

Universidad de Sonora

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

POSGRADO EN CIENCIAS DE LA SALUD

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA (*in vitro* e *in vivo*) DE
PROPÓLEOS SONORENSES Y ALGUNOS DE SUS CONSTITUYENTES
SOBRE *Giardia lamblia*.**

Que para obtener el grado de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Presenta:

Q.B.C. Alday Provencio Juan Samuel.

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



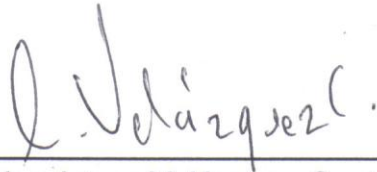
“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”



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

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de **Juan Samuel Alday Provencio**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.



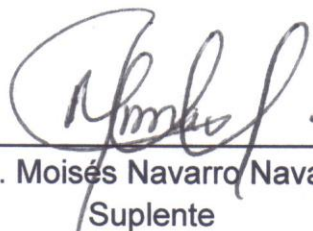
Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras
Director Académico



Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda
Secretario



M.C. María Lucila Rascón Durán
Vocal



M.C. Moisés Navarro Navarro
Suplente

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

A Dios por permitirme tener ésta bendición y oportunidad en la realización de uno más de mis éxitos.

A mi Alma Mater la Universidad de Sonora, por darme la oportunidad de alcanzar una de mis metas, gracias a los excelentes profesores e investigadores quienes durante estos años se esmeran por dar lo mejor para nuestra formación profesional, y también por las experiencias vividas.

A mi asesor de tesis el Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras, por la orientación y ayuda que me brindó para la realización de éste trabajo, ya que sus consejos y asesorías me permitieron aprender y salir adelante con mi formación.

A mis sinodales por su amable tiempo, aceptación, recomendaciones y correcciones realizadas a esta importante investigación: Dr. Ramón Robles, M. C. Moisés Navarro y M. C. Lucila Rascón.

A mis compañeros maestros y amigos: Jael, Lulú, Paola, Alejandra, Erika, Brenda, Gloria, Ramsés, Panchito, Raúl, Efraín a la maestra Judith Valdez, porque mutuamente formamos parte de nuestra formación, ya que somos el motor uno del otro para que todo esto salga adelante, muchas Gracias compañeros.

A la maestra Lucila Rascón quien también aparte de ser mi sinodal, es una excelente maestra y compañera de laboratorio, siga con ese entusiasmo que la

caracteriza, ya que es una motivación para nosotros, y por supuesto gracias por sus observaciones y regaños objetivos.

A mis compañeros y amigos de la academia Latina Urban Dance: Luis Arce, Jess y todos los que forman parte de esta gran familia ya que ustedes también contribuyeron en gran manera a la realización de todo esto, muchas Gracias por todo.

A mis amigos de siempre y compañeros de generación: Cecy, Ivonne, Mónica, Cesar y a sus respectivas familias que van en aumento, porque a pesar de no vernos muy seguido saben que ustedes forman una parte importante por todas las experiencias compartidas y vividas.

Al departamento de Posgrado en Ciencias de la Salud, por brindarme la oportunidad de formar parte de tan excelente formación, y por el apoyo brindado en la utilización de sus instalaciones, y por supuesto también agradecer a Denia Abril Montes por todo el excelentísimo apoyo brindado para poder obtener este logro ya también forma parte importante.

Al personal del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA), por brindarnos parte de sus instalaciones, en particular al M. C. Rafael Canett por su apoyo en el Bioterio.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por los recursos y materiales otorgados.

Esta tesis se la dedico con mucho cariño, como símbolo de mi gratitud por su amor incondicional, a mi familia: mis padres Sergio y Yolanda; y mis hermanos, en especial a Regina que me ha apoyado en sobremanera. Que gracias a ellos he llegado a esta etapa, gracias por su paciencia y comprensión porque a pesar de las dificultades y carencias han realizado el máximo esfuerzo por darme lo mejor, reconozco ese infinito esfuerzo por mi educación y formación. Los quiero mucho.

También dedico con mucho cariño la realización de éste trabajo a la Dra. Jael Quintero ya que desde el momento que entre a este laboratorio ha sido también quien me ha guiado e instruido en la realización de éste trabajo y, claro que formamos buen equipo en plasmar este trabajo en un artículo de investigación, Gracias infinitas Jalea. Y por otra parte también quiero dedicar y agradecer a Lourdes Valencia ya que ella sabe que también forma parte de la obtención y producción de todo este trabajo, Gracias Luly!.

INDICE

	Página
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMEN	xi
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	4
Propóleos	4
Generalidades	4
Origen Botánico del Propóleos	4
Composición Química del Propóleos	6
Flavonoides	8
Actividad Biológica del Propóleos	12
Actividad Antiparasitaria del Propóleos	13
<i>Giardia lamblia</i>	14
Características Generales	14
Taxonomía	14
Morfología	16
Ciclo de Vida	17
Giardiasis	19
Características Clínicas	21
Aspectos Clínicos	21
Tratamiento	23
OBJETIVO GENERAL	25
Objetivos Particulares	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26

Cultivo de <i>G. lamblia</i>	26
Recolección de Propóleos y Obtención de Extractos Metanólicos de Propóleos Sonorenses	26
Ensayo de Actividad Antiparasitaria de Propóleos Sonorenses y Algunos de sus Constituyentes Sobre el Crecimiento <i>in vitro</i> de Trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	27
Recolección y Obtención del Extracto Metanólico para la Especie Vegetal <i>Populus fremontii</i> .	28
Modelo Animal	29
Ensayo de actividad antiparasitaria de propóleos de Ures (verano) y CAPE sobre el crecimiento <i>in vivo</i> de trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	29
Análisis Estadístico	30
RESULTADOS	31
Evaluación de la actividad antiparasitaria de algunos de los constituyentes de propóleos sonorenses sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	31
Evaluación de la actividad antiparasitaria de <i>P. fremontii</i> (fuente botánica principal de propóleos de Ures) sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	31
Evaluación <i>in vivo</i> de propóleos de Ures (verano) y CAPE, como tratamiento, sobre gerbiles infectados con trofozoítos de <i>G. lamblia</i> .	33
DISCUSIÓN	38
CONCLUSIONES	42
BIBLIOGRAFÍA	43
ANEXOS	51
Paper Submission Confirmation Letter	
Manuscript submitted to editorial office	

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Manifestaciones clínicas de la giardiasis.	22
II	Resumen de resultados de compuestos químicos, propóleos de Ures, Sonora, y su fuente botánica principal sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de trofozoítos de <i>G. lamblia</i> .	35

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Comparación del perfil cromatográfico: de A : propóleos de Ures, Sonora y B : de resinas extraídas de <i>P. fremontii</i> .	7
2	Estructura química base de flavonoides.	9
3	Categorías en las que se clasifican a los flavonoides.	10
4	Morfologías del protozooario <i>G. lamblia</i> en la naturaleza.	18
5	Ciclo biológico de <i>G. lamblia</i>	20
6	Evaluación de la actividad antiparasitaria <i>in vitro</i> de compuestos químicos de propóleos sonorenses	32
7	Evaluación de la actividad antiparasitaria de <i>P. fremontii</i> sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de trofozoítos de <i>G. lamblia</i> .	34
8	Evaluación <i>in vivo</i> de propóleos de Ures (verano) y CAPE, como tratamiento, sobre gerbiles infectados con trofozoítos de <i>G. lamblia</i> .	37
9	Cámara de Neubauer o hemacitómetro.	57
10	Estructura química de algunos de los constituyentes de propóleos sonorenses evaluados sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de trofozoítos de <i>G. lamblia</i> .	58

RESUMEN

Los propóleos son un producto natural que las abejas (*Apis mellifera*) elaboran a partir de exudados y resinas de plantas. Diferentes modelos animales han sido utilizados para investigar propóleos con actividades anti-inflamatorias, cariostática, agente anti-parasitario, entre otras actividades. Estos efectos se han asociado con la presencia de flavonoides, ácidos aromáticos y ésteres. Esta composición química y sus actividades biológicas dependen del origen geográfico de los propóleos. *G. lamblia* es el agente causal de giardiasis, siendo la enfermedad parasitaria intestinal más común en el mundo. Dentro de las manifestaciones clínicas de la giardiasis se encuentran el dolor abdominal, náusea, vómito, diarrea, estados de mal nutrición y pérdida de peso. En estudios previos de nuestro grupo de investigación se estableció que extractos metanólicos de propóleos colectados en la región de Ures, Sonora (N29°27'W110°22') tienen actividad anti-proliferativa *in vitro* sobre trofozoítos de *G. lamblia* (temporada de verano IC₅₀: 63.8 µg/mL). Adicionalmente, se han identificado los principales compuestos presentes en los propóleos de esta región. Basado en estas observaciones, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar la actividad antiparasitaria de propóleos sonorenses y algunos de los constituyentes químicos (CAPE, Pinocembrina, Naringenina, Hesperetina, Crisina y Rutina) sobre el crecimiento (*in vitro* e *in vivo*) de trofozoítos de *G. lamblia*. El efecto de propóleos sobre el crecimiento de *G. lamblia* se evaluó mediante ensayos de proliferación *in vitro*, así como utilizando un modelo de infección en el roedor *Meriones unguiculatus* (gerbil de Mongolia). Entre los compuestos químicos presentes en propóleos sonorenses CAPE (IC₅₀: 63.1 µg/mL), naringenina (IC₅₀: 125.7 µg/mL), hesperetina (IC₅₀: 149.6 µg/mL) y pinocembrina (IC₅₀: 174.4 µg/mL) presentaron la mayor actividad inhibitoria sobre el crecimiento *in vitro* de *G. lamblia*, mientras que crisina y rutina no mostraron actividad antiparasitaria a las concentraciones evaluadas sobre el crecimiento *in vitro* de trofozoítos de *G. lamblia*. Se evaluó el efecto del extracto metanólico por inmersión (sometiendo las hojas frescas, tallos y brotes) de la

principal fuente botánica (*P. fremontii*) de propóleos de Ures, Sonora frente al crecimiento *in vitro* de trofozoítos de *G. lamblia*, mostrando un efecto inhibitorio significativo contra éste parasito con una IC₅₀ de 113.8 µg/mL. CAPE y propóleos de Ures, Sonora (verano) mostraron una disminución de la carga parasitaria en el modelo gerbil, siendo el primero el que mostró un mayor efecto inhibitorio, comparados con el grupo control de infección. Con base a los resultados obtenidos en este trabajo, se sugiere que los compuestos químicos CAPE, naringenina, hesperetina y pinocembrina son algunos de los constituyentes responsables de la actividad antiparasitaria contra *G. lamblia* de propóleos sonorenses. *P. fremontii*, presentó un efecto inhibitorio sobre el crecimiento *in vitro* de trofozoítos de *G. lamblia* (a la mayor concentración evaluada), en comparación con el efecto de propóleos de Ures, Sonora (verano), el cual mostró mayor actividad. En el modelo gerbil se disminuyó la carga parasitaria de *G. lamblia*, al someterlos al tratamiento con propóleos de Ures, Sonora (verano) y CAPE, mostrando un efecto inhibitorio significativo. La caracterización de la actividad antiparasitaria de los propóleos Sonorenses contribuirá significativamente al incremento de nuestro entendimiento sobre las propiedades biológicas de este producto natural, la cual pudiera ser una alternativa en la búsqueda de nuevos compuestos de origen natural con actividad anti-*Giardia*.

INTRODUCCIÓN

Los propóleos son un material resinoso natural producidos por las abejas (*Apis mellifera*) en la colmena a partir de yemas, hojas y exudados de ciertos árboles y plantas (Marcucci, 1995). Los propóleos han sido utilizados como medicina tradicional en muchas regiones del mundo. La composición química de los propóleos y sus propiedades biológicas dependen del tipo de vegetación de la zona geográfica circundante a la colmena (Velázquez y col., 2007).

La abeja utiliza sus mandíbulas para recolectar partículas resinosas de distintas plantas cercanas a la colmena y las mezclan con cera y secreciones salivales para formar los propóleos (Bedascarrasbure y col., 2000), los cuales son utilizados para cubrir, mantener y reparar sus colmenas (Marcucci, 1995), así como para bloquear el paso de pequeños insectos y animales que pudieran invadir la colmena y transformarse en un peligro para su comunidad. Cumplen una importante función como arma química de protección para la colmena contra microorganismos ya que impiden su proliferación (Burdock, 1998; Bedascarrasbure y col., 2000; Bankova, 2005).

Las propiedades de los propóleos han sido el objeto de estudio de científicos desde finales de los años 60's. Durante estos últimos 50 años, se han publicado diversos artículos científicos sobre la composición química de los propóleos, actividad biológica, farmacológica y usos terapéuticos (Bankova, 2000). Actualmente, se les atribuye un amplio espectro de actividades biológicas entre las cuales se encuentra su capacidad antifúngica (*Candida albicans*), antiviral (Virus de *Avian influenza*), antibacteriana (*Staphylococcus aureus* y *Vibrio cholerae*), antiinflamatoria, inmunomoduladora, antioxidante, antitumoral (Paulino y col., 2003; Uzel y col., 2005; Ruiz y col., 2012) y antiparasitaria (Barbosa y col., 2004), entre otras. Con base a este conocimiento, se ha profundizado en el estudio de los propóleos en todo el mundo, principalmente de los propóleos europeos, asiáticos, brasileños, y africanos (Burdock, 1998). En México, la investigación en este rubro es aún incipiente, pocos son los trabajos publicados sobre la

evaluación de actividades biológicas de propóleos mexicanos. Las propiedades antimicrobianas de los propóleos están relacionadas con el efecto sinérgico de sus componentes (Santos y col., 2002), haciendo que los propóleos afecten la motilidad bacteriana y su actividad enzimática (Boyanova y col., 2005). Dentro de las más estudiadas son la actividad antioxidante, antibacteriana, anticancerígena y recientemente se ha iniciado en el estudio de la actividad antiparasitaria tomando como modelo al protozoario *G. lamblia* (Velázquez y col., 2007; Hernández y col., 2007; Valencia y col., 2012; Robles-Zepeda y col., 2012; Lotti y col., 2010; Tolosa, 2002).

