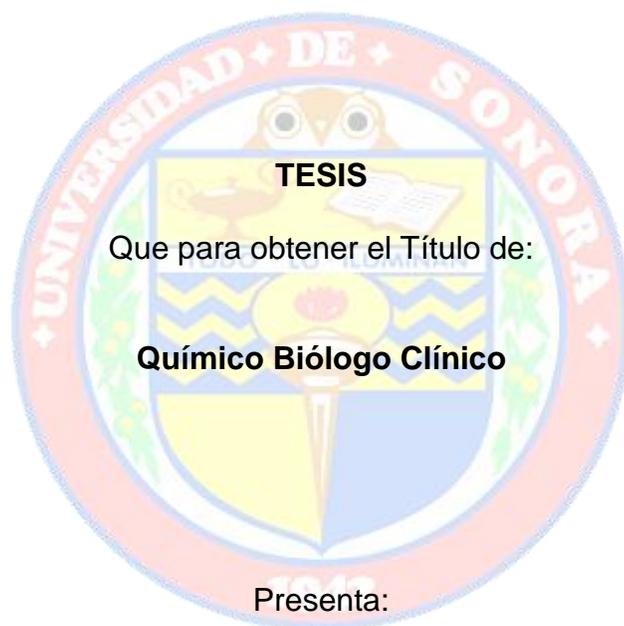


UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS

Efecto de la actividad antioxidante de propóleos sonorenses sobre el estado redox de células cancerígenas y su actividad antiproliferativa



TESIS

Que para obtener el Título de:

Químico Biólogo Clínico

Presenta:

Jorge Luis Hernández Tánori

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 designado para revisar el trabajo de Tesis de **Jorge Luis Hernández Tánori**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Químico Biólogo Clínico, otorgado por la Universidad de Sonora, Unidad Regional Norte, Campus Caborca.

Presidente
Dra. Dora Edith Valencia Rivera

Secretario
M.C. Ramón Efraín Lugo Sepúlveda

Vocal
Dr. Jesús Ortega García

Suplente
Q.B. Rafael de la Rosa López

DEDICATORIAS

A Dios:

Por acompañarme y guiarme durante toda mi carrera, por darme fortaleza en los momentos difíciles y bendecirme cada día, te agradezco por esta etapa llena de conocimiento, aprendizaje, experiencia, felicidad y sobre todo por seguir motivado cada día más a continuar con mis estudios.

A mis padres:

Jorge y Norma, porque han creído en mí y me han sacado adelante, siendo siempre un ejemplo a seguir, por siempre apoyarme durante mi carrera, estar presentes en los momentos más difíciles y estar orgullosos de mí, han sido parte fundamental de mi desarrollo y siempre mirar hacia el futuro, va por ustedes, por lo que valen, admiro y por lo que han hecho.

A mi hermano:

Sergio, por estar siempre presente, sentirte orgulloso de mí y ser un ejemplo de que cuando te propones algo lo puedes lograr, sigues tú.

AGRADECIMIENTOS

A la universidad de Sonora, campus Caborca por haber sido mi casa de estudios en estos últimos años, por dame la oportunidad de empezar a prepararme académicamente, y al campus Hermosillo por recibirme durante parte de mi trabajo de tesis.

Le agradezco a la **Dra. Dora Edith Valencia Rivera**, por la confianza, consejo y apoyo durante el tiempo que ha sido mi maestra y sobre todo durante el tiempo que ha sido mi asesora. Por haber compartido sus conocimientos y tenerme paciencia, gracias maestra.

A **Ana Laura** por confiar en mí, tenerme paciencia y enseñarme como se trabaja en un laboratorio de cultivo celular, también agradezco a **Heriberto, Diana, Wenceslao, Max y Mario**, por hacer de mi estancia en el laboratorio de productos naturales, una experiencia muy agradable, por tratarme como uno más de sus compañeros y estar siempre al pendiente.

CONTENIDO

	Página
DEDICATORIAS	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABLAS	viii
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Productos naturales	3
2.2 Propóleos	4
2.3 Propóleos sonorenses	5
2.4 Actividad biológica de los propóleos	6
2.5 Actividad antiproliferativa	8
2.5.1 Método de reducción del MTT	9
2.6 Estrés oxidativo	9
2.7 Actividad antioxidante	11
2.7.1 Método de Wolfe y Liu	12
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. OBJETIVOS	16
4.1 General	16
4.2 Específicos	16
5. MATERIALES Y MÉTODOS	17
5.1 Recolección de las muestras de propóleos	17
5.2 Obtención de los extractos metanólicos	17

5.3 Preparación de las muestras	18
5.4 Líneas celulares	18
5.5 Evaluación de la actividad antiproliferativa	20
5.6 Evaluación de la actividad antioxidante	21
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
6.1 Recolección de las muestras de propóleos	23
6.2 Rendimiento de la extracción metanólica	23
6.3 Actividad antiproliferativa de los extractos de propóleos	25
6.4 Actividad antioxidante de los extractos de propóleos	26
7. CONCLUSIONES	33
8. RECOMENDACIONES	34
9. BIBLIOGRAFÍA	35
10. APÉNDICES	40

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Proceso de desacetilación y oxidación del DCFH-DA a un producto fluorescente.	14
2	Ubicación geográfica del rancho “el tecolote”.	19
3	Actividad antiproliferativa de los propóleos recolectados en primavera y verano.	29
4	Actividad antiproliferativa de los propóleos recolectados en otoño e invierno.	30
5	Actividad antioxidante de los propóleos recolectados en la temporada de otoño.	31
6	Actividad antioxidante de los propóleos recolectados en la temporada de primavera.	32

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Cantidad de propóleos recolectada en cada temporada y porcentaje del rendimiento metanólico obtenido de los extractos de propóleos.	24
2	Resumen de la actividad antiproliferativa por temporada.	28

ABREVIATURAS

µg	Microgramos
g	Gramos
DCFH DA	Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína
DCFH	Diclorofluorescina
DCF	Diclorofluoresceína
PI	Yoduro de propidio
PMA	Acetato de forbol miristato
M12.A ^k . C3F6	Línea celular de linfoma murino de células B
rpm	Revoluciones por minuto
µg/mL	Microgramos sobre mililitros
CAPE	Éster fenético del ácido cafeico
ATP	Adenosín trifosfato
HELA	Línea celular de cancer cérvico uterino

DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
CAA	Actividad antioxidante celular
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
pH	Potencial de hidrógeno
mL	Mililitros
mg/mL	Miligramos sobre mililitros
μL	Microlitros
%	Porcentaje
°C	Grados centígrados
(p:v)	Relación peso volumen
CO ₂	Dióxido de carbono
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
cel/mL	Células por mililitro
μM	Micrómetro
mM	Milimolar

IC ₅₀	Concentración inhibitoria a la cual es reducida al 50 % la proliferación celular
PBS	Buffer fosfato salino
H ₂ O	Agua
O ₂	Oxígeno diatómico
NaH ₂ PO ₄	Bifosfato de sodio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sodio dibásico
NaCl	Cloruro de sodio
IMF	Intensidad media de fluorescencia
RLO	Radicales libre de oxígeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
LS-180	Adenocarcinoma intestinal de colon humano
MTT	Reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazolio
MTS	(3-[4,5,dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxi-fenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio

XTT	(2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfonil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilido)
RAW 264.7	Macrófagos murinos de un tumor inducido por el virus de la leucemia de Abelson
L-929	Línea celular murina no cancerígena
A-549	Adenocarcinoma de células epiteliales basales alveolares humanas
HepG2	Hepatocarcinoma humano
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno

RESUMEN

Los propóleos son una especie de resina cerosa, elaborada por las abejas a partir de exudados que colectan de tallos, hojas de árboles y plantas, esta fuente depende de la flora cercana al área de recolección. Es un producto orgánico que posee un gran espectro de actividades biológicas en las que se destacan la antiproliferativa, antioxidante y antimicrobiana, dichas actividades le confieren un gran potencial como tratamiento para diversas enfermedades e incluso su uso en la industria alimenticia, de ahí el interés de la comunidad científica en evaluar dichas actividades, así como caracterizar los compuestos responsables. La finalidad de este trabajo fue evaluar la actividad antiproliferativa y antioxidante de los extractos metanólicos de propóleos recolectados en la región de Caborca durante las temporadas de primavera, verano, otoño e invierno. La capacidad antiproliferativa fue evaluada por el método colorimétrico de reducción de la sal de tetrazolio (MTT). La capacidad antioxidante se evaluó mediante una técnica de citometría de flujo de doble marcaje con DCFH-DA (diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína) y PI (yoduro de propidio). Los extractos metanólicos de las temporadas de primavera y otoño fueron los que mostraron mayor actividad antiproliferativa con un IC_{50} de $9.16 \pm 1.2 \mu\text{g/mL}$ y $5.92 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$ respectivamente, en comparación con los de invierno que mostraron valores de $12.06 \pm 0.49 \mu\text{g/mL}$ y verano $9.47 \pm 0.44 \mu\text{g/mL}$. Respecto a la actividad antioxidante los extractos de primavera y otoño mostraron la capacidad de reducir el estrés oxidativo intracelular, así como la capacidad para retardar la degradación oxidativa. Los resultados obtenidos indicaron que los propóleos recolectados en Caborca son capaces de inhibir la proliferación de la línea celular M12.A^k.C3F6, neutralizar radicales libres y reducir el estrés oxidativo dentro de las células. Estos resultados pueden ser de gran utilidad para futuras investigaciones que busquen caracterizar los compuestos responsables de dichas actividades biológicas así como evaluar otras posibles actividades.

