control de Inhibición de la Proliferación de Trofozoítos de *G. lamblia*

Con el fin de evaluar la actividad inhibitoria de los propóleos sobre los trofozoítos *G. lamblia*, fue necesario incluir un compuesto de referencia en los ensayos de inhibición de la proliferación de trofozoítos, para lo cual se requirió utilizar una de las drogas utilizadas actualmente como agentes antiparasitarios. El albendazol, conocido como un antiparasitario eficaz en el tratamiento de giardiasis en adultos (Karabay y col., 2003), fue elegido como antiparasitario control y sometido a evaluación en diferentes concentraciones (60 y 120 μ M) (Figura 11) (Anexo 3).

Los cultivos tratados con albendazol mostraron cambios morfológicos notables. Mientras que un cultivo normal de trofozoítos se adhiere a la superficie del tubo de cultivo mostrando elementos piriformes y ligeramente alargados, aquellos tratados con albendazol presentaron un grado de desprendimiento de hasta 90%, tornándose en su mayoría redondeados y con un incremento en su tamaño. Después de 72 horas de exposición al fármaco, se hizo evidente la fragmentación de las células, se observó desprendimiento total de la superficie del cristal, disminución del movimiento flagelar (aunque no totalmente) y detritos celulares, datos que indican la pérdida de la viabilidad celular (Figura 12). Los resultados mostraron que una concentración de albendazol de 60 μ M es capaz de inhibir la proliferación de trofozoítos de *G. lamblia* cepa GS/M-H7 en aproximadamente un 94.9%.

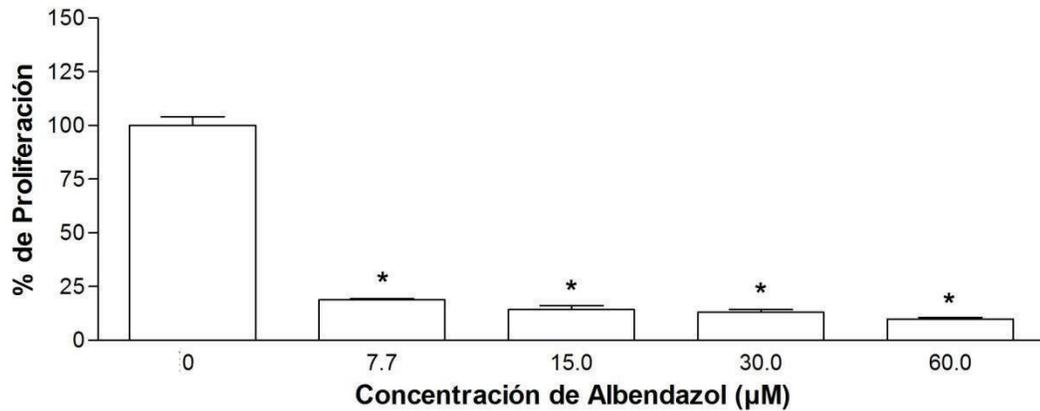


Figura 11. Uso del albendazol como control de inhibición de la proliferación de trofozoítos de *G. lamblia*. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado (\bar{X} +DE) y evaluados a las 72 h. posteriores a la adición del albendazol. Como cultivo control (0) se utilizaron cultivos normales en fase logarítmica en medio TYI-S33. Los asteriscos muestran diferencias significativas con respecto al cultivo control ($P < 0.05$). Los datos de la gráfica pertenecen a un ejercicio representativo de por lo menos tres experimentos.

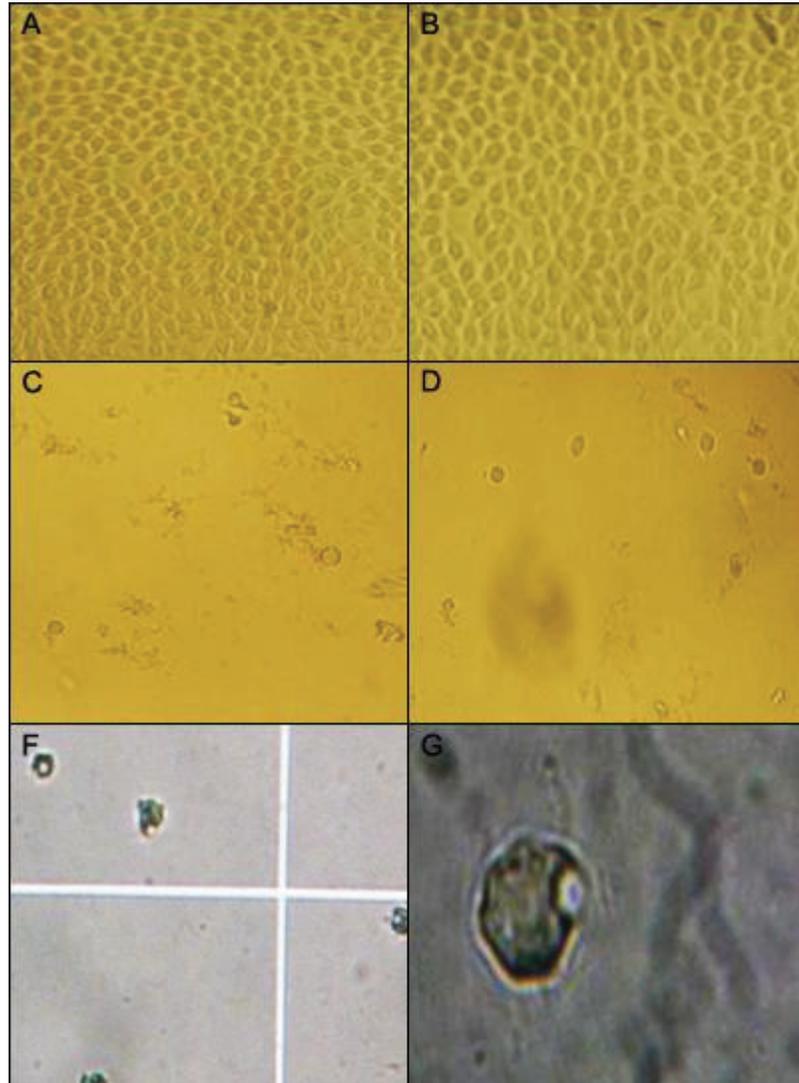


Figura 12. Cambios morfológicos inducidos por albendazol sobre los trofozoítos de *G lamblia*. Las figuras **A** (20x) y **B** (20x) muestran cultivos axénicos normales de *G. lamblia* en medio de TYI-S33. Las figuras **C** (40x) y **D** (40x) muestran microfotografías de un cultivo tratado con una concentración de albendazol de 12 μ M, 24 horas posteriores a la incubación. **F** (40x) y **G** (40x adicionalmente, se aumentó la imagen por computadora) muestran trofozoítos tratados con albendazol, 72 horas posteriores a la incubación montados en una cámara de Neubauer utilizando azul de tripán.

Evaluación de la Actividad Antiparasitaria de los Extractos Metanólicos de los Propóleos Sonorenses

Estudios recientes en los laboratorios del Departamento de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad de Sonora, han demostrado que los propóleos de Ures poseen una importante actividad antibacteriana (Velázquez y col., 2007) y antiproliferativa en líneas celulares cancerígenas (Hernández y col., 2007). Con el objetivo de determinar si los propóleos sonorenses afectan la proliferación de *G. lamblia*, se prepararon extractos metanólicos de estos productos naturales y se evaluó su actividad en los ensayos de antiproliferación.

Los extractos de temporalización de Ures mostraron una inhibición significativa en la proliferación celular con respecto al grupo control. Los resultados de los ensayos donde se utilizaron extractos de pueblo de Álamos y Caborca no probaron ser significativos como inhibidores de la proliferación del parásito. En la figura 13 se observa el efecto antiparasitario de los diferentes extractos metanólicos de temporalización de Ures por cada concentración trabajada, siendo el extracto de verano el que mostró mayor actividad antiparasitaria (92.1% a 200µg) seguido por el de invierno (85.9% a 200µg), otoño (71.1% a 200µg) y por último el extracto de primavera (53.6 % a 200µg).

Cambios Morfológicos Inducidos por el Extracto Metanólico

En un cultivo normal, los trofozoítos se adhieren a la superficie del tubo, mostrando elementos piriformes y ligeramente alargados y solos algunos redondeados y despegados de la pared, sin embargo, al adicionar los propóleos en sus diferentes concentraciones a los cultivos, estos mostraron células redondeadas, tumefactas, con movimientos lentos, algunas células mostraron un cuerpo más alargado y entre un 40-80% se desprendieron de la superficie del cristal. Al final de la incubación se observaron detritos celulares (Figura 14).