G. lamblia es un parásito intestinal frecuente en niños. La enfermedad es cosmopolita y es una de las causas de la diarrea del viajero (Vázquez y col., 2009). El parásito se puede propagar mediante la ingestión de alimentos o agua contaminada con quistes. La giardiasis es la enfermedad parasitaria intestinal más común en el mundo (Benchimol, 2002). Constituye un problema de salud pública, especialmente en países en desarrollo, siendo el protozoo más común en el humano, presentando una amplia distribución mundial (Busatti y col., 2009).

Giardia tiene un ciclo de vida simple el cual alterna entre dos formas de vida morfológica y bioquímicamente: el trofozoíto móvil, causa la enfermedad colonizando la parte superior del intestino delgado; y el quiste ambientalmente resistente es la forma infectiva de éste parásito (Lujan, 2009). La infección se inicia por la ingestión de quistes (10-100) en agua o comida contaminada (Vázquez y col., 2009), los cuales al pasar por el estómago comenzarán un proceso de exquistación transformándose en trofozoítos los cuales se dividirán y colonizarán la parte superior del intestino delgado. Los trofozoítos se diferenciarán en forma de quiste, los cuales serán liberados a través de las heces al medio ambiente infectando nuevamente a hospederos susceptibles, completando así su ciclo de vida (Weiland, 2005).

Se han realizado muchos esfuerzos para controlar la giardiasis en zonas endémicas, entre los medicamentos disponibles para tratar esta parasitosis, el albendazol es la droga de primera elección en el tratamiento convencional contra esta parasitosis (Cedillo-

Rivera, y col. 1992). También el metronidazol entre otros, es un agente eficaz en la eliminación de éste parásito. Con el uso de estos antiparasitarios se ha reportado una alta incidencia en efectos secundarios indeseables incluyendo mareos, trastornos gastrointestinales, dolores de cabeza y erupciones transitorias (Karabay O. y col., 2004). Se han encontrado evidencias científicas que sugieren la aparición de cepas resistentes a los medicamentos reportados de primera elección, debido al uso incorrecto de estas drogas antiparasitarias (Freitas y col., 2006; Cedillo-R. R. y col., 2002). Por esta razón constantemente se busca una alternativa más para la erradicación de esta parasitosis, siendo el empleo de productos naturales en la medicina, especialmente provenientes de plantas, uno de los más utilizados. El desarrollo de la medicina moderna conlleva al perfeccionamiento de fármacos efectivos sintetizados a partir de precursores obtenidos de plantas medicinales.

ANTECEDENTES

Propóleos

Generalidades

Los propóleos fueron usados en el Egipto antiguo y en la civilización Griega donde se reconocieron sus propiedades curativas. Hipócrates, fundador de la medicina moderna, usaba los propóleos para curar llagas, úlceras internas y externas (Parolia y col., 2010).

Propóleos es el nombre genérico para el producto natural resinoso de composición compleja colectada por las abejas de la especie *Apis mellifera* (Ansorge, 2003). Las abejas usan los propóleos como un sellador para sus colmenas y para embalsamar organismos que han matado. Los propóleos están compuestos principalmente por resinas, cera, aceites esenciales, polen y compuestos orgánicos que exhiben actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral entre otras. Las abejas desinfectan su ambiente interno mediante la difusión de una fina capa de propóleos en las paredes internas de la colmena (Strehle, 2002; Boyanova, 2005).

Origen Botánico del Propóleos

Los propóleos son colectados de los exudados de diferentes plantas por lo tanto presentan una composición compleja dependiendo básicamente de la fuente vegetal que se encuentre disponible. En zonas templadas, *Populus spp.* (Álamo) es la fuente principal del propóleos, mientras que en regiones tropicales, hay una gran variedad de fuentes botánicas que se utilizan para la elaboración de esta resina, esto conlleva a que los propóleos de diferentes regiones geográficas presenten una composición química distinta (Salomão, 2008).

La actividad farmacológica, un punto importante en la investigación del propóleo, ha sido ligada a su origen botánico, con una consiguiente variación en la composición química, lográndose observar que dicha actividad varía al comparar propóleos de diferentes localizaciones, e inclusive al comparar muestras de una misma región (Salatino, y col. 2005). Propóleos de Europa y América del Sur comparten actividad antimicrobiana, antiviral, cicatrización de heridas, estimulación inmune, anti-inflamatoria y anestésica (Robles-Zepeda y col., 2012). Se han encontrado similitudes en las actividades biológicas en propóleos de diferentes zonas geográficas, pero al comparar su composición química se observan diferentes perfiles, lo cual se basa en la diversidad botánica de la región. Estudios recientes han establecido el perfil químico de los propóleos de Europa como consecuencia del hecho de que las abejas recogen de resinas principalmente de brotes de álamos vegetativo (*Populus nigra*, Salicaceae).

En el trópico, el álamo es raramente cultivado, por lo tanto plantas alternativas son fuente de resina que las abejas buscan para la elaboración de propóleos. Por ejemplo, las flores de *Clusia minor* y *Clusia rosea* (Venezuela y Cuba, respectivamente) producen la resina recolectada por las abejas para la producción de los propóleos (Salatino, 2005; Robles-Zepeda y col., 2012). La actividad biológica de los propóleos es asignada a las sustancias derivadas de las plantas. Por lo tanto, aunque el propóleo es un producto vegetal-animal, una considerable proporción de sus componentes, principalmente aquellos sobre los que recae su actividad biológica, son derivados de las plantas. Esta resina contiene la mayoría de los compuestos encontrados en los extractos de alcohol consumidos por la gente de muchos países como complemento alimenticio o medicina alternativa.

Se han caracterizado y analizado propóleos colectados en la región de Ures Sonora, así como plantas (extractos por inmersión con metanol) de la especie *P. fremontii*, *Ambrosia ambrosioides*, *Bursera laxiflora* y *Prosopis velutina*, mediante el análisis cromatográfico por RP-HPLC (Alday-Noriega, Tesis Maestría, 2012). Los cromatogramas muestran la presencia de picos que sugieren similitud en la composición química de los propóleos de Ures, Sonora con respecto a *P. fremontii*. Por otra parte los

cromatogramas analizados de *B. laxiflora* y *A. ambrosioides* muestran pocos picos comunes a estas plantas y el propóleo, indicando la presencia de pocos compuestos presentes en los propóleos de la región de Ures, Sonora (Figura 1) (Alday-Noriega, Tesis Maestría, 2012).

Lo anterior sugiere que la fuente botánica principal o mayoritaria de los propóleos de Ures, Sonora es la especie vegetal *P. fremontii*, con base a la similitud en sus perfiles cromatográficos y a la evidente presencia de compuestos de naturaleza fenólica como pinocembrina, crisina y pinobanksina-3-O-acetato, compuestos principalmente provenientes de las especies de *Populus* (Hernández y col., 2007; Valencia y col., 2012, Bankova y col., 2000, Bankova y col., 2005).

Composición Química del Propóleo

Los propóleos se originan como una gama de secreciones recogidas por las abejas a partir de una gran variedad de plantas, y puede variar de color dependiendo del origen de la especie vegetal (Daugsch y col., 2007).

Existe un extenso número de publicaciones sobre propóleos y su composición química. Más de 300 compuestos individuales se han identificado como constituyentes de propóleos (Bankova y col. 2000). Los propóleos contienen principalmente resinas, bálsamos, aldehídos fenólicos (polifenoles), ceras, ácidos grasos, aceites esenciales, polen, y minerales, así como compuestos orgánicos. Ácidos fenólicos, esterés, y flavonoides han demostrado ser los componentes principales de los propóleos (Bankova y col. 2000; Robles-Zepeda, y col. 2012).

Con el fin de identificar los componentes químicos de propóleos Sonorenses, diversos trabajos han analizado los extractos metanólicos de los propóleos por HPLC-DAD-MS. La identificación y cuantificación los principales picos en los cromatogramas de HPLC, UV y espectros de masas de los compuestos presentes en estas resinas, fueron comparados con los estándares ya existentes en bases de datos de las muestras patrón

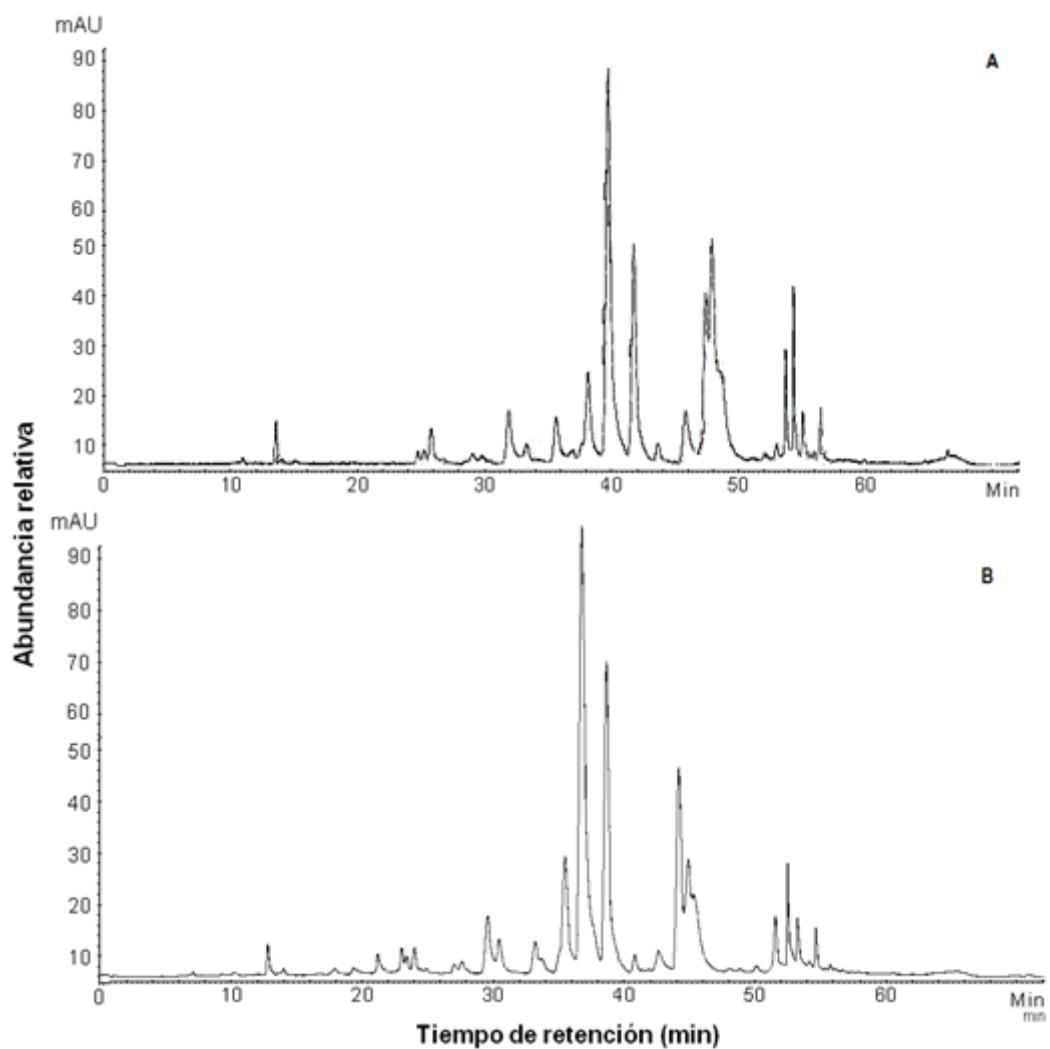


Figura 1. Comparación del perfil cromatográfico: de **A:** propóleos de Ures, Sonora y **B:** de resinas extraídas de *P.fremontii* (Alday-Noriega, Tesis Maestría, 2012).

(Hernández y col., 2007). Se identificaron 22 constituyentes químicos en las muestras de propóleos de la región de Ures, Sonora, entre ellos flavonoides, siendo la mayoría ésteres de pinobanksina (Alday-Noriega, Tesis Maestría, 2012; Hernández y col., 2007; Valencia 2012.).

Flavonoides

El estudio de la química de flavonoides ha surgido, como la de la mayoría de productos naturales, de la búsqueda de nuevos compuestos con propiedades fisiológicas útiles. Los flavonoides son un grupo diverso de metabolitos secundarios de origen vegetal, comprendido aproximadamente por 3,000 compuestos fenólicos que comparten una estructura química similar (Figura 2) (Jaganath, y col. 2010). Los flavonoides se encuentran en casi todas las especies vegetales superiores, y juegan un papel importante en el desarrollo, crecimiento y defensa de las plantas contra microorganismos y plagas. En muchos casos su función es proporcionar pigmento y otorgarle a las plantas sus características de color, también actúan protegiendo los tejidos vegetales de radiaciones dañinas, debido a su capacidad de absorber ciertas radiaciones ultravioleta (Boik, 2001; Venkatesh y col., 2007). Los flavonoides son sintetizados a partir de precursores derivados de fenilpropanoides y acetato, siendo moléculas que tienen como estructura base dos anillos bencénicos unidos a través de una cadena de tres átomos de carbono. Los fenilpropanoides son derivados del ácido cinámico (Diniz y col., 2003; Crozier y col., 2006).