1. INTRODUCCIÓN

El propóleo también llamado “propolis” del griego *pro polis* que significa: “defensor de la ciudad” es una especie de resina cerosa de aspecto blando y viscoso, elaborado por las abejas a partir de exudados que colectan de diferentes fuentes vegetales como brotes, tallos, hojas de ciertas plantas y árboles. Las abejas lo utilizan como sellador para proteger la colmena y prevenir la descomposición de animales muertos dentro de la colmena (Marcucci, 1994). Es un producto natural que ha sido utilizado como medicina tradicional desde tiempos remotos, los egipcios por ejemplo, lo utilizaban en el proceso de embalsamamiento, Aristóteles lo señala como remedio para ciertas afecciones de la piel y heridas, inclusive el médico griego Galeno lo menciona en varios de sus tratados (US National Library of Medicine, 2015).

Los propóleos poseen un amplio espectro de actividades biológicas tales como: antifúngica (Quintero *et al.*, 2008), antiinflamatoria (Figuroa, 2012), antibacterial (Vargas-Sanchez, *et al.*, 2013), antiviral (Kujumgiev *et al.*, 1999), hepatoprotectora (Herrera *et al.*, 2010), antiproliferativa (Valencia *et al.*, 2012) y antioxidante (Velázquez *et al.*, 2007). Razón por la cual estos productos han despertado un gran interés en diversas áreas de la ciencia donde se exploran sus posibles aplicaciones en biología y medicina, así como su potencial contra diversas enfermedades del corazón, diabetes y cáncer (Banskota *et al.*, 2002).

Sin embargo, no todos los propóleos comparten las mismas características, al tratarse de un compuesto orgánico su composición varía según el clima, estación del año y fuente botánica (Burdock, 1998). Actualmente se encuentra reportado en la literatura que la actividad biológica de los propóleos depende de la composición química de las muestras (Velázquez *et al.*, 2007). Otro factor importante es la

temporalización, es decir, la época del año en la que se recolectan las muestras, en propóleos de Ures, Sonora, se observó que la temporalización posee un efecto significativo sobre la cantidad de las muestras y sobre sus actividades biológicas: antiproliferativa y antioxidante (Valencia *et al.*, 2012).

En la literatura existen diversos trabajos donde se evalúa la actividad antioxidante de los propóleos, la mayoría se basan en ensayos químicos, donde se mide la capacidad de un extracto para reaccionar en presencia de radicales libres, es decir, su capacidad para estabilizar radicales libres, sin embargo es necesario distinguir entre esta capacidad y la actividad antioxidante celular, donde se mide la capacidad para retardar la degradación oxidativa (Londoño, 2012).

Con base a lo anterior, el presente trabajo tuvo como finalidad evaluar la actividad antioxidante de propóleos recolectados en la región de Caborca, Sonora, basándose en un método directo, para conocer el efecto que se produce en un sistema (proteínas, lípidos o membranas biológicas), así como la actividad antiproliferativa en las diferentes temporadas del año. El conocimiento generado de este trabajo, contribuirá a futuras investigaciones que busquen caracterizar los compuestos responsables de dichas actividades y evaluar otras actividades biológicas.

2. ANTECEDENTES

2.1. Productos naturales

Los organismos en la naturaleza constantemente están transformando una gran cantidad de compuestos orgánicos, esto con el fin de crecer y reproducirse, dichas transformaciones necesitan de energía la cual obtienen en forma de ATP principalmente y otros bajo la presencia de ciertos sistemas enzimáticos. Este conjunto de reacciones mediante las cuales el organismo produce sus propias sustancias se conoce como metabolismo (Vanbergen, 2013). Existen dos tipos de metabolismo, en uno los organismos modifican y sintetizan moléculas, tales como hidratos de carbono, proteínas, grasas y ácidos nucleicos, este se conoce como metabolismo primario. En el caso de que dichos compuestos se utilicen de manera más limitada y específica, se conoce como metabolismo secundario y estos se denominan metabolitos secundarios.

Los metabolitos secundarios pueden ser considerados como productos para la adaptación a un determinado ecosistema. En un sentido amplio un producto natural está formado por todos los compuestos de la naturaleza, en un sentido más restrictivo un producto natural solo es un metabolito secundario (Gutiérrez *et al.* 2009). Los productos naturales son entonces metabolitos secundarios ya sea de plantas, hongos y organismos marinos, su función no se conoce con exactitud y se sabe que estos no están involucrados en los procesos de crecimiento ni desarrollo, sin embargo, estos interactúan con el medio ya sea para atraer insectos, repeler predadores o seres dañinos, impedir la competencia con otras plantas y adaptarse a condiciones adversas de suelo o clima (Ringuelet *et al.*, 2013). Dichos productos son consecuencia del resultado de la selección a lo largo de la evolución de la especie, gracias a esto, han desarrollado diversas actividades biológicas importantes, el uso

de los productos naturales se ha vuelto cada vez más común en terapias o como modelo para generar nuevos fármacos (Avendaño, 2010).

2.2. Propóleos

La palabra propóleos proviene del griego *pro-* que significa en defensa y *polis-* que significa ciudad, es decir, en defensa de la ciudad. El propóleos es un producto natural, una sustancia dura y resinosa que las abejas del género *Apis mellífera*, colectan de las grietas de ciertos árboles y brotes de hojas, esta es masticada mientras se le añaden enzimas salivales, este material ahora parcialmente digerido se combina junto con cera para después ser utilizada dentro de la colmena (Burdock 1998). Su color puede variar de amarillo claro a café oscuro, al ser una sustancia bastante adhesiva las abejas la utilizan para sellar el interior de la colmena y evitar la descomposición de animales asesinados por las abejas después de una invasión a la colmena (Marcucci, 1994).

Desde tiempos remotos el hombre ha utilizado los propóleos y otros productos de la colmena, su uso más común ha sido como medicina tradicional debido, a que se le han atribuido diversas propiedades como: antiséptico, antimicótico, analgésico, antiespasmódico y antioxidante (Burdock, 1998). Los egipcios lo utilizaron en el proceso de embalsamiento, los romanos lo utilizaron para curar y cicatrizar heridas, los incas lo empleaban como una especie de agente antipirético, incluso Aristóteles y Galeno los mencionan como remedio para afecciones de la piel (U.S National Library of Medicine, 2015).

Su uso continúa hasta la actualidad como una especie de remedio casero, producto de belleza y alimento de fácil disponibilidad, ya sea de forma pura o en combinación con otros productos naturales (Sforcin *et al.*, 2010). Como cualquier

producto natural los propóleos y sus extractos poseen una composición química compleja, ciertos constituyentes químicos le confieren la actividad biológica, algunos de estos gregarios también poseen actividad por si solos, como es el caso del CAPE y los flavonoides (Burdock, 1998). La composición es variable y depende de ciertas condiciones fitogeográficas como la zona geográfica, la flora cercana y la época del año en que se recolecten las muestras (Hernández *et al.*, 2007; Valencia *et al.*, 2012).

2.3. Propóleos Sonorenses

Existen diversos trabajos que buscan analizar la composición química de los propóleos sonorenses, así como sus actividades biológicas. Algunos de estos partiendo de un extracto metanólico del propóleos y analizados por cromatografía líquida de alta eficiencia, dan como resultado que los constituyentes más abundantes son la: pinocebrina, pinobanksina 3-acetato, crisina, galangina y CAPE. Muchos de estos compuestos poseen actividad biológica importante, como el caso del CAPE y la crisina que presentan un efecto antiproliferativo frente a células cancerígenas (Hernández *et al.*, 2007).

Una de las actividades biológicas más estudiadas en los propóleos del estado es la actividad antiproliferativa, se ha reportado que estos poseen una fuerte actividad en contra de líneas celulares cancerígenas, tanto de origen murino como humano, en especial contra las líneas celulares M12.A^k. C3F6 y RAW 264.7. Otras líneas celulares no cancerígenas como la L-929, si bien no mostraron una fuerte actividad si mostraron dicho efecto (Hernández *et al.*, 2007). Otra de las actividades más estudiadas es la antibacteriana, se ha observado que muestras de diferentes partes del estado muestran actividad antibacteriana en contra de las bacterias Gram positivas, en especial contra muestras clínicas de *Staphylococcus aureus*, sin

embargo dicho efecto no se encontró frente a las Gram negativas (Velázquez *et al.*, 2007).