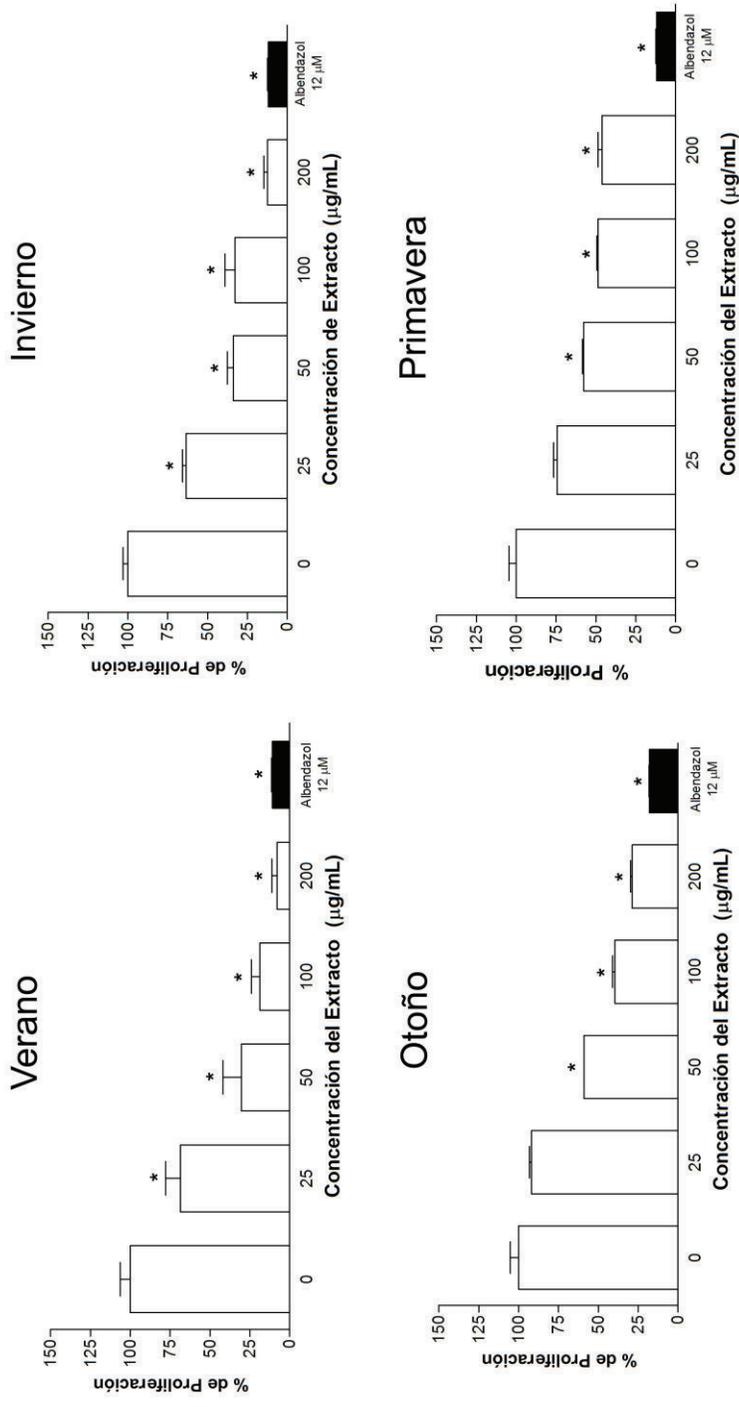


Figura 13. Evaluación de la actividad antiparasitaria de los extractos metanólicos de temporalización de Ures sobre los trofozoítos de *G. lamblia*. Ensayo realizado por triplicado (\bar{X} +DE), evaluado a las 72 h. Los asteriscos muestran diferencias significativas con respecto al cultivo control. **Verano.** El porcentaje de inhibición a la máxima concentración probada fue de 92.1 %. **Invierno.** 85.9% de inhibición. **Otoño.** 71.1% de inhibición. **Primavera.** 53.6% de inhibición. Esta gráfica representa el promedio de los resultados obtenidos en los diferentes ensayos y es por lo tanto representativa de todos los experimentos

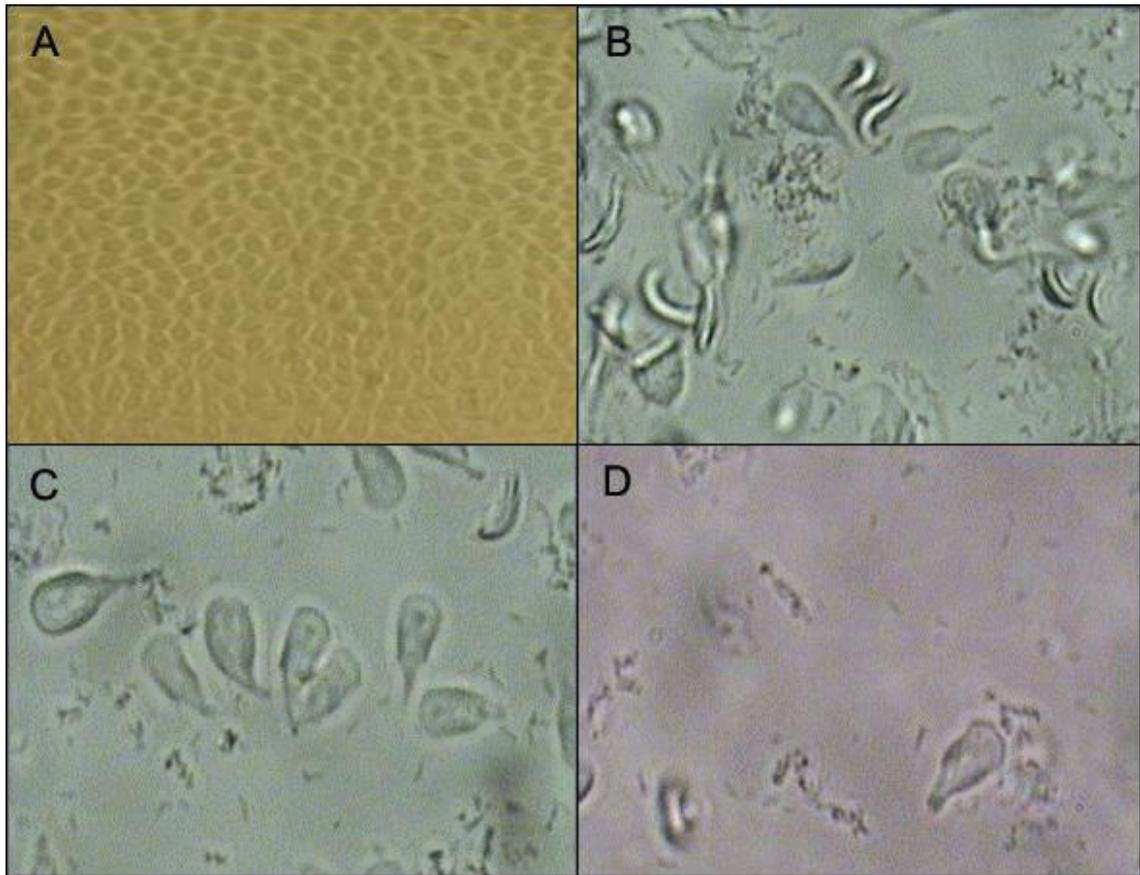


Figura 14. Cambios morfológicos inducidos por la presencia del extracto metanólico de los propóleos sonorenses de temporalización de verano de Ures. **A** (20x) Se muestra el cultivo celular incubado con medio de TYI, en donde se observan células adheridas normalmente al cristal. **B** (40x) Se observan células incubadas en DMSO. **C** (40x) y **D** (40x + 1.6 x) Se muestran los cambios morfológicos producidos por el extracto a las 72 horas posteriores a la incubación En una concentración de 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente. Las imágenes B, C y D fueron obtenidas utilizando un microscopio Olympus 1x71 invertido.

En el caso del extracto metanólico de Pueblo de Álamos (EMPA) no se observaron cambios morfológicos como los mencionados anteriormente, sin embargo se observó una disminución notable en el porcentaje de adherencia al tubo y una inhibición en la proliferación celular de 54.97% en una dosis de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (la máxima concentración analizada) (Figura 15). A diferencia de los otros extractos anteriormente mencionados, el extracto metanólico de Caborca no mostró cambios morfológicos ni disminución significativa en la adherencia de los trofozoítos al tubo. (Figura 16).

Evaluación de la Actividad Antiparasitaria del CAPE

Dentro de los constituyentes de los propóleos de Ures que poseen una potente actividad antiproliferativa sobre células cancerígenas se encuentra el éster fenético del ácido cafeico (CAPE) (Hernández y col., 2007; Banskota y col., 2002). Con el fin de evaluar el efecto del CAPE sobre el crecimiento *in vitro* de trofozoítos se realizaron ensayos de proliferación antiparasitaria. Se observó que CAPE no presentó una actividad inhibitoria significativa (< 40% de inhibición a 600 μM) sobre el crecimiento de *G. lamblia* a las concentraciones estudiadas (0-600 μM) (Figura 17).

Evaluación de los Extractos Hexánico, Etéreo y de Acetato de Etilo de Caborca

Con el fin determinar cuál de estos extractos en estudio es el que presenta mayor actividad, se realizaron ensayos de proliferación celular contra los trofozoítos de *G. lamblia*. Una vez analizados los resultados del ensayo se determinó que los extractos hexánico, etéreo y acetato de etilo de Caborca no presentaron una actividad inhibitoria significativa sobre el crecimiento de *G. lamblia* (Anexo 5).

