

UNIVERSIDAD DE SONORA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**Actividad anti*amibiana* de propóleos de Ures, Sonora y de Aguascalientes
en cultivos axénicos de *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

HÉCTOR DANIEL PARRA SÁNCHEZ

Agosto 2013

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

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado calificador del examen profesional de Héctor Daniel Parra Sánchez, hemos revisado detenidamente su trabajo escrito titulado “**Actividad anti-amibiana de los propóleos de Ures, Sonora y de Aguascalientes en cultivos axénicos de *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS**” y encontramos que cumple con los requisitos para la presentación de su examen profesional. Por tal motivo recomendamos se acepte dicho trabajo como requisito parcial para la obtención de título de Químico Biólogo Clínico.

Atentamente:

Dra. Olivia Valenzuela Antelo
Presidente

Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras
Secretario

Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda
Vocal

M. en C. María Lucila Rascón Durán
Suplente

AGRADECIMIENTOS

A MIS PADRES, que siempre me apoyaron y sacaron adelante, hasta en los momentos más difíciles

AL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS, por su aceptación, formación y conocimientos adquiridos durante mi estancia.

A mi asesora DRA. OLIVIA VALENZUELA ANTELO por haber confiado en mí y brindarme su apoyo para la elaboración de mi tesis.

A la maestra Lucila Rascón por el apoyo brindado en el laboratorio día con día y a mis compañeros del CABB en especial a Samuel y Erika que me ayudaron siempre que necesité ayuda.

DEDICATORIA

Ésta tesis va dedicada con todo mi cariño:

A MIS PADRES SILVIA SÁNCHEZ ZERMEÑO Y HÉCTOR ANGEL PARRA BALDERRAMA, de verdad muchas gracias por todo lo que han hecho por mí, desde sus cuidados extremos cuando era niño hasta el apoyo incondicional que a la fecha me siguen dando, me enorgullece decir que son mis padres. LOS QUIERO MUCHO!

A MIS HERMANOS KARLA PATRICIA Y ANGEL, cada uno con su forma de ser, siempre me han apoyado y sé que estarán ahí cada vez que los necesite. Los quiero chamacones.

A MIS TÍAS OLIVIA Y ADELA que de igual manera me han apoyado, les estoy agradecido, de verdad. Las quiero

A MI NOVIA SILVIA AROS (yo si puse el nombre), por ser el motor que me impulsa día a día y por no permitir que me caiga y cuando lo hago, siempre estás ahí para levantarme. Te quiero mucho Shivis!

Y por último a todas aquellas personas que siempre han estado para mí en momentos buenos y malos. Gracias.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
OBJETIVOS	x
Objetivo general	x
Objetivos particulares	x
RESUMEN.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
<i>Entamoeba histolytica</i>	3
Taxonomía.....	4
Morfología.....	4
Ciclo de vida.....	5
Amibiasis.....	8
Amibiasis intestinal	9
Amibiasis extraintestinal (Absceso hepático amibiano)	11
Epidemiología	11
Tratamiento	13
Metronidazol.....	13
Farmacodinamia	15
Efectos secundarios	16
Propóleos.....	17
Composición química	18

Propiedades biológicas de los propóleos.....	19
Actividad antiparasitaria	20
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
Cultivo axénico de <i>E. histolytica</i>	22
Estandarización del experimento según el tiempo de proliferación de <i>E. histolytica</i>	22
Curva de crecimiento amibiano: medio de cultivo axénico Diamond, dimetil sulfóxido y Metro- nidazol como control positivo	23
Evaluación de la capacidad antiamibiana de los propóleos: Ures y Aguascalientes.....	23
RESULTADOS	25
Cultivo axénico de <i>E. histolytica</i>	25
Curva de crecimiento de <i>E. histolytica</i> HM1:IMSS.....	25
Efecto de DMSO en cultivos axénicos de <i>E. histolytica</i> HM1:IMSS	26
Efecto del Metronidazol como control positivo de la actividad antiparasitaria en cultivos axé- nicos de <i>E. histolytica</i> HM1:IMSS.....	26
Evaluación de la actividad antiamibiana de los propóleos Aguascalientes y Ures, Sonora....	30
CONCLUSIONES.....	36
BIBLIOGRAFÍA.....	37
ANEXOS.....	41

LISTA DE TABLAS

	Página
TABLA I: Organismos sensibles al Metronidazol.....	14
TABLA II: Origen de los propóleos y su actividad antiparasitaria estudiada	21

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Trofozoíto de <i>E. histolytica</i> , A: microscopía electrónica de barrido, B: microscopia óptica.....	6
FIGURA 2. Quiste de <i>E. histolytica</i> , A: microscopia electrónica de barrido, B: microscopia óptica.....	6
FIGURA 3. Ciclo de vida <i>E. histolytica</i>	7
FIGURA 4. Colon con presencia de múltiples úlceras causadas por <i>E. histolytica</i>	10
FIGURA 5. Absceso hepático causado por <i>E. histolytica</i>	10
FIGURA 6. Aspecto de los propóleos	17
FIGURA 7. Trofozoítos de <i>E. histolytica</i> cepa HM1:IMSS, en medio de cultivo Diamond	25
FIGURA 8. Curva de crecimiento de <i>E. histolytica</i> HM1:IMSS.....	28
FIGURA 9. Efecto de DMSO en cultivos axénicos de <i>E. histolytica</i> HM1:IMSS	28
FIGURA 10. Efecto del Metronidazol como control positivo de la actividad antiparasitaria en cultivos axénicos de <i>E. histolytica</i> HM1:IMSS	29
FIGURA 11. Efecto del Metronidazol sobre la morfología de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> (resolución 20x).	29
FIGURA 12. Actividad antiamebiana de propóleos de Aguascalientes en cultivos axénicos de <i>E. histolytica</i> HM1:IMSS.....	31
FIGURA 13. Actividad antiamebiana de propóleos de Ures, Sonora en cultivos axénicos de <i>E. histolytica</i> HM1:IMSS	31
FIGURA 14. Cambios morfológicos en cultivos axénicos de <i>E. histolytica</i> HM1:IMSS inducidos por la exposición de propóleos de Aguascalientes (24 horas,200x y100x).....	32
FIGURA 15. Efecto de la dosis de propóleos Ures, a las 48 hr en cultivo axénicos de <i>E. histolytica</i> HM1:IMSS.....	32
FIGURA 16. Actividad antiamebiana de los propóleos Aguascalientes y Ures, Sonora	33

FIGURA 17. Actividad antiamebiana de los propóleos Aguascalientes y Ures, Sonora en los parásitos *E. histolytica* y *G. lamblia*.....34

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la actividad antiamebiana de propóleos de Ures, Sonora y el de Aguascalientes, en cultivos axénicos de *Entamoeba histolytica* (HM1:IMSS).

Objetivos Particulares

- Establecer las condiciones óptimas de crecimiento de *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS, en medio de cultivo axénico Diamond.
- Analizar el crecimiento in vitro de trofozoitos de *Entamoeba histolytica*, en medio de cultivo Diamond.
- Determinar la actividad antiamebiana de propóleos de Ures, Sonora y de Aguascalientes, en cultivos axénicos de *Entamoeba histolytica*.

RESUMEN

E. histolytica es de los protozoarios intestinales y patógenos más frecuente en nuestro medio después de *Giardia lamblia*, siendo una de las principales causas de diarrea en menores de cinco años y la cuarta causa de muerte en el mundo debida a infección por protozoarios. Posee mecanismos patogénicos complejos que le permiten invadir la mucosa intestinal y causar colitis amibiana. Solamente un pequeño porcentaje desarrolla amibiasis invasiva por este parásito (10%), manifestada generalmente por disentería o absceso hepático, el otro 90% posee lo que se conoce como amibiasis asintomática la cual se considera la más peligrosa ya que estos son transmisores de la enfermedad pues desconocen que la padecen. El medicamento de elección sigue siendo el Metronidazol que a pesar de sus buenos resultados ha mostrado diversos efectos secundarios. Es por eso que en los últimos años la comunidad científica se ha interesado en la medicina natural, por tal motivo se han dado la tarea de purificar, sintetizar y caracterizar químicamente compuestos que tengan actividad biológica. Entre los compuestos naturales estudiados destacan los propóleos ya que estos han mostrado actividad antimicrobiana, antifúngica, y antiparasitaria entre otras, debido a las distintas características fitogeográficas, existe una gran diversidad en la constitución química de los propóleos. En Ures, Sonora, las abejas colectan exudados a partir de especies vegetales que se encuentran en abundancia y disponibles durante todo el año (naturaleza perenne) en la región. El objetivo principal de este trabajo fue probar la actividad anti-amibiana de propóleos de Ures, Sonora y Aguascalientes, en cultivos axénicos de *E. histolytica* cepa HM1:IMSS, para lo cual se emplearon tres diferentes concentraciones de propóleos (200, 100, 50 y 25 µg/mL) y se evaluó el efecto a las 24 y a las 48 horas de exposición por medio de curvas de crecimiento y conteo en cámara de Neubauer. Se utilizó el Metronidazol como control positivo utilizando concentraciones de 2.0, 1.0, 0.5 µg/mL y dimetil sulfóxido como solvente de propóleos por lo que fue necesario el establecimiento de las concentraciones del mismo. En conclusión los resultados obtenidos nos permitieron determinar la IC₅₀ de cada uno de los propóleos que fue de 100 µg/mL para el de Aguascalientes y Ures, Sonora 91 µg/mL respectivamente, lo cual sienta las bases para el desarrollo de futuras investigaciones.

INTRODUCCIÓN

E. histolytica, protozooario perteneciente al *Subphylum Sarcodina* causante de la amibiasis la cual es producida por la ingesta de quistes del mismo que después de pasar por el estómago se desenquistan liberándose trofozoítos los cuales colonizan principalmente al intestino grueso (ciego); en ocasiones, invade la mucosa intestinal y puede diseminarse por vía hemática, generando al absceso hepático amibiano (AHA) (Pumarola, 1991).

Las principales formas clínicas de amibiasis en el humano son la amibiasis intestinal invasiva y absceso hepático amibiano, la amibiasis es la cuarta causa de muerte en el mundo debida a la infección por protozoarios, ubicándose después del paludismo, la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis. México, Centro y Suramérica, África y Asia se consideran zonas endémicas para amibiasis. La amibiasis se transmite principalmente por consumo de agua o alimentos contaminados con heces de personas infectadas, "fecalismo" (Gomez y col., 2007).

El tratamiento de elección para la amibiasis intestinal sigue siendo el Metronidazol asociado a la diyodohidroquinina, pues se ha comprobado que esta última evita las recurrencias intestinales que en ocasiones se presentan cuando se emplea únicamente el Metronidazol (Pumarola, 1991); sin embargo, se han reportado algunos efectos secundarios al uso del Metronidazol como boca seca, náuseas, prurito y en algunos casos, orina de un color oscuro. Además de ser carcinogénico, teratogénico y embriogénico (Behnia y col., 2008). Por lo que la búsqueda de alternativas anti-amibianas, con características ideales: baja toxicidad, económica y más efectiva es necesaria.

Existen diversos reportes sobre actividad anti-amibiana de propóleos referente a las alternativas anti-amibianas que se encuentran en estudio. Se encontraron diversos extractos de plantas (Lakshmi y col., 2004), y solamente se ubicó un estudio realizado con extractos metanólicos de propóleos en Bahgdad (Ardalan y col., 2011).