Estas dos actividades biológicas no son las únicas presentes en los propóleos de origen sonoreense, se han reportado de igual manera: actividad antibacteriana contra *Vibrio* spp, especialmente contra *Vibrio cholerae*, mediante métodos de microdilución se determinó que los propóleos de Ures son los que poseen la mayor actividad antimicrobiana seguidos, por los de Caborca y Pueblo de Álamos (Navarro-Navarro *et al.*, 2013).

Actividad antiparasitaria contra trofozoitos de *Giardia lamblia*, dando como resultado que los propóleos de Ures poseen el mayor efecto inhibitorio seguido por los propóleos de Pueblo de Ures, en contraste con los de Caborca, los cuales no mostraron ningún efecto significativo sobre la proliferación de *Giardia lamblia* (Alday-Provencio *et al.*, 2015) y antioxidante donde por medio del ensayo químico del DPPH se concluyó que los propóleos de Caborca poseen una fuerte actividad en contraste con lo de Ures y Pueblo de Álamos, los cuales mostraron una actividad antioxidante débil (Velázquez *et al.*, 2007)

2.4. Actividad biológica de los propóleos

El propóleos posee una amplia variedad de propiedades biológicas como lo son: la antiinflamatoria, antitumoral, antioxidante, antibacterial, antifúngica, entre otras (Sforcin *et al.*, 2010). La composición química es la responsable de dichas actividades, sin embargo esta no es constante y depende de ciertas condiciones fitogeográficas como la fuente botánica, la época del año en que se recolecte y la flora cercana (Burdock, 1998). Es por esta razón que muchos de los constituyentes químicos que se han podido aislar y caracterizar de propóleos que se conoce su

actividad biológica han sido ampliamente estudiados, el interés radica en el hecho de que estos podrían ser usados en un futuro por la industria alimenticia y farmacéutica (Valencia *et al.*, 2012). Algunas de las actividades biológicas más estudiadas de los propóleos son:

a) Antifúngica: extractos de propóleos recolectados en diferentes áreas de México han demostrado tener actividad frente a cepas de referencia y de origen clínico de *Candida albicans* (Quintero *et al.*, 2008).

b) Antiinflamatoria: los propóleos chilenos mostraron valores significativos en todas las muestras evaluadas en comparación al fármaco de referencia nimesulida (Figuroa, 2012).

c) Antibacterial: se evaluaron muestras de diferentes partes del desierto de Sonora frente a las bacterias Gram negativas (*E. coli* y *P. aeruginosa*) y las Gram positivas (*S. aureus*, *E. faecalis*, y *L. monocytogenes*), obteniéndose efectos positivos únicamente frente a las Gram positivas (Vargas-Sanchez, *et al.*, 2013).

d) Antiviral y hepatoprotectora: se encontró actividad frente al virus de la influenza aviar (Kujumgiev *et al.*, 1999; Herrera *et al.*, 2010).

e) Antiproliferativa: contra las líneas celulares cancerígenas: M12.A^k, C3F6, HELA, RAW, A-549 y LS-180, así como la línea celular normal L-929, donde todas las muestras de propóleo mostraron actividad (Valencia *et al.*, 2011)

f) Antioxidante: al evaluarse tres áreas diferentes del estado de Sonora, todas las muestras con actividad, sin embargo la mayor actividad se observó en los propóleos de Caborca, obteniéndose valores similares al antioxidante de referencia la vitamina C (Velásquez *et al.*, 2007).

2.5. Actividad antiproliferativa

La actividad antiproliferativa se refiere a la capacidad que poseen ciertas sustancias y compuestos para impedir la reproducción celular, ya sea de células sanas o células cancerígenas. Propóleos de origen asiático, europeo y americano han mostrado una importante actividad contra líneas celulares cancerígenas en ensayos *in vitro*. A los propóleos mexicanos se le ha atribuido dicho efecto a algunos de sus principales constituyentes, los flavonoides y el éster del ácido cafeico (CAPE) (Hernández *et al.*, 2007).

Existen investigaciones de propóleos del estado de Sonora, donde se ha evaluado la actividad antiproliferativa de distintas líneas humanas y murinas. Se obtuvieron resultados positivos para todas las líneas celulares, demostrando que los propóleos sonorenses poseen una fuerte actividad antiproliferativa en contra de las líneas celulares cancerígenas: M12.A^k, C3F6, RAW 264.7 y HeLa, así como la línea celular murina no cancerígena: L-929. Se observó que los cultivos de células cancerosas tratados con los propóleos mostraban un cierto número de células con cambios morfológicos y características típicas de las células apoptóticas, tales como contracción celular, membrana plasmática irregular, condensación y fragmentación del núcleo así como la presencia de cuerpos apoptóticos (Hernández *et al.*, 2007).

Existen diferentes métodos para evaluar la actividad antiproliferativa, algunos de los más utilizados son: el uso de colorantes como el cristal violeta y la sulforrodamina B, los cuales tiñen componentes específicos de la célula y permiten medir residuos celulares después de un tiempo de incubación con el compuesto evaluado, los detectores de liberación de componentes constitutivos de la célula (miden la actividad de diversas enzimas como la lactato deshidrogenasa) y los métodos que miden la función metabólica de las células, utilizando sales de tetrazolio, MTT, MTS, y XTT (Escobar *et al.*, 2010).

2.5.1. Método de reducción del MTT

Una de las técnicas más utilizadas y método estándar para medir la proliferación celular es la reducción metabólica del MTT, dicho método fue desarrollado por Mosmann en 1983 para determinar la supervivencia y capacidad de proliferación de células mamíferas. El método se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4-,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio, realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul denominado formazan. El cambio de color se produce únicamente en las células vivas y metabólicamente activas. La principal ventaja de ese ensayo es la velocidad con la que las muestras son procesadas, los pasos finales del ensayo (adición del MTT, lectura de la placa y obtención de resultados) toman considerablemente menos tiempo que los iniciales (cultivo de células y adición de factores de crecimiento o diluciones), así como que los resultados que se obtienen son claramente visibles, lo que representan una ventaja si se necesitan datos cualitativos de forma rápida (Mosmann, 1983).

El método fue modificado por Francois Denizot y Rita Lang en 1985 al encontrar ciertas limitaciones, como la alteración de las propiedades espectrales del formazan, lo que evitaron al utilizar propanol puro o etanol para solubilizar rápidamente el formazan, el uso de mayores concentraciones de MTT, bandejas de microtitulación más grandes para aumentar la zona de lectura así como utilizar un espectrofotómetro de longitud onda dual (Denizot *et al.*, 1986).

2.6. Estrés oxidativo

Desde un punto de vista bioquímico, la oxidación se refiere a todo proceso en el que ocurra: por un lado pérdida de electrones, captación de electrones o cesión de

hidrógeno y por otro reducción en aquel que se capten dichos electrones o se pierdan oxígenos. Las reacciones que se dan son óxido-reducción o reacciones redox entre pares conjugados. Cualquier proceso de oxidación va siempre de la mano con otro de reducción. Dicho proceso de oxidación es sumamente importante para la vida ya que participa activamente en la obtención de energía celular, en la fotosíntesis por ejemplo, la energía del sol incita la reducción del CO_2 y la oxidación del H_2O , formando carbohidratos y O_2 , algo similar ocurre en las células eucarióticas, donde un proceso reverso a la fotosíntesis, permite almacenar la energía producida en la oxidación de carbohidratos u otros compuestos orgánicos, en forma de ATP. Aunque el oxígeno es un recurso esencial para la vida, paradójicamente puede ser también fuente de enfermedad, a través de un producción incontrolada de radicales libres de oxígeno (RLO) mismas que alteran procesos celulares como funcionabilidad de la membrana celular y producción de enzimas, dañan las macromoléculas (hidratos de carbono, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos).

Al haber un exceso de radicales libres estos rompen el equilibrio de las reacciones óxido-reducción, produciéndose de esta manera el estrés oxidativo. Las células constantemente generan especies reactivas de oxígeno (ROS), dichas especies juegan un papel protector y funcional en el sistema inmunológico. Las células son armadas con un poderoso sistema antioxidante que tiene como fin el combatir esta excesiva producción de las distintas especies reactivas como los radicales libres (Eruslanov *et al.*, 2010). Dichos radicales libres se producen durante la transformación de los alimentos en energía por parte de las células, durante el ejercicio pesado o hiperoxia o por exposición a factores externos como la radiación ionizante, luz ultravioleta, humo del tabaco, etc.

Por un lado de la balanza se encuentran los RLO inorgánicos y los orgánicos, del otro lado se encuentran sustancias que tienen la capacidad de oponerse a la

reacción del oxígeno y ciertas especies oxidantes, independientemente de su mecanismo, denominadas antioxidantes (Elejalde, 2001).