Los flavonoides pueden ser clasificados en seis categorías (Figura 3) (Diniz y col., 2003; Venkatesh y col., 2007; Jaganath, y col. 2010):

- Flavanonas: son caracterizados estructuralmente por la ausencia de un doble enlace en C2 y C3, y la presencia de un centro quiral en C2. La estructura de las flavanonas es altamente reactiva y generalmente experimenta procesos de hidroxilación, glucosilación y reacciones de *O*-metilación. Son una categoría

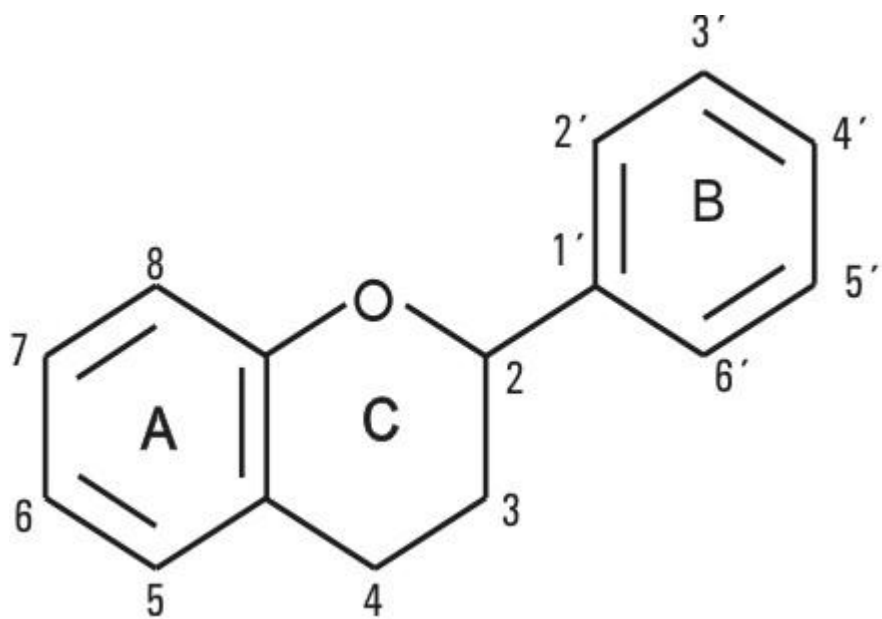


Figura 2. Estructura química base de flavonoides. Son compuestos fenólicos diaril-propánicos, es decir, su estructura es del tipo C₆-C₃-C₆, con dos anillos aromáticos (bencénicos) unidos entre sí por una cadena de 3 carbonos ciclada a través de un oxígeno. (Jaganath, y col. 2010).

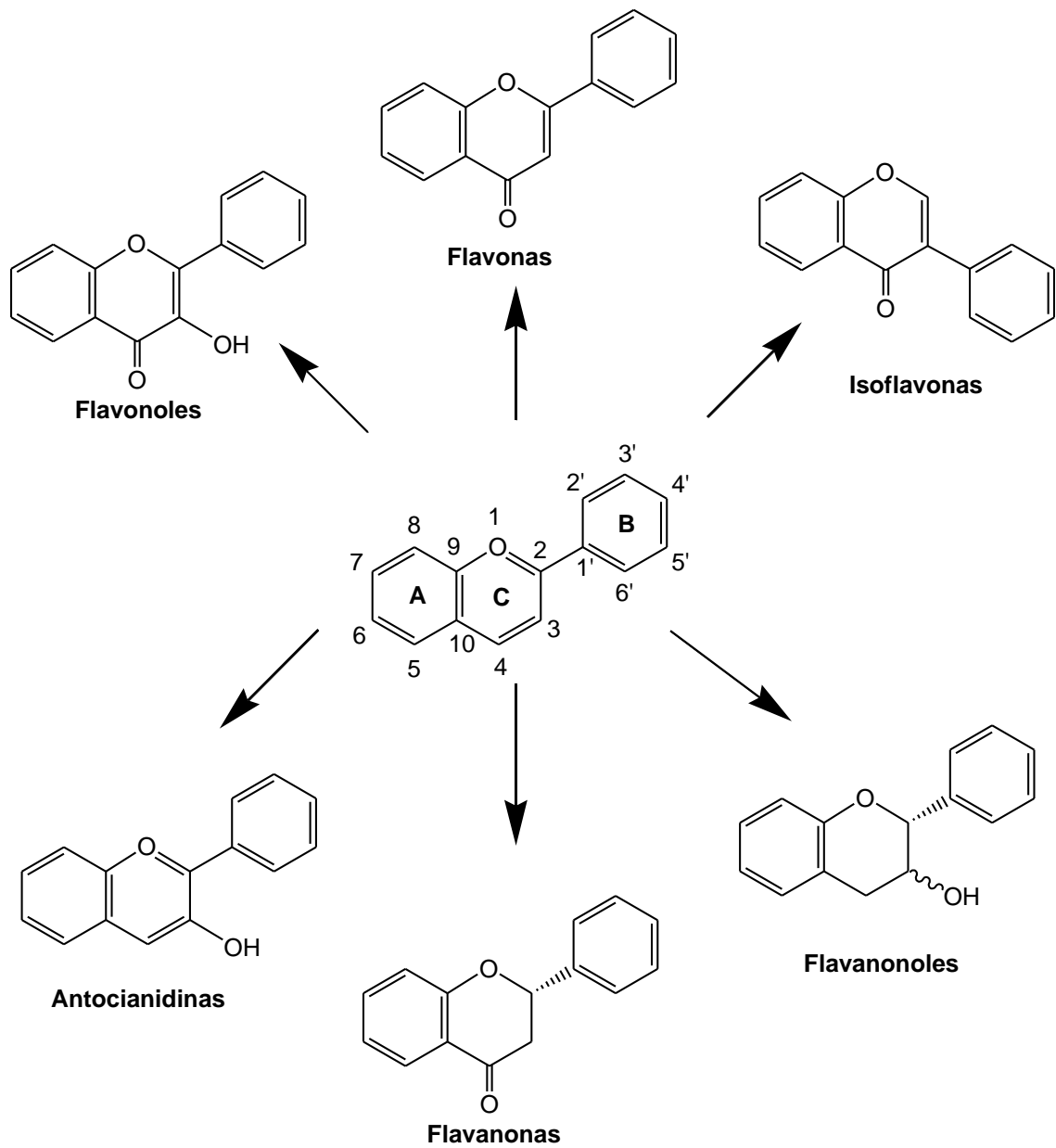


Figura 3. Categorías en las que se clasifican a los flavonoides (Jaganath, y col. 2010).

minoritaria de los flavonoides debido a su limitada distribución natural, encontrándose principalmente en las frutas cítricas, flavanonas como pinocembrina, tangeretina, naringenina y naringina.

- Flavonoles: Son el grupo de flavonoides más ampliamente distribuido en la naturaleza, encontrándose en una gran variedad de plantas. Al igual que las flavonas, existen pocos flavonoles primarios, pero estos se encuentran generalmente en forma de *O*-glucósidos, este tipo de conjugación es más frecuente en la posición C3, sin embargo las sustituciones pueden presentarse en los carbonos 5,7,4',3' y 5'. Los principales son la quercitina y el kampferol.
- Flavonas: tienen similitud estructural con los flavonoles, presentan sustituciones en los anillos A y C, así como la ausencia de hidroxilación en C3. Exhiben un amplio rango de sustituciones, entre ellas: hidroxilación, metilación, *O*- y *C*-alquilación y glucosilación. Presentan una amplia distribución en la naturaleza, aunque existen pocas flavonas primarias, éstas se pueden combinar con varios monosacáridos (azúcares) en distintas maneras para dar lugar miles de compuestos de glucósidos diferentes. Flavonas primarias incluyen luteolina y apigenina.
- Isoflavonas, o isoflavonoides: Son caracterizados principalmente por tener el anillo B unido por medio de C3 en lugar de C2 se encuentran principalmente en leguminosas como la soya. Genisteina y daidzeina son algunas de las comunes. Las isoflavonas también se encuentran naturalmente como glucósidos.
- Flavanonoles: Al igual que las flavanonas tienen saturado el C3 del anillo C heterocíclico siendo de esta manera una estructura no planar. Mientras que las flavanonas presentan sólo un centro quiral en C2 los flavonoles poseen dos uno en C2 y otro en C3. Son considerados una categoría minoritaria en los flavonoides debido a su limitada distribución natural. Los flavonoles van desde estructuras monoméricas sencillas como catequina y su isómero epicatequina hasta proantocianidinas oligoméricas y poliméricas. Las proantocianidinas

derivan su nombre del hecho que bajo condiciones ácidas y de elevadas temperaturas de ellas se obtienen antocianidinas.

- Antocianidinas y proantocianidinas. Se encuentran altamente distribuidas en las plantas actuando como pigmentos de color azul y rojo, principalmente como glucósidos. Generalmente forman conjugados con hidroxicinamatos y ácidos orgánicos, este tipo de sustituciones tienen lugar en los carbonos 3,5,7,3' y 5', ocurriendo más frecuentemente en C3. en forma de antocianinas. Están altamente concentradas en frutos como las moras (Martínez-Sánchez, y col. 2007; Jaganath, y col. 2010).

Actividad Biológica del Propóleo

Esta resina o producto natural se conoce desde la antigüedad y ha sido ampliamente estudiada y utilizada por diferentes culturas con múltiples finalidades. Según algunas publicaciones, hay registros de su uso en la medicina tradicional desde 300 a.C. (Hernández y col. 2007).

Durante las últimas décadas, se ha incrementado el número de estudios publicados acerca de la composición química, actividades biológicas así como farmacológicas y usos terapéuticos de los propóleos (Marcucci, 1995; Hernández y col. 2007). La actividad biológica de los propóleos es asignada a las sustancias derivadas de las plantas. Por lo tanto, aunque los propóleos son un producto animal, una considerable proporción de sus componentes, principalmente aquellos sobre los que recae su actividad biológica, son derivados de las plantas. Esta resina contiene la mayoría de los compuestos encontrados en los extractos de alcohol consumidos por la gente de muchos países como complemento alimenticio o medicina alternativa (Bankova, y col. 2000).

Los constituyentes activos más importantes en los propóleos son los flavonoides (flavonas, flavonoles, flavononas), compuestos fenólicos y aromáticos, desde el punto de vista farmacológico son considerados los compuestos responsables del espectro de

actividades biológicas generados por los propóleos (Uzel y col., 2005).

Se ha reportado que este producto natural posee un amplio espectro de actividades biológicas, principalmente: efecto citotóxico sobre células cancerosas (Hernández y col., 2007), antiinflamatorio, antiviral (Paulino y col., 2003), antioxidante (Russo y col., 2004), inmunorreguladora, antimutagénica, antiparasitaria (Barbosa da Silva-Cunha y col., 2004; Freitas y col., 2006), antimicrobiana (Velázquez y col., 2007), antimicótica (Katircioglu y col., 2006), antiséptica, astringente, entre otros (Bankova, 2005; Burdock, 1998).

Estudios previos han demostrado que los propóleos de Ures, Sonora poseen actividad antibacteriana (Velázquez y col., 2007), antiproliferativa sobre líneas celulares cancerígenas (Hernández y col., 2007) y antiparasitaria (Alday-Provencio, 2013; Díaz G., Tesis Maestría, 2010).

Actividad Antiparasitaria del Propóleos

En Brasil se evaluó la actividad antiparasitaria *in vitro* de los propóleos empleando extractos metanólicos contra cepas de *Trypanosoma cruzi*, donde solo uno de quince extractos presentó la más alta actividad antiparasitaria (Barbosa da Silva-Cunha y col., 2004); extractos de Bulgaria y Brasil fueron probados contra diferentes especies de *Leishmania*, demostrando que el extracto de Bulgaria presentó mayor actividad que los de Brasil (Machado y col., 2007); de igual manera extractos etanólicos de propóleos de Brasil han demostrado un alto grado de actividad biológica en el crecimiento y adherencia de trofozoítos *G. lamblia* inhibiendo el 50 % de la proliferación celular a una concentración de 125 µg/mL (Freitas y col., 2006).

En un estudio previo de nuestro grupo de investigación, se demostró, que propóleos de la región de Ures, Sonora recolectados durante el verano de 2008 poseen actividad antiparasitaria significativa sobre el crecimiento *in vitro* de trofozoítos de *G. lamblia* (92.1 % a una concentración máxima de 200 µg/mL) (Díaz G., Tesis Maestría, 2010; Alday-

Provencio, 2013). Actualmente se tiene el interés de estudiar la actividad anti-*Giardia* de los constituyentes de propóleos obtenidos en la región de Sonora, ya que México, es un país endémico con prevalencias que varían del 5 al 60 % y según el sistema nacional de vigilancia epidemiológica, en el primer semestre del 2012, Sonora se ubicó en el quinto lugar con 645 casos (S.S.A. 2013).

Tomando en cuenta todo lo anterior, nos proponemos establecer las condiciones experimentales para la evaluación del efecto de los constituyentes de propóleos sonorenses sobre el crecimiento *in vitro* e *in vivo* de *G. lamblia*.

G. lamblia

G. lamblia es un protozoo parásito que habita el intestino delgado de los seres humanos y de muchos otros vertebrados y es una de las causas más comunes de diarrea en todo el mundo (Lujan, 2006).

Tomando en cuenta la variación morfológica, la posición de cuerpos medios, la forma del parásito y la relación del disco de adhesión con el tamaño total del trofozoíto, se ha dividido al género en tres grupos: *Giardia agilis* (anfibios), *Giardia muris* (roedores y aves), *Giardia lamblia* (mamíferos como el perro, el gato, el ganado y el hombre) (Vázquez y col., 2009).

Características Generales

Taxonomía. El descubrimiento del protozoo fue descrito el 4 de noviembre de 1681 por el científico holandés Anton van Leeuwenhoek (Vázquez y col., 2009). Este flagelado fue denominado inicialmente como *Cercomonas intestinalis* por Lambl en 1859; sin embargo, fue el parasitólogo norteamericano Charles Wardell Stiles, quien propuso en 1915 una denominación nueva, *Giardia lamblia*, en honor del profesor A.