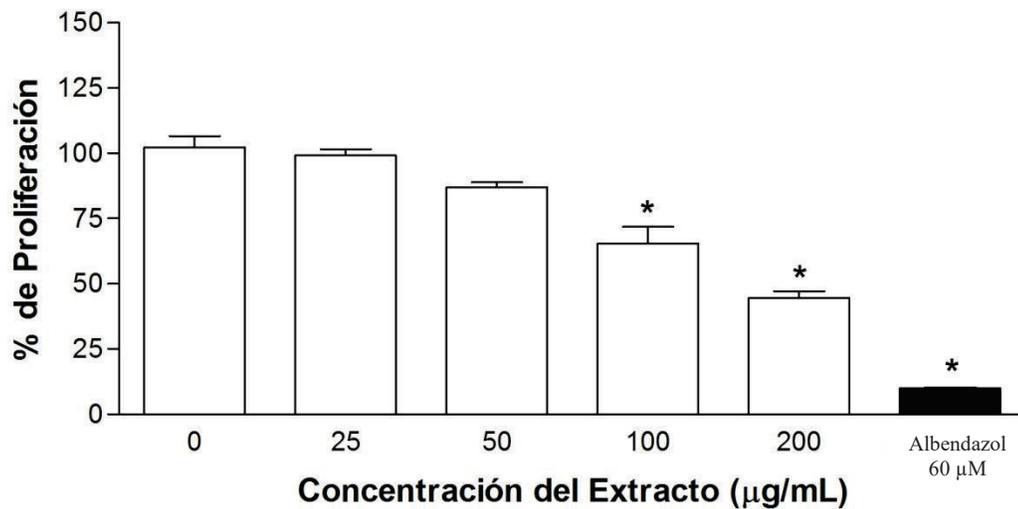


Figura 15. Evaluación de la actividad antiparasitaria del extracto metanólico de Pueblo de Álamos (EMPA). Esta gráfica muestra resultados representativos de por lo menos 3 ensayos donde el porcentaje máximo de inhibición de la proliferación de *G. lamblia* obtenido con el extracto metanólico de Pueblo de Álamos fue de 54.9 %. Los ensayos se realizaron por triplicado (\bar{X} +DE) y fueron evaluados a las 72 h. posteriores a la adición del extracto. Como cultivo control (0) se utilizaron cultivos normales en crecimiento en fase logarítmica en medio TYI- S33. Los asteriscos muestran diferencias marcadamente significativas con respecto al cultivo control.

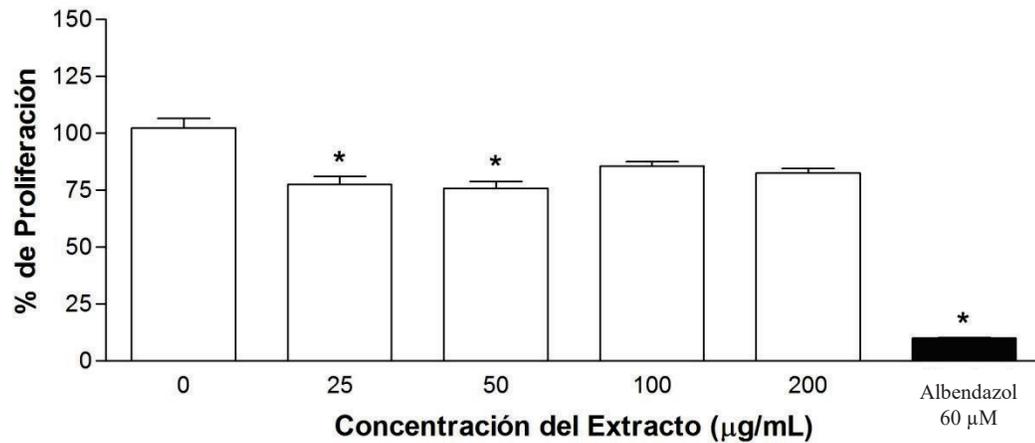


Figura 16. Evaluación de la actividad antiparasitaria del extracto metanólico de Caborca (EMC). Esta gráfica muestra resultados representativos de por lo menos 3 ensayos donde el porcentaje máximo de inhibición de la proliferación de *G. lamblia* obtenido con el extracto metanólico de Caborca fue de 16.9 %. Los ensayos se realizaron por triplicado (\bar{X} +DE) y fueron evaluados a las 72 h. posteriores a la adición del extracto. Como cultivo control (0) se utilizaron cultivos normales en crecimiento en fase logarítmica en medio TYI- S33. Los asteriscos muestran diferencias significativas con respecto al cultivo control.

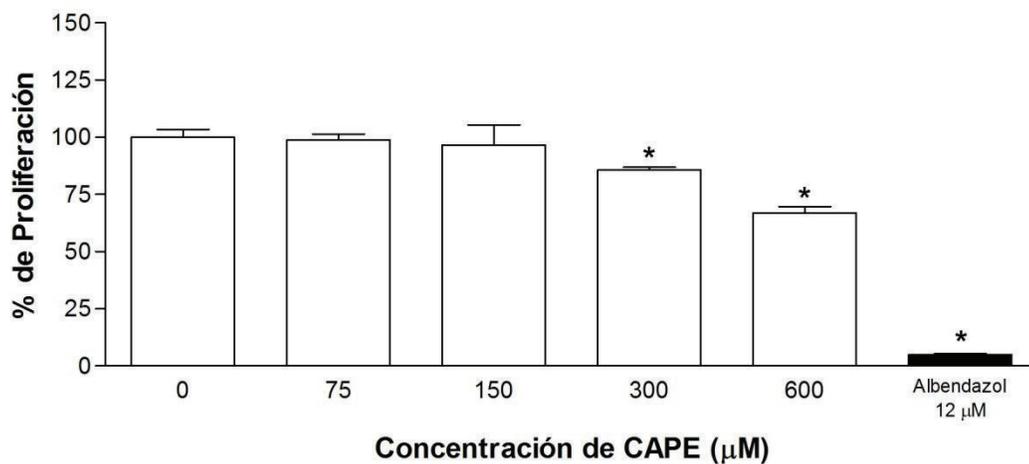


Figura 17. Evaluación de la actividad antiparasitaria del CAPE. Esta gráfica muestra resultados representativos de por lo menos 3 ensayos donde el porcentaje máximo de inhibición de la proliferación de *G. lamblia* obtenido con la adición de CAPE fue de 33 %. Los ensayos se realizaron por triplicado (\bar{X} +DE) y fueron evaluados a las 72 h. posteriores a la adición del extracto. Como cultivo control (0) se utilizaron cultivos normales en crecimiento en fase logarítmica en medio TYI- S33. Los asteriscos muestran diferencias significativas con respecto al cultivo control.

DISCUSIÓN

Los propóleos del Estado de Sonora han sido atribuidos con importantes propiedades antibacterianas (Velázquez y col., 2007) y antiproliferativas en líneas celulares cancerígenas (Hernández y col., 2007) Esta investigación demuestra que algunos de ellos también pueden ser atribuidos con la actividad antiproliferativa en parásitos.

En el presente trabajo fue necesario establecer un método para evaluar la actividad antiproliferativa *in vitro* de propóleos, preparación de extractos y lectura de los resultados. Mientras Freitas y col, procesaron sus propóleos como extractos etanólicos, los propóleos sonorenses fueron procesados como extractos metanólicos, ya que el etanol, posee un punto de ebullición más alto y por lo tanto la aplicación de mayor temperatura a los propóleos para obtener los extractos sólidos. Los extractos ya procesados fueron adicionados en distintas concentraciones a los cultivos de *G. lamblia* que, al igual que Freitas y col., 2004, utilizaron medio de cultivo TYI-S33. Todos los ensayos de esta investigación fueron trabajados por triplicado en viales de vidrio de 2ml y posteriormente evaluados por lectura en cámara de Neubauer. Inicialmente, se pretendía hacer la lectura de resultados utilizando el método colorimétrico descrito por Kang y col., 1998, sin embargo, no fue reproducible en nuestras manos. Se optó por utilizar el método de lectura en cámara de Neubauer ya que existía el antecedente de su uso en estudios similares (Freitas y col., 2004). El método antiproliferativo establecido permitió evaluar adecuadamente la actividad inhibitoria de los propóleos sobre el crecimiento *in vitro* de *G. lamblia*.

Mientras Freitas y col., 2004, utilizaron metronidazol como control de inhibición, en este proyecto se tomó la decisión de utilizar albendazol, un fármaco antiparasitario que en ensayos demostró un poder inhibitorio similar al metronidazol (Karabay y col., 2003) y el cual, según literatura farmacológica, posee menos efectos secundarios en su terapéutica *in vivo*. Los fármacos benzimidazólicos como el albendazol, actúan

inhibiendo la polimerización de microtúbulos por unión a las β -tubulinas del citoesqueleto, acción que los convierte en un agente selectivo para parásitos (Brunton y col., 2009). Los trofozoítos expuestos a albendazol mostraron cambios evidentes en su estructura, se observó tumefacción, vacuolación, fragmentación y desprendimiento del tubo; por otro lado, los expuestos al extracto Ures-verano (92.12 % de inhibición a 200 μ g/mL), presentaron a las 72 horas, morfología normal, estructura piriforme, ligeramente alargada pero con una gran pérdida en la adherencia al tubo de cultivo (aproximadamente 90% de desprendimiento). Para comprender mejor las características encontradas en ambos ensayos, es necesario profundizar un poco más en el conocimiento de la estructura del trofozoíto. La estructura del trofozoíto está conformada por microtúbulos, filamentos huecos que poseen extrema importancia para funciones como el crecimiento, la división celular, la diferenciación y la adherencia, por lo tanto se les considera como excelentes objetivos de ataque en terapias antiparasitarias (Fennell, y col., 2008). Dentro de la estructura del trofozoíto, es el disco ventral, la parte principal que le brinda la capacidad de adherencia (Rodney, 1991). Tomando en cuenta las observaciones de los cultivos expuestos al extracto de Ures-verano, se sugiere que la actividad del extracto podría centrarse sobre los microtúbulos del disco ventral, afectándolos de forma que propicie el desprendimiento y por lo tanto la pérdida de la viabilidad y la interrupción de todas sus funciones vitales. Experimentos adicionales son necesarios para conocer el mecanismo de acción del propóleo.