2.7. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante es la capacidad que posee una sustancia o compuesto para inhibir la degradación oxidativa, no hay que confundir actividad estabilizadora de radicales o antiradicalaria en inglés (“radical scavenger”) con actividad antioxidante. La actividad antiradicalaria se refiere únicamente a la reacción de un antioxidante frente a radicales libres, por otra parte la actividad antioxidante mide la capacidad para retardar la degradación oxidativa. Se ha reportado que los propóleos poseen un amplio potencial antioxidante principalmente por su composición rica en polifenoles, flavonoides y ácidos fenólicos (Vargas-Sanchez *et al.*, 2013).

Existen investigaciones donde se evalúa la actividad antioxidante de propóleos recolectados en distintas zonas del estado de Sonora, dando como resultado que los propóleos de Caborca poseen una fuerte actividad antioxidante en contraste con propóleos de Ures y Pueblo de Ures los cuales mostraron una actividad débil (Velázquez *et al.*, 2007). Existen diferentes métodos para medir la actividad antioxidante, los cuales pueden clasificarse en métodos directos e indirectos. Los métodos indirectos se evalúan la capacidad del antioxidante para estabilizar algún radical libre coloreado, el ejemplo más común es la del radical DPPH. Los métodos directos se basan en evaluar el efecto de un antioxidante sobre la degradación oxidativa de un sistema (proteínas, plasma sanguíneo, lipoproteínas y membranas biológicas) (Londoño, 2012).

Un ejemplo claro de un método directo es el propuesto por Wolfe y Liu en 2007 para determinar la actividad antioxidante celular. Este tipo de métodos miden el índice de CAA (actividad antioxidante celular) el cual refleja la capacidad de los antioxidantes para reducir el estrés oxidativo intracelular así como evaluar no solo el potencial de reducción de un determinado compuesto o su capacidad para captar radicales libres, si no factores como la permeabilidad de la membrana celular, captación celular, distribución y metabolismo. La metodología del CAA le da un enfoque más biológico al concepto de antioxidante, este entonces es un compuesto capaz de modular el estado redox de la célula (López-Alarcón *et al.*, 2012).

2.7.1. Método de Wolfe y Liu

El método de Wolfe y Liu surge de la necesidad de desarrollar un método capaz de evaluar la actividad antioxidante de suplementos dietéticos, fitoquímicos y alimentos en cultivo celular, dándole un enfoque biológico más relevante que los métodos químicos convencionales. El método utiliza el DCFH-DA (Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína) como sonda, el cual es tomado por la células del cultivo y desacetilado a DCFH (Diclorofluorescina) a un producto fluorescente DCF (Diclorofluoresceína). Wolfe y Liu en 2007 utilizaron células HepG2 (Hepatocarcinoma humano) para evaluar dicho efecto. En la Figura 1 se muestra el proceso de desacetilación y oxidación del DCFH-DA a un producto fluorescente.

El DCFH-DA (Diacetato de 2',7' –diclorofluoresceína) tiene la capacidad de ser permeable a las células, después de la difusión, el DCFH-DA es desacetilado por las esterasas celulares a un compuesto no fluorescente denominado DCFH (Diclorofluorescina), el cual después es oxidado por las especies reactivas de hidrógeno a un compuesto altamente fluorescente, el DCF (Diclorofluoresceína). Los

antioxidantes impiden la oxidación de DCFH, neutralizando los radicales libres y por lo tanto disminuyendo la fluorescencia (López, 2015).

El nivel fluoresceína es proporcional al nivel de oxidación, esto debido a que los compuestos y sustancias con capacidad antioxidante impiden la oxidación de DCFH, neutralizando los radicales libres y disminuyendo así la fluorescencia (Wolfe *et al.*, 2007).

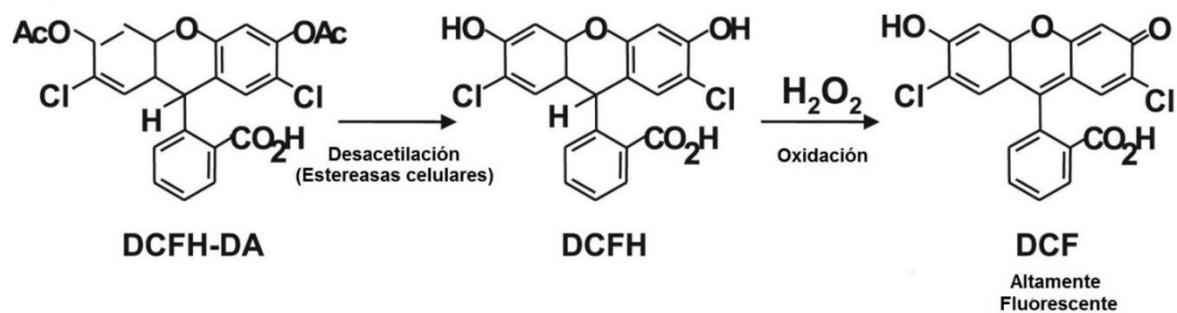


Figura 1. Proceso de desacetilación y oxidación del DCFH-DA a un producto fluorescente.

3. JUSTIFICACIÓN

Los estudios de investigación sobre las actividades biológicas de los propóleos sonorenses han demostrado que éstos poseen una fuerte actividad antiproliferativa, así como una importante actividad antioxidante, estas propiedades sitúan a los propóleos de Sonora como un producto con potencial para su uso dentro de la industria farmacéutica, como fuente para la búsqueda de nuevos compuestos con actividad biológica y en la búsqueda de nuevos compuestos activos contra diferentes enfermedades en especial las provocadas por el estrés oxidativo o tratamiento contra el cáncer.

Por esta razón es sumamente importante evaluar dichas actividades biológicas, sin embargo en los trabajos reportados en la literatura, los métodos utilizados para evaluar la actividad antioxidante se basan en métodos químicos indirectos, los cuales miden únicamente la capacidad que posee un extracto de estabilizar radicales libres. Es necesario evaluar la actividad antioxidante utilizando un método directo, donde se mida la capacidad para retardar la degradación oxidativa a nivel celular. Así como utilizar muestras de propóleos que correspondan a cada una de las estaciones del año, pues hay evidencia de que la temporalización tiene un efecto significativo sobre las actividades biológicas de los propóleos. De esta manera se busca contribuir al conocimiento que existe sobre los propóleos de las distintas zonas del estado.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Evaluar la actividad antiproliferativa y antioxidante de los propóleos de distintas temporadas (invierno, otoño, primavera y verano) sobre la línea celular cancerígena M12^K. C3F6 (linfoma de células b murino).

4.2 Particulares

a) Evaluar la actividad antiproliferativa de extractos de propóleos pertenecientes a distintas temporadas (invierno, otoño, primavera y verano) sobre la línea celular cancerígena M12^K. C3F6 mediante el método de reducción del MTT.

b) Evaluar la actividad antioxidante de extractos de propóleos sobre la línea celular cancerígena M12^K. C3F6 por citometría de flujo.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Recolección de las muestras de propóleo

Las muestras de propóleos se recolectaron en el rancho “el tecolote” (longitud norte 31°02’18.0”, longitud oeste 112°02’58.0”), el cual se encuentra ubicado en la región “el arenoso”, municipio de H. Caborca, Sonora (Figura 2) durante las cuatro estaciones del año (invierno, otoño, primavera y verano). En la parte superior de las colmenas se colocaron marcos de madera de 59 x 37 cm, provistos de una malla de polietileno con orificios de 1 mm². Una vez retirados los marcos que contenían las muestras de propóleo se enfriaron a -80 °C para facilitar la recuperación de las muestras. Una vez obtenidas las muestras fueron almacenadas en bolsas de polietileno a -80 °C hasta su procesamiento (Valencia *et al.*, 2012).

5.2. Obtención de los extractos metanólicos

Para obtener los extractos metanólicos, se tomaron 10g de la muestra, estos se trituraron de forma mecánica y con ayuda de un mortero se pulverizaron hasta obtener un polvo fino. El polvo se colocó en un matraz y añadió metanol absoluto en una proporción de 1:6 (p:v). Esta mezcla se mantuvo en agitación constante, durante tres días a temperatura ambiente y oscuridad, una vez transcurrido el tiempo, se filtró sobre tela de algodón para eliminar posibles sólidos, como pedazos de hojas, después se filtró ahora con papel tipo Whatman No.4 para eliminar partículas más pequeñas como las de polvo o polen. El filtrado se recuperó y concentró en un rotavapor a 40°C y presión reducida. Este proceso se repitió tres veces. Una vez terminado el último proceso los extractos se secaron al alto vacío, obteniéndose de esta manera los extractos metanólicos “crudos”, uno para cada estación del año,

estos extractos se lavaron con hexano tres veces cuidando que la temperatura no fuera mayor de 40°C , esto con el fin de remover las ceras. Una vez libres de ceras los extractos se almacenaron en oscuridad a una temperatura de - 20°C hasta su evaluación (Valencia *et al.*, 2012).