Giard de Paris, y del doctor F. Lambl de Praga (Adam, 2001). Durante varios años se fueron describiendo alrededor de 40 especies teniendo en cuenta solamente el tipo de huésped donde se encontraba. No fue hasta 1952, que Filice publicó una detallada descripción morfológica y propuso en realidad tres especies de *Giardia* basado en las diferencias de los cuerpos medianos, que eran identificables por el microscopio óptico.

Existen dos especies adicionales que son indistinguibles de *G. lamblia* por el microscopio de luz: *G. ardeae* (de garzas) y *G. psittaci* (de pericos), las que han sido identificadas a partir de las diferencias morfológicas en el examen por microscopía electrónica. Otra especie, *G. microti*, ha sido descrita sobre las bases de la especificidad de hospederos en ciertas especies de roedores, las diferencias entre los quistes por microscopía electrónica (Adam, 2001), y en las secuencias de la pequeña subunidad ribosomal 18S cuando se comparó con *G. lamblia* de origen humano (Van Keulen y col., 1998).

G. lamblia es un protozoo flagelado que ha sido ubicado taxonómicamente según la clasificación ampliamente aceptada de Levine y col. (1980), como se refiere a continuación:

Reino: *Protista*.

Subreino: *Protozoa*.

Phylum: *Sarcomastigophora*

Subphylum: *Mastigophora*

Clase: *Zoomastigophorea*

Orden: *Diplomonadida*

Familia: *Hexamitidae*

Género: *Giardia*

Especie: *lamblia*

En los últimos tiempos la taxonomía de los protozoos parásitos del hombre ha sufrido importantes modificaciones pues los flagelados que antes correspondían a un sólo phylum: *Sarcomastigophora*, ahora se dividieron en cuatro phyla: *Parabasalia*, *Percolozoa*, *Euglenozoa* y *Metamonada*. La especie *G. lamblia* se incluye precisamente es este último phylum (Núñez, 2004).

Morfología. *G. lamblia* se encuentra clasificado dentro de la clase *Zoomastigophorea*, es decir, tiene flagelos como medios de locomoción. Incluido dentro del orden *Diplomonadida* y familia *Hexamitidae*; rubro que caracteriza a protozoos que presentan axostilo, dos núcleos y simetría bilateral. Este protozoario en la naturaleza tiene la capacidad de adoptar dos formas: trofozoíto o forma móvil y quiste o forma infectante (Vázquez y col., 2009).

Los trofozoítos de *G. lamblia* presentan forma de gota o lágrima con simetría bilateral, el extremo anterior es ancho y redondeado, el extremo posterior termina en punta. Mide de 12 a 15 micrómetros de largo por 7 a 9 micrómetros de ancho y 1 a 2 micrómetros de espesor. En su membrana citoplasmática se han detectado un gran número de glucoproteínas de superficie mediante lectinas (Vázquez y col., 2009). Posee dos núcleos ovoides, situados simétricamente a cada lado de la línea media, con un gran cariosoma central. No se ha demostrado la presencia de nucléolo y la membrana nuclear no está revestida por cromatina, aunque parcialmente está recubierta por ribosomas. El citoesqueleto está constituido principalmente por el disco ventral, los cuerpos medios y los cuatro pares de flagelos. El citoesqueleto y, fundamentalmente el disco ventral, tiene un papel importante en la supervivencia de *Giardia* en el intestino del hospedador. El disco ventral es una estructura cóncava de 0,4 μm rígida que contacta con las microvellosidades intestinales. Contiene proteínas contráctiles, actina, miosina y tropomiosina, que constituyen la base bioquímica para la contracción del disco, implicada en la adherencia del trofozoíto al epitelio intestinal. Este parásito presenta cuatro pares de flagelos (antero-lateral, postero lateral, caudal y ventral) que se originan

de cuatro pares de cuerpos basales o blefaroplastos en la cara ventral del cuerpo del trofozoíto con sus correspondientes axonemas. La función de los flagelos es permitir la movilidad a los trofozoítos y su papel en la adherencia al epitelio intestinal no parece importante (Alcaraz, 2002; Ankarklev, y col. 2010).

La forma quística se caracteriza por ser una estructura incolora que se tiñe con lugol parasitológico de color amarillo. Tiene forma ovoide y mide de 8 a 12 micrómetros en su diámetro mayor y 8 micrómetros como promedio el menor. El quiste es circundado por una pared quística hialina que le confiere capacidad de resistencia al medio ambiente. La parte exterior de la pared quística está cubierta por una red de filamentos de 7-20 nm. Cuatro proteínas principales se han identificado en su pared externa, el componente de azúcar de la parte exterior es predominantemente galactosamina en la forma N-acetilgalactosamina (Faubert, y col. 2000; Adam, 2001; Ankarklev, y col. 2010).

En preparaciones teñidas se aprecia en el interior del quiste un citoplasma granular en el que se encuentran inmersos varios núcleos que van en número de 2 a 4, dicho número dependerá del grado de madurez quística, los quistes inmaduros poseen 2 núcleos, mientras que los maduros tienen 4 en su interior. Además, pueden verse flagelos retraídos situados a los lados de núcleos y axonemas longitudinalmente al diámetro mayor del quiste (Figura 4) (Lujan, 2006).

Ciclo de Vida. El ciclo biológico de transmisión se inicia con la ingestión por el hombre de la forma infectante o quistes viables de *G. lamblia*, según la literatura es necesarios entre 10 y 100 quistes para provocar la infección. El mecanismo de infección es variable, puede llevarse a cabo por medio de materia fecal diseminada en el ambiente como consecuencia directa de defecación al ras del suelo. Esto es fundamental, ya que de manera ordinaria el número de quistes contenidos en una muestra de materia fecal de un paciente con infección moderada es de alrededor de 300 millones. Otro proceso involucrado en la transmisión es el consumo de alimentos mal lavados que han sido regados con aguas negras. La contaminación del agua de consumo por drenajes

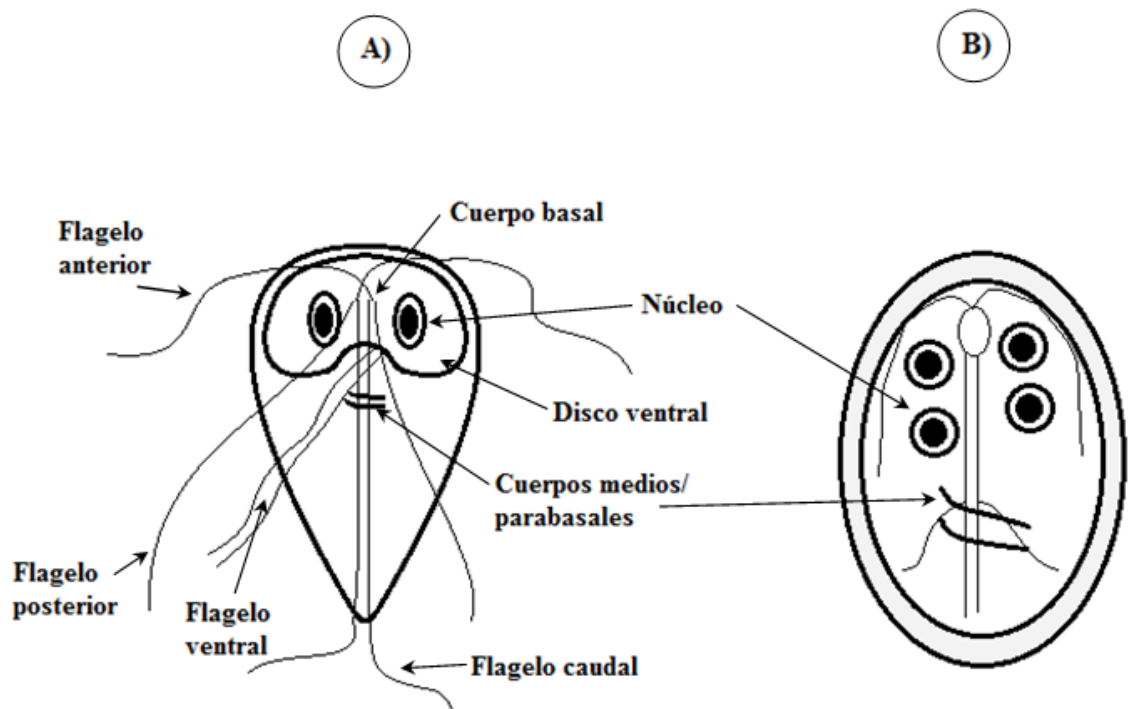


Figura 4. Morfologías del protozoario *G. lamblia* en la naturaleza. **A)** Trofozoíto (forma vegetativa); **B)** Quiste (forma infectiva).

defectuosos (Vázquez y col., 2009).

Después de ser ingeridas las formas quísticas infectantes sufren un proceso de desenquistamiento, mismo que es iniciado por la acidez gástrica, como el trofozoíto es intolerante a cambios de pH y sólo tolera un rango entre 6.4 y 7.4, dicho desenquistamiento se va a completar a nivel duodenal. En este lugar, emerge a través de la pared quística; un trofozoíto tetranucleado en forma asexual por un proceso de división binaria longitudinal que da lugar a dos trofozoítos binucleados. Después de lo cual, los parásitos se establecen en su hábitat, constituido por el epitelio en cepillo de los dos tercios superiores del intestino delgado por medio de su disco ventral o de adhesión, formados en parte por duodeno y yeyuno. Sin embargo, los trofozoítos también pueden llegar a localizarse en intestino grueso y vesícula biliar (Lujan, 2006; Vázquez y col 2009).

Algunas de esas formas vegetativas o trofozoítos, por razones desconocidas, se desprenden del epitelio intestinal, entrando de esta manera a la materia fecal. Comenzando de esta manera el proceso de enquistamiento en el intestino delgado en donde el protozoo sufre retracción de sus flagelos y, más tarde, se rodea de una pared quística hialina. Como consecuencia de lo anterior los quistes son excretados con las heces. La forma resistente o quiste, va a sobrevivir el pasaje hacia el exterior del huésped y a tolerar hasta cierto punto condiciones fuera de su micro-hábitat, lo que los hace susceptibles a ser ingeridos de nuevo por otro huésped para reiniciar su ciclo biológico (Figura 5) (Birkeland y col., 2010; Vázquez y col., 2009).

Giardiasis

G. lamblia es un protozoo binucleado y flagelado que habita el intestino delgado de humanos y otros mamíferos y es el agente responsable de la giardiasis, una patología de distribución geográfica cosmopolita (Vázquez y col., 2009; Faubert, y col. 2000), el período de incubación en la giardiasis sintomática oscila entre 3 y 45 días. La infección

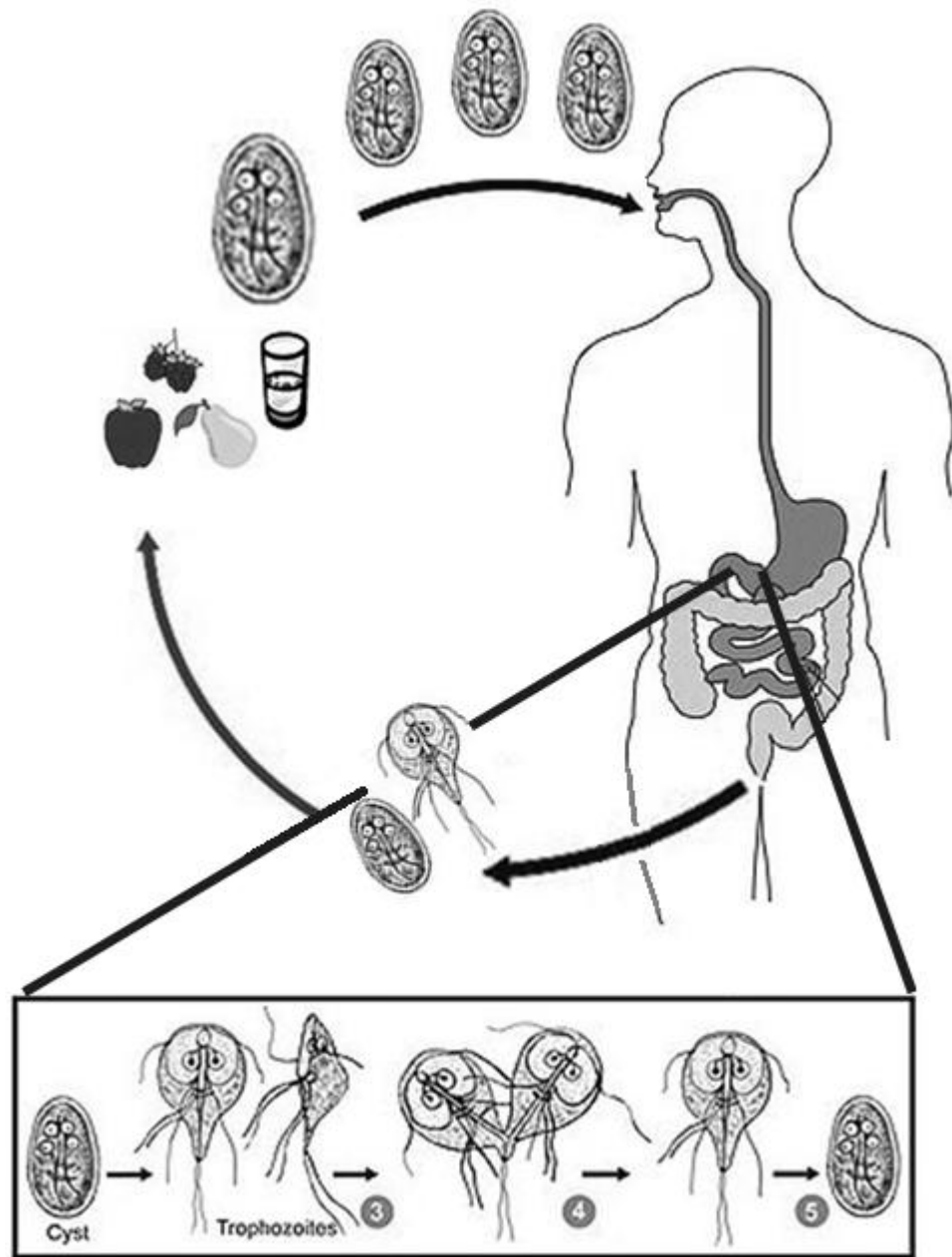


Figura 5. Ciclo biológico de *G. lamblia* (Modificado de: Wisconsin Department of Health Services. *Giardia intestinalis*. 2001).

puede evolucionar de forma aguda, subaguda o crónica. Aunque la giardiasis suele resolverse de forma espontánea, con un curso autolimitado, en otras ocasiones la parasitosis puede durar semanas o meses en ausencia de tratamiento. Además, las formas agudas pueden evolucionar, en un número limitado de casos, a infección crónica, con mayor frecuencia entre la población infantil. La sintomatología gastrointestinal es la más frecuente y comprende un amplio espectro de manifestaciones clínicas (Tabla I): a) enteritis aguda (autolimitada), b) diarrea crónica, y c) malabsorción con esteatorrea y pérdida de peso (Alcaraz-Soriano, 2009). En las formas de giardiasis crónica los síntomas predominantes son el malestar abdominal acompañado de dolor epigástrico difuso. La diarrea puede persistir o alternar con estreñimiento y puede acompañarse de pérdida de peso. (Lujan, 2006).