Otro aspecto importante de la investigación es el hecho de que el extracto de temporalización de verano presentó una acción anti-*Giardia* muy diferente con respecto a los propóleos recolectados en otras temporadas y localizaciones, esto nos hace suponer, que los elementos que fueron requeridos para la creación de ese propóleo solo están presentes en la flora regional en esta época del año (Silva y col., 2008) o en cantidades significativas para inducir el efecto observado.

Parece importante señalar que la mayor actividad antiproliferativa se encontró en los propóleos provenientes de la región de Ures. Para encontrar el origen de esta

actividad, se investigó la actividad antiparasitaria de uno de los constituyentes del propóleo de Ures con mayor actividad antiproliferativa. El CAPE no se encontró en los propóleos de Caborca y Pueblo de Álamos. El CAPE, ha demostrado tener una actividad antibacteriana, antioxidante (Velázquez y col., 2007), antiinflamatoria y una alta actividad antiproliferativa sobre líneas celulares cancerígenas de humano y ratón (Hernández y col., 2007), por lo que es factible pensar que podría afectar de igual manera el crecimiento de parásitos.

Para determinar si este compuesto fué el responsable de la actividad antiproliferativa mostrada en los cultivos de *G. lamblia* por los extractos provenientes de la región de Ures, se decidió probarlo en los ensayos de proliferación. Los resultados de este experimento demostraron que el CAPE no posee una actividad antiparasitaria significativa, por lo tanto, para determinar los elementos que proporcionan al propóleo de la región de Ures sus propiedades antiparasitarias, será necesario desarrollar futuras investigaciones encaminadas a la búsqueda de los principios activos de los propóleos de Ures-verano.

CONCLUSIONES

- Se estableció un método *in vitro* para evaluar la actividad de los propóleos contra los trofozoítos de *G. lamblia*.
- Los Propóleos de Ures recolectados en la temporada de Verano, Otoño, Invierno y Primavera poseen actividad antiparasitaria significativa.
- Los propóleos de Ures-verano mostró la mayor actividad antiparasitaria contra los trofozoítos de *G. lamblia*.
- El éster fenetílico del ácido caféico (CAPE), un constituyente del propóleo de Ures, no mostró actividad contra el crecimiento de *G. lamblia in vitro*.
- Los extractos hexánicos y etéreos de Caborca no mostraron actividad significativa sobre el parasito *G. lamblia*

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta Silva, L. 2007. Actividad biológica y composición química de propóleos sonorenses. Maestría en Polímeros y Materiales, División de Ingeniería. Departamenteo de Investigación en Polímeros y Materiales, Universidad de Sonora. México.
- Adam, R. D. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin. Microbiol. Rev.* 14(3): 447-475.
- Aherne, S. A., O'Brien, N. M. 2002. Dietary flavonols: Chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition.* 18:75-81.
- Ali, S. A., Hill, D. R. 2003. *Giardia intestinalis*. *Curr Opin Infect Dis.* 16:453-460.
- Ankarklev, J., Jerlström, H., Ringqvist, E., Troell, K., G. Svárd, S. 2010. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Natur Reviews Microbiology.* 8, 413-422
- Bankova V. S., de Castro S. L., Marcucci M. C. 2000 Propolis: Recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie;* 31:3-15.
- Bankova, V. 2005. Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine;* 2:29-32.
- Banskota, A. H., Nagaoka, T., Yoshie Sumioka, L., Tezuka, Y., Awale, S., Midorikawa, K., Matsushige, K., Kadota, S. 2002. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology.* 80:67-73.
- Banskota, A. H., Tezuka, Y., Prasain, J. K., Matsushige, K., Saiki, I., Kadota, S. 1998. Chemical constituents of brazilian propolis and their cytotoxic activities. Department of Natural Products Chemistry, Department of Pathogenic Biochemistry. Toyama Medical and Pharmaceutical University, Japan.
- Barbosa da Silva-Cunha, I., Salomao, K., Shimizu, M., Bankova, V. S., Ármalo-Custodio, A., Lisboa de Castro Marcucci M. C. (2004). Antitripanosomal activity of brazilian propolis from *Apis mellifera*. *Chem. Pharm. Bull.* 52(5) 602—604.

- Bedascarrasbure, E. L., Maldonado, L., Álvarez, A. 2000. El propóleo un valioso producto de la colmena. *Apis NetLA: Red apícola latinoamericana*.
- Bestwick, C. S., Milne, L. 2006. Influence of galangin on HL-60 cell proliferation and survival. *Cancer Lett.* 2006 Nov 8;243(1):80-9.
- Bosio, K., Avanzini, C., D'Avolio, A., Ozino, O., Savoia, D. 2003. *In Vitro* activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. *Letters in Applied Microbiology.* 31:174-177.
- Brunton, L., Parker, K., Blumenthal, D., Buxton, I. 2009. Goodman & Gilman: Manual de farmacología y terapéutica. 1era ed. Mc Graw Hill.
- Burdock, G. A. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food and Chemistry Toxicology.* 36:347-363.
- Bylka, I. M., Pilewski, N.A. 2004. Natural Flavonoids as Antimicrobial Agents. *JANA* Vol. 7, No. 2:24-31.
- Castaldo, S., Cappasso, F. 2002. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia.* 73(Suppl. 1):S1-S6.
- Castillo Dominichetti, S. E. 2002. Efecto de la distancia de las colmenas de abejas (*Apis mellifera*) a los árboles de palto (*Persea americana mill*) y efecto de un segundo ingreso de colmenas de abejas al huerto de paltos, sobre el número de abejas encontradas en las flores de palto. Quillota, Chile.
- Castro, M. L., do Nascimento, A. M., Ikegaki, M., Costa-Neto, C.M., Alencar, S. M., Rosalen, P. L. 2009. Identification of a bioactive compound isolated from Brazilian propolis type 6. *Bioorg Med Chem.* 2009 Jul 15;17(14):5332-5.
- Chen, C. N., Wu, C. L., Shy, H. S., Lin, J. K. 2003. Cytotoxic Prenylflavanones from Taiwanese Propoli *J. Nat. Prod.*, 66, 503-506
- Cuesta-Rubio, O., Frontana-Uribe, B. A., Ramirez-Apanb T., Cardenas, J. 2002. Polyisoprenylated Benzophenones in Cuban Propolis; Biological Activity of Nemorosones. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana. Cuba.
- Cushnie, T. P. T., Lamb, A. J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 26: 343-356.

- Dantas Pires, A., Olivieri, S., Gomez, B., Fátima H. M., De Castro, L. 2005. Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected mice with propolis promotes changes in the immune response. *Journal of ethnopharmacology*. 103(2):187-93.
- Díaz Cinco, M. E., Ballesteros Vázquez, M. N., Pérez Morales, R., Mata Haro, V. 2002. Impacto de la dieta sobre la inducción de infección con quistes de *Giardia lamblia* en ratas *Sprague-Dawley*. *Salud Pública Mex*; 44:315-322.
- Duran, G., Duran, N., Culha, G., Ozcan, B., Oztas, H., Ozer, B. 2008. *In vitro* antileishmanial activity of Adana propolis samples on *Leishmania tropica*, a preliminary study.
- Eckaman, L., Gillin, F. D. 2001. Microbes and microbial toxins: Paradigms for microbial-mucosal interactions I. Pathophysiological aspects of enteric infections with the lumen-dwelling protozoan pathogen *Giardia lamblia*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280: G1-G6.
- Espinoza Cifuentes, N. A. 2004. Caracterización de la flora apícola visitada por cinco especies de abejas sin aguijón en el Meliponario Sinai, aldea san Antonio las flores, Pajapitam San Marcos, Guatemala. Ingeniería en agronomía. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Farré, R., Frasset, I., Sánchez, A. 2004. El própolis y la salud. *Ars Pharmaceutica*, 45:1; 21-43.
- Faten, K. A. E. H., Hegazi, A. G. 2001. Egyptian Propolis: 2. Chemical Composition, Antiviral and Antimicrobial Activities of East Nile Delta Propolis Departments of Chemistry of Natural products and Parasitology, National Research Center, Dokki, Giza, Egypt.
- Faubert, G. M. 2000. Immune Response to *Giardia duodenalis*. *Clinical Microbiology Review*. 13.1:35-54.
- Fennell, B. J., Naughton, J. A., Barlow, J., Brennan, G., Fairweather, I., Hoey, E., McFerran, N., Trudgett, A., Bell, A. 2008. Microtubules as antiparasitic drug targets. *Expert Opin. Drug Discov.* 3:501-518.