Propóleos, es el nombre genérico que se le da a la sustancia resinosa que las abejas colectan de diferentes plantas. Este producto ha sido utilizado a través de la historia en la medicina

tradicional y se ha reportado tener un amplio espectro de actividades biológicas, como antioxidante, antibiótico, antimicótico entre otros (Acosta, 2004).

Debido a lo expuesto anteriormente, el objetivo central del presente trabajo es evaluar la actividad anti*amibiana* de los propóleos Ures, Sonora y el de Aguascalientes, en cultivos axénicos de *E. histolytica* (HM1:IMSS), con la finalidad de identificar si alguno de éstos propóleos o ambos presentan actividad anti*amibiana* los cuales pudieran ser nuevos candidatos para tratamientos contra la amibiasis intestinal, una vez que se identifique los componentes activos de dichos propóleos.

ANTECEDENTES

Entamoeba histolytica

Es el protozooario intestinal patógeno más frecuente en nuestro medio después de *Giardia lamblia*, siendo una de las principales causas de diarrea en menores de cinco años y la cuarta causa de muerte en el mundo debida a infección por protozoarios. Posee mecanismos patogénicos complejos que le permiten invadir la mucosa intestinal y causar colitis amibiana (Gómez y col., 2007). Fue descrita por Friedrich Lösch en 1873 en Rusia, quien la aisló de un paciente con disentería e incluso, estableció la relación existente entre la enfermedad y el protozooario en perros infectados experimentalmente con quistes amibianos procedentes de humanos (Lesh, 1975)

En 1925, Brumpt propuso que existían dos especies distintas, una patógena y una no patógena, aunque morfológicamente iguales. Para 1961, Diamond logró el primer cultivo axénico y, en 1978, Sargeant diferenció la variante patógena de *E. histolytica* de una no patógena mediante patrones electroforéticos de isoenzimas

Diamond en 1961 demostró que realmente eran dos especies diferentes y, en 1997 la OMS recomendó que se diferencien las dos especies para efectos de diagnóstico, tratamiento y que se reporte como *E. histolytica/E. dispar* (Diamond, 1961), cuando el diagnóstico se lleve a cabo por microscopía óptica. En el 2005, se publicó el genoma de *E. histolytica*, con un tamaño de 23.751 Kilobases y 9.938 genes. No hay una clara conformación cromosómica y se confirmó la ausencia de mitocondrias (Loftus y col., 2005).

El acceso al agua potable, los servicios sanitarios adecuados, un tratamiento oportuno y adecuado y el desarrollo de una vacuna, son los ejes para disminuir la incidencia y mortalidad por este parásito (Gómez y col., 2007)

Taxonomía

Es uno de los eucariontes más primitivos pertenecen al reino Protista y sub-reino *Protozoa*, familia *Entamoebidae* del orden Amoebida, subfilo Sarcodina, superclase Rhizopoda de protozoos formadores de pseudópodos de la clase Lobosea (Bakker, 1993), género *Entamoeba* y especie *histolytica*.

Morfología

Presenta dos formas o fases de desarrollo bien establecidas: El trofozoíto y el quiste, que constituyen respectivamente, la forma invasiva e infectante.

El trofozoíto o forma móvil, es pleomórfico, debido a su movilidad (Pumarola, 1991), la cual es aproximadamente de 50 $\mu\text{m/s}$, misma que es favorecida por los pseudópodos, (prolongaciones del ectoplasma) (Romero, 1993). El trofozoíto se nutre por fagocitosis a expensas de los tejidos disueltos, bacterias y hematíes (Pumarola, 1991). Se multiplica por fisión binaria, es muy sensible al jugo gástrico y a los agentes externos. Su hábitat comprende la luz y pared del colon, especialmente ciego y recto (Pumarola, 1991). El citoplasma presenta dos zonas que no están separadas físicamente, pero sí bien diferenciadas: el ectoplasma y el endoplasma (Romero, 1993). En la zona endoplásmica se encuentran: vacuolas, lisosomas, cisternas aplanadas semejantes a los sistemas de Golgi, y un sistema reticular membranoso similar a un retículo endoplásmico. El núcleo es esférico, con cromatina en el centro "cariosoma central". También presentan cromatina adherida a la cara interna de la membrana nuclear, distribuida en forma más o menos homogénea (Brown, 1985) (Figura 1).

Si las condiciones del medio ambiente no son muy propicias, el trofozoíto empieza a cambiar de forma, deja de emitir pseudópodos, el ectoplasma y el endoplasma ya no se diferencian, de manera que casi desaparece el primero, se pierde la forma irregular y se hace esférico, al tiempo que aparece una pared gruesa llamada pared quística (Petri, 1993).

El prequiste es el estadio que se presenta cuando las condiciones del medio ambiente en que se mueve el trofozoíto son desfavorables para su vida. Es esférico, inmóvil, sin diferenciación de ectoplasma y endoplasma, con pared gruesa y con un solo núcleo (Romero, 1993). Al mismo

tiempo empieza a formar material de reserva de glucógeno y barras cromatoidales. Finalmente se forma el quiste, el cual eventualmente es excretado en las heces. (Romero, 1993).

El quiste es la forma infectiva, sobrevive al suelo húmedo durante una semana por lo menos, si la temperatura fluctúa entre los 28 y 34°C, y hasta un mes, si la temperatura es de 10°C. Es esférico, y mide aproximadamente entre 5 y 20 micras; tiene cuatro núcleos, una pared gruesa compuesta principalmente por quitina y en ocasiones presenta barras cromatoidales (Campos y col., 2011) (Figura 1). Se forma por evolución del trofozoíto y posee de 1 a 4 núcleos, según la fase de maduración. Los quistes jóvenes tienen 1 ó 2 núcleos, algunos cuerpos cromáticos y vacuolas de glucógeno. Cuando el quiste madura, posee 4 núcleos y desaparecen los cuerpos cromáticos. Solo los quistes maduros son infecciosos (Pumarola, 1991) (Figura 2).

Ciclo de vida

La infección con *E. histolytica* ocurre por la ingestión de quistes maduros presentes en agua, alimento o manos contaminadas con materia fecal. El quiste maduro desciende en el tubo digestivo hasta llegar al intestino, donde previo al contacto con jugos digestivos, se inicia el proceso de desenquistamiento, en este proceso la pared de resistencia se reblandece y finalmente se liberan pequeñas formas trofozoíticas llamadas amébulas metaquísticas, las cuales se diferencian a trofozoítos maduros que migran hacia el intestino grueso (ciego). Los trofozoítos se multiplican por fisión binaria. Cuando los trofozoítos se encuentran en condiciones adversas inician el proceso de enquistamiento y posteriormente son expulsados por las heces principalmente en forma de quiste. Gracias a la protección que les confiere su pared quística, pueden sobrevivir semanas o meses en el ambiente exterior y son los responsables de la transmisión, los trofozoítos también pueden ser expulsados en procesos diarreicos, sobre todo en la diarrea aguda, pero son bastante lábiles al medio exterior; por lo que la ingestión de trofozoítos no implica una forma de infección ya que no sobreviven la exposición al ambiente gástrico y no alcanzan a colonizar al individuo (Clark, 1992) (Figura 3).



Figura 1. Trofozoíto de *E. histolytica*, A: microscopía electrónica de barrido, B: microscopía óptica.

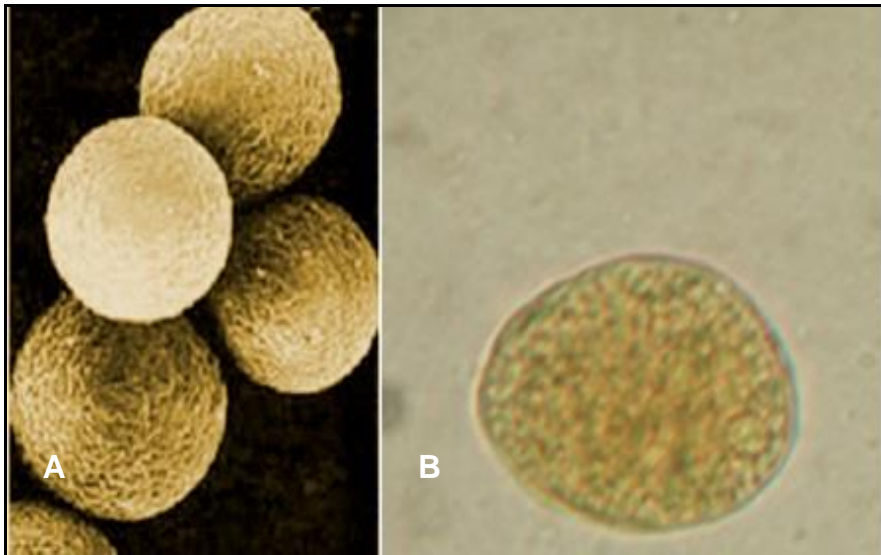


Figura 2. Quiste de *E. histolytica*, A: microscopía electrónica de barrido, B: microscopía óptica.