5.3. Preparación de las muestras

Se prepararon dos “stocks” para cada temporada, cada uno con una concentración de 20mg/mL. Para esto se pesaron 0.02g del extracto descerado en una balanza digital, se colocaron en un tubo Eppendorf nuevo y a continuación se agregó al tubo 1mL de DMSO (dimetilsulfóxido) y se agitó con ayuda de un vortex. Una vez agitado, se pasaron 500µL del stock a otro tubo Eppendorf nuevo con ayuda de una pipeta, el proceso se repitió para cada temporada, los tubos se etiquetaron y guardaron en refrigeración a 4°C (Castillo-Woolrich, 2009).

5.4. Líneas celulares

Se utilizó la línea celular: M12.A^k. C3F6 (linfoma murino de células B), la cual fue proporcionada amablemente por el Dr. Emil R. Unanue (Department of Pathology and Immunology, Washington University in St. Louis, MO, USA) para la evaluación de la actividad antiproliferativa y antioxidante. Las células se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado al 5% con suero de ternero (Apéndice A). Las condiciones de mantenimiento fueron las siguientes: 5% de CO₂, 37°C y 80-90% de humedad relativa en incubadora Isoterm (Fisher Scientific, USA). Por tratarse de células adherentes para mantenerlas, el medio se cambiaba por periodos de 3-4 veces por semana con ayuda de una pipeta estéril y dentro de la campana de flujo laminar para evitar contaminaciones (Langdon, 2004).



Figura 2. Ubicación geográfica del rancho “el tecolote”.

5.5. Evaluación de la actividad antiproliferativa

La actividad antiproliferativa se evaluó mediante el método de reducción de las sales de tetrazolio, se utilizaron diferentes extractos de propóleos (invierno, otoño, primavera y verano) sobre la línea celular M12.A^k. C3F6. Las células que son viables, poseen metabolismo oxidativo, estas provocan una reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Apéndice B) a través de las deshidrogenasas mitocondriales a formazan. En esta reacción colorimétrica el cambio de color de amarillo a morado que se produce en el MTT, permite estimar que porcentaje de células es viable, al pasar por un agente citotóxico (Mosmann, 1983; Hernández *et al.*, 2007).

A partir de un cultivo celular en fase de crecimiento exponencial, se realizó primeramente un conteo celular en una cámara de Neubauer utilizando el colorante azul de tripano, después se realizó una suspensión celular, a una concentración de 200,000 cel/mL. A partir de la suspensión se colocaron en una placa de 96 pozos de fondo plano (Costar, Corning, N.Y. US) 50µL a cada pozo, se incubó por 24 horas a 37°C y 5% de CO₂ en incubadora Isoterm (Fisher Scientific, USA), una vez transcurrido el tiempo se agregaron 50µL de una dilución de concentración conocida del extracto a evaluar, cada una de estas por triplicado.

Para el caso de los controles de los extractos, se agregaron 50µL del componente a evaluar por 24 horas bajo condiciones estándar, a las 24 y 48 horas se realizaron observaciones al microscopio. Una vez cumplidas las 48 horas de incubación se agregaron 10µL de MTT (5mg/mL) y se incubó durante cuatro horas más. Los cristales de formazan son de color morado y estos al ser impermeables a la membrana celular, se acumulan dentro de las células vivas. Por último después de las 4 horas, se añadieron 100µL de isopropanol ácido (Apéndice C), se resuspendieron los cristales de formazan y se leyó la placa a las absorbancias de

570 y 630nm (Mosmann, 1983). En un lector de placas de ELISA (Multiskan EX, ThermoLab).

5.6. Evaluación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante se evaluó mediante el método descrito por Wolfe y Liu (2007) con ligeras modificaciones (López, 2015). Con el objetivo de conocer si los propóleos poseen la capacidad de reducir el estrés oxidativo intracelular y modular el estado redox de la célula. Se utilizaron dos fluorocromos, DCFH-DA (Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína) el cual es permeable a las células por lo que puede ser utilizado como especie de sonda para el estrés oxidativo intracelular, una de sus ventajas es el hecho de que es extremadamente sensible a los cambios en el estado redox de la célula (Eruslanov *et al.*, 2010), y PI (Yoduro de propidio) utilizado para medir la viabilidad celular.

A partir de un cultivo celular en fase de crecimiento exponencial, se realizó un conteo celular en cámara de Neubauer utilizando el colorante azul de tripano, después se realizó una suspensión celular, con una concentración de 200,000 cel/mL, este tipo de ensayos utiliza una mayor cantidad de células por lo que fue necesario hacer los cálculos correspondientes para colocar 500,000 células por pozo, en una placa con 6 pozos de fondo plano (Costar, Corning, N.Y. US), en tres pozos de dicha placa se colocaron las células más medio de cultivo y en los otros tres pozos tres pozos células en DMSO, a continuación se incubó por 1hr bajo condiciones estándar.

Las células de la placa fueron despegadas y colocadas en tubos para citometría de flujo, los cuales se sometieron a dos lavados con PBS 1X (Apéndice D), en una centrifuga a 1700 rpm, a 4°C por 7 minutos, se tiñeron con DCFH-DA (1µM), para incubarse durante 30 minutos bajo condiciones estándar. A continuación se adicionó

el inductor de estrés oxidativo: H_2O_2 (peróxido de hidrógeno) a dos diferentes concentraciones, 0.5 y 1.0mM, se dejó actuar por 5 minutos para inmediatamente después agregar 4mL de PBS 1X a cada tubo, se lavó en la centrifuga y descartó el sobrenadante, a continuación se realizó la tinción con PI (Yoduro de propidio) a una concentración de 0.5 μ g/mL durante 10 minutos a temperatura ambiente y oscuridad, finalmente se agregaron 200 μ L de PBS1X y se centrifugó bajo las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante y finalmente se resuspendió en 200 μ L de PBS 1X para ser analizado en el citometro de flujo.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Recolección de las muestras de propóleos

De la recolección se obtuvieron las siguientes cantidades de propóleos para cada temporada, invierno: 31.18g, otoño: 184.2g, primavera: 151g y Verano: 192.3g. En la Tabla 1 se observa el efecto de la temporalización sobre la cantidad de propóleos recolectados. Las muestras de propóleos se recolectaron durante las cuatro estaciones del año (invierno, otoño, primavera y verano), ya que existen reportes que señalan que la temporalización tiene un efecto significativo sobre la cantidad de propóleos que se recolecten, así como en sus actividades biológicas: antiproliferativa y antioxidante (Valencia *et al.*, 2012).

6.2. Rendimiento de la extracción metanólica

La extracción metanólica de las muestras de propóleo se llevó a cabo utilizando una proporción de 1:6 (p:v). En la Tabla 1 se muestran los porcentajes de rendimiento para los extractos de invierno, otoño, primavera y verano así como su rendimiento en relación a la cantidad de propóleos recolectada. El extracto que obtuvo mayor rendimiento fue el correspondiente a la temporada de invierno, mientras que el de menor rendimiento fue el recolectado durante la temporada de primavera.

Tabla 1. Cantidad de propóleos recolectada en cada temporada y porcentaje de rendimiento metanólico obtenido de los extractos de propóleos.

Temporada de recolección	Cantidad de propóleos colectados (g)	*Cantidad de propóleos recuperada (g)	**Rendimiento Porcentual (%)
Invierno	31.18	19.13	61.364
Primavera	151.00	53.62	35.510
Verano	192.30	95.19	49.51
Otoño	184.20	84.69	45.978

*Se refiere al extracto metanólico descerado. **Rendimiento de los extractos metanólicos en relación a la cantidad de propóleos colectada

6.3. Actividad antiproliferativa de los extractos de propóleos

Se evaluó la actividad antioxidante de cuatro extractos de propóleos recolectados en el municipio de Caborca, Sonora, correspondientes a diferentes temporadas (invierno, otoño, primavera y verano), esto mediante ensayos *in vitro*, utilizando el método colorimétrico de reducción del MTT, sobre la línea celular cancerígena M12.A^k. C3F6.

De acuerdo al Instituto Americano Nacional del Cáncer, valores de IC₅₀ menores a 30µg/mL son criterios para que un extracto crudo presente actividad antiproliferativa, considerando lo anterior en todas las muestras analizadas se observó una fuerte actividad antiproliferativa de los extractos sobre la línea celular, así como en cada una de las temporadas, (Tabla 2), el extracto que presentó la mayor actividad fue el que corresponde a la temporada de otoño con un IC₅₀ de 5.92 ± 0.5µg/mL, mientras que la temporada de invierno fue la que mostró menor actividad 12.06 ± 0.4µg/mL, al comparar dichos resultados con otro estudio donde de igual manera se evaluaron propóleos sonorenses por el método colorimétrico de reducción del MTT (Valencia *et al.*, 2012), se encontró una sola similitud, en los propóleos de primavera, las demás temporadas muestran valores muy distintos, de igual manera sucede al compararse con otro trabajo donde se evalúan propóleos provenientes de Caborca, Álamos y Pueblo de Álamos (Hernández *et al.*, 2007).