- Freitas, S. F., Shinohora, L., Sforcin, J. M., Guimaraes, S. 2004. *In vitro* effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology*.
- Havsteen, B. H. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*. 96:67-202.
- Hawrelak, J. 2003. Giardiasis: Pathophysiology and Management. *Altern Med Rev*. 8:129-142.
- Hegazi, A. G., Faten, K. A. E. H. 2001. Egyptian Propolis: 3. Antioxidant, Antimicrobial Activities and Chemical Composition of Propolis from Reclaimed Lands. Departments of Parasitology Chemistry of Natural Products, National Research Center, Dokki, Giza, Egypt.
- Hellner, M., George, R. V., Winter, D., Munstedt, K. 2008. Apitherapy: Usage and experience in German beekeepers. *eCAM*. 5(4)475–479.
- Hernández, J., Goycolea, F. M., Quintero, J., Acosta, A., Castañeda M., Dominguez, Z., Robles, R., Vazquez- Moreno, L. Velázquez E. F., Astiazarn H., Lugo E., Velázquez, C. 2007. Sonoran Propolis: Chemical Composition and Antiproliferative Activity on Cancer Cell Lines. Department of polymerers, Department of Foot Science, Department of Nutrition, CIAD, Hermosillo, Sonora.
- Kang, E. W., Clinch, K., Furneaux, R. H., Harvey, J. E., Schofield, P. J., Gero A. M. 1998. A novel and simple colorimetric method for screening *Giardia intestinalis* and anti-giardial activity in vitro. *Parasitology*. Sep;117:229-34.
- Karabay, O., Tamer, A., Gunduz, H., Arine, H. 2003. Albendazole versus metronidazole treatment of adult giardiasis: An open randomized clinical study. *World Journal of Gastroenterology*.
- Katircioglu, H., Mercan, N. 2006. Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different regions. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 5, No. 11, 2 June 2006, pp. 1151-1153.
- Keister, D. B. 1983. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 77:487–488.

- Kumasawa, S., Yoneda, M., Shibata, I., Kanaeda, J., Hamasaca, T., Nakayama, T. 2003. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. *Cem Pharm Bull* 51: 740-742.
- Laidlaw, H. H. 2009. Honey Bee Research Facility. University of California. Dirección URL: <http://beebiology.ucdavis.edu/> <Último acceso 10/08/10>.
- Lane, S., Lloyd, D. 2002) Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Crit Rev Microbiol*. 28:123-47.
- Lauwaet, T., Davids, J. B., Reiner, S. D., Gillin, F. D. 2007. Encystation of *Giardia lamblia*: A model for other parasite. Department of Pathology, Division of Infectious Disease, UCSD.
- López Luengo, M. T. 2002. Flavonoides. *Fitoterapia*. Vol 21 Núm 4:108-114.
- López, F. A. T., Mondragón, L., Hernández, G. 2006. Los flavonoides y el sistema cardiovascular: ¿Pueden ser una alternativa terapéutica? *Arch Cardiol* v.76 supl. 4 México oct/dic.
- Lotti, C., Campo Fernandez, M., Piccinelli, A. L., Cuesta-Rubio, O., Márquez Hernández, I., Rastrelli, L. 2010. Chemical constituents of red Mexican propolis. *J Agric Food Chem*. 2010 Feb 24;58(4):2209-13.
- Lujan, D. H. 2006. *Giardia* y giardiasis. Instituto de investigaciones Médicas Mercedes y Martín Ferreyra. Córdoba, Argentina.
- Machado de Carvalho, G. M., Leon, L. L., Castro, S. L. 2007. Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of *Leishmania*. *Mem Isnt Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 102 (1):73-77.
- Martínez Flórez, S., González Gallego, J., Culebras, J. M., Tuñón, M. J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp*. 17:271-278.
- Meyer Marinate, R., Gomes Vancini, R., Melo, A. L., Benchimol, M. 2005. *Giardia lamblia*: Evaluation of the *in vitro* effects of nocodazole and colchicine on trophozoites. *Experimental Parasitology*. 110:62-72.

- Moreno, N., Isla A., Cudmani, N.G., Vattuone, M. A., Sampietro, A.R. 1999. Screening of antibacterial activity of Amaicha del Valle (Tucumán, Argentina) propolis. *Journal of Ethnopharmacology*. 68 (1999) 97–10.
- Narayana, K. R., Reddy, M. S., Chaluvadi, M. R., Krishna, D. R. 2001. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*. 33:2-16.
- Nash, T. E. 2002. Surface antigenic variation in *Giardia lamblia* Laboratory of Parasitic Diseases, National Institutes of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892-0425, USA. *Molecular Microbiology* (2002) 45(3), 585–590.
- Núñez Fernández, F. A. 2004. Estudio de factores asociados con la reinfección por *Giardia lamblia* en niños de círculos infantiles. Tesis doctorado en ciencias. La Habana, Cuba.
- Ortega-Rivas, C., Ochoa-Bautista, R. 2004. La producción de miel en México, modernidad y tradición. *Claridades Agropecuarias*. 128:3-13.
- Paulino, N., Dantas, A. P., Bankova, V., Longhi, D. T., Scremin, A., de Castro, S. L., Calixto, J. B. 2003. Bulgarian propolis induces analgesic and anti-inflammatory effects in mice and inhibits *in vitro* contraction of airway smooth muscle. *J Pharmacol Sci*. Nov;93(3):307-13.
- Pavilonis, A., Baranauskas, A., Puidokaite, L., Mazeliene, Z., Savickas, A., Radziūnas, R. 2008. Antimicrobial activity of soft and purified propolis extracts. *Medicina (Kaunas)*. 2008;44(12):977-83.
- Prucca, C. G., Lujan, H. D. 2009. Antigenic variation in *Giardia lamblia*. Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, Catholic University of Cordoba, Argentina. *Cellular Microbiology*.
- Ragaa, M. I. 2007. *Schistosoma mansoni*: The prophylactic and curative effects of propolis in experimentally infected mice. Department of Parasitology, Research Institute of Ophthalmology, Giza, Egypt.

- Rodney, D. A. 1991. The biology of *Giardia spp.* *Microbiological Reviews*. Dec 1991:706-732.
- Rodriguez Garcia, R., Aburto Bandala, M., Sánchez Maldonado, M. 1996. Eficacia del albendazol en el tratamiento de giardiasis en niños.
- Rubio, O. C., Cuellar Cuellar, A., Rojas, N., Castro, H. V., Rastrelli, L., Aquino, R. 1999. A polyisoprenylated benzophenone from Cuban propolis. *J Nat Prod*. Jul; 62 (7):1013-5.
- Russo, A., Cardile, V., Sanchez, F., Troncoso, N., Vanella, A., Garbarino, J. A. 2004. Chilean propolis: Antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life Sciences*. 76(5):545-58.
- Sahinler, N., Kaftanoglu, O. 2005. Natural product propolis chemical composition. *Natural Product Research*. 19:183-188.
- Salamanca Grosso, G., Correa Carvajal, I. L., Principal, J. 2007. Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. *Zootecnia Tropical*. 25(2):95-102.
- Salatino, A., Weinstein-Teixeira, E., Negri, G., Message, D. 2005. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*. 2:33-38.
- Santos, F. A., Bastos, E. M. A., Uzeda, M., Carvalho, M. A. R., Farias, L. M., Moerira, E. S. A., Braga, F. C. 2002. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *J Ethnopharmacology*. 80: 1-7.
- Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (S.A.R.H). 2004. Dirección URL: www.sagarhpa.sonora.gob.mx <Último acceso: Mayo 2004>.
- Secretaría de Salud. 2003. Sistema Único para la Vigilancia Epidemiológica. Dirección General de Epidemiología.
- Secretaría de Salud. 2010. Sistema Único para la Vigilancia Epidemiológica. Dirección General de Epidemiología. <http://www.dgepi.salud.gob.mx>

- Silici, S., Kutluca, S. 2005. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology*. 99(1):69-73.
- Silva, B. B., Rosalen, P. L., Cury, J. A., Ikegaki, M., Souza, V. C., Esteves, A. Alencar, S. M. 2008. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of brazilian propolis. *eCAM* 2008:5:313-316.
- Syed, A. A., Hill D. R. 2003. *Giardia intestinalis*. *Current opinion in infectious diseases*. 16:453-460
- Teixeira Weinstein, E., Message, D., Negri, G., Salatino, A., Steingheta, C. 2008. Seasonal Variation, Chemical Composition and Antioxidant activity of Brazilian Propolis Samples. *eCAM Advance Access*. 7: 307-315.
- Tolosa, L., Cañizares, E. 2002. The collection, characterisation and evaluation of antimicrobial activity of propolis extracts from Campeche, Mexico. Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Campeche, México.
- Upcroft, J. A., Dunn, L. A., Wright, J. M., Benakli, K, Upcroft, P., Vanelle, P. 2006 5-Nitroimidazole Drugs Effective against Metronidazole-Resistant *Trichomonas vaginalis* and *Giardia duodenalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 50:344-347.
- Uribarren Berrueta, T. 2010. Giardiasis. Recursos de Parasitología. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina de la UNAM, México.
- Uzel, A., Sorkun, K., Öncag, Ö., Cogulu, D., Gencay, Ö., Sali, B. 2005. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological Research* 160(2):189-95.
- Valcic, S., Montenegro, G., Timmermann, B. 1998. Lignans from Chilean propolis. *Journal Natural Products*. 61(6): 771-775.
- van Keulen, H., Macechko, P. T., Wade, S., Schaaf, S., Wallis, P., Erlandsen, S. 2002. Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggest a zoonotic potential for giardiasis. *Vet Parasitol* 108: 97-107.