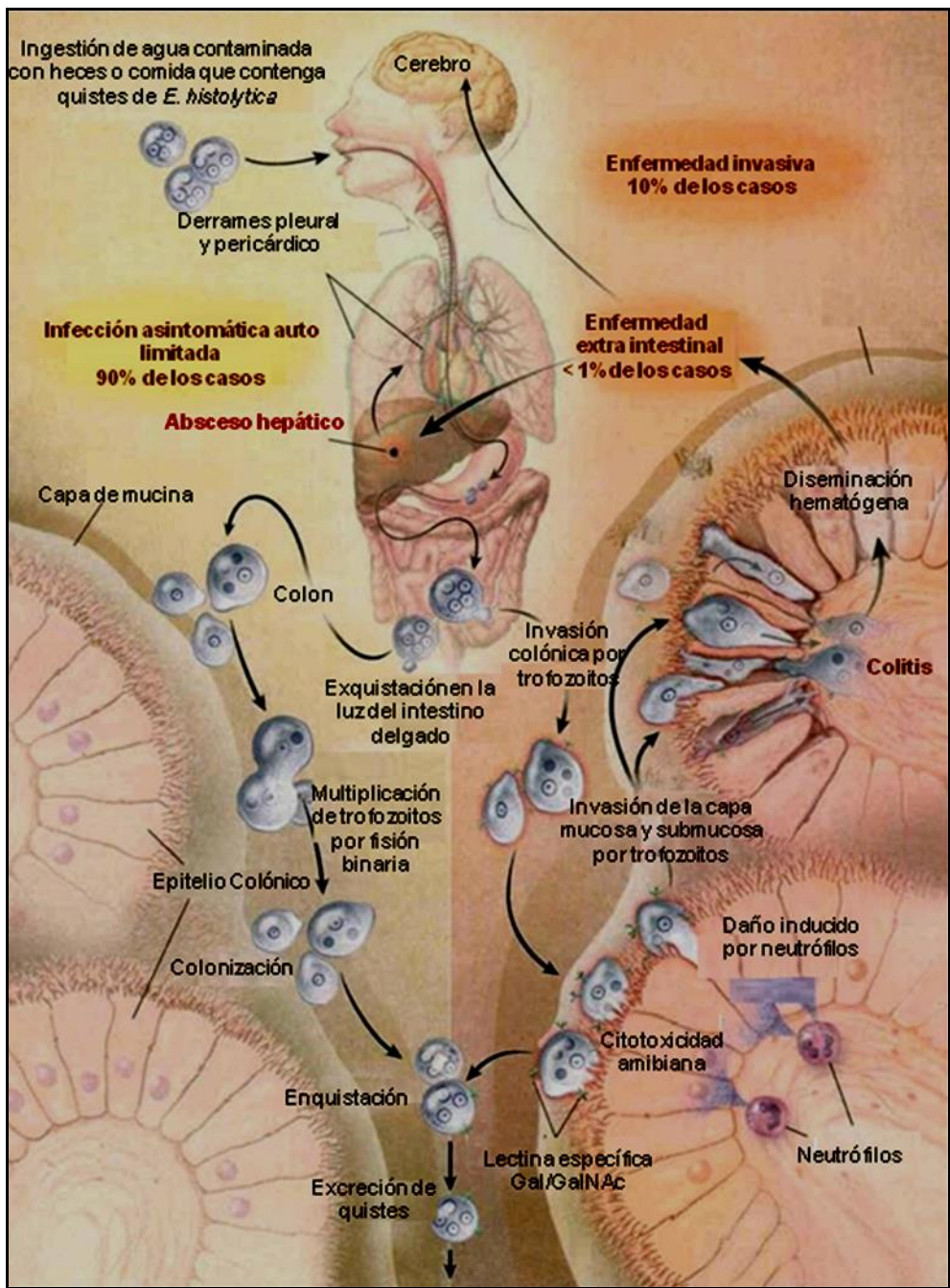


Figura 3. Ciclo de vida *E. histolytica*. Adaptado de Haque y col., 2003.

En muchos casos, los trofozoítos se mantienen en el lumen intestinal (infección no invasiva) de los individuos que son portadores asintomáticos, eliminando quistes en las heces. En algunos pacientes los trofozoítos invaden la mucosa intestinal (enfermedad intestinal), o a través del flujo sanguíneo, sitios extraintestinales como el hígado, cerebro y pulmones (enfermedad extraintestinal), resultando en manifestaciones patológicas (Romero, 1993). (Figura 3).

Amibiasis

La enfermedad producida por *E. histolytica* se conoce tradicionalmente como amibiasis, la cual se clasifica por sus manifestaciones en sintomática y asintomática, por su localización en intestinal y extraintestinal, y por su evolución en aguda y crónica, de la combinación de estas clasificaciones se integran los cuadros específicos de la amibiasis (Biagi, 1988).

Solamente un pequeño porcentaje (aproximadamente el 10%) de la población desarrolla amibiasis invasiva, manifestada generalmente por disentería o absceso hepático. Las pruebas serológicas, en busca de anticuerpos antiamibianos, empleados para medir la proporción de la población con enfermedad invasiva presente o pasada, sugieren que aproximadamente un décimo del total de personas infectadas, esto es, alrededor de 48 millones, presentan anualmente síntomas de amibiasis invasiva, sobre todo de disentería amibiana. A su vez, la disentería amibiana es 5 a 50 veces más frecuente que el absceso hepático.

(http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen1/ciencia2/47/html/sec_9.html)

De acuerdo con las normas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) emitidas en 1997, todos los portadores asintomáticos de la especie *E. histolytica* deberán tratarse con antiamibianos lumbinales, debido al riesgo sanitario que representan y a la posibilidad que manifiesten síntomas de amibiasis intestinal. La amibiasis invasora es un importante problema médico y social en China, México, la porción oriental de América del Sur, Sureste y Oeste de África, y en todo el Sureste de Asia, incluyendo el subcontinente indio. En estas regiones, las condiciones sanitarias inadecuadas y la presencia de cepas virulentas de amibas se combinan para sostener una incidencia elevada de amibiasis intestinal y de absceso hepático amibiano. (Ximénez y col., 2007).

Las formas potencialmente mortales de amibiasis invasora son fundamentalmente el absceso hepático y la colitis fulminante; del 2 al 10% de las personas con absceso hepático mueren; en cambio, la mortalidad por colitis amibiana grave es hasta del 70%. Es probable que la amibiasis invasora produzca anualmente entre 40,000 y 110,000 muertes en el mundo. (http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen1/ciencia2/47/html/sec_9.html)

Amibiasis intestinal

Los pacientes con amibiasis intestinal sintomática o colitis amibiana refieren dolor abdominal tipo cólico de varias semanas de evolución, en ocasiones tienen pérdida de peso y diarrea, que puede ser acuosa con abundante moco y poca materia fecal acompañada o no de sangre, cuando ésta existe se habla de disentería amibiana. El inicio suele ser insidioso y los síntomas pueden ser muy heterogéneos, lo que dificulta el diagnóstico (Ximénez y col., 2007). Se caracteriza por un síndrome diarreico o disentérico con 3 a 4 evacuaciones diarias, precedidas de dolor abdominal moderado de tipo cólico, pujo y tenesmo rectal. Las heces contienen mucosidad y sangre, fiebre moderada o ausente, la palpación abdominal es dolorosa en el marco colónico. (Náquira, 1997)

El cuadro histopatológico revela úlceras que pueden ser pequeñas (0.5 cms. de diámetro), circulares, conteniendo, moco y sangre; y en casos más graves, úlceras de más de 1 cm. de diámetro de forma irregular y bordes elevados. Las localizaciones de estas lesiones son generalmente el ciego, ángulos hepático y esplénico del colon, y el restosigmoides. (<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/amibiasis.html>)(Figura4).

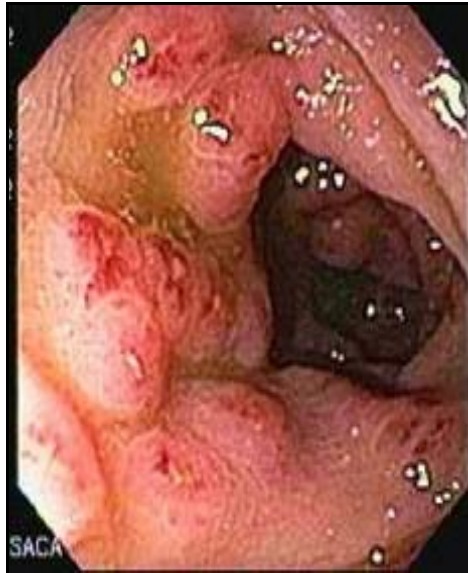


Figura 4. Colon con presencia de múltiples úlceras causadas por *E. histolytica*. (Julio Murra-Saca. Atlas de Video Endoscopia Gastrointestinal El Salvador, 2012).



Figura 5. Absceso hepático causado por *E. histolytica* (Julio Murra-Saca. Atlas de Video Endoscopia Gastrointestinal El Salvador,2012).

Amibiasis extraintestinal (Absceso hepático amibiano)

Los trofozoítos de *E. histolytica* pueden llegar por diseminación hematógica a todos los órganos, a partir de la invasión de los vasos sanguíneos de la pared intestinal. El hígado es el órgano en el que ocurre con mayor frecuencia. Los trofozoítos que arriban producen lisis del tejido del órgano afectado y con el tiempo se forma una cavidad que recibe el nombre de absceso amebiano, llena de detritos del tejido lizado (Náquira, 1997).

Alrededor del 80% de los pacientes con absceso hepático amibiano tienen síntomas después de dos a cuatro semanas de la infección, aunque no existe un consenso en relación con un periodo de incubación de la enfermedad invasora propiamente dicho. Entre los viajeros con absceso hepático luego de dejar un área endémica, 95% lo desarrolla en los primeros cinco meses. El derrame pleural y la ictericia son raros. Si bien el sitio primario de la infección es el colon, menos de un tercio de los pacientes con absceso hepático tiene diarrea activa. Los síntomas gastrointestinales concomitantes incluyen: náusea, vómito, distensión abdominal y estreñimiento, estos síntomas se manifiestan del 10 al 35% de los casos (Ximénez y col., 2007) (Figura 5).

Epidemiología

La infección por *E. histolytica*, se encuentra en todo el mundo, desde climas muy fríos hasta zonas tropicales. Sin embargo estos protozoos se encuentran en proporciones pequeñas en países industrializados y la transmisión en países desarrollados ha sido reportada sobre todo en poblaciones homosexuales. La amibiasis es más frecuente en regiones tropicales, climas cálidos y templados. Se ha descrito que afecta del 10 al 20% de la población mundial y alcanza prevalencias de 30 a 55% en regiones tropicales y sub tropicales carentes de higiene (Benzeguir, 1999).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que la amibiasis resulta en 100,000 muertes/año considerándose como la segunda enfermedad asociada a mortalidad solo después de la malaria en términos de protozoarios (OMS, 1997). Se considera que 10% de la población mundial está infectada y el 90% son asintomáticos. La prevalencia combinada de la colitis amibiana y el AHA se estima en 40-50 millones de casos anuales en todo el mundo, dando

lugar a 40,000 a 100,000 muertes (Aristizábal y col., 1991; Fotedar y col., 2007). En nuestro país la amibiasis es considerada uno de los problemas de salud pública más importantes. Un estudio seroepidemiológico reportó que 8.41% de la población presenta anticuerpos antiamebianos, lo que demuestra la elevada frecuencia de infección por este parásito (Caballero y col. 1994).

En las tres últimas décadas, la morbilidad por absceso hepático amibiano ha disminuido en algunas áreas geográficas de México, particularmente donde los servicios públicos (drenaje, agua potable y pavimentación de calles) y de salud han mejorado en calidad y en accesibilidad para sus habitantes. No obstante, la heterogeneidad en las características geográficas, socioeconómicas y en las propias estructuras sociales de las diferentes regiones mantuvo cifras de incidencia por 100,000 habitantes de 6.37% en el año 2000 y 3.66% en el 2002. En 2007 la mortalidad relacionada con los abscesos hepáticos amibianos se estima en 50 a 90 casos (Ximénez y col., 2007).

El estado de Sonora, el AHA es uno de los cinco estados (Colima, Chiapas, Nayarit, Sinaloa y Sonora) cuya tasa de incidencia es mayor a 10 casos por cada 100,000 habitantes (Sonora=12.57 casos/100,000 habitantes). Los datos oficiales de morbilidad por AHA están disponibles hasta el año 2002, cuando dejó de ser una enfermedad de comunicación obligatoria en México. Durante el año 2005, se realizó una evaluación de la morbilidad por AHA en el estado de Sonora, a través de un estudio retrospectivo (2000-2005) de los egresos hospitalarios y el cálculo de la incidencia de egresos hospitalarios por AHA. La investigación se llevó a cabo en los cuatro principales hospitales generales e infantiles de la entidad. Los resultados obtenidos señalan que la incidencia de egresos hospitalarios por AHA en Sonora fue de 1.19 casos/1000 egresos, entre los años 2000 a 2005, lo cual corresponde a una incidencia poblacional para los años estudiados, de 7.14 - 9.12 / 100,000 habitantes. El 75% de los casos correspondieron a habitantes de 5 municipios: Santa Ana, Hermosillo, Ures, Bacanora y Empalme (Valenzuela y col., 2007).