Por otro lado y a pesar de que los resultados para las cuatro temporadas son positivos, los valores de IC₅₀ varían en las distintas temporadas, lo que concuerda con el reporte de que la temporalización posee un efecto significativo sobre la actividad biológica antiproliferativa y antioxidante de los propóleos. En la Figura 3 se ilustra la actividad antiproliferativa de los extractos de propóleos recolectados en primavera y verano), se utilizó como control positivo CAPE (constituyente químico de los propóleos sonorenses) con valores de IC₅₀ 1.26-1.55µg/mL. En la Figura 4 se

muestra la actividad antiproliferativa de extractos de propóleos recolectados en otoño e invierno. Se utilizaron diferentes concentraciones (0-100mg/mL). Los resultados son representativos de por lo menos tres experimentos independientes. Los valores son el promedio de tres determinaciones \pm desviación estándar.

6.4. Actividad antioxidante de los extractos de propóleos

Con la finalidad de evaluar la capacidad para reducir el estrés oxidativo a nivel celular así como para modular el estado redox de la célula y las muestras de propóleo, se determinó la actividad antioxidante celular (CAA) utilizando el método descrito por Wolfe y Liu (2007) con ligeras modificaciones (López 2015) de dos extractos de propóleos correspondientes a las temporadas de otoño y primavera, mismas que presentaron mayor actividad antiproliferativa, sobre la línea celular M12.A^k. C3F6. La actividad antioxidante de los extractos de propóleos de la temporada de primavera se ilustra en la Figura 5, los correspondientes a la temporada de otoño en la Figura 6. Ambos extractos se evaluaron a dos concentraciones (25 y 50 μ g/mL).

De igual manera se utilizaron dos concentraciones del inductor de estrés oxidativo peróxido de hidrógeno (1 y 5mM). Se encuentra reportado que los propóleos sonorenses poseen una importante actividad antioxidante, siendo los propóleos de Caborca los de mayor actividad en comparación con los de Ures y Pueblo de Álamos (Velázquez *et al.*, 2007) sin embargo para medir esta actividad, se utilizó un método indirecto, es decir que mide únicamente la capacidad que tiene el extracto de propóleos para estabilizar los radicales libres y no el efecto que este produce sobre la degradación oxidativa de un sistema (proteínas, lípidos y membranas biológicas). En las Figuras 5 y 6, se compara el efecto entre: células con DMSO únicamente y células con los extractos de propóleos, frente a la IMF, entre

mayor estrés oxidativo mayor fluorescencia. Los resultados son representativos de tres determinaciones y los valores representan el promedio de tres determinaciones \pm desviación estándar.

En este trabajo para evaluar la actividad antioxidante celular, se utilizó el método de Wolfe y Liu (Wolfe y Liu, 2007) con algunas modificaciones (López 2015), el cual permite medir la capacidad para retardar la degradación oxidativa y de diversos factores como la permeabilidad de la membrana celular, dándole un enfoque más biológico al concepto de antioxidante, donde este es un compuesto capaz de modular el estado redox de la célula.

Todos los extractos evaluados mostraron actividad antioxidante al compararse los valores de intensidad media de fluorescencia obtenidos por las células del cultivo en presencia de DMSO y a los obtenidos por las células del cultivo en presencia de los extractos de propóleos a diferentes concentraciones. En el ensayo se utiliza el fluorocromo DCFH-DA mismo que se oxida a DCFH dentro de las células, los antioxidantes impiden esta oxidación, neutralizando los radicales libres y disminuyendo la fluorescencia, este efecto se observa en las Figuras 5 y 6, de igual manera se utiliza el PI, el cual tiene la función de medir la viabilidad celular.

Tabla 2. Resumen de la actividad antiproliferativa por temporada.

Temporada	*IC ₅₀
Primavera	9.16 ± 1.27 µg/mL
Verano	9.47 ± 0.44 µg/mL
Otoño	5.92 ± 0.58 µg/mL
Invierno	12.06 ± 0.49 µg/mL

*Se refiere a la concentración que requiere un inhibidor para que su respuesta (o unión) se reduzca a la mitad.

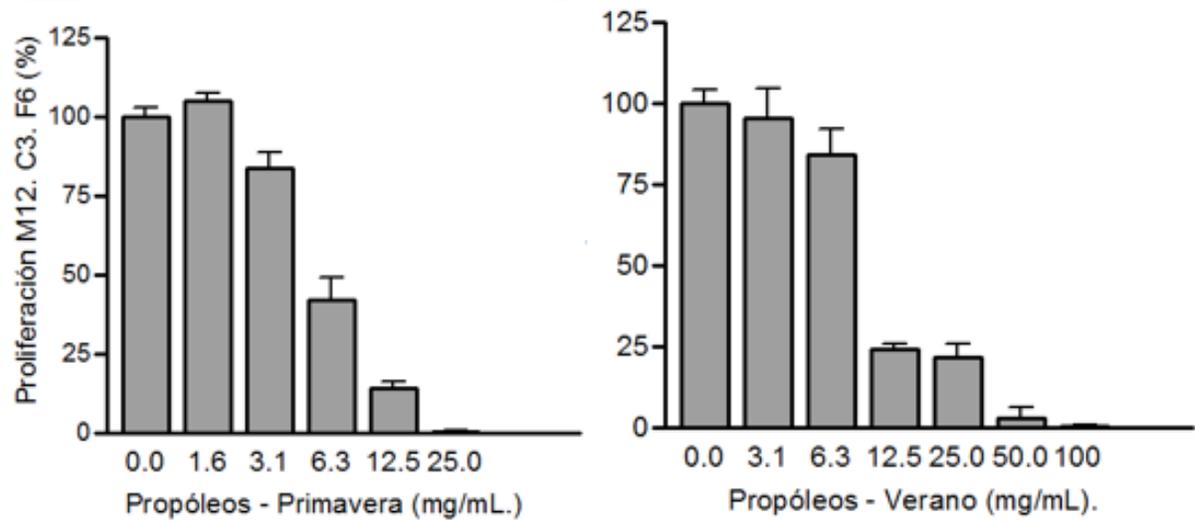


Figura 3. Actividad antiproliferativa de los propólisis recolectados en primavera y verano.

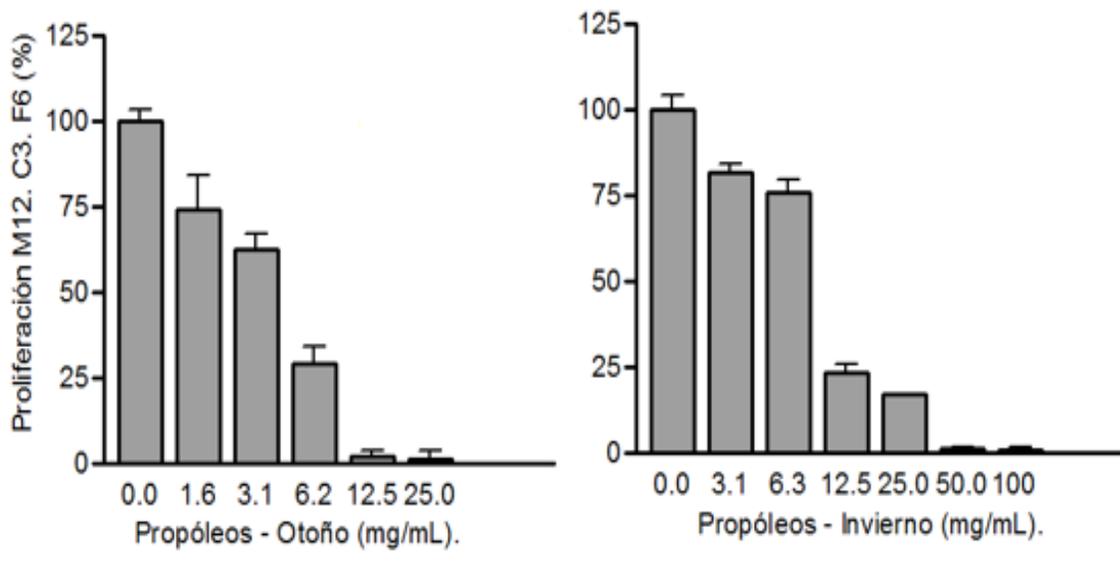


Figura 4. Actividad antiproliferativa de los propóleos recolectados en otoño e invierno.