Es la enfermedad diarreica más común no bacteriana y no viral que afecta a los seres humanos en todo el mundo. Se estima que alrededor de 280 millones de personas se infectan cada año con *G. lamblia*. La transmisión se produce por vía fecal-oral por la ingestión de quistes, la fase infectiva del parásito, ya sea por contacto directo de persona a persona o indirectamente a través del agua y los alimentos (Lalle, 2010).

Durante mucho tiempo el estudio de las características de este microorganismo se vio limitado por las dificultades con su cultivo, sin embargo, en los últimos 20 años se han reportado métodos que han permitido el aislamiento y la axenización del cultivo (Agostinho y col., 2003). El establecimiento de cultivos axénicos de *G. lamblia* ha permitido evaluar la susceptibilidad de las cepas a los distintos medicamentos antiparasitarios, ya que la giardiasis es considerada una importante enfermedad parasitaria en nuestro país.

Características Clínicas

Aspectos Clínicos. La infección por *Giardia* puede manifestarse como:

- 1) Estado de portador asintomático que se observa en aproximadamente el 50 % de los

Tabla I. Manifestaciones clínicas de la giardiasis.

Síntomas	%
Diarrea	63
Déficit de absorción de lactosa	60
Estreñimiento	55
Déficit de absorción de B12 / fólico	45
Flatulencia	46
Esteatorrea	44
Dolor / distensión abdominal	32
Fatiga	28
Anorexia / náuseas	20
Pérdida de peso	18
Vómitos	5
Moco en heces	4
Fiebre	3

(Alcaraz-Soriano, 2009)

individuos infectados (Lujan, 2006).

- 2) Enfermedad sintomática que varía desde una diarrea leve hasta un síndrome de malabsorción grave. El periodo de incubación es de 1-30 días tras los que de forma brusca aparece una diarrea acuosa y esteatorreica acompañada de dolor abdominal. No se observan en heces ni sangre ni pus dado que no hay invasión ni destrucción tisular. Generalmente es un cuadro autolimitado tras 10-14 días pero puede convertirse en una infección crónica conduciendo a déficits nutricionales, pérdida de peso, entre otras anomalías (Ramos y col., 2007).

Tratamiento. Los antibióticos más comunes utilizados para esta parasitosis presentan la estructura base de 17 carbonos, 5-nitroimidazol (NI), con una cadena lateral que llevan un grupo fenilo en la posición 2 del anillo imidazol, es al menos 14 veces más activo con el parásito intestinal *G. lamblia* que la droga 5-NI metronidazol, el cual contiene una cadena lateral en la posición 1 del anillo imidazol, ésta es la principal droga para el tratamiento de la giardiasis (Dunn y col., 2009). Tiene efecto antiparasitario por degradación del ADN. La reducción del grupo nitro (NO₂) parece ser necesaria para que se produzca el efecto anti-parasitario (Vives E.A. y col. 2004; Pasupuleti, y col. 2014).

El tratamiento para la erradicación de esta parasitosis se basa en los derivados de 5-NI, benzimidazol, nitrofuranos, acridina y nitrotiazoles. Estos medicamentos producen efectos secundarios indeseables, que van desde un sabor metálico en la boca hasta daño genético y la selección de cepas resistentes, es por ello que diversos laboratorios se ven en la necesidad de desarrollar nuevas alternativas terapéuticas (Rufino-González Y. y col 2012).

Recientemente, se han identificado varios candidatos a fármacos prometedores, dentro de los más utilizados se encuentran algunos miembros de la familia de los imidazoles como albendazol, metronidazol e inidazol; 5-nitrofuranos, acridinas, quinolinas y aminoglucósidos (Watkins y Eckmann, 2014). Albendazol, también considerado un agente anti-*Giardia* muy eficaz, aunque hay evidencias que indican que

los casos de resistencia al tratamiento con estos fármacos va en aumento (Argüello-García y col. 2004), cuyas causas se deben posiblemente a la administración inadecuada de éstos fármacos antimicrobianos, induciendo la generación de resistencia de algunas cepas de *G. lamblia* (Lemée y col. 2000; Karabay y col., 2004; Busatti y col.2009).

En el caso de metronidazol la tasa de prevalencia en resistencia clínica esta en alrededor de un 20 %, reportándose una recurrencia de hasta un 90 % (Zaat y col. 1997). Por otra parte, la difusión de bencimidazol o albendazol puede convertirse en un problema, ya que en algunos países se utilizan estas drogas en dosis únicas o dosis subóptimas para la erradicación de parásitos en niños, y estos casos son los que llevan al aumento de cepas resistentes (Argüello-García y col. 2009). Es por ello que cada vez se incrementa más la necesidad en la búsqueda de nuevas alternativas para tratar y curar esta parasitosis.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antiparasitaria (*in vitro* e *in vivo*) de propóleos sonorenses y algunos de sus constituyentes sobre *G. lamblia*.

Objetivos particulares

- » Evaluar la actividad antiparasitaria de algunos de los constituyentes de propóleos sonorenses, sobre el crecimiento *in vitro* de trofozoítos de *G. lamblia*.
- » Evaluar la actividad antiparasitaria del extracto metanólico (por inmersión) de *P. fremontii* sobre el crecimiento *in vitro* de trofozoítos de *G. lamblia*.
- » Evaluar la actividad antiparasitaria del extracto metanólico de propóleos de Ures, Sonora (verano) y CAPE sobre el crecimiento *in vivo* de trofozoítos de *G. lamblia*, en un modelo gerbil.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de *G. lamblia*

Se utilizaron trofozoítos de *G. lamblia* cepa GS/M-83-H7 (ATCC 50581), los cuales se mantuvieron en medio de cultivo de TYI-S33 suplementado con suero de ternera recién nacida (NBCS, GIBCO, Invitrogen, 16010) al 10 %, Ceftriaxona 100 µg/mL a 37° C (Anexo 1) (Keister, 1983).

Recolección de Propóleos y Obtención de Extractos Metanólicos de Propóleos Sonorenses

Los propóleos fueron colectados a partir de 12 colmenas dispuestas en el predio “San Enrique” localizado en la comunidad “El Coyote” en Ures, Sonora, México (29°27’81”N; 110°23’398”W), En la parte superior de las colmenas se colocaron marcos de madera de 59 x 37 cm, con una malla de polietileno con orificios de 1 mm², como trampa. Se instalaron en las colmenas al inicio de la estación de verano durante el 21 de junio 2009 – 22 septiembre 2009. Posteriormente se retiraron las trampas con los propóleos producidos al término de la misma. Una vez retiradas se sometieron a -80°C para facilitar la recuperación de las muestras. Las muestras de propóleos se trituraron, se extrajeron con metanol, adicionándoles metanol en una proporción 1:6 (p/v). Se mantuvieron en oscuridad a 25°C por un período de 3 días con agitación periódica, para posteriormente filtrarlos con papel Whatman No.1 y concentrarlos en un evaporador rotatorio Yamato RE300 a 40°C bajo presión reducida (Hernández y col., 2007; Velázquez y col., 2007; Valencia y col., 2011).

Para llevar a cabo el desgrasado de los extractos metanólicos secos de los propóleos, éstos se disolvieron en hexano de nueva cuenta pero en una proporción 1:10 (p/v), facilitando la disolución por medio de ciclos de sonicación a 59 Hz y

calentamiento, una vez que se obtuvo una solución homogénea se procedió a almacenarla por toda una noche a 4°C para favorecer la precipitación de ceras y material inerte. Al día siguiente, efectuada la precipitación se filtró al vacío la solución en papel Whatman No.1 y se sometió a evaporación a 40°C bajo presión reducida para obtener el extracto libre de grasas (Cuesta-Rubio y col., 2007).

Ensayo de Actividad Antiparasitaria de Propóleos Sonorenses y Algunos de sus Constituyentes Sobre el Crecimiento *in vitro* de Trofozoítos de *G. lamblia*

Para evaluar la actividad antiparasitaria de los propóleos o sus constituyentes se utilizaron trofozoítos de *G. lamblia* (GS/M-83-H7). Se realizaron soluciones en medio de cultivo TYI-S33 a concentraciones de 0, 25, 50, 100 y 200 µg/mL de cada uno de los extractos de propóleos o constituyentes. El ensayo se realizó en tubos de vidrio (13X100) con tapón de rosca con 1×10^5 trofozoítos/mL, incubados a 37 °C por 12 horas en medio de cultivo TYI-S33. Los tubos fueron agrupados en conjuntos de 3, de tal forma que cada concentración de extracto de propóleos o compuesto independiente, se evaluó por triplicado. Se tomaron 400 µL de cada una de las soluciones previamente mencionadas y se adicionaron por triplicado. Al grupo control se le adicionó albendazol como control positivo de inhibición del crecimiento (Karabay, y col. 2004). También, se utilizó el solvente dimetilsulfóxido (DMSO) como control negativo (todas las soluciones madre (stock) de compuestos y la de propóleos fueron preparadas utilizando DMSO), y un último conjunto como control de crecimiento normal (sin la presencia de ningún solvente). Estos cultivos se incubaron a 37 °C por 48 horas. Se realizaron observaciones microscópicas de los cultivos cada 24 horas. Una vez cumplido el tiempo de incubación, fueron colocados en agua con hielo por un periodo de 15 minutos para lograr el desprendimiento de los trofozoítos de la pared del tubo para posteriormente ser evaluados utilizando una cámara de Neubauer. Los datos obtenidos del ensayo fueron analizados con los programas Microsoft Excel 2007 y GraphPad prism v3.02 32.

Recolección y Obtención del Extracto Metanólico para la Especie Vegetal *P. fremontii*.

La fuente vegetal se muestreó tomando en cuenta un radio de 2000 metros desde la posición de las colmena en el predio San Enrique (29°27.81'N; 110°23.398'W), posteriormente fue clasificada taxonómicamente en el herbario de la Universidad de Sonora por el Ing. Jesús Sánchez Escalante.

Durante la recolección de propóleos correspondientes a cada estación del año en el período 2009-2010, se llevó a cabo contemporáneamente el muestreo de especímenes característicos de flora nativa de la región de Ures, Sonora. La especie vegetal colectada se trituró y se sometió a un proceso de extracción por medio del método convencional en metanol (Hernández y col., 2007; Velázquez y col., 2007; Valencia y col., 2012). Adicionando metanol en una proporción 1:6 (p/v). Se almacenó en oscuridad a temperatura de 25°C por tres días con agitación periódica, posteriormente fue sometida a un proceso de filtración. Finalmente se procedió a su concentración en un evaporador rotatorio Yamato RE300 a 45°C bajo presión reducida.

Para extraer sólo los compuestos bioactivos que conforman los exudados superficialmente disponibles se sometieron las hojas frescas, tallos y brotes de la planta recién colectada a una extracción por inmersión por un período de 20 segundos (en la proporción p/v de 1:2), parte por parte (brote a brote y hoja a hoja) empleándose metanol (índice de polaridad de 5.1) como disolvente orgánico. Posteriormente se procedió a concentrarlos en un evaporador rotatorio Yamato RE300 a 45°C bajo presión reducida.

Una vez concentrado el extracto metanólico vegetal se procedió a desgrasarlo, adicionando hexano (3 mL/g), y se homogenizó en placa de calentamiento a 40°C por algunos minutos, sin que se presentara ebullición. Después de algunos minutos se decantó el hexano y se repitió el proceso de lavado 3 veces. (Hernández y col., 2007; Velázquez y col., 2007; Valencia y col., 2011).

Modelo Animal

Se utilizó al roedor gerbil (*Meriones unguiculatus*) como modelo de infección por *G. lamblia* debido a la susceptibilidad que este animal presenta ante esta infección parasitaria. Se utilizaron gerbiles (entre 55 y 65 gr de peso) de aproximadamente 6-8 semanas de edad, los cuales fueron adquiridos en el centro de investigación de estudios avanzados del instituto politécnico nacional (CINVESTAV, México, D.F.). Después de una semana de adaptación a las condiciones del bioterio de la Universidad de Sonora, los gerbiles se ubicaron en cajas especiales, colocando un solo gerbil por caja (ya que los gerbiles son socialmente monógamos, viven en grupo con una organización social basada en una pareja estable reproductiva) (Florez-Acevedo, 2010)

Antes de proceder al experimento de infección, se excluyó la presencia del parásito *G. lamblia*, sacrificando a 2 gerbiles al azar, y posterior examinación coproparasitoscópica de la sección proximal del intestino delgado, con la finalidad de descartar la presencia de cualquier tipo de infección por parásitos.