Tratamiento

El tratamiento de la amibiasis intestinal debe hacerse siempre, pues aún en personas asintomáticas es necesario exterminar los parásitos del intestino con dos finalidades: Evitar que en algún momento haya invasión de los tejidos y eliminar la fuente de infección. Según el tipo de infección será elegido el tratamiento a utilizar tomando en cuenta que este dependerá del diagnóstico clínico. Un paciente con un cuadro de colitis amebiana no requiere el mismo tratamiento que un portador asintomático, debido a los sitios y mecanismos de acción de los medicamentos empleados. Éstos se suelen dividir en luminales, como las 8-hidroxiquinolinas halogenadas (yodoquinol) y las amidas (teclozán, etofamida, quinfamida, etc.), o tisulares, como los nitroimidazoles (metronidazol, secnidazol, ornidazol). El Metronidazol presenta una acción mixta, es decir, tanto luminal como tisular (Gómez y col., 2007).

Los fármacos de acción luminal se absorben poco y alcanzan elevadas concentraciones en el interior del intestino, pero su actividad se limita a los trofozoítos que están en la mucosa. Las indicaciones para la utilización de los agentes luminales son los pacientes con colitis o un absceso hepático y el tratamiento de portadores a sintomáticos. Los amebicidas tisulares alcanzan elevadas concentraciones en la sangre y los tejidos tras su administración por vía oral o parenteral. El desarrollo de compuestos de nitroimidazol, especialmente Metronidazol fue un importante avance en el tratamiento de la amibiasis invasiva. El Metronidazol también es el fármaco de elección para el tratamiento del absceso hepático amebiano (Caseres, 2004).

Metronidazol

Es un agente sintético antibacteriano y antiparasitario que se encuentra clasificado dentro de los nitroimidazoles, y cuyo uso en la práctica clínica ya tiene más de 35 años. Su indicación original fue para el tratamiento de infecciones provocadas por *Trichomonas vaginalis*, pero con el paso del tiempo se ha ido ampliando su empleo, incluyendo el tratamiento de una variedad de infecciones provocadas por diferentes tipos de organismos (Tabla 1.), inicialmente fue aprobado por la asociación de alimentos y drogas de Estados Unidos (FDA) para uso humano en 1963, se encuentra disponible en formulación oral, parenteral, vaginal y tópica (Bendesky y Menéndez, 2001) (Figura 6). Ha mostrado ser efectivo como radiosensibilizador para células hipóxicas, al

grado de ser empleado para incrementar la efectividad biológica de la radiación ionizante durante la radioterapia de pacientes con cierta clase de tumores así como en combinación con agentes alquilantes para mejorar la eficacia de la terapia antitumoral. Los niveles en suero pueden llegar a detectarse después de 1 hora de la ingestión de una dosis de 500 mg alcanzando una concentración plasmática máxima de 8 a 13 mg/L. La absorción es excelente, presentando una biodisponibilidad de \pm 90% por vía oral. La administración de 500 mg por vía rectal presenta una biodisponibilidad de 62 al 82% y concentración máxima de 4 a 5.5 mg/L (Bendesky y Menéndez, 2001).

Tabla I: Organismos sensibles al Metronidazol.

Organismo
Protozoarios
<i>Trichomonas vaginalis</i>
<i>Giardia lamblia</i>
<i>Entamoeba histolytica</i>
Anaerobios Gram-Negativos
<i>Bacteriodes fragilis</i>
Otros <i>Bacteriodes spp</i>
<i>Fusobacterium spp.</i>
<i>Actinobacillus spp</i>
<i>Campylobacter fetus</i>
<i>Helicobacter pylori</i>
<i>Gardenerella vaginalis</i>
Anaerobios Gram-Positivos
<i>Peptostreptococcus</i>
<i>Clostridium perfringes</i>
<i>Clostridium difficile</i>

Fuente: Bendesky y Menéndez, 2001.

Tanto la administración oral como intravenosa, son ampliamente distribuidas en los tejidos y fluidos del organismo, debido en gran parte a que su unión a proteínas séricas o plasmáticas es relativamente baja (< 20%) (Bernard, 1981).

El MTZ en humanos es principalmente excretado por vía renal, en forma de sus metabolitos y en menor grado como su forma parental. Los valores medios de eliminación, varían entre 6 y 12

horas en individuos sanos. Usando trazas radiactivas, los estudios de farmacocinética de MTZ en humanos muestran que en un periodo de 5 días, aproximadamente el 77% del medicamento es eliminado en la orina y el 14% es excretado en las heces 40%. Alrededor del 5% es excretado como bióxido de carbono (CO₂) como resultado del metabolismo reductivo de la flora intestinal (Vives y col., 2004). Puede también ser encontrado en otros fluidos corporales incluyendo fluidos seminales y vaginales, bilis, saliva e inclusive como ya se había mencionado con anterioridad en leche materna, donde la vida media es de 9 horas aproximadamente (Bernard, 1981).

Farmacodinamia

El MTZ y sus metabolitos hidroxilados, no inducen la degradación del ADN si no son activados en la célula blanco. De acuerdo con varias evidencias experimentales, los metabolitos activos serian productos de reducción del grupo nitro del MTZ.

Esta droga podría actuar como aceptor de electrones, dicha captación provocaría su reducción, inhibiendo tanto la liberación de H₂ como la producción de ATP. La reducción de cada molécula de MTZ requiere 3 electrones, la estructura del metabolito activo no se conoce, pero por las características de su reactividad se supone que es un radical libre u otra molécula fuertemente electrofílica.

La mayor parte de los estudios sobre su mecanismo de acción, se han efectuado en bacterias y se conoce menos como se reduce en parásitos y en células tumorales en anaerobiosis pero existen evidencias de que el MTZ puede reducirse en anaerobiosis sin intervención de enzimas tiene efecto bactericida, al finalizar la reducción del fármaco la liberación de H₂ se reestablece y las bacterias no pierden vitalidad por lo que se cree, no es debido a la interrupción en la producción de energía. Los derivados reducidos actúan sobre las moléculas de ADN produciendo hipercromaticidad y disminución de la viscosidad, además, inhiben a la ADNasa 1, enzima que cataliza la reparación del ADN fragmentado. El conjunto de estas evidencias señala una extensa ruptura no reparable del ADN y este parece ser el mecanismo del efecto bactericida (Vives, y col., 2004)

Efectos secundarios

Los efectos adversos raramente son lo suficientemente severos para causar la suspensión del tratamiento; los más comunes son cefalea, náuseas, sequedad de la boca, y sabor metálico; ocasionalmente se presenta vómito, diarrea y dolor abdominal. Se han observado algunos efectos neurotóxicos: pueden aparecer mareo, vértigo y raramente, encefalopatía, convulsiones, incoordinación y ataxia. La reversibilidad de estas neuropatías puede ser lenta o incompleta (Bendesky y Menéndez, 2001). Está contraindicado en pacientes con enfermedad activa del sistema nervioso central (SNC). La dosis, debe ser disminuida en pacientes con enfermedad obstructiva del hígado o disfunción hepática, cirrosis alcohólica, o disfunción renal severa. También se ha reportado pancreatitis aguda concomitante al tratamiento con MTZ (Bendesky y Menéndez, 2001).

Dada la facilidad que tiene de atravesar la barrera placentaria, este medicamento presenta un potencial teratogénico y embriotóxico en ratones, ratas y conejos, a pesar de que en humanos, se ha mostrado que a dosis terapéuticas, el MTZ no presenta aparentemente ningún peligro no se recomienda el tratamiento durante el primer trimestre del embarazo. El MTZ es un mutágeno en sistemas bacterianos, produciendo sustitución de pares de bases; sin embargo, su mutagenicidad y actividad clastogénica en mamíferos es controversial (Bendesky y Menéndez, 2001). Publicaciones recientes, han mostrado que su metabolito hidroxilado tiene la capacidad de inducir daño al ADN en linfocitos humanos manifestados como rompimientos de cadena sencilla y aberraciones cromosómicas, aunque varía la respuesta según los individuos (Vives, y col., 2004)

Existen suficientes evidencias para aceptar la actividad carcinogénica en animales experimentales, produciendo linfomas, cáncer pulmonar y fibroadenomas mamarios y adenocarcinomas por lo que ha sido prohibido para uso veterinario en Alemania (Bendesky y Menéndez, 2001).

De 1960 a la fecha, se han llevado a cabo diferentes estudios en poblaciones humanas terapéuticamente expuestas al fármaco. Pese a que la mayoría de los datos son negativos, en un estudio de ellos el carcinoma broncogénico aumentó significativamente en el grupo que tomó MTZ (Vives, y col., 2004)

Propóleos

Son productos naturales que las abejas elaboran a partir de exudados y resinas de árboles, plantas y flores; siendo utilizado principalmente para el tratamiento y reparación de la colmena. Para éstas, los propóleos representan el arma química más importante para proteger su colmena contra microorganismos ya que impiden su proliferación; así mismo, estos bloquean el paso de pequeños insectos y animales que pudieran invadir la colmena y transformarse en un peligro para su comunidad. Por otro lado, evitan pérdida de calor al ser depositados sobre las grietas o hendiduras de la colmena, reducen vías de acceso, ayudan a consolidar los componentes de la colmena y aíslan las partículas extrañas dentro de la colonia para evitar su descomposición (Paulino, 2003) (Figura 6).



Figura 6. Aspecto de los propóleos. (<http://www.propolisnatural.es>)

La composición química de los propóleos es muy compleja y varía dependiendo de las zonas geográficas, así como de la vegetación de la cual son recolectadas. En general, están compuestos por 50% de resinas, 30% de ceras, 10% de aceites aromáticos y esenciales, y el resto de otros compuestos. Distintos análisis químicos realizados a los propóleos, han revelado que los principales componentes son de tipo fenólico como los flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres, además de aceites esenciales, di y triterpenos entre otros (Castañeda, 2004).

En cuanto a su consistencia, es viscosa variable, dependiendo de su origen y la temperatura hasta los 15°C es duro y se torna más maleable a medida que la temperatura aumenta (Hernández y col., 2005).

Hay evidencias históricas que datan de 300 años a.C. del uso de los propóleos con fines medicinales. Los antiguos egipcios utilizaban para embalsamar sus momias y los griegos lo utilizaban para aliviar diferentes padecimientos. Actualmente, se les atribuye un amplio espectro de actividades biológicas como la capacidad antifúngica, antibacteriana, antiviral, antioxidante, antiinflamatoria (Bankova, 2005).

La demanda de propóleos es creciente en un mundo cada vez más globalizado y que tiende a volver a los productos naturales como fuente de materia prima para resolver problemas tanto en el área alimentaria como farmacológica (Iñigo y Soto, 2009).

En México, se ha extendido la recolección y uso de propóleos como promotor de la salud y exista una amplia variedad de productos derivados de los propóleos en diferentes presentaciones (Angulo, 2005).

Composición química

Los componentes químicos en los propóleos dependen de la flora local cercana al sitio donde se encuentra la colmena. Las abejas recolectan resinas en un perímetro de 3 a 4 kilómetros alrededor de la colmena. Debido a las distintas características fitogeográficas, existe una gran diversidad en la constitución química de los propóleos (Bankova, 2005).

Los compuestos identificados en los propóleos se originan de tres fuentes: exudados de las plantas que son recolectados por las abejas, sustancias secretadas del metabolismo de las abejas y materiales que son introducidos durante el proceso de elaboración del propóleos (Iñigo y Soto, 2009).