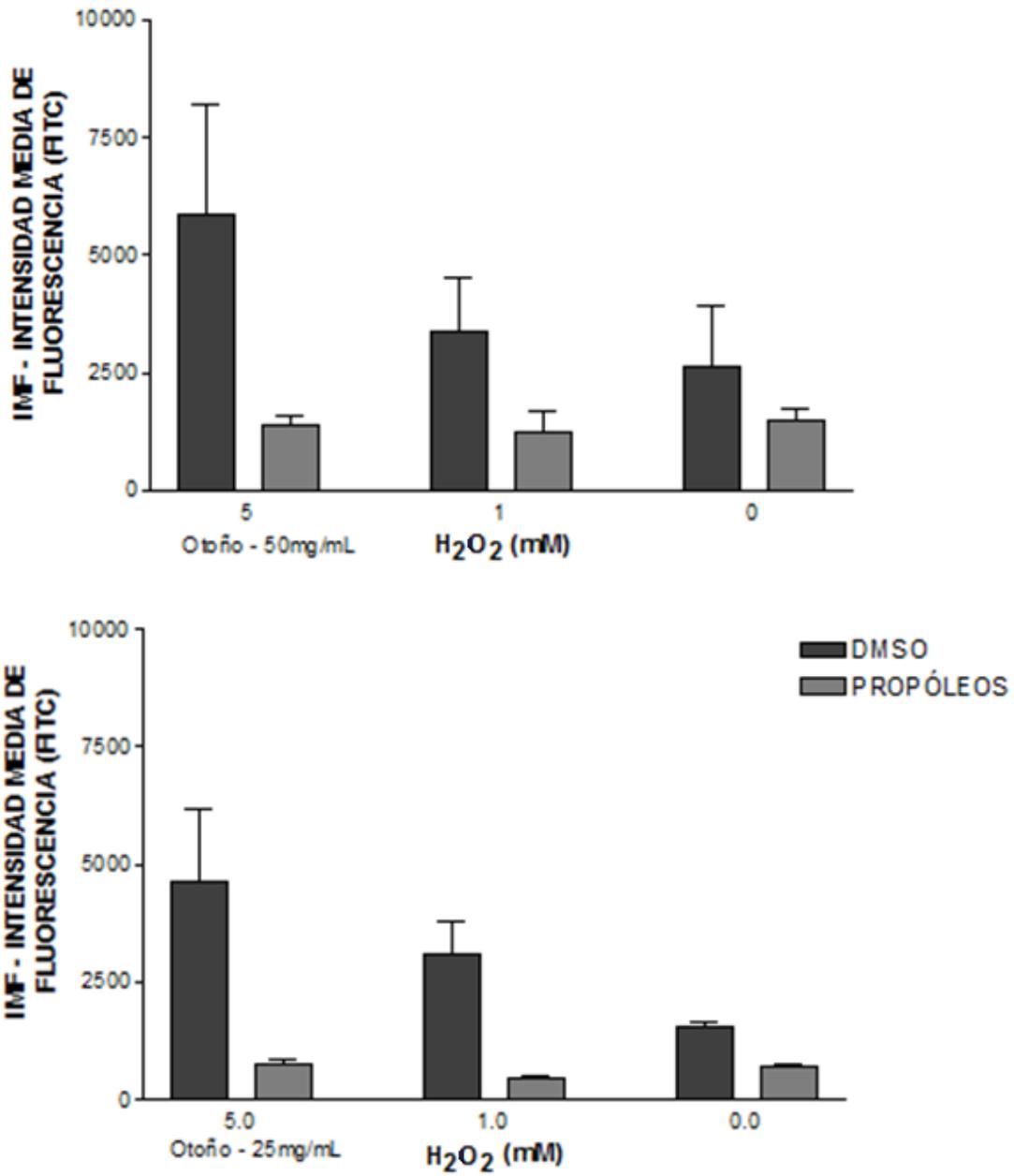


Figura 5. Actividad antioxidante de los propóleos recolectados en la temporada de otoño.

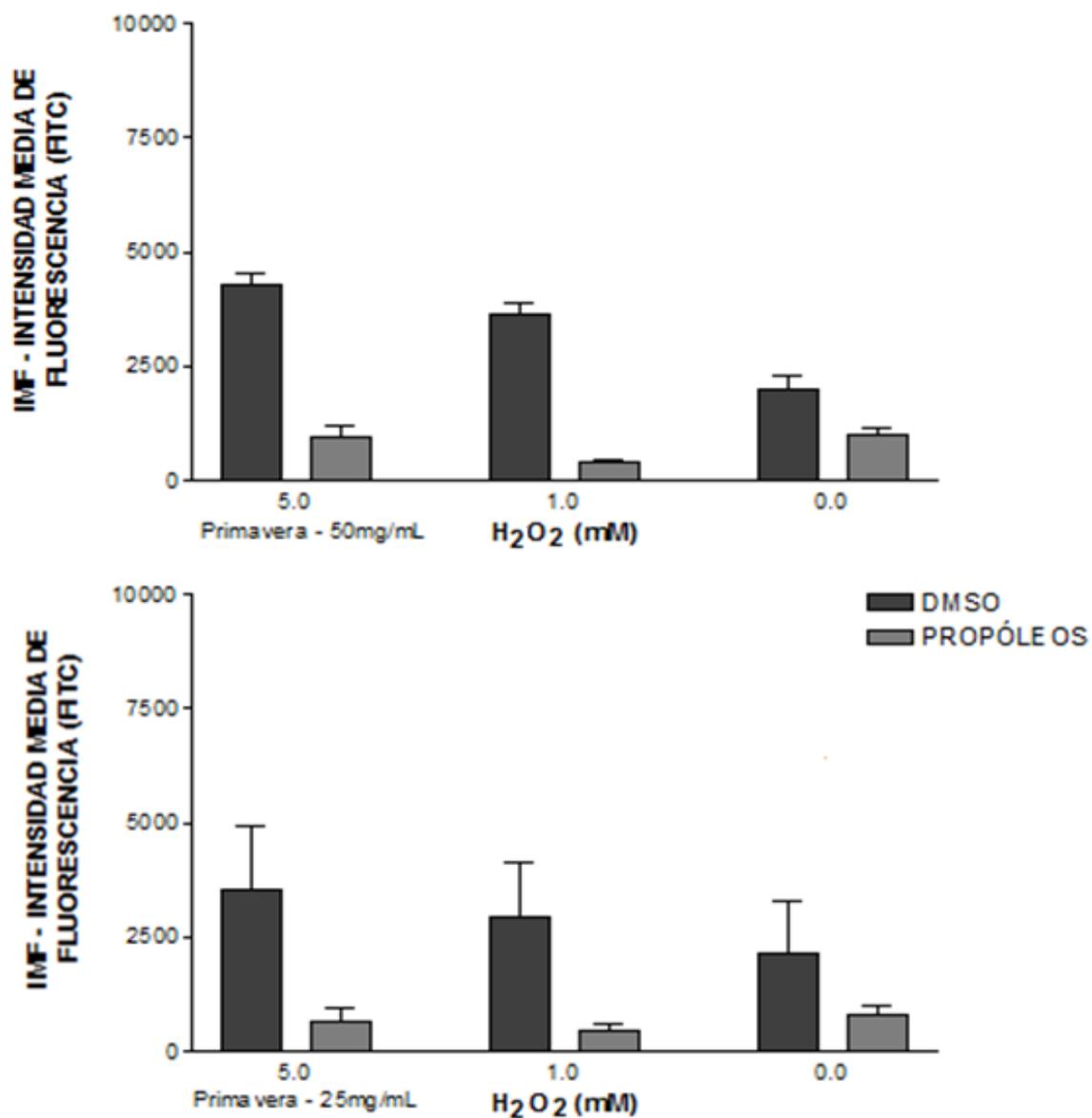


Figura 6. Actividad antioxidante de los propóleos recolectados en la temporada de primavera.

7. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos, se concluye lo siguiente:

- Todos los extractos de propóleos mostraron actividad antiproliferativa sobre la línea celular cancerígena utilizada, siendo los extractos correspondientes a la temporada de primavera y otoño los que mostraron mayor actividad.
- Todos los extractos de propóleos mostraron actividad antioxidante.
- La actividad antioxidante presente en los extractos de propóleo evaluados tiene potencial para ejercer una respuesta antioxidante a nivel celular y no solo como agente reductor.

8. RECOMENDACIONES

- Evaluar otras actividades biológicas, que posiblemente se encuentren en los propóleos evaluados, tales como antibacterial y antifúngica.
- Caracterizar los compuestos químicos y biológicos responsables de la actividad biológica, presentes en los propóleos evaluados.

9. BIBLIOGRAFÍA

Alday-Provencio, S. 2015. Sonoran propolis and some of its chemical constituents inhibit *in vitro* growth of *Giardia lamblia* trophozoites. *Planta Med.* (9): 742-7.

Avendaño López, M. C. 2010. Los productos naturales en la búsqueda de nuevos fármacos. Una visión de conjunto. *Anales real academia de farmacia.* (77): 13-26.