El experimento de infección se estableció utilizando trofozoítos de cultivos axénicos *in vitro*. Los gerbiles fueron mantenidos en ayuno 12 hrs. previas a la infección, para posteriormente administrarles 1×10^6 trofozoítos en 200 μL de solución reguladora de fosfato salino (PBS) (Astiazarán-García, y col. 2000).

Ensayo de actividad antiparasitaria de propóleos de Ures (verano) y CAPE sobre el crecimiento *in vivo* de trofozoítos de *G. lamblia*

Tubos con cultivos de trofozoítos de *G. lamblia* observados al microscopio en monocapa y morfología habitual, fueron colocados en agua-hielo durante 15 min y posteriormente centrifugados a 800 xg, 8 min a 4 °C. Posteriormente se realizó un conteo de los trofozoítos totales, y se ajustó el inoculo a 1×10^6 trofozoítos en 200 μL de PBS por cada gerbil, y se procedió a inocular intragástricamente 5 gerbiles por cada condición (Anexo 2).

A las 48 y 96 hrs posteriores a la infección, se aplicó el tratamiento respectivo a cada grupo. Se administró propóleos de Ures (verano) en una relación de 100 mg/kg y CAPE a 50 mg/kg de peso corporal. Siete días después de la infección se procedió al sacrificio de todos los roedores, donde la sección proximal del intestino delgado (15 cm, siendo longitudinalmente dividido) se resuspendió en \approx 4 mL de medio TYI-S33 durante 1 hr en refrigeración (4 °C) con agitación constante, para facilitar que los trofozoítos adheridos a la células del duodeno se desprendieran. Una vez concluido este tiempo de incubación se procedió a centrifugar las muestras, 800 xg, 8 min a 4 °C, descartando el sobrenadante y las muestras se resuspendieron en 1 mL de medio TYI-S33, para proceder a diluir las muestras con azul de tripano y determinar la proliferación y viabilidad celular por conteo en cámara de Neubauer (Anexo 3). Los resultados se analizaron utilizando el programa GraphPad prism v3.02 32.

Análisis Estadístico

Los datos obtenidos se procesaron y analizaron por el método de Kruskal-Wallis en el software Statistical Package for the Social Sciences 2002 (SPSS 21). La significancia estadística fue aceptada cuando $P < 0.05$.

RESULTADOS

Evaluación de la actividad antiparasitaria de algunos de los constituyentes de propóleos sonorenses sobre el crecimiento *in vitro* de trofozoítos de *G. lamblia*

Con base a resultados obtenidos sobre la actividad antiparasitaria (Díaz G., Tesis Maestría, 2010; Alday-Provencio, 2013) y antiproliferativa sobre células cancerígenas de propóleos sonorenses (Hernández y col. 2007) y algunos de sus constituyentes químicos previamente purificados e identificados (Alday-Noriega, Tesis maestría, 2012), se decidió evaluar la inhibición de la proliferación celular sobre trofozoítos de *G. lamblia* (GS/M-83-H7) de algunos de estos constituyentes: CAPE, naringenina, hesperetina, pinocembrina, crisina y rutina, a diferentes concentraciones (0.0, 25.0, 50.0, 100.0 y 200.0 $\mu\text{g/mL}$). Los constituyentes que mostraron mayor actividad antiparasitaria fueron CAPE y naringenina con una IC_{50} de 63.1 y 125.7 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Seguidos por hesperetina y pinocembrina, los cuales presentaron una IC_{50} de 149.6 y 174.4 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. En contraste, crisina y rutina no mostraron actividad antiparasitaria a las distintas concentraciones evaluadas (Figura 6), sin embargo se logró observar un efecto dosis respuesta a las distintas concentraciones evaluadas. Se incluyó como control de inhibición de crecimiento a la droga albendazol, reduciendo más del 90 % la proliferación del parásito. También, se utilizó el solvente DMSO como control negativo (la más alta concentración utilizada (0.06 %)), el cual no presentó efecto significativo sobre la viabilidad celular.

Evaluación de la actividad antiparasitaria de *P. fremontii* (fuente botánica principal de propóleos de Ures) sobre el crecimiento *in vitro* de trofozoítos de *G. lamblia*.

En estudios previos en nuestro grupo de investigación se observó que la resina extraída de la especie botánica *P. fremontii*, muestra similitud con en el cromatograma obtenido mediante HPLC con los cromatogramas de los propóleos de Ures provenientes de cualquiera de las estaciones. Lo cual sugiere que la fuente botánica principal de los

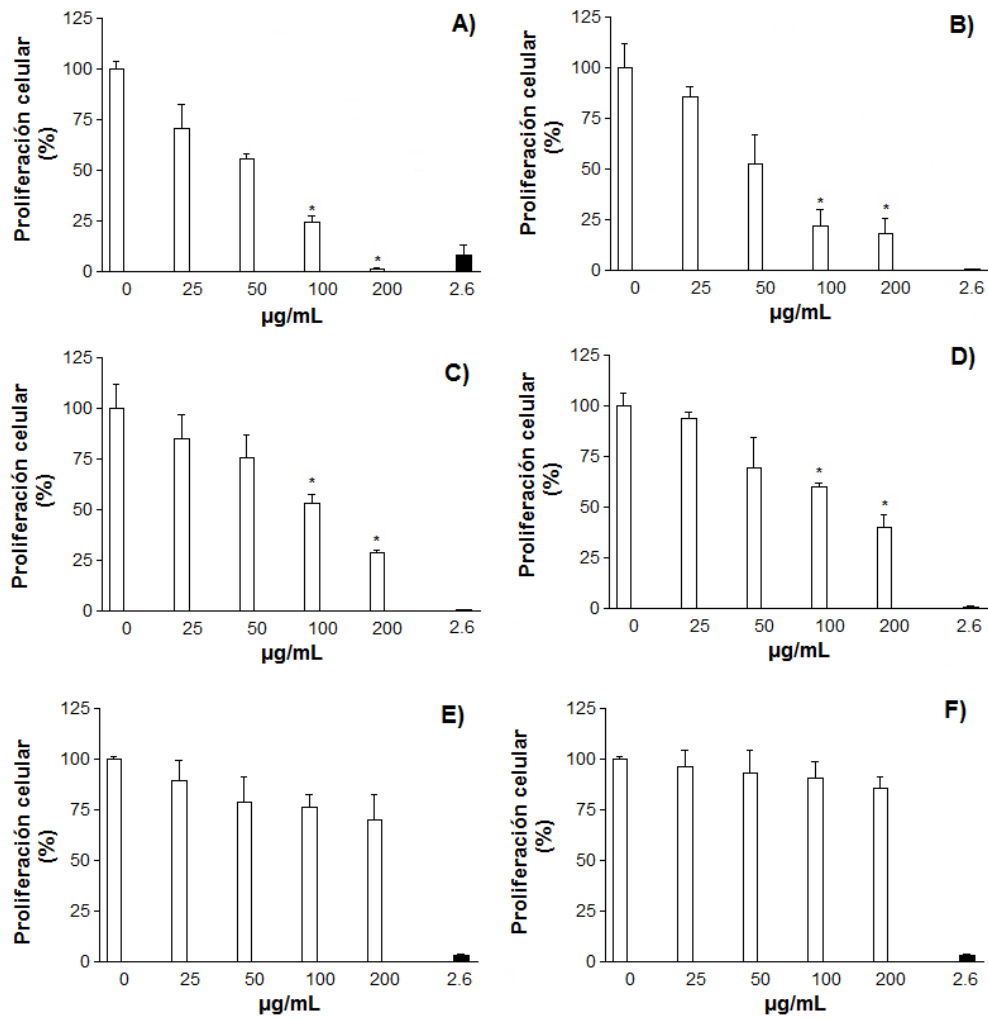


Figura 6. Evaluación de la actividad antiparasitaria *in vitro* de compuestos químicos de propóleos sonorenses. La evaluación de la actividad antiparasitaria de algunos compuestos químicos que constituyen a los propóleos de Sonora se realizó sobre el crecimiento *in vitro* de cultivos axénicos de trofozoítos de *G. lamblia* (GS/M-83-H7) utilizando los compuestos **A)** CAPE, **B)** naringenina, **C)** hesperetina, **D)** pinocembrina, **E)** crisina y **F)** rutina. Como control de inhibición de crecimiento se utilizó la droga antiparasitaria albendazol a una concentración de 2.6 µg/mL (10 µM). Los ensayos se realizaron por triplicado y evaluados a las 48 horas posteriores a la adición del extracto. Los asteriscos sobre las barras muestran diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto al cultivo control.

propóleos de Ures, Sonora es la especie vegetal *P. fremontii*. También se determinó la actividad antiproliferativa *in vitro* del material resinoso extraído por inmersión en metanol de *P. fremontii*, encontrando actividad antiproliferativa importante sobre líneas celulares cancerígenas (Alday-Noriega, Tesis maestría, 2012). Con base a esta observación, fue interesante investigar el efecto antiparasitario *in vitro* del extracto de la principal fuente botánica de propóleos sobre *G. lamblia*. En el presente trabajo, se observó que el extracto de *P. fremontii* presentó un efecto inhibitorio sobre el crecimiento *in vitro* de trofozoítos de *G. lamblia* con una IC₅₀ de 113.8 µg/mL, en comparación con la IC₅₀ de 63.8 µg/mL obtenida de propóleos de Ures, Sonora (verano), la cual presentó una actividad mayor (Alday-Provencio, 2013) (Figura 7). Se incluyó como control de inhibición de crecimiento a la droga albendazol, reduciendo más del 90 % la proliferación del parásito. También, se utilizó el solvente DMSO como control negativo a la más alta concentración utilizada (0.06 %), el cual no presenta efecto significativo sobre la viabilidad celular.

En resumen, en la tabla II se presentan las IC₅₀ obtenidas en las evaluaciones realizadas para algunos de los constituyentes de propóleos de Ures, Sonora y de su principal fuente botánica (*P. fremontii*).

Evaluación *in vivo* de propóleos de Ures (verano) y CAPE, como tratamiento, sobre gerbiles infectados con trofozoítos de *G. lamblia*

Con el objetivo de evaluar la actividad antiparasitaria de propóleos de Ures (verano) y CAPE sobre el crecimiento *in vivo* de trofozoítos de *G. lamblia*, se llevó a cabo el establecimiento de la giardiasis en un modelo gerbil. La colonización intestinal con trofozoítos de *G. lamblia* ya ha sido reportada utilizando cultivos de cepas de referencia o aislados obtenidos de pacientes sintomáticos y asintomáticos para este modelo animal (Astiazarán-García y col. 2000). En éste trabajo se analizó el efecto de propóleos y CAPE en la infección intestinal por *G. lamblia* en el modelo gerbil. Se inocularon cinco grupos de animales (cada grupo n=5) con 1×10^6 trofozoítos de *G. lamblia* resuspendidos en 200 µL de PBS a pH 7.2 (Anexo 2). Siete días después de la infección, los gerbiles de los cinco grupos fueron sacrificados y se

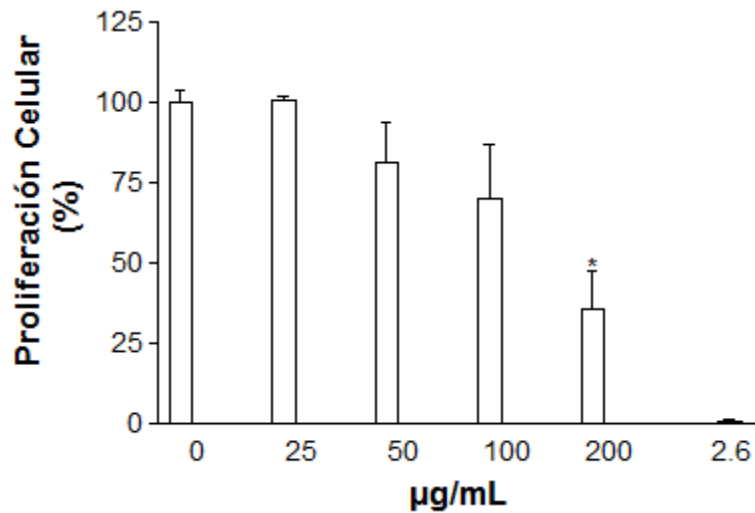


Figura 7. Evaluación de la actividad antiparasitaria de *P. fremontii* sobre el crecimiento *in vitro* de trofozoítos de *G. lamblia*. La evaluación de la actividad antiparasitaria de *P. fremontii* se realizó sobre el crecimiento *in vitro* de cultivos axénicos de trofozoítos de *G. lamblia* (GS/M-83-H7). Como control de inhibición de crecimiento se utilizó la droga antiparasitaria albendazol a una concentración de 2.6 µg/mL (10 µM). Los ensayos se realizaron por triplicado y evaluados a las 48 horas posteriores a la adición del extracto. Los asteriscos sobre las barras muestran diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto al cultivo control.

Tabla II. Resumen de resultados de compuestos químicos, propóleos de Ures, Sonora y su fuente botánica principal, sobre el crecimiento *in vitro* de trofozoítos de *G. lamblia*.