- Velázquez, C., Navarro, M., Acosta, A., Angulo, A., Domínguez, Z., Robles, R., Robles, R., Lugo, E., Goycolea, F. M., Velázquez, E. F., Astiazaran, H., Hernández, J. 2007. Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. Department of Chemistry-Biology, University of Sonora, Hermosillo, Sonora, Mexico.
- Villalobos, P., Araujo Fernández, M., Castellano J., Díaz, O., y Cheng, R. 2001. Evaluación de la eficacia anti-giardiasis del albendazol en preescolares.
- Weinstein, E. T., Negri, G., Meira, R., Message, E., Salatino, A. 2005. Plant origin of green propolis: Bee behavior, plant anatomy and chemistry. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*. 2:85-9.
- WHO. 1996. The World Health Report. Geneva: World Health Organization

ANEXOS

Anexo 1. Preparación del Cultivo de *G. lamblia*

Material

- Incubadora a 37°C
- Tubos de ensayo 13 x 100 con tapón de rosca estériles
- Pipetas serológicas estériles de 10, 5 y 1 mL
- Pipetor (Drummond Broomal, Scientific CO)
- Mechero
- Sistema de filtración (Steril aseptic system, Millipore, Bradford MA 01730)
- Filtros de poro 0.45 µm
- Campana de flujo laminar (Purifier class II biosafety cabinet, Delta series, LABCONCO)

Medio de Cultivo TYI-S-33

Bilis	50 mg
Tripticasa	2.0 gr
Extracto de levadura	1.0 gr
Dextrosa	1.0 gr
Cloruro de sodio	0.2 gr
L-Cisteína	0.2 gr
Ácido Ascórbico	0.01 g
Citrato Férrico Amoniacal	2.3 mg
Fosfato Monobásico	60 mg
Fosfato Dibásico	100 mg

Se ajusta el pH a 6.9 con NaOH 10N y se afora a 100 mL con agua bidestilada. Se agrega 0.2 mL de antibiótico (Ceftriaxona, Rocephin, IM, 1 gr. Roche). Se suplementa con 10 mL de suero de ternera recién nacida (NBCS. GIBCO. Invitrogen 16010) y se filtra en un sistema con filtro de 0.45µm.

Procedimiento

1. Colocar 7.5 mL de medio TYI-S-33 suplementado al 10% con ternera recién nacida (NBCS. GIBCO. Invitrogen) en un tubo de ensayo 13 x 100 mm estéril.
2. Adicionar 0.5 mL de cultivo de *G. lamblia* GS/M-H7.en confluencia (1×10^6 trofozoítos/mL). La transferencia se realiza en una campana de flujo laminar en condiciones completamente estériles, reduciendo los riesgos de contaminación.

Anexo 2.- Evaluación de la Proliferación y Viabilidad Celular Utilizando Cámara de Neubauer

La cámara de Neubauer o hematocitómetro es utilizada en la clínica para la cuenta de células sanguíneas (los eritrocitos, linfocitos y plaquetas), sin embargo puede ser utilizada para el conteo de otros tipos de células. En este ensayo se utilizó, para determinar la viabilidad de los trofozoítos.

Equipo

- Campana de flujo laminar (Purifier Class II Biosafety Cabinet, delta series, LABCONCO)
- Microscopio Invertido (Leica)
- Microscopio Óptico (Leica)

Equipo Auxiliar

- Puntas estériles para micropipeta
- Micropipeta de volumen variable de 100-1000 μL .
- Micropipeta de volumen variable de 2-20 μL .
- Cámara de Neubauer bright light hemacytomether (Hausser scientific)
- Tubos eppendorf de 1.5 mL.
- Azul de tripán (SIGMA. T8154)
- Gradilla para tubos eppendorf

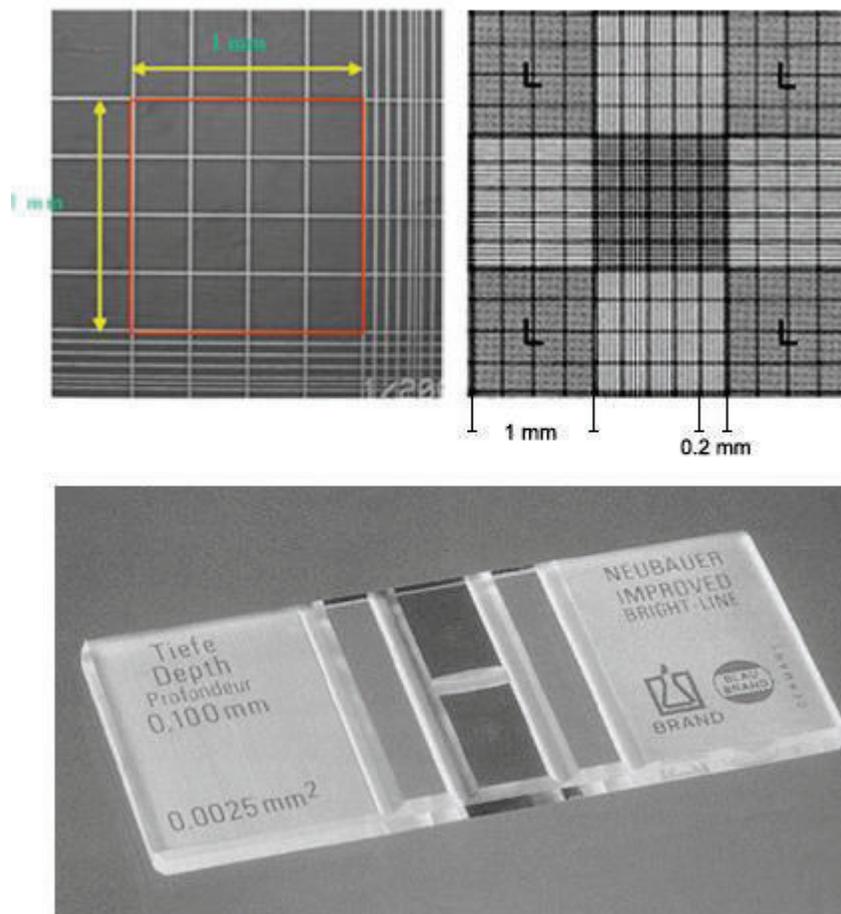


Figura 18. Cámara de Neubauer o hematocitómetro. El conteo celular se lleva a cabo en las áreas marcadas con “L”.

Procedimiento

- 1.- Se requiere de cultivos axénicos de trofozoítos de *G. lamblia* cepa GS/M-H7, en tubos de ensaye con tapón de rosca.
- 2.- Tomar un tubo de cultivo y observarlo al microscopio invertido: descartando si hay contaminación y verificando el estado del cultivo celular.
- 3.- Desprender las células adheridas a la superficie del tubo en agua con hielo por 20 minutos.
- 4.- Se transfiere el contenido del tubo de cultivo a un tubo falcón de 15 mL.
- 5.- Se centrifugan a 800 xg por 10 minutos a 4° C. Se decanta el sobrenadante.
- 6.- Se resuspende el pellet en 1 mL de medio TYI-S33 limpio.
- 7.- Con ayuda de una micropipeta, se toman 5µL se y agregan a un tubo eppendorf al cual previamente se le agregaron 95µL de colorante azul de tripán obteniendo así una dilución 1:20 (factor dilución).
- 8.- Se agita el contenido del tubo eppendorf con una micropipeta, y se toman 10 µL para ser analizados en el hematocitómetro dejando que la suspensión celular fluya por debajo del cubreobjetos hasta llenar el área de la cuadrícula, evitando que se derrame o entren burbujas en el área de conteo, si esto sucede, montar la cámara de nuevo.
- 9.- Una vez montada la cámara dejarla reposar por unos segundos permitiendo que las células se asienten y se observen en el mismo plano.
- 10.- Posteriormente se inicia el conteo de las células contenidas en los 4 cuadrantes.
 - a. Para conocer la viabilidad celular se empleará el colorante azul de tripán. Este es un colorante que penetra a las células muertas es decir a las células no viables tiñéndolas de color azul; permitiendo distinguir entre las células viables que no son teñidas.
- 11.- El porcentaje de viabilidad se calcular de la siguiente manera.