A la fecha se han identificado más de 300 constituyentes en los propóleos entre los que se encuentran ácidos fenólicos, terpenos, ácido cinámico, ácido caféico (CAPE), varios ésteres y flavonoides. Uno de los constituyentes más estudiados es el ácido caféico, el cual ha sido identificado como uno de los principales compuestos activos de los propóleos con capacidad

antioxidante, antitumoral y quimiopreventiva. El CAPE ha sido estudiado por diferentes grupos de investigadores a nivel mundial; en años recientes se determinó que la actividad antiproliferativa de CAPE está mediada por apoptosis (Angulo, 2005).

Existen otros constituyentes de los propóleos de tipo flavonoide que son importantes en términos de acción farmacológica. Varios estudios clínicos y epidemiológicos han puesto en evidencia la correlación inversa entre el consumo de productos naturales ricos en flavonoides con el desarrollo de enfermedades como el cáncer. En los últimos años se ha incrementado el interés por los flavonoides derivados de los propóleos ya que ellos son en parte responsables de la actividad biológica. Dentro de los flavonoides de mayor interés están la quercitina, kampferol, naringenina, acacetina, apigenina, pinocembrina y galangina, así como derivados del ácido cinámico (Angulo, 2005).

En Ures, Sonora, las abejas colectan exudados a partir de especies vegetales que se encuentran en abundancia y disponibles durante todo el año (naturaleza perenne) en la región. En la zona de recolección (29°27'81"N; 110°23'39 8"W), la distribución de la vegetación es muy irregular y su aspecto cambia radicalmente de lugar a lugar. La flora nativa característica está constituida por: plantas xerófilas (principalmente cactáceas), *Prosopis velutina* (mezquite), *Olneya tesota* (palo fierro), *Parkinsonia praecox* (Brea), *Populus fremontii* (álamo) y *Ambrosia ambrosioides* (chicura) (Alday, 2008)

Los propóleos recolectados de estas regiones han sido estudiados e identificado por HPLC-MS permitiendo caracterizar 13 compuestos entre los más abundantes están: pinocembrina, 3-O-acetato de pinobanksina, Crisina y galangina (Alday, 2008)

Propiedades biológicas de los propóleos

Debido a la gran cantidad de flavonoides contenidos en los propóleos, se les atribuyen un amplio espectro de actividades biológicas: antifúngicas, antiviral, antibacteriana, antioxidante, anticancerígena y antiparasitaria (Díaz, 2010).

La actividad antimicrobiana y antiviral de propóleos de diferentes regiones de Egipto se evaluó, mostrando gran inhibición en el crecimiento de bacterias, pero el grado de inhibición varió de

acuerdo al origen de los propóleos. Se recolectaron en las regiones de Dakahlia, Sharkia, Ismalia Egipto. Los propóleos recolectados en Dahkahlia tuvo la actividad antimicrobiana más alta contra *Escherichia coli* y *Candida albicans*, esto se debe a que estos propóleos poseen ácidos alifáticos y aromáticos, ésteres de cafeatos, triterpenos y flavonoides. Los propóleos proveniente de Sharkia mostró la mayor actividad en contra de *Staphylococcus aureus*. Los provenientes de Ismalia (Egipto) tuvieron la mayor actividad antiviral en contra de Reo-virus. La variación de la actividad parece deberse a la diferencia en la composición química de los tres propóleos (Quintero, 2005).

Los propóleos poseen actividad antioxidante y ésta es atribuida a los compuestos fenólicos, principalmente flavonoides. La actividad antioxidante de propóleos de diversas regiones geográficas, ha sido evaluada por medio del ensayo de β -caroteno-ácido linoléico, el cual se evalúa la decoloración del β -caroteno inducida por los radicales libres producidos por la oxidación del ácido flavonoide. La actividad antioxidante parece estar relacionada con la concentración de flavonoides presentes en los propóleos, aunque también otros compuestos pueden estar constituyendo con dicha actividad (Castañeda, 2004).

En cuanto a la actividad antitumoral de este producto natural, Om-Alí revela que los propóleos provenientes de Egipto administrados 24 horas antes de la inyección de Earlich Ascitis Carcinoma (EAC), inducen una reducción significativa del tamaño del tumor así como de la viabilidad de las células tumorales; concluyendo que el mecanismo antitumoral pudiera estar mediado por la prevención del daño oxidativo y la inducción de apoptosis (Om-Ali, 2003).

La actividad antifúngica de los propóleos también ha sido demostrada. Propóleos de Brasil, Turquía y Argentina mostraron actividad en contra de *C. Albicans*, entre los compuestos asociados con la actividad antifúngica están el ácido caféico, ácido ferulico, ácido cinámico, pinobanksina, galangina y pinocembrina (Robles y col., 2012).

Actividad antiparasitaria

La actividad de los propóleos contra la Leishmaniasis es de las más estudiadas además, diversos estudios sobre los efectos de los propóleos de Brasil, Turquía, Egipto y Bulgaria han sido estudiados contra varios protozoarios. Entre los compuestos identificados en estos propóleos están: Ácido caféico, ácido hidroxycinámico y pinostrobin (Robles y col., 2012).

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 las cuales redujeron en un 58.5% la proliferación de los parásitos (Ragaa, 2007).

Los propóleos de Brasil y Bulgaria fueron evaluados contra *Leishmania* (*L. major*, *L. amazonas*, *L. braziliensis*, *L. chagasi*), los resultados mostraron 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 (Díaz, 2010).

En Bulgaria, fueron administrados extractos etanólicos de los propóleos por vía oral en dosis de 25 a 100 mg/Kg a ratones de experimentación 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 los ratones (Dantas y col. 2005).

En Bagdad, en el 2011, se evaluó la actividad inhibitoria de los extractos etanólicos de propóleos contra cultivos axénicos de *E. histolytica*. Los resultados variaron de acuerdo a la concentración del extracto y periodos de incubación. La inhibición más alta se mostró con las concentraciones de 25, 50 mg/mL de propóleos, todos en incubación de 24 a 48 horas, dando como resultado 76% de inhibición en la concentración de 125 mg/mL, mientras que en las concentraciones de 25 y 50 mg/mL se inhibió más del 90%. Con la microscopia de luz se pudieron observar cambios morfológicos en los trofozoítos de *E. histolytica* (Ardalan, 2011).

Tabla II. Origen de los propóleos y su actividad antiparasitaria estudiada.

Orígen de propóleos	Actividad contra
Brasil	<i>Leishmania</i>
Turquia	<i>Leshmania</i>
Bulgaria	<i>Leshmania, Trypanosoma cruzi</i>
Egipto	<i>Schistosoma mansoni</i>
Baghdad	<i>Entamoeba histolytica</i>

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo axénico de *Entamoeba histolytica*

Se utilizaron trofozoítos de *E. histolytica* cepa HM1:IMSS, los cuales se mantuvieron en medio de cultivo Diamond, a un pH de 6.8 (Anexo I) con Penicilina/Estreptomicina (10 µg/mL) y suplementado con suero bovino adulto al 10% (SBA.MICROLAB Lote F-9901); manteniéndose a 36.5 °C y adicionados

La cepa fué donada amablemente por la Dra. Shibayama Salas Mineko del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV).

Estandarización del experimento según la fase logarítmica de *Entamoeba histolytica*.

Se evaluó el período en que la amiba llega a su fase logarítmica, para establecer las horas de los posteriores experimentos, con lo que podremos confirmar que el efecto (muerte) fue por lo propóleos y no por causas de su ciclo vital (carencia de nutrientes, etc.). Los resultados de los ensayos que se muestran a continuación se realizaron en un total de 78 horas: 30 horas de incubación en puro medio de cultivo y 24 horas de incubación con los diferentes reactivos a probar (54 horas) e inmediatamente contar trofozoítos viables por mL, en cámara de Neubauer empleando azul tripano. Los diversos componentes que se evaluaron fueron los siguientes: DMSO, MTZ, propóleos de Ures + DMSO, Propóleos de Aguascalientes + DMSO y 24 horas después (78 horas) se volverá a contar para una segunda evaluación de la actividad de dichos componentes.

Curvas de crecimiento amibiano: Medio de cultivo axénico Diamond, dimetil sulfóxido y Metronidazol como control positivo.

Se realizaron curvas de crecimiento por triplicado en tubos de 13x100 de vidrio con tapadera de rosca. Se utilizó un inóculo inicial de 1×10^4 trofozoítos/mL (7.3 mL) y se observó el crecimiento

del cultivo durante 6 días. Cada 24 horas, se evaluó la viabilidad celular utilizando un hematocitómetro (cámara de Neubauer) mediante el colorante de azul de tripán. Lo cual nos permitió identificar en qué momento la amiba llega a su fase logarítmica, todo esto para establecer las condiciones óptimas de los posteriores experimentos.

El dimetil sulfóxido (DMSO) es el solvente utilizado para los propóleos. Por lo que se establecieron las concentraciones óptimas de DMSO, a la cual el solvente afectar menos el cultivo amibiano. Se realizaron una serie de ensayos a diferentes concentraciones de DMSO por triplicado. Se utilizó un inóculo inicial de 1×10^4 trofozoítos/mL (7.3 mL) incubados a 36.5 °C y se observó el crecimiento del cultivo cada 24 horas (durante 6 días). Al término de este tiempo, de igual manera se evaluó la viabilidad de los trofozoítos viables/mL con la cámara de Neubauer y azul de tripán. Esto nos permitirá restar el efecto provocado por el disolvente en el cultivo amibiano.

Para evaluar el efecto de los propóleos en cultivo axénico de *E. histolytica* fue necesario incluir una droga antiamebiana como control positivo. Se optó por Metronidazol, un antiamebiano con eficacia para eliminar a la amiba. Se realizaron ensayos de proliferación celular por triplicado a diferentes concentraciones seriadas (2.0, 1.0, 0.05 µg/mL). Se utilizó un inóculo inicial de 1×10^4 trofozoítos/mL (7.3 mL) incubados a 36.5 °C para proceder con la prueba de viabilidad en la cámara de Neubauer y azul de tripán a las 24 y 48 horas después de adicionar la droga.

Evaluación de la capacidad antiamebiana de los propóleos: Ures, Sonora y Aguascalientes

Para evaluar la actividad antiamebiana solo de propóleos se empleó el cultivo axénico de *E. histolytica* cepa HM1:IMSS. Los propóleos a evaluar, se probaron en concentraciones de 200, 100, 50, 25 µg/mL. El ensayo se realizó en tubos de 13x100 de vidrio con tapadera de rosca en medio de Diamond con un inóculo inicial de 1×10^4 trofozoítos/mL incubados a 36.5 °C por 24 horas. Cada condición experimental se realizó por triplicado. Se tomaron 300 µL de cada una de las concentraciones y se adicionaron por triplicado. A otro conjunto de tubos, se le añadió solamente DMSO como control de referencia y un último conjunto como control de crecimiento normal. Una vez adicionados los compuestos se incubaron por 30 horas. Una vez cumplido el tiempo de incubación se despegaban los trofozoítos de la pared del tubo, en agua con hielo por

un periodo de 15 minutos para después homogenizar y contar los trofozoítos viables en cámara de Neubauer. Los resultados fueron graficados en el programa Prisma 3.