COMPUESTOS/Extracto	IC₅₀ (µg/mL)
CAPE	63.1 ± 0.9
Naringenina	125.7 ± 20.7
Hesperetina	149.6 ± 24.8
Pinocembrina	174.4 ± 26
Crisina	> 200
Rutina	> 200
<i>P. fremontii</i>	134.80 ± 29.6
Propóleos-Ures (verano)	63.875 ± 7.1

Se muestran las IC₅₀ (µg/mL) de cada uno de los resultados (±DE).

estimó la carga parasitaria en los gerbiles mediante la cuenta de trofozoítos recuperados utilizando una cámara de Neubauer (Anexo 3). Posterior al sacrificio, se observó que los gerbiles del grupo control negativo de infección (los cuales no se infectaron y solamente se les administró PBS (grupo C)), se encontraban libres de parásitos. Caso contrario el grupo control positivo de infección (grupo A), donde todos los gerbiles de este grupo se infectaron, recuperando un promedio de $9 \pm 2.8 \times 10^6$ trofozoítos de *G. lamblia*, representando un incremento en la carga parasitaria de hasta nueve veces a la inoculación inicial (1×10^6 trofozoítos). De igual manera se observa un aumento en la carga parasitaria en el grupo control de animales tratados con propilenglicol (grupo B, propilenglicol se utilizó como solvente de propóleos) fue de $6.1 \pm 2.79 \times 10^6$ de trofozoítos recuperados. Por último los grupos de tratamiento con CAPE (grupo D) y propóleos de Ures, Sonora (verano) (grupo E), se obtuvo una recuperación de $4 \pm 3 \times 10^6$ y $6.4 \pm 5.4 \times 10^6$ de trofozoítos (respectivamente) (Figura 8). Los animales utilizados en el presente trabajo se mantuvieron estables y sin reacciones adversas al tratamiento.

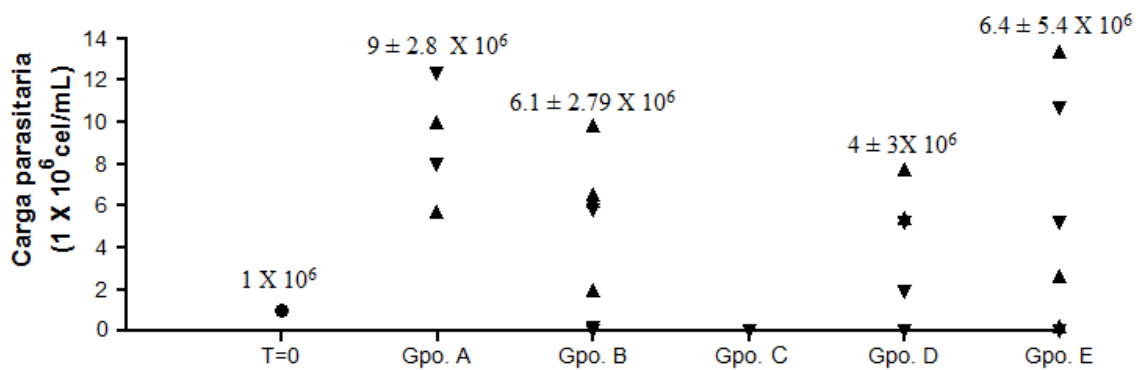


Figura 8. Evaluación *in vivo* de propóleos de Ures (verano) y CAPE, como tratamiento, sobre gerbiles infectados con trofozoítos de *G. lamblia*. La evaluación de la actividad antiparasitaria se llevó a cabo a los siete días post-infección del modelo gerbil, con un tratamiento aplicado a los 2 y 4 días post-infección. T=0, corresponde a la cantidad inicial de trofozoítos inoculados intraperitonealmente en el modelo gerbil (1X10⁶ trofozoítos). **Grupo A:** Control de infección; **Grupo B:** Control de propilenglicol; **Grupo C:** Control de PBS; **Grupo D:** Tratamiento con CAPE (50 mg/kg); **Grupo E:** Tratamiento con propóleos de Ures (verano) (100 mg/kg).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluó la actividad antiparasitaria *in vitro* e *in vivo* de propóleos sonorenses y de algunos de sus constituyentes químicos, así como también el efecto de la principal fuente botánica que se utiliza para la elaboración de estas resinas.

La actividad antiparasitaria de propóleos de diferentes partes del mundo ha sido estudiada sobre el crecimiento de diferentes parásitos (*T. cruzi*, *Leishmania ssp.* y *Trichomonas vaginalis*) (Salomão K. y col. 2008; Amarante M.K. y col. 2011). Se ha reportado el efecto anti-*Giardia* de propóleos de Brasil, observándose un efecto inhibitorio significativo en la proliferación y adhesión *in vitro* de trofozoítos de *G. duodenalis* (Freitas y col. 2004). Previamente nuestro grupo de investigación, evaluó el efecto de la temporalización de propóleos de Ures, Sonora sobre el crecimiento *in vitro* de trofozoítos de *G. lamblia*. El propóleo de la temporada de verano tuvo una inhibición del 50 % de la proliferación celular a una concentración de 63.8 µg /mL, siendo este propóleo que mostró mayor actividad. Estas diferencias en la actividad antiparasitaria sugieren que la composición química de los propóleos es distinta en las diversas temporadas del año. Con base a estos hallazgos se eligió analizar la actividad antiparasitaria de algunos constituyentes de los propóleos de Ures, Sonora, así como su principal fuente botánica (*P. fremontii*).

Los principales compuestos químicos que constituyen a los propóleos de la región de Sonora han sido analizados, y se ha encontrado similitud en el perfil químico de los propóleos de las diferentes estaciones del año, contrastando con las diferencias en la actividad antiproliferativa (Valencia, y col. 2012; Hernández, y col.2007) y antiparasitaria (Díaz G., Tesis de Maestría, 2010). La composición química de los propóleos se encuentra directamente relacionada a la vegetación circundante a la zona de recolección, por lo cual la abundancia en términos de concentración de los compuestos y por consecuencia las propiedades biológicas de los propóleos son altamente variables y dependen de la vegetación del área, así como de las condiciones geográficas y climáticas (Bankova, y col. 2005; Falcão, y col. 2010; Ghedira, y col. 2009; Lotti, y col. 2010;

Salatino, y col.2005; Teixeira, y col. 2008). Los principales constituyentes de propóleos recolectados en zonas templadas con distinto origen geográfico pertenecen a la familia de flavonoides, ácidos orgánicos, ésteres, alcoholes y aldehídos entre otros (Bankova, y col. 2005; Hernández, y col.2007; Lotti, y col. 2010; Velázquez, y col. 2007; Teixeira, y col. 2008). Algunos de los constituyentes químicos de propóleos sonorenses evaluados en este trabajo pertenecen a la familia de las flavononas (naringenina, hesperetina y pinocembrina), flavonas (crisina) y flavonoles (rutina), así como un éster fenético (CAPE). Los constituyentes que mostraron mayor actividad antiparasitaria fueron CAPE, naringenina, hesperetina y pinocembrina, en contraste con crisina y rutina que no mostraron actividad antiparasitaria. Estas diferencias en la actividad biológica pueden deberse a diferencias químicas. Estructuralmente CAPE presenta dos grupos hidroxilos en el carbono 4 y 5 del anillo aromático del ácido caféico (Anexo 4) a los cuales se le atribuye su actividad biológica (Hernandez, y col.2007).

Pinocembrina, se encuentran ampliamente distribuida en la naturaleza, y ha sido aislada de diferentes especies de plantas, también se ha reportado como uno de los principales componentes de propóleos de diferentes zonas geográficas, el cual presenta un amplio espectro de actividades biológicas (antibacterial, antifúngica, antiviral, antioxidante y anti-inflamatoria) (Diaz N. G. y col. 2009). Naringenina y pinocembrina han sido encontrados en el fraccionamiento de orégano (*Lippia graveolens*), el cual inhibió la proliferación de trofozoítos de *G. lamblia*, demostrando que esta fracción rompe la envoltura nuclear dañando el disco de adhesión ventral. Rutina también ha sido encontrada en *Conyza filaginoides*, y no inhibió la proliferación de éste parásito (Rufino-González, y col. 2012; Calzada F. y col. 2001). Nuestros resultados mostraron que naringenina presentó mayor inhibición sobre el crecimiento de trofozoítos de *G. lamblia* a diferencia de pinocembrina que fue menos sensible, esta diferencia puede deberse a la presencia de un grupo hidroxilo en el carbono 4' del anillo "B" de naringenina, mientras que rutina y crisina no presentaron actividad sobre el crecimiento *in vitro* de éste parásito. Esto puede deberse a que crisina presenta un simple doble enlace entre los carbonos 2-3 del anillo "C" (Anexo 4) a diferencia de pinocembrina que no lo presenta,

por lo cual, la presencia de este doble enlace puede provocar una disminución de la actividad antiparasitaria de crisina (Hernandez, y col.2007). Estudios posteriores serán necesarios para determinar la relación estructura-actividad de estos compuestos químicos de propóleos sonorenses.

Nuestro grupo de investigación determinó que la principal fuente botánica de propóleos de Ures, es *P. fremontii*, con base a la similitud del perfil cromatográfico comparado con el de propóleos de Ures Sonora (verano). A dicha fuente botánica se le determinó que posee una importante actividad antiproliferativa sobre líneas celulares cancerígenas (Alday-Noriega, Tesis Maestría, 2012). En el presente trabajo se determinó la actividad antiparasitaria de *P. fremontii* mostrando una actividad inhibitoria significativa a la máxima concentración evaluada (200µg/mL), comparando estos resultados con el extracto metanólico de propóleos de Ures Sonora (verano), el cual presenta una mayor actividad.

El efecto antiparasitario fue evaluado en un modelo gerbil observándose que CAPE y propóleos de Ures sonora (verano) tienen un efecto sobre la colonización por *G. lamblia*, logrando apreciar una disminución en la carga parasitaria en ambos grupos. Además al comparar éstos grupos de tratamiento con el control de infección, vemos una disminución más fuerte de la carga parasitaria del grupo de tratamiento con CAPE. Por otra parte el grupo tratado con propilenglicol (solvente de propóleos), al ser comparado con el control de infección se observa que la cantidad parasitada es menor, pero aun así observamos cómo este vehículo no afecta al establecimiento de ésta infección. En general, la carga parasitaria fue muy heterogénea en estos grupos evaluados, por lo cual es necesario realizar más estudios para establecer las condiciones ideales de infección y tratamiento en este modelo animal.

Nuestros resultados sugieren que los propóleos sonorenses y algunos de sus constituyentes químicos tienen un importante efecto anti-*Giardia*. Sin embargo es necesario profundizar en los mecanismos moleculares por los que estos compuestos ejercen su efecto antiparasitario. Para nuestro conocimiento, éste es el primer trabajo sobre el efecto de algunos de los constituyentes de propóleos del estado de Sonora, y su

principal fuente botánica (*P. fremontii*) sobre la actividad antiparasitaria *in vitro* de trofozoítos de *G. lamblia*, así como la actividad *in vivo* de propóleos de Ures (verano) y CAPE, sobre éste parásito.

CONCLUSIONES

- Los compuestos químicos: CAPE, Naringenina, Hesperetina y Pinocembrina son algunos de los componentes responsables de la actividad antiparasitaria (contra *G. lamblia*) de propóleos sonorenses.
- Los flavonoides Crisina y Rutina, no presentaron actividad frente al crecimiento *in vitro* de trofozoítos de *G. lamblia*.
- *P. fremontii*, como fuente botánica principal de propóleos de la región de Ures, Sonora, presentó actividad antiparasitaria significativa sobre el crecimiento *in vitro* de trofozoítos de *G. lamblia*.
- Se observó una disminución de la carga parasitaria en gerbiles (*Meriones unguiculatus*) infectados con *G. lamblia* y sometidos a un posterior tratamiento con CAPE.

BIBLIOGRAFÍA

- Adam R.D. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001, 14(3), 447-475.
- Alcaraz-Soriano M.J. 2009. *Giardia* y Giardiosis. Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Doctor Peset Aleixandre. Valencia. Control de calidad SEIMC.
- Alday-Noriega J.E. 2012. Análisis del efecto de la temporalización sobre el origen botánico, la composición química y actividades biológicas de propóleos de Ures, Sonora. Tesis de Maestría. Departamento de Ciencias Químico Biológicas. Universidad de Sonora.
- Alday-Provencio J.S. 2013. Establecimiento de condiciones experimentales para la evaluación de la actividad antiparasitaria de propóleos de la región de Ures, Sonora y Aguascalientes sobre el crecimiento *in vitro* de trofozoítos de *Giardia lamblia*. Tesis Especialidad. Departamento de Ciencias Químico Biológicas. Universidad de Sonora.
- Amarante MK, Watanabe MA, Conchon-Costa, Fiori LL, Oda JM, Búfalo MC, Sforcin JM. 2011. The effect of propolis on CCL5 and IFN- γ expression by peripheral blood mononuclear cells from leishmaniasis patients. *J Pharm Pharmacol*. 64(1), 154-160.
- Ankarklev, J., Jerlstróm, H., Ringqvist, E., Troell, K., G. Svárd, S. 2010. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nature Reviews Microbiology*. Vol. 8(6), 413-422.
- Ansorge S., Reinhold D., Lendeckel U. 2003. Propolis and some of its constituents down-regulate DNA syntesis and inflammatory cytokine production but induce TGF- β 1 production of human immune cells. *Z. Naturforsch*. 58c. 580-589.
- Argüello-García R., Cruz-Soto M., Romero-Montoya L., Ortega-Pierress G. 2004. Variability and variation in drug susceptibility among *Giardia duodenalis*