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{Numero de células viables contadas}}{\text{Total de células contadas}} \times 100$$

12.- La proliferación se evaluará con el uso de la siguiente fórmula:

$$\text{Proliferación celular} = \frac{\text{Número de células contadas}}{\text{Número de cuadros contados}} \times \text{dilución} \times 10,000$$

Anexo 3.- Protocolo de la Suspensión de Trofozoítos para el Ensayo de Proliferación

Procedimiento

1. Partir de un cultivo axénico de 16 x 150 mm confluyente, confirmado por observación al microscopio invertido.
2. Desprender las células adheridas a la superficie del tubo colocando el tubo en agua con hielo por 20 minutos
3. Transferir el contenido del tubo de cultivo a un tubo falcon con 50mL estéril.
4. Centrifugar a 800 xg por 10 minutos a 4° C. Se desecha el sobrenadante y se resuspenden en 1 mL de medio TYI-S33 limpio.
5. Contar los trofozoítos en un mililitro de medio de YTI-S33 limpio. El conteo celular se lleva a cabo en la cámara de Neubauer en los 2 lados de la cuadrícula que se utilizan para contar las células blancas.
6. Ajustar la concentración de trofozoítos a la cantidad 10, 450, 000 para un volumen de 104.500 mL de medio de TYI.
7. Conservar los tubos en agua con hielo durante toda la realización del ensayo.
8. Colocar una pequeña cantidad en una caja petri estéril y tomar 1900 µL de esta suspensión (agregar 2 veces 950 µL con diferentes puntas) y pasarla a los tubos de vidrio de 2 mL.
9. Incubar los tubos de 2 mL a 37 ° C, por 12 horas.
10. A partir de la solución stock preparar las soluciones de los extractos, albendazol y DMSO.
11. Agregar por triplicado 100 µL de las diluciones de los extractos.
12. De la misma manera agregar 100 µL de DMSO (como control de crecimiento) y 100 µL de albendazol (como control de inhibición)
13. Incubar los tubos de 2 mL a 37 ° C por 60 horas (completar 72 horas).
14. Al término de este tiempo colocar los tubos en agua con hielo por 15 minutos.

15. Tomar 10 μL de cada tubo en un tubo eppendorf y agregar 20 μL de azul de tripán (dilución 1:3).
16. El conteo celular se realiza en los 8 cuadrantes de la cámara de Neubauer que se utilizan para los glóbulos blancos.

17. La proliferación se evaluará con el uso de la siguiente fórmula:
$$\text{Proliferación celular} = \frac{\text{Número de células contadas}}{\text{Número de cuadros contados}} \times \text{dilución} \times 10,000$$
18. Graficar los datos

Anexo 4.- Preparación de los Extractos y Compuestos Aislados de Propóleos de la Región de Sonora

Reactivos

- Dimetil sulfóxido (Aldrich. CAS 67-68-5)
- Extractos Sonorenses

Material Auxiliar

- Tubos eppendorf de 1.5 mL
- Espatula en punta
- Gradilla para tubos eppendorf
- Puntas estériles para micropipeta
- Pipetor (Drummond Broomal, Scientific CO)
- Micropipeta de volumen variable de 100-1000 μ L.
- Micropipeta de volumen variable de 2-20 μ L.
- Microplacas de 24 pozos en fondo plano (Corning Costar, NY, USA)

Equipo

- Vortex
- Campana de flujo laminar (Purifier Class II Biosafety Cabinet, delta series, LABCONCO)

Procedimiento para la Preparación de la solución stock 20,000 µg/mL a una concentración de 333,333 µg/mL (0.33 mg/mL)

1. Pesar el tubo Eppendorf
2. Pesar la cantidad necesaria de extracto
3. Etiquetar
4. Hacer los cálculos necesarios para determinar la cantidad de DMSO que se requiere:

a. Ejemplo:

$$\text{Peso de la muestra} = 0.0068 \text{ gr.} = 6.8 \text{ mg.} = 6,800 \text{ µg /mL}$$

$$\text{Volumen de DMSO} = 20 \text{ mg} \text{-----} 1 \text{ mL}$$

$$6.8 \text{ mg} \text{-----} X = 0.34 \text{ mL de DMSO}$$

5. En el ensayo se requiere de una concentración del stock de propóleo de 20 mg/mL a una concentración final de 200 µg/mL por lo tanto:

$$6.8 \text{ µg} \text{-----} 0.34 \text{ mL}$$

$$X \text{-----} 1000 \text{ mL}$$

$$= 20,000 \text{ µg /mL ó } 20 \text{ mg /mL}$$

La concentración ideal de los propóleos es de 333,333 µg /mL = 0.33 mg/mL

$$333,333 \text{ µg} \text{-----} 1 \text{ mL}$$

$$6,800 \text{ µg} \text{-----} X = 0.0204 \text{ mL} \times 1000 = 20.40 \text{ µL de DMSO}$$

6. Adicionar al tubo Eppendorf 20.40 µL de DMSO

7. Agitar en el vortex el tiempo que se necesario para disolver el propóleo y almacenar en el congelador a una temperatura de -20°C.

Procedimiento de Preparación de Diluciones

Recordando que la concentración del extracto de los propóleos es de 333,333 µg/mL y se quiere una concentración final de 200 µg/mL por lo que se parte de 20 x o 400 µg/mL

Concentración del extracto: $C_1 = 333,333 \mu\text{g/mL}$

Volumen de extracto que se tomará: $V_2 = ?$

Concentración final: $C_2 = 4000$

Volumen final se la solución: $V_2 = 1000$

$$V_1 = \frac{C_2 \times V_2}{C_1} = \frac{4000 \times 1000}{333,333} = 12 \mu\text{L} - 1000 \text{ mL} - 533 = 988 \text{ mL de TYI}$$

20 x			Extracto + Medio de Cultivo	1 x		
Extr. µg/mL	DSMO %	Alb. mM		Extr. µg/mL	DSMO %	Alb. mM
4000	1.2	0.240	a) Tomar 12 µL de sol stock + 988 µL de TYI limpio	200	0.06	0.012
2000	0.6	0.12	b) Tomar 500 µL de a + 500 µL de TYI limpio	100	0.03	0.006
1000	0.3	0.06	c) Tomar 500 µL de b + 500 µL de TYI limpio	50	0.015	0.003
500	0.15	0.03	d) Tomar 500 µL de c + 500 µL de TYI limpio	25	0.07	0.0015

Añadir 100 µL de cada una de estas diluciones a tubos de 2 mL con trofozoítos previamente adheridos (por triplicado). La transferencia se realiza en una campana de

flujo laminar en condiciones completamente estériles, reduciendo los riesgos de contaminación.

En la siguiente tabla se muestran los cálculos para la realización de las gráficas de inhibición de los propóleos, como ejemplo se muestra la tabla del extracto metanólico de verano de Ures.

Metanólico Verano de Ures						1206166.67	
Conc.	1era Lectura	2da Lectura	3era Lectura	% 1° lectu.	% 2° Lect	% 3 lect	Prom. del %
200	82500	90000	112500	6.84	7.46	9.33	7.88
Alb. 0.012	117500	140000	135000	9.74	11.61	11.19	10.85
DMSO 0.06 %	1052500	1262500	1303500	87.26	104.67	108.07	100.00
						1220000.00	
100	157000	262500	270000	12.87	21.52	22.13	18.84
DMSO 0.03 %	1262500	1175000	1222500	103.48	96.31	100.20	100.00
						1315833.33	
50	402500	575000	420000	30.59	43.70	31.92	35.40
DMSO 0.015 %	1420000	1230000	1297500	107.92	93.48	98.61	100.00
						1428333.33	
25	1005000	945000	870000	70.36	66.16	60.91	65.81
DMSO 0.007 %	1412500	1575000	1297500	98.89	110.27	90.84	100.00
Control 1/2 y trof.	1175000	1055000	1052500	107.39	96.42	96.19	100.00
						1094166.67	

*Los resultados con sombra roja indican el promedio de las 3 lecturas de DMSO utilizados para encontrar el valor real de inhibición del extracto sin intervención del DMSO.

*El resultado en sombra verde corresponde al promedio de las lecturas del cultivo sin DMSO.

Anexo 5.- Extractos Hexánico, Etéreo y de Acetato de Etilo de Caborca

Tabla IV. Resultados de la Obtención de los Extractos Hexánico, Etéreo y de Acetato de Etilo de Caborca

Extracto	Cantidad de Extracto Metanólico	% Rendimiento
Caborca		
• Hexánico	7.1 gr.	0.4 gr.
• Etéreo	Parte insoluble	4.9 gr.
• Acetato de Etilo	Parte insoluble	0.6 gr.
Pueblo de Álamos		
• Hexánico	11 gr.	2.4 gr.
• Etéreo	Parte insoluble	0.6 gr.
• Acetato de Etilo	Parte insoluble	1 gr.