Banskota, A. H., T. Nagaoka, L. Y. Sumioka, Y. Tezuka, S. Awale, K. Midorikawa, K. Matsushige, S. Kadota. 2002. Antiproliferative activity of the Netherlands Propolis and its active principles in cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology.* (80): 67-73.

Burdock, G. A. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food and chemical toxicology.* (36): 347-363.

Castillo García, D., N. L. Woolrich Zavaleta. 2009. Identificación química de compuestos fenólicos por cromatografía de HPLC con detector de UV de extractos de pró-poleos recolectados en la zona de Córdoba-Orizaba. Tesis de licenciatura en química industrial. Universidad Veracruzana. México. 30-35.

Denizot, F., R. Lang. 1986. Rapid colorimetric assay for the cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Immunol Methods.* (2): 22-89.

Díaz Reyes, G. A. 2010. Evaluación de la actividad de propóleos recolectados en las regiones de Caborca, Ures y Pueblo de Álamos, Sonora, sobre el crecimiento *in vitro* de trofozoitos de *Giardia lamblia*. Tesis de maestría. Universidad de Sonora. México. 38-50.

Eruslanov, E., S. Kusmartsev. 2010. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow cytometry. *Advanced protocols in oxidative stress*. (594): 57-69.

Elejalde Guerra, J. I. 2001. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de medicina interna*. (18): 326-335.

Figueroa Benavides, C. P. 2012. Análisis de la calidad y actividad antiinflamatoria tópica *in vitro* de propóleos de la región metropolitana de Santiago de Chile. Tesis de licenciatura en químico farmacéutico. Universidad de Chile. Chile. 36-44.

Gutiérrez Ravelo, A., A. Estévez-Braun. 2009. Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el S. XXI. *R. Acad.Cienc.Exact.Fis.Nat*. (103): 409-419.

Herrera, C. L., O. Fritz, G. Montenegro, M. Alvear, M del Sol, L. A. Salazar. 2010. Propolis decrease diet-induced hepatic steatosis in mice. *Int. J. Morphol*. (28): 75-84.

Hernández, J., F. M. Goycoolea, J. Quintero, A. Acosta, M. Castañeda, Z. Domínguez, R. Robles, L. Vázquez-Moreno, E. F. Velásquez, H. Astiazaran, R. E. Lugo, C. Velázquez. 2007. Sonoran propolis: Chemical composition and antiproliferative on cancer cell lines. *Planta Med*. (73): 1469-1474.

Kujumgiev, A., I. Tsvetkova, Y. Serkedjieva, V. Banskova, R. Christov, S. Popov. 1999. Antibacterial, antifungal and antiviral of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*. (64): 235-240.

Langdon, S. P. 2004. *Cancer cell culture: Methods and protocols*. Methods in molecular medicine. ISBN: 978-1-59259-406-1.

Londoño-Londoño, J. 2012. *Antioxidantes: Importancia biológica y métodos para medir su actividad*. Corporación Universitaria Lasallista. ISBN: 978-958-8406-14-5.

López-Alarcón, C., A. Denicola. 2012. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*. (736): 1-10.

López-Carreño, A. L. 2015. *Evaluación de la capacidad antioxidante intracelular de propóleos sonorenses de sus constituyentes*. Tesis de Maestría. Universidad de Sonora. México.

Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for celular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. (65): 55-63.

Navarro-Navarro, M., R. E. Lugo-Sepúlveda, M. C. García-Moraga, R. de la Rosa-López, R. E. Robles-Zepeda, E. Ruiz-Bustos, C. A. Velázquez-Contreras. 2012. Actividad antibacteriana y antioxidante de extractos metanólicos de propóleos de Magdalena de Kino y Sonoyta, Sonora. *Biocencia*. (3): 9-15.

Navarro-Navarro, M., P. Ruiz-Bustos, D. Valencia, R. Robles-Zepeda, E. Ruiz-Bustos, C. Virués, J. Hernández, Z. Domínguez, C. Velázquez. 2013. Activity of Sonoran propolis and some of its constituents against clinically significant *Vibrio* species. *Foodborne pathogens and disease*. (10): 150-158.

Quintero-Mora, M. L., A. Londoño-Orozco, F. Hernández-Hernández, P. Manzano-Gayoso, R. López-Martínez, C. I. Soto-Zárate, L. Carillo-Miranda, G. Penieres-Carrillo, C. G. García-Tovar, T. A. Cruz-Sanchez. 2009. Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellífera* sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*. *Revista Iberoamericana de Micología*. (25): 22-26.

Ringuelet, J., S. Viña. 2013. *Productos naturales vegetales*. Universidad Nacional de la Plata. ISBN: 978-950-34-0971-8.

Sforcin, J. M., V. Banskova. 2010. Propolis: Is there a potencial for the development of new drugs. *Journal of Ethnopharmacology*. (133): 256-260.

U.S National Library of Medicine. 2015 El propóleos <http://www.nlm.nih.gov/medicines/spanich/druginfo/natural/390.html>, 26 de diciembre del 2015.

Vanbergen, A. 2013. *Lo esencial en metabolismo y nutrición*. Elsevier Mosby. ISBN: 978-0-7234-3626-3.

Vargas-Sanchez, R. D., G. R. Torrescano-Urrutia, A. M. Mendoza-Wilson, B. Vallejo-Galland, E. Acedo-Félix, J. J. Sánchez-Escalante, M. C. Peñalba-Garmendia, A. Sánchez-Escalante. 2013. Mecanismo involucrados en la actividad antioxidante y antibacteriana de propóleos. *Biocencia*. (16): 32-37.

Valencia-Rivera, D. E. 2012. Evaluación de propóleos de Ures, Sonora como material bioactivo/efecto de la temporalización sobre su composición química y sus actividades biológicas. Tesis de doctorado en ciencias de materiales. Universidad de Sonora. México. 21-48.

Velázquez, C., M. Navarro, A. Acosta, A. Angulo, Z. Domínguez, R. Robles, R. Robles-Zepeda, R. E. Lugo, F. M Goycoolea, E. F. Velázquez, H. Astiazaran, J. Hernández. 2007. Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonora propolis. *Journal of Applied Microbiology*. (56): 273-277.

Wolfe, K. L., R. H. Liu. 2007. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*. (55): 8896-8907.

10. APÉNDICES

Apéndice A. Preparación de medio de cultivo

Se pesaron los siguientes compuestos sólidos en una balanza digital (necesarios para preparar 1 litro de medio): 13.37g de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium), 0.11g de L-arginina, 0.036g de L- asparagina, 2g de bicarbonato de sodio, estos se disolvieron en agua destilada deionizada, aforando a 1 litro, se pone en agitación con un magneto, una vez disuelto, se mide el pH con ayuda de un pH metro, hasta ajustar en un rango entre 7.2 y 7.4, añadiendo hidróxido de sodio si está muy ácido o ácido clorhídrico en el caso contrario.

En la campana de flujo laminar se agregan los siguientes compuestos líquidos (utilizando material estéril), 10mL de Piruvato de sodio, 7mL de glutamina, 10mL de penicilina y 50mL de suero de ternera, una vez agregados los líquidos, con ayuda de un sistema, matraz Erlenmeyer grande y frasco estériles dentro de la campana, se acopló el sistema (estéril con membrana milipore) en el matraz y conecto a una bomba de vacío, esto mientras el medio es vertido dentro del sistema, el medio que pasa por el sistema y llega al matraz se encuentra ahora estéril por último se pasa el medio del matraz a un frasco de 1 litro estéril, el frasco se cierra bien y se etiqueta con nombre y fecha para después guardar a refrigeración a una temperatura de 4°C.

Apéndice B. Preparación de MTT

Para preparar 20mL de MTT, se pesan 100mg de sales MTT y se añaden 20mL de PBS 1X en un tubo para después agitar muy bien con ayuda del vortex hasta que no queden grumos. Se filtra con ayuda de un filtro milipore dentro de la campana de flujo laminar esto con el fin de que el líquido que vaya siendo filtrado

sea estéril y se pasa a un tubo estéril, el cual se cierra dentro de la campana, envuelve en una hoja de papel aluminio para proteger del sol y se guarda en refrigeración mientras no se utiliza.

Apéndice C. Preparación del alcohol isopropílico

Para preparar 100mL de alcohol isopropílico, se añaden a un vaso de precipitado 100mL de isopropanol y 337 μ L de ácido clorhídrico al 37%, se tapa y guarda a temperatura ambiente.

Apéndice D. Preparación de PBS 10X

Para preparar un litro de solución regulada de fosfatos es necesario: Disolver en agua deionizada las siguientes sales: NaHPO₄ (1.9g), Na₂HPO₄ (12g) y NaCl (85g), se ajusta el pH a 7.2 al igual que en la preparación de medio de cultivo y se afora con agua ultra pura a 1000 ml. Se recomienda esterilizar por filtración y a volúmenes más pequeños según se utilice, para preparar PBS 1X solo es necesario tomar una parte de PBS 10X y las otras nueve aforar con agua destilada.