- isolates and clones exposed to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles *in vitro*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 54(4), 711-721.
- Argüello-García R., Cruz-Soto M., Romero-Montoya L., Ortega-Pierress G. 2009. *In vitro* resistance to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles in *Giardia duodenalis*: variability and variation in gene expression. *Infection, Genetics and Evolution*. 9(6), 1057–1064.
- Bankova V., L. de Castro S. and Mrcucci M.C. 2000. Propolis: Recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*. 31(1), 3-15.
- Bankova V. 2005. Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*. 2(1), 29-32.
- Barbosa da Silva-Cunha, Salomão K., Shimizu M., Bankova V.S., Ármalo-Custodia A., Lisboa de Castro Marucucci M. C. 2004, Antitripanosomal activity of brazilian propolis from *Apis mellifera*. *Chem Pharm Bull*. 52(5), 602-604.
- Bedascarrasbure E. L., Maldonado L., Alvarez A. 2011. El propóleo un valioso producto de la colmena. Apis NetLA: Red apícola latinoamericana. <http://www.apinetla.com.ar>
- Benchimol Marlene. 2002. A new set of vesicles in *Giardia lamblia*. *Experimental Parasitology*. 102 (1) 30-37.
- Birkeland Shanda R., Preheim Sarah P., Davids Barbara J., Cipriano Michael J., Palm Daniel, Reeiner David S., Svärd Staffan G., Gillin Frances D., McArthur Andrew G. 2010. Transcriptome analyses of the *Giardia lamblia* life cycle. *National Institutes of Health*. 174(1), 62-65.
- Boik, J. 2001. Cancer at the cellular level / clinical considerations. Part I and part III in natural compounds in cancer therapy. Promising nontoxic antitumor agents from plants & and other natural sources. *Quality Books*. 1(33), 251-267.
- Boyanova L., Gergova G., Nikolov R., Derejian S., Lazarova E., Katsarov N., Mitov I. y Krastev Z. 2005. Activity of bulgarian propolis against 94 *Helicobacter pylori*

- strains *in vitro* by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods. *Journal of Medical Microbiology*. 54(5), 481-483.
- Burdock G. A. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (Propolis). *Food and Chemistry Toxicology*. 36(4), 347-363.
- Busatti H.G., Santos J.F. and Gomes M.A. 2009. The old and new therapeutic approaches to the treatment of giardiasis: Where are we?. *Biological: Targets & Therapy*. 3, 273-287.
- Cedillo-Rivera R. and Muñoz O. 1992. *In-vitro* susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. *Journal Medical Microbiology*. 37, 221-224.
- Cedillo-Rivera R., Chávez B., González-Robles A., Tapia A., and Yépez-Mulia L. 2002. In vitro effect of nitazoxanide against *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis* Trophozoites. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 49(3), 201-208.
- Daugusch A., Moraes C. S., Fort P. and Park Y. K. 2007. Brazilian red propolis-chemical composition and botanical origin. Advance Access Publication. Original Article. *Department of Food Science, College of Food Engineering*. 5(4), 435-441.
- de Carvalho Machado G. M., Leon Leonor L., Lisboa De Castro S. 2007. Activity of brazilian and bulgarian propolis against different species of *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 102(1), 73-77.
- Díaz Reyes G. 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 trofozoítos de *Giardia lamblia*. Tesis de Maestría. Departamento de Ciencias Químico Biológicas. Universidad de Sonora.
- Dunn Linda A., Burgess Anita G., Krauer Kenia G., Eckmann Lars, Vanelle Patrice, Crozet Maxime D., Gillin Frances D., Upcroft Peter, Upcroft Jacqueline A. 2010. A new-generation 5-Nitromidazole can induce highly metronidazole-resistant

- Giardia lamblia* in vitro. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 36(1), 37-42.
- Falcão SI, Vilas-Boas M, Estevinho LM, Barros C, Domingues MR, Cardoso SM. 2009. Phenolic characterization of northeast portuguese propolis: usual and unusual compounds. *Anal Bioanal Chem*. 396(2), 887-897.
- Florez-Acevedo S., Sarmiento N., S. Martínez G., 2010. Patterns of feeding, sleep and reproductive behavior in mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Fundación Universitaria Konrad Lorenz*, Colombia. *Suma Psicológica*. 17(2), 201-208.
- Freitas S. F., Shinohara L., M. Sforcin J., Guimarães S.. 2006. *In vitro* effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. *Phytomedicine*. 13(3),170-175.
- Faubert, G. M. 2000. Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clinical Microbiology Review*. 13(1)35-54.
- Ghedira K, Goetz P, Le Jeune R. 2009. Propolis. *Matière Médicale Pratique. Phytothérapie*; 7(2), 100–105.
- Hernández J., Goycoolea F. M., Quintero J., Acosta A., Castañeda M., Dominguez Z., Robles R., Vázquez-Moreno L., Velázquez E. F., Astiazarán H., Lugo E., Velázquez C. 2007. Sonoran propolis: chemical composition and antiproliferative activity on cancer cell lines. *Planta Medica*. 73(14), 1469-1474.
- Jaganath Indu B., Crozier Alan. 2010. 1 Dietary Flavonoids and phenolic compounds. *Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition and Pharmacology*. Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Inc.
- Karabay O., Tamer A., Gunduz H., Kayas D., Arnic H., Celebi H. 2004 Albendazole Versus Metronidazole Treatment of adult giardiasis: an open randomized clinical study. *World Journal of Gastroenterology*. 10(8), 1215-1217.
- Keister DB. 1983. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 77(4), 487-488.

- Lotti C., M. Campo Fernandez, A. L. Piccinelli, O. Cuesta-Rubio, I. Marquez Hernandez & L. Rastrelli. 2010. Chemical constituents of red mexican propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58(4), 2209-2213.
- Lujan H.D. 2006. GIARDIA Y GIARDIASIS. *Medicina (Buenos Aires)*. 66, 70-74.
- Lujan H.D., Mowatt M.R. and Nash T.E. 1997. Mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 61(3), 294-304.
- Marcucci M. C. 1995. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. Review Article. *Apidologie*. 26(2), 83-99.
- Martínez-Sánchez, A., R.,Llorach, M.L., Gil. 2007. Identification of new flavonoid glycosides and flavonoid profiles to characterize rocket leafy salads (*Eruca vesicaria* and *Diplotaxis tenuifolia*). *J Agric Food Chem*. 55(4), 1356-1363.
- Núñez Fernandez F. A. 2004. Estudio de factores asociados con la reinfección por *Giardia lamblia* en niños de círculos infantiles. Tesis Doctorado en Ciencias Médicas. La Habana, Cuba.
- Pasupuleti V., Escobedo A. A., Deshpande A., Thota P., Roman Y., Hernandez A. V., 2014. Efficacy of 5-nitroimidazoles for the treatment of giardiasis: A systematic review of randomized controlled trials. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 8(3): 1-11
- Pulino N., Pieres Dantas A., Bankova V., Taggliari Longhi D., Scremin A., Lisboa de Castro S. y Batista Calixto J. 2003. Bulgarian propolis induces analgesic an anti-inflammatory effects in mice and inhibits *in vitro* contraction of airway smooth muscle. *Journal of Pharmacological Sciences*. 93(3), 307-313.
- Ramos A. F. N.Miranda J. L. 2007. Propolis: A Review of its anti-inflammatory and healing actions. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis*. 13(4), 697-710.
- Robles-Zepeda R., J. Hernández, A. Garibay, Dora Valencia, Carlos Velázquez. 2012. Medicinal plants, biodiversity and drugs. 18 botanical origin and biological

- activity of propolis . *Science Publishers*. ISBN 978-1-57808-000-0.
- Rufino-González Y., Ponce-Macotela M., González-Maciel A., Reynoso-Robles R., Jimenez- Estrada M., Sánchez-Contreras A. and Martínez-Gordillo M. 2012. *In vitro* activity of the F-6 fraction of oregano against *Giardia intestinalis*. *Parasitology*. 139(4), 434-440.
- Salomão K., Souza E. M., Henriquez-Pons A., Barbosa H. S. and L. de Castro S. Original Article. 2008. Brazilian green popolis: effects *in vitro* and *in vivo* on *Trypanosoma cruzi*. *Hindawi Publishing Corporation. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011, 1-11.
- Santos F. A., Bastos E. M. A., Uzeda M., Carbalho M. A. R., Farias L. M., Moreira E. S. A., Braga F. C. 2002. Antibacterial activity of brazilian propolis and fractions aganist oral anaerobic bacteria. *Journal or Ethnopharmacology*. 80(1), 1-7.
- Salatino A., Teixeira E. W., Negri G., Message D. 2005. Origin and chemical variation of brazilian propolis. *Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine*. 2(1), 33-38.
- Sousa M. C., Poiares-da-Silva J. 2001. The cytotoxic effects of ciprofloxacin in *Giardia lamblia* trophozites. Pergamon. *Toxicology in Vitro*. 15(4-5), 297-301.
- Strehle M. A., Jenke F., Fröhlich B., Tautz J., Riederer M., Kiefer W., Popp J. Raman Spectroscopic Study of Spatial Distribution of Propolis in Comb of *Apis mellifera carnica* (Pollm.). *Biopolymers (Biospectroscopy)*. 72(4), 217-224.
- Teixeira E.W., Message D., Negri G., Salatino A. and Stringheta P.C. 2008. Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of brazilian propolis samples. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 7(3), 307-315.
- Tolosa, L. 2002. The collection, characterisation and evaluation of antimicrobial activity of propolis extracts from Campeche, Mexico. *Ars Pharmaceutica*. 43(1-2), 187-204.

- Uzel A., Sorkun K., Öncagc Ö., Cogulu D., Gencay Ö., Salih B. 2005. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different anatolian propolis samples. *Microbiological Research*. 160(2), 189-195.
- Valencia D., Alday E., Robles-Zepeda R., Garibay-Escobar A., Galvez-Ruiz J.C., Salas-Reyes M., Jiménez-Estrada M. d, Velazquez-Contreras E., Hernandez J., Velazquez C. 2012. Seasonal effect on chemical composition and biological activities of sonoran propolis. *Food Chemistry*. 131(2), 645–651.
- Van Keulen H., Macechko P. T., Wade S., Schaaf S., Wallis P. M., Erlandsen S. L. 2002. Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggests a zoonotic potential for giardiasis. *Veterinary Parasitology*. 108(2), 97-107.
- Vázquez T.O., Campos R.T. 2009. Giardiasis. La parasitosis más frecuente a nivel mundial. *Revista del Centro de Investigación. Universidad la Salle, México*. 8(31), 75-90.
- Velazquez C., Navarro M., Acosta A., Angulo A., Dominguez Z., Robles R., Robles-Zepeda R., Lugo E., Goycoolea F.M., Velazquez E.F., Astiazaran H., Hernandez J. 2007. Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *Journal of Applied Microbiology*. 103(5), 1747-1756.
- Venkatesh P., Jaiprakash M., Prasad P. 2007. Flavonoid biosynthesis in tea (*Camellia sinensis*). *International Journal of Tea Science*. 6,11-17.
- Vives E. A., Ventriglia M. V., Medvedovsky D. y Rothlin R. 2004. Nitroimidazoles y Nitrofuranos. *Farmacología II*. 1-6.
- Watkins R. and Eckmann L. 2014. Treatment of giardiasis: Current status and future directions. *Current Infectious Disease Reports*. 16(2), 1-8.
- Weiland Malin E.-L., McArthur Andrew G., Morrison Hilary G., Sogin Mitchell L., Svärd Staffan G. 2005. Annexin-like alpha giardians: A new cytoskeletal gene family in *Giardia lamblia*. *International Journal for Parasitology*. 35(6), 617-

626.

Wisconsin Department of Health Services. *Giardia intestinalis*. 2001. Guidelines for Prevention and Control for Local Public Health Agencies. Communicable Disease Epidemiology Section, Bureau of Public Health, Division of Public Health, Department of Health and Family Services. July 2001.

<https://www.dhs.wisconsin.gov/communicable/Giardia/GiarMan.pdf>

Zaat, J.O., Mank, T.G., Assendelft, W.J., 1997. A systematic review on the treatment of giardiasis. *Trop. Med. Int. Health* 2(1), 63–82.

ANEXO 1

Preparación del cultivo de *G. lamblia*

La *Giardia lamblia* es un protozoo parásito que afecta al hombre y otras especies. Durante mucho tiempo el estudio de las características de este microorganismo se vio limitado por las dificultades con su cultivo, sin embargo, en los últimos 20 años se han reportado métodos que permiten su aislamiento y cultivo axénico. Estos avances han posibilitado un mejor conocimiento de las características fenotípicas y genotípicas de este protozoo (Lujan, 2006).

La exquistación in vitro de *G. lamblia* puede ser inducida utilizando soluciones ácidas que imitan las condiciones del estómago. El pH óptimo para este proceso es de 1,3-4. Sin embargo, la exquistación de *G. lamblia*, también ocurre a pH 7,5 en tampón fosfato con bicarbonato, indicando que el pH ácido no se requiere obligatoriamente para la exquistación, apuntando el papel de las proteasas pancreáticas en el proceso, es por ello que el medio TYI-S 33 contiene los nutrientes y pH esenciales para supervivencia y mantenimiento de trofozoítos de *G. lamblia*.

MEDIO TYI-S-33

Tripticasa..... 20 gr.

(BBL Tripticase Peptone Pancreatic Digest of Casein) BD 211921 445 gr. – LOT. 0097483

Levadura extracto..... 10 gr.

(Bacto Yeast Extracto Technical) BD 288620 500 gr. LOT. 0055682

Dextrosa..... 10 gr.

(D – (+) – Dextrose) SigmaD9434 500 gr. Batch #108K0014

NaCl..... 2 gr.

Sigma 5-5886

L-Cisteína..... 2 gr.

(L-Cysteine Hydrochloride Monohydrate from non-animal Source) Sigma C6852-1006 Batch #019K10362

Fosfato de Na dibásico..... 1 gr.

Sigma S0876-1KG Batch #057K0040

Fosfato de Na monobásico..... 0.6 gr.

Sigma S0751-500G Batch #067K0110

Bilis..... 0.6 gr.

(Bile From Bovine and Ovine) Sigma B8381-1006 Batch #098K0012

Acido ascórbico..... 0.1 gr.