RESULTADOS

Cultivo axénico de *Entamoeba histolytica*

Los trofozoítos de *E. histolytica* cepa HM1:IMSS (Figura 7), se mantuvieron en cultivo axénico en medio Diamond a 36.5 grados centígrados realizando pases de 17 mL de cultivo con trofozoítos a tubos de 18X150 con tapón de rosca conteniendo 17 mL.

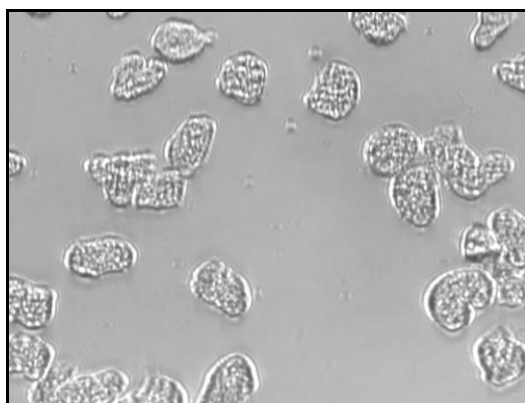


Figura 7: Trofozoítos de *E. histolytica* cepa HM1:IMSS mantenidos en medio de cultivo Diamond donde se aprecian las formas irregulares y prolongaciones de dicho parásito debido a la presencia de pseudopodos.

Curva de crecimiento de *E. histolytica* HM1:IMSS

En la Figura 8, se puede apreciar la curva del crecimiento amibiano a partir del tiempo 0, en el cual se adicionaron 10,000 trofozoítos/mL (9%) en medio Diamond. A las 24 horas después de mantenerlas a 36.5 °C, se obtuvo un conteo de 20,000 trofozoítos/mL (20% de proliferación), a las 48 horas se obtuvo un conteo de 62,000 trofozoítos/mL (60% de proliferación), a las 72 horas obtuvo un conteo de 136,666 trofozoítos/mL (100% de proliferación), a las 96 horas se obtuvo un conteo de 72,500 trofozoítos/mL (53% de trofozoítos viables), y a las 120 horas se obtuvo un conteo de 34,000 trofozoítos/mL (24% de trofozoítos viables). Por lo que la fase de crecimiento logarítmica de *E. histolytica* cepa HM1:IMSS, se determinó entre las 48 y 72 horas de cultivo a 36.5 °C y la confluencia se aprecia a las 72 horas

. Efecto de DMSO en cultivos axénicos de *E. histolytica* HM1:IMSS

En la Figura 9, se muestra el efecto del DMSO a diferentes concentraciones (0.0%, 0.062%, 0.125% y 0.25%), en el crecimiento amibiano el cual causó muerte celular en todos los ensayos; sin embargo, la concentración a la cual se presentó menos efecto fue al 0.062%, produciendo la muerte del 7% de los trofozoítos cultivados. Obteniéndose un conteo de trofozoítos viables por mL en el cultivo sin DMSO de 111,666 (100 de proliferación) y con DMSO (0.062%) se obtuvo un conteo de 102,499 (93% de proliferación) trofozoítos viables/mL, Es importante mencionar que la adición del DMSO se realizó a las 30 horas del cultivo celular y el conteo de trofozoítos se realizó a las 24 horas después (54 horas del cultivo), estando dentro de la fase logarítmica del crecimiento amibiano.

Efecto del Metronidazol como control positivo de la actividad antiparasitaria en cultivos axénicos de *E. histolytica* HM1:IMSS

Para evaluar la actividad antiamebiana de los propóleos en cultivo axénico de *E. Histolytica* HM1:IMMS, fue necesario incluir un antiparasitario de referencia en los experimentos de inhibición de la proliferación de trofozoítos, esta droga fue el MTZ, antiparasitario de elección para tratar la amibiasis (Ahmed, 2011).

En las Figuras 10 y 11, se muestra el efecto del MTZ en el crecimiento amibiano. A las 24 horas el 85% de la población estaba muerta y a las 48 horas de incubación la cifra aumento a 98%, obteniéndose a las 24 horas un conteo de 108,405 trofozoítos viables por mL (100 % de proliferación) en el cultivo sin MTZ y con MTZ a las diferentes concentraciones manejadas (2.0, 1.0 y 0.5 µg/mL), se obtuvieron 14,850, 25,333, 58,666 respectivamente (17, 29 y 58 % de proliferación). Posteriormente, A las 48 horas de cultivo, el tubo sin MTZ, presentaba 146,000 trofozoítos viables/mL mientras que con MTZ a las concentraciones de 2.0, al 1.0 y al 0.5 µg/mL se observaron 6,250, 90,000, 115,000 (1, 6, 63% de proliferación) trofozoítos viables/mL respectivamente. Es importante mencionar que la adición del MTZ se realizó a las 30 horas del cultivo celular y el conteo de trofozoítos se realizó a las 24 horas después (54 horas del cultivo), estando dentro de la fase logarítmica del crecimiento amibiano.

Los cultivos tratados con MTZ mostraron desprendimiento en el tubo formando cúmulos con presencia de detritos celulares. Los resultados mostraron que a las 24 horas, a una concentración de 2.0 $\mu\text{g/mL}$ de Metronidazol se inhibe la proliferación de la amiba un 86% aproximadamente y a las 48 horas una se inhibición del 99%.

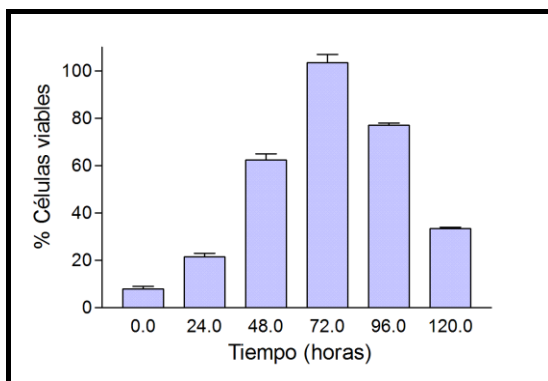


Figura 8. Curva de crecimiento de *E. histolytica* HM1:IMSS en medio de cultivo Diamond, se evaluó cada 24 partiendo del tiempo 0 hasta las 120 horas (5 días) por medio del conteo en cámara de Neubauer.

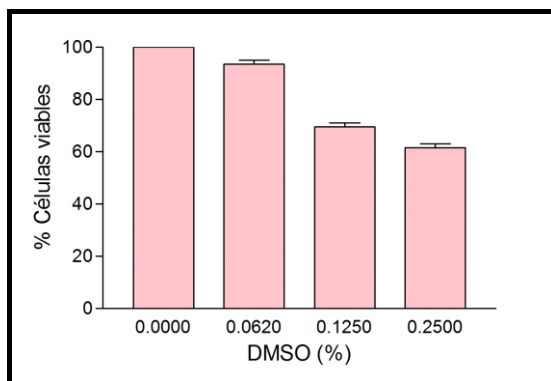


Figura 9: Efecto de DMSO en cultivos axénicos de *E. histolytica* HM1:IMSS. La proliferación celular se evaluó a las 24 horas posteriores a la adición del solvente al cultivo celular. Como cultivo control se utilizaron cultivos sin DMSO y en fase logarítmica en medio Diamond.

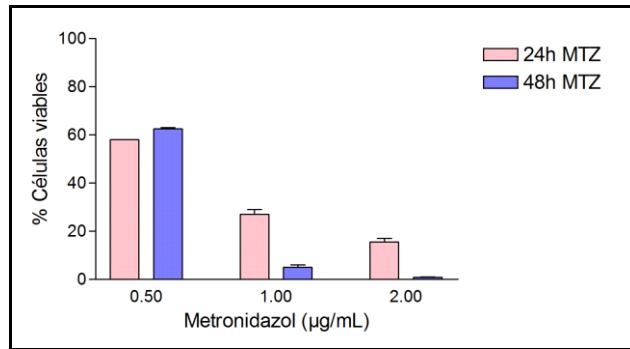


Figura 10: Efecto del Metronidazol como control positivo de la actividad antiparasitaria en cultivos axénicos de *E. histolytica* HM1:IMSS. Los ensayos fueron evaluados a las 24 y 48 horas después de la adición del Metronidazol. Los datos de la gráfica representan los experimentos por triplicado.

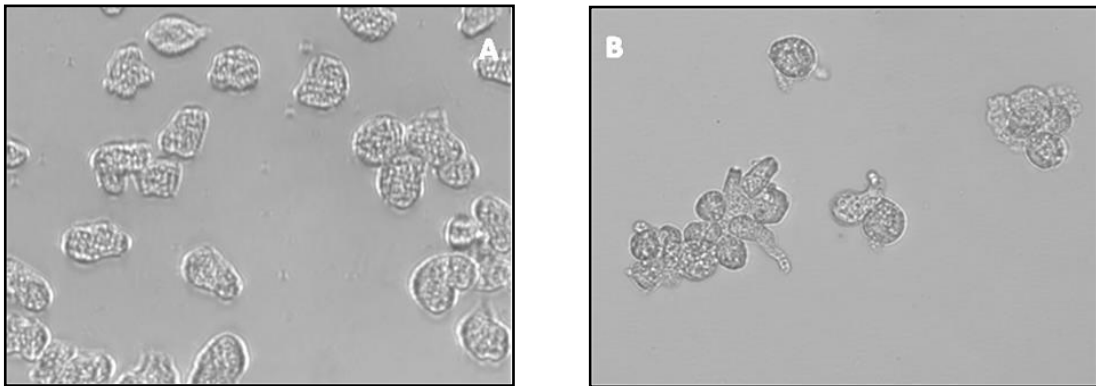


Figura 11: Efecto del Metronidazol sobre la morfología de trofozoítos de *E. histolytica* (resolución 20x). Las figura **A** muestra un cultivo axénico normal de *E. histolytica* en medio de Diamond. En la figura **B** se muestra el cultivo tratado con una concentración de 2 µg/mL a las 24 horas posteriores a la incubación.

Evaluación de la actividad antiamebiana de los propóleos Aguascalientes y Ures, Sonora.

Estudios previos han demostrado que los propóleos de Aguascalientes (PA) y Ures (PU) poseen una actividad antiparasitaria en contra de *Giardia lamblia* (Alday, 2012). Con el objetivo de ampliar el conocimiento de la actividad antiparasitaria de los propóleos mencionados, se evaluó su efecto sobre trofozoítos de *E. histolytica* cultivados axénicamente en medio Diamond.

Los propóleos de Aguascalientes mostraron una inhibición significativa en la proliferación celular con respecto al grupo control. En la Figura 12, se observa el porcentaje de actividad antiparasitaria del propóleos Aguascalientes a diferentes concentraciones (200,100, 50 y 25 $\mu\text{g/mL}$), obteniéndose 16,000, 41,000, 83,000 y 103,500 trofozoítos viables/mL y el porcentaje de la actividad antiparasitaria correspondiente a cada concentración sería 80, 54, 10 y 7% respectivamente.

En la Figura 12, se observa el porcentaje de células viables a las 48 horas, del propóleos Aguascalientes a diferentes concentraciones (200, 100, 50 y 25 $\mu\text{g/mL}$), obteniéndose 5,000, 33,000, 48,000 y 107,000 trofozoítos viables/mL y el porcentaje de la actividad antiamebiana correspondiente a cada concentración sería 95, 70, 30 y 12% respectivamente.