Anexo 6. Evaluación de la Actividad de los Extractos de Acetato de Etilo y Etéreo de Caborca

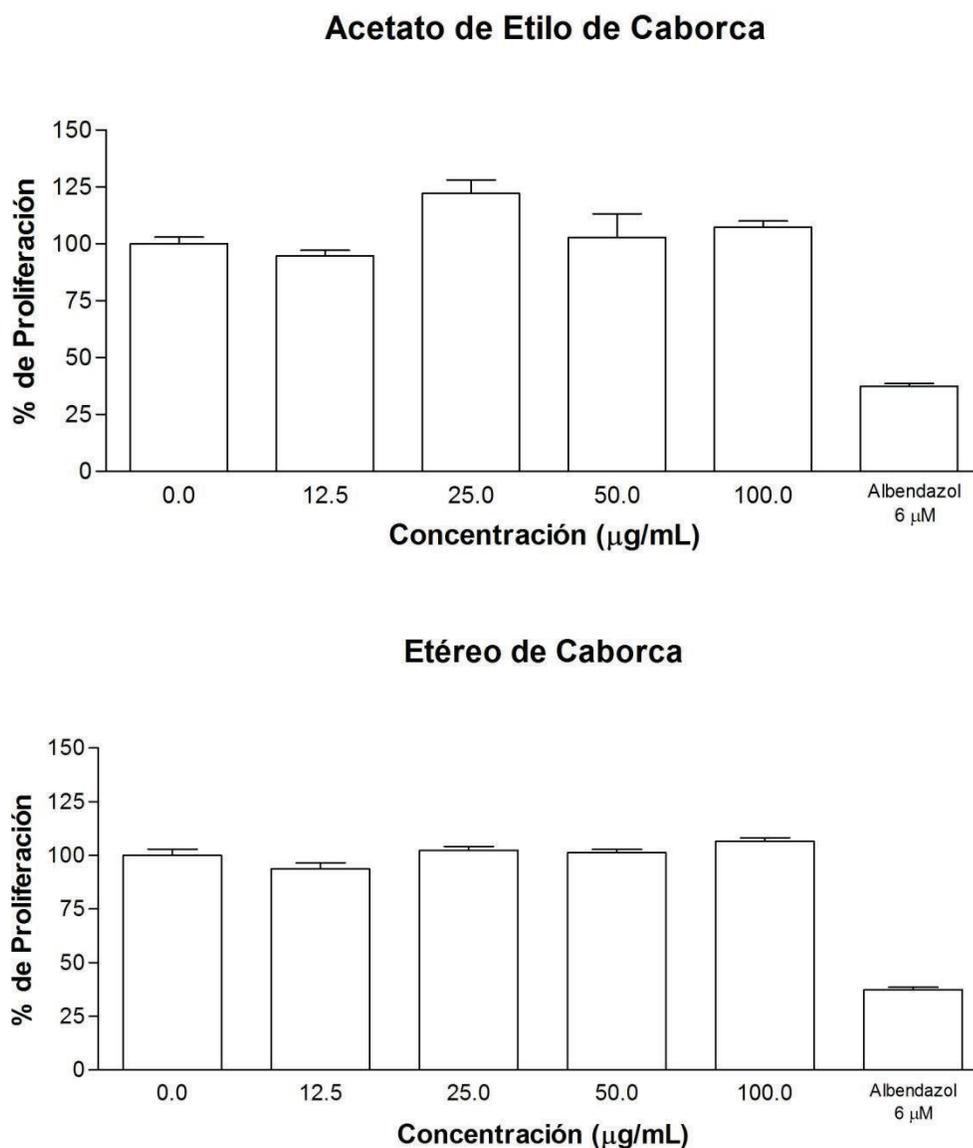


Figura 19. Evaluación de la actividad antiparasitaria de los extractos de Acetato de Etilo y Etéreo de Caborca La proliferación celular fue evaluada a las 48 horas posterior al tratamiento con el extracto al cultivo celular. Como cultivo control (0) se utilizó un cultivo celular en medio de TYI. Ensayo realizado por triplicado ($\bar{X}+DE$). No se observan diferencias significativas con respecto al cultivo control.

Anexo 7.- Cromatografía en Columna de Vidrio en Silica gel del Extracto Hexanico de Caborca

Tabla V. Resultados de las Fracciones por Cromatografía en Columna de Vidrio en Silica gel del Extracto Hexanico de Caborca

Extracto Hexánico de Caborca			
No.	Fracción	Proporción	Solventes
1	2.5 L	95:5	Hexano-Acetato
2	Sobrenadante	95:5	Hexano-Acetato
3	Fracción 1- 5	95:5	Hexano-Acetato
4	Fracción 8 – 23*	95:5	Hexano-Acetato
5	Fracción 24- 31	90:10	Hexano-Acetato
6	Fracción 32-57	90:10	Hexano-Acetato
7	Fracción 58- 65	80:20	Hexano-Acetato
8	Fracción 66	300 mL	Acetato de Etilo
9	Fracción 67- 69	500 mL	Acetato de Etilo
10	Fracción 70- 80	300 mL	Acetato de Etilo

*Mancha azul intensa

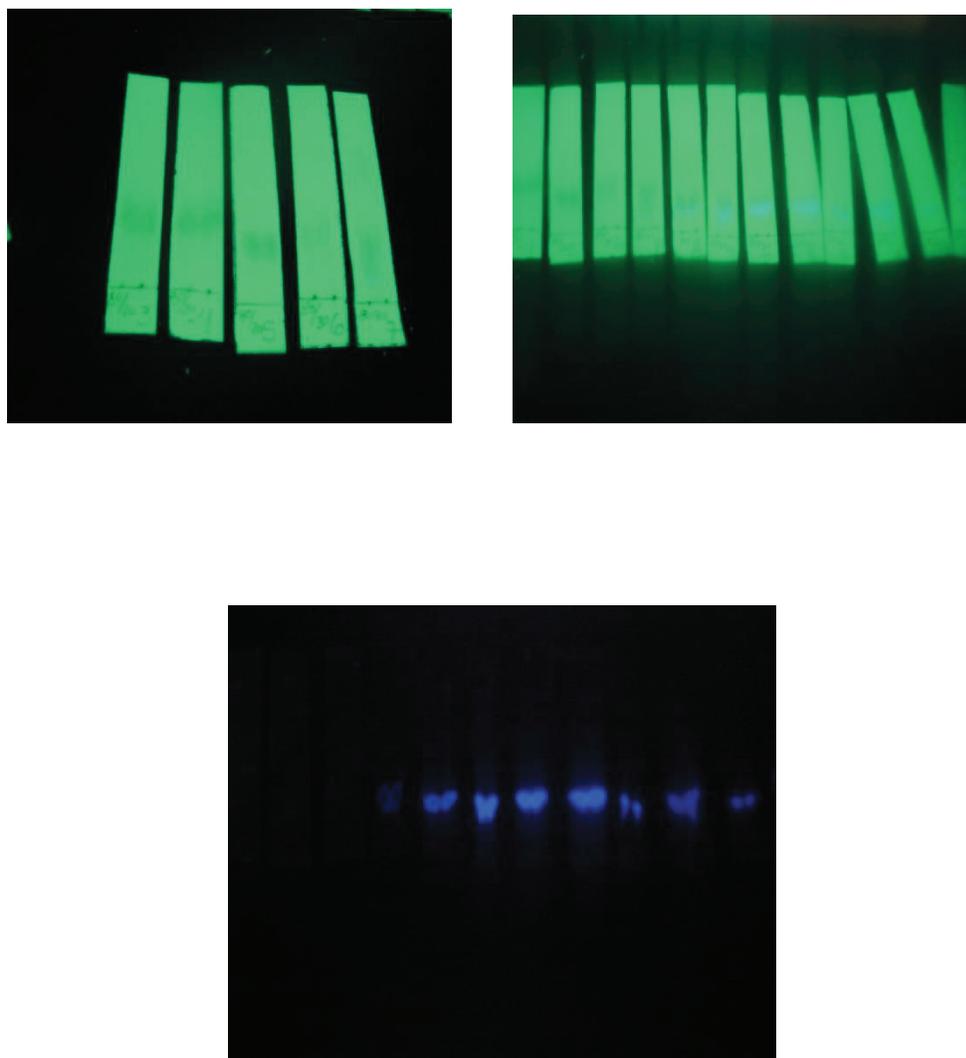


Figura 20. Placa cromatográfica de capa fina (sílica gel 60 de 0.2 mm grosor, F-254 1x5 cm) del extracto hexánico de caborca. Se observa en los en la fracción 4 en la mezcla 95/5 de Hexano – Acetato la presencia de un compuesto puro en forma de una mancha azul muy intensa a la luz UV.

Anexo 8. Fracciones por Cromatografía en Columna de Vidrio en Silica Gel del Extracto Etéreo de Caborca

Tabla VI. Resultados de las fracciones por cromatografía en columna de vidrio en silica gel del extracto etéreo de Caborca.

Etéreo de Caborca	Fracción	Solvente Hex-Ace.	Peso de muestra en gr.
1	1	90/10	0.0093
2	1-5	90/10	0.0017
3	6-8	90/10	0.0136
4	9-15	90/10	0.0873
5	16-19	90/10	0.0763
6	20-21	90/10	0.0124
7	22-30	90/10	0.0224
8	31-60	80/20	0.286
9	61-64	80/20	0.0128
10	65-69	80/20	0.014
11	70-81	80/20	0.0010
12	82-92	70/30	0.0243
13	91-106	70/30	0.0291
14	107-115	60/40	0.0236
15	Lavado 1	Acetato solo	0.0699
16	Lavado 2	Acetato solo	0.0137
17	Lavado 3	Acetato solo	0.0136
18	Lavado 1	Etanol	0.0021
19	Lavado 1	Etanol	0.7784
20	Lavado 1	Etanol	