En la Figura 13, se observa el porcentaje de viabilidad a las 24 horas, del del propóleos Aguascalientes a diferentes concentraciones (200,100, 50 y 25 $\mu\text{g/mL}$), obteniéndose 15,000, 40,000, y 85,000 y 93,000 trofozoítos viables/mL y el porcentaje de la actividad antiparasitaria correspondiente a cada concentración sería 81, 56, 7 y 6% respectivamente.

En la Figura 13, se observa el porcentaje de viabilidad a las 48 horas del propóleos Ures, Sonora a diferentes concentraciones (200,100, 50 y 25 $\mu\text{g/mL}$), obteniéndose 3,000, 40,000, 75,000 y 110,000 trofozoítos viables/mL y el porcentaje de la actividad antiparasitaria correspondiente a cada concentración sería 97, 61, 38 y 16% respectivamente.

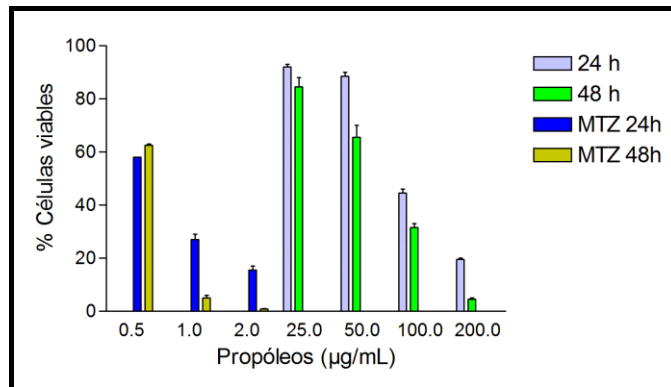


Figura 12: Actividad antiamebiana de propóleos de Aguascalientes en cultivo axénico de *E. histolytica* HM1:IMSS. Ensayo evaluado a las 24 y 48 horas. El porcentaje de mortalidad a la máxima concentración fue de 95 % y una IC₅₀ 100 µg/mL. Esta gráfica representa el promedio de los resultados obtenidos en los diferentes ensayos.

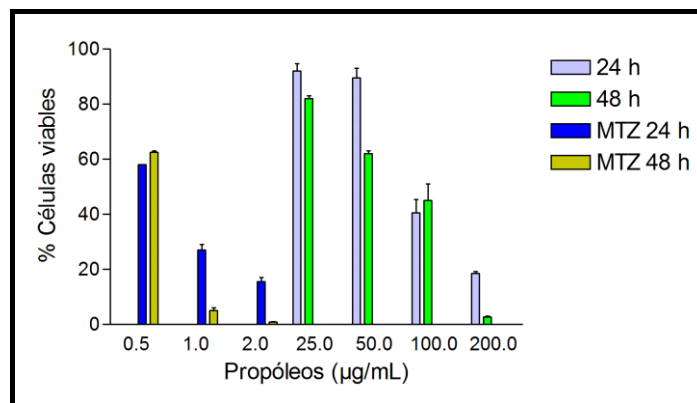


Figura 13: Actividad antiamebiana de propóleos de Ures, Sonora en cultivo axénico de *E. histolytica* HM1:IMSS. Ensayo evaluado a las 24 y 48 horas. El porcentaje de mortalidad a la máxima concentración fue de 97% y una IC₅₀ 91 µg/mL. Esta gráfica representa el promedio de los resultados obtenidos en los diferentes ensayos.

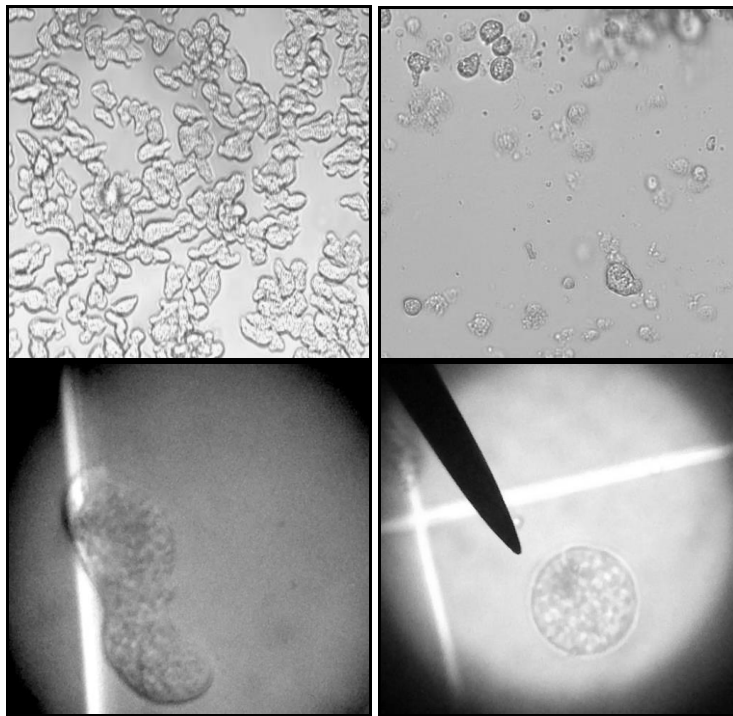


Figura 14: Cambios morfológicos en cultivos axénicos de *E. histolytica* HM1:IMSS inducidos por la exposición de propóleos de Aguascalientes (24horas,20x y 100x).

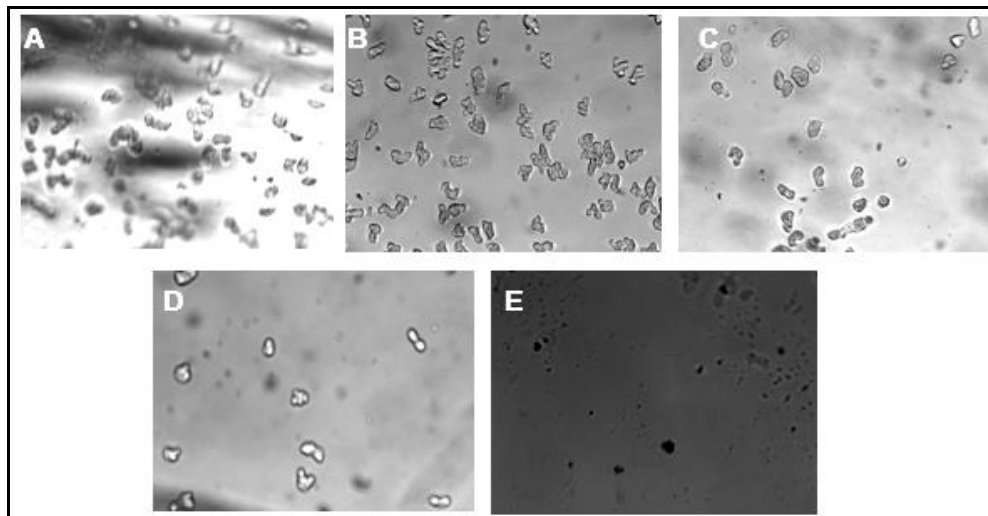


Figura 15: Efecto de la dosis de propóleos de Ures, a las 48 hr en cultivos axénicos de *E. histolytica* HM1:IMSS. La figura A es un cultivo normal de *E. histolytica* que está en fase logarítmica y sin adición de propóleos, la figura B es la concentración más baja añadida al cultivo (25µg/mL) mientras que la figura C se le añadieron 50 µg/mL y se observa una disminución del número de trofozoítos, por otro lado las figuras D y E con una cantidad de 100

µg/mL y 200 µg/mL respectivamente muestran una severa disminución en el número de trofozoítos viables en el cultivo.

El presente trabajo, muestra que los (propóleos Aguascalientes y Ures, Sonora muestran una actividad anti*amibiana* semejante, como se puede observar en la Figura 17.

Además el trabajo reciente determinó que las resinas colectadas por las abejas para la elaboración de los propóleos de Ures, eran principalmente de *P. fremontii*, *A. ambrosioides*, *B. laxiflora* y *P. velutina* las cuales pertenecen a la principal vegetación de Ures, Sonora, aunado a esto se tiene reportado algunos de los componentes principales que conforman a dichos propóleos como: pinocembrina, pinobanksina-3-O-acetato, crisina, galangina y acacetina, también, se identificó la presencia del éster fenetílico del ácido cafeico (Alday, 2012).

La información sobre el propóleos de Aguascalientes es escasa, solo se cuenta con las coordenadas de colecta de propóleos (La Posta Colmenas 21°58'15.52"N 102°22'36.13"O) por lo que se buscó la principal vegetación que posee Aguascalientes, según la página del gobierno del estado de Aguascalientes (<http://www.biodiversidad.gob.mx>) las familias *Bignoniaceae*, *Rosaceae*, *Salicaceae* (*Populus alba* L., *Populus canadensis* Moench, *Populus deltoides* Marsh) son la principal vegetación. En relación con el propóleos de Ures, Sonora se pudiera pensar que el comportamiento tan similar de la actividad antiparasitaria se debe a que *Populus fremontii* es el principal proveedor de resinas para las abejas y la misma especie *Populus spp*, es de las principales en Aguascalientes.

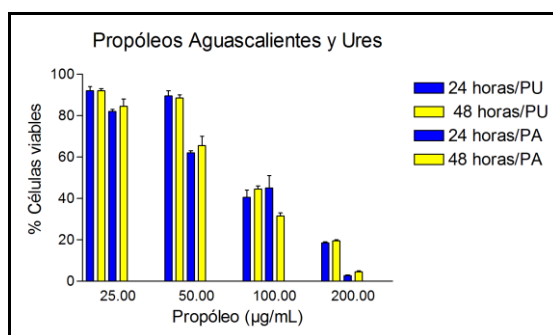


Figura 16: Actividad anti*amibiana* de los propóleos Aguascalientes y Ures, Sonora. Comparación de los cultivos de *E. histolytica* a las 24 y 48 horas en contacto con los propóleos de Aguascalientes (PA) y Ures, Sonora (PU) donde las IC₅₀ fueron de 91 y 100 µg/mL respectivamente.

Como resultado a la búsqueda en la base de datos de literatura relacionada a *E. histolytica* y los propóleos, solo se encontró un estudio llevado a cabo en Baghdad (Ahmed, 2011) donde las concentraciones del propóleos empleado en dicho experimento fueron de 12.5, 25.0 y 50.0 mg/mL probados en periodos de 24 a 48 h, los cuales reportaron una actividad antiparasitaria del 76% en la concentración más baja (12.5 mg/mL), mientras que las concentraciones de 25.0 y 50.0 mg mostraron una actividad de más del 90%; en este reporte no se mencionan las características del propóleos por lo que se desconocen los componentes, además que las concentraciones de propóleos que se emplearon fueron altísimas.

Se ha demostrado que el propóleos de Ures, Sonora posee actividades biológicas como las antibacterianas (Velázquez y col. 2007), antioxidante (Angulo, 2005), antiproliferativas en líneas celulares cancerígenas (Hernández y col. 2007) y antiparasitarias (Alday 2012). En cuanto al propóleo Aguascalientes la información que se tiene es muy poca, solo se ha probado la actividad antiparasitaria en *G. lamblia* obteniendo resultados de hasta un 100% de inhibición. Debido a lo anterior se decidió probar los propóleos en *E. histolytica* para comparar su actividad con *G. lamblia*.

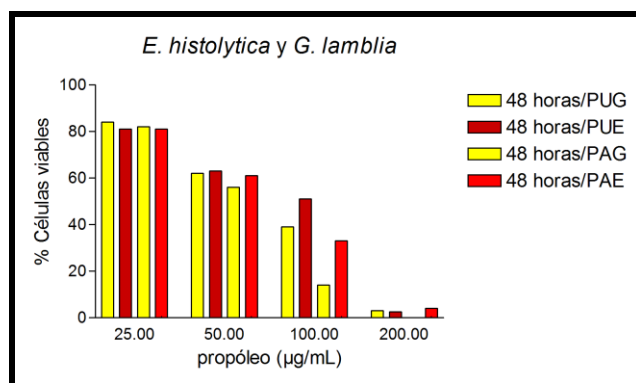


Figura 17: Actividad antiamebiana de los propóleos Aguascalientes y Ures, Sonora en los parásitos *E.histolytica* y *G.lamblia*. Comparación de los cultivos de *E. histolytica* y *Giardia lamblia* a las 48 horas en contacto con los propóleos de Aguascalientes (PA) y Ures, Sonora (PU).

En la Figura 17 se observa el porcentaje de viabilidad a las 48 horas a diferentes concentraciones (200,100, 50 y 25 µg/mL) de ambos propóleos. Para el caso de *G. lamblia* se obtuvo 97, 61, 38 y 16% de actividad antiparasitaria para el propóleo Ures, Sonora partiendo de

mayor a menor concentración de propóleos, mientras que para el de Aguascalientes se presentó una actividad antiparasitaria de 100, 86, 44 y 18%. En cuanto a *E. histolytica*, con los propóleos de Ures, Sonora se obtuvo 97, 76, 46 y 22% de actividad antiparasitaria y para el de Aguascalientes la actividad fue de 95, 70, 30 y 12%. Como se puede observar los valores obtenidos son muy similares entre sí, lo que demuestra su eficiencia con ambos parásitos, en cambio los tratamientos Metronidazol y Albendazol son solo eficientes para *E. histolytica* y *G. lamblia* respectivamente, es decir, el uso Albendazol no es efectivo para tratar *E. histolytica* pues existen reportes que confirman que solo altera su morfología sin lograr detener su reproducción. Por otro lado, *G. lamblia* es muy sensible al Metronidazol pero se evita recetar dicho fármaco ya que para tratar la giardiasis es suficiente administrar Albendazol pues elimina eficientemente al parásito.

La actividad antiparasitaria mostrada en el estudio realizado con *E. histolytica* fue muy similar a la actividad obtenida con *G. lamblia* por lo que sería importante evaluar el potencial terapéutico de los propóleos de Aguascalientes y Ures, Sonora bajo condiciones *in vivo* mediante el uso de animales de experimentación que permitan sentar las bases para su uso en el tratamiento de estas parasitosis en humanos

CONCLUSIONES

Se establecieron las condiciones óptimas de crecimiento de *E. histolytica* HM1:IMSS, en medio de cultivo axénico Diamond con las cuales se pudo obtener la curva de crecimiento de *E.histolytica*, gracias a esto se pudo determinar la actividad anti*amibiana* de los propóleos de Ures, Sonora y de Aguascalientes obteniendo resultados muy favorables ya que las IC₅₀ fueron de 95 y 100 µg/mL respectivamente por lo que este hallazgo nos permite avanzar un poco más en el estudio de estos propóleos en contra de esta parasitosis.

BIBLIOGRAFÍA

A.Pumarola, J. G. Piédrola-Angulo (1995). Microbiología y Parasitología Médica.

Abdel Kader Benzeguir, T. C., Agneta Aust-Kettis, Anders Björkman (1999). "High Frequency of Gastrointestinal Parasites in Refugees and Asylum Seekers upon Arrival in Sweden." Scand J Infect Dis **31**: 79-82.

Ahmed, N. (2011). "Effects of propolis extract on growth of *Entamoeba histolytica* (trophozoites) *in vitro*." Journal of Biotechnology Research Center **1**

Alday Noriega, J. E. (2008). Análisis del efecto de la temporalización sobre el origen botánico, la composición química y actividades biológicas de propóleos de Ures, Sonora. Ciencias Químicas Biológicas, Universidad de Sonora.

Andrés Bendesky, D. M. (2001). "Metronidazol: una visión integral." Rev Fac Med UNAM **44**.

Angulo, A. (2005). Evaluación de la Actividad Antioxidante y Apoptótica de Propóleos Sonorenses. Ciencias Químico Biológicas. Hermosillo, Universidad de Sonora.

Bakker-Grundwald, T. (1993). "*Entamoeba histolytica* as a model for the primitive eukaryotic cell " Parasitol Today **9**: 27-31.

Bankova, V. (2005). "Recent trends and important developments in propolis research." eCAM **2(1)**: 29-32.

Bansal D, S. R., Chawla Y, Malla N, Mahajan RC. (2006). "Multidrug resistance in amoebiasis patients." Indian J Med Res. **124**(189-194).

Bernard B., M. A. M., Ronald L. (1981). "Metronidazole Metabolism in Cultures of *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*." Antimicrobial Agents And Chemotherapy **20(3)**: 410-414.

Biagi., F. (1988). "Enfermedades Parasitarias." Ediciones científicas **2**.

Brown H., N. F. (1985). Parasitología Clínica.

Brumpt, E. (1925). "Brumpt E. Etude sommaire de l' "*Entamoeba dispar*" n. sp. Amibe a` kystes quadrinucleés, parasite de l'homme." Bull Acad Med. (Paris) **94**: 943-952.

Campos Peralta José Manuel, S. M. V., Villalba Magdalena José D'Artagnan. (2011). "*Entamoeba histolytica* y su relación huésped-parásito" ENF INF MICROBIOL **31**: 63-70.

Caseres, F. R. (2004). Determinación de Anticuerpos Anti-*Entamoeba histolytica* Mediante Inmunofluorescencia Indirecta en Pacientes con Pruebas de Hepaticas Alteradas. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Talca.

Cecilia Ximénez, P. M., Fernando Ramos, Manuel Ramiro (2007). "Amibiasis intestinal: estado actual del conocimiento." Med Int Mex **23(5)**: 398-407.

Clark CG, D. L. (1992). "Differentiation of pathogenic *Entamoeba histolytica* from other intestinal protozoa by riboprinting." Arch Med Res **23**:15-16.

Diamond, L. S. (1961). "Axenic Cultivation of *Entamoeba histolytica*." The Journal of Parasitology **134**: 336-337.

E. A. Vives, M. V. V., D. Medvedovsky y R. Rothlin (2004). FARMACOLOGÍA II NITROIMIDAZOLES Y NITROFURANOS

Gemma Iñigo., J. S. (2009). Efectos de propóleos de Ures y Éster Fenetílico de Ácido Cafeico (CAPE) sobre la viabilidad de *Staphylococcus aureus*. Ciencias Químico Biológicas. Hermosillo, Universidad de Sonora.

Hernández, S. M., Lazo, SC., Junod, MJ., Arancibia, MJ., Flores, SR., Valencia, AE. (2005). "Características organolépticas y físico-químicas de propóleos de la Provincia de Ñuble, VIII Región Chile." Archivos Latinoamericanos de Nutrición **55(4)**: 374-379.

Julio César Gómez, J. A. C., Sonia Isabel Cuervo, Myriam Consuelo López (2007). "Amebiasis intestinal." Infectio **11**: 36-45.

Lakshmi, S. G. a. V. (2004). "In Vitro and In Vivo Activity of Extracts from the Soft Coral *Lobophytum pauciflorum* on Trophozoites of *Entamoeba histolytica*." Russian Journal of Marine Biology **30**: 426–428.

Lesh, F. A. (1975). " Massive development of amebas in the large intestine." Am J Trop Med Hyg. **24**: 383-392.

Loftus B, A. I., Davies R, Alsmark UC, Samuelson J, Amedeo ;433:865-8. (2005). "The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*." Nature.P **433**: 865-868.

Maryam Behnia, A. H., Hossein Komeylizadeh, Seyyed-Javad Seyyed Tabaei and a. A. Abadi (2008). "Inhibitory Effects of Iranian *Thymus vulgaris* Extracts on in Vitro Growth of *Entamoeba histolytica*." Korean J Parasitol **46**: 153-156.

Náquira, C. (1997). "Amebiosis." Revista de Gastroenterología del Perú **17**: versión electrónica 1609-722X.

Paulino, N., Dantas, A.P., Bankova V., Taggliari, D., Screamin, A., Lisboa de Castro, S., Batista, J. (2003). "Bulgarian propolis induces analgesic and antiinflammatory effects in mice and inhibits in vitro contraction of airway smooth muscle." *Journal of Pharmacology Sciences* 93: 303-313.

Petri WA Jr, M. B. (1993). "Molecular mechanisms of invasion by *Entamoeba histolytica*." *Semin Cell Biol.* 4: 305-313.

Robles-Zepeda RE, Martínez JH, Garibay A, Dora Valencia E, Velázquez Contreras CA (2012). "Botanical Origin and Biological Activity of Propolis, In: *Medicinal Plants: Biodiversity and Drugs*", Eds: Mahendra Rai, Geoffrey A. Cordell, Jose L. Martinez, Mariela Marinoff, Luca Rastrelli, CR Press Taylor and Francis Group, 570-598.

Romero, R. (1993). *Microbiología y Parasitología Humana*. México DF, Médica Panamericana.

<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/amibiasis.html>

http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen1/ciencia2/47/html/sec_9.html

ANEXOS

Elaboración de medio Diamond para cultivos axénicos de *E.histolytica*

Reactivo	Casa comercial	1 lt.
*Biosate peptona	BD	36.58 g
*Dextrosa	SIGMA	12.19 g
*Cloruro de sodio	Química Meyer	2.43 g
*Fosfato de potasio monobásico	SIGMA	0.73 g
*Fosfato de potasio dibásico	SIGMA	1.21 g
*Cisteína	SIGMA	1.21 g
*Ac. Ascórbico	SIGMA	0.24 g
*Citrato férrico de amonio	-----	0.0287 g
Suero Bovino Vaca Adulta	MICROLAB	100 mL
Vitamina Diamond Tween 80 solution (40X)	SAFC	20mL
Penicilina-Streptomicina	SIGMA	10 mL

Medio diamond para 1 Lt.

Disolver en orden secuencial (*) los reactivos arriba enlistados hasta obtener un volumen final de 750 ml. Enseguida medir pH (inicialmente es de 6.2 – 6.4) ajustando a 6.8 con NaOH 0.2 N. Aforar en probeta de 1000 ml.

Envasar en frasco de 1Lt. previamente lavado y seco con medio de Diamond. Tapanlo ligeramente, y esterilizar 15 minutos, 15 libras de presión y 121 °C. Posteriormente, dejar enfriar completamente la olla, sacar el frasco y tapanlo correctamente.

Al frasco que contiene 1 litro de medio Diamond se le adicionan **100 mL del suero bovino** más **10 mL de vitaminas** y **5 mL de antibiótico (Penicilina-Streptomycin)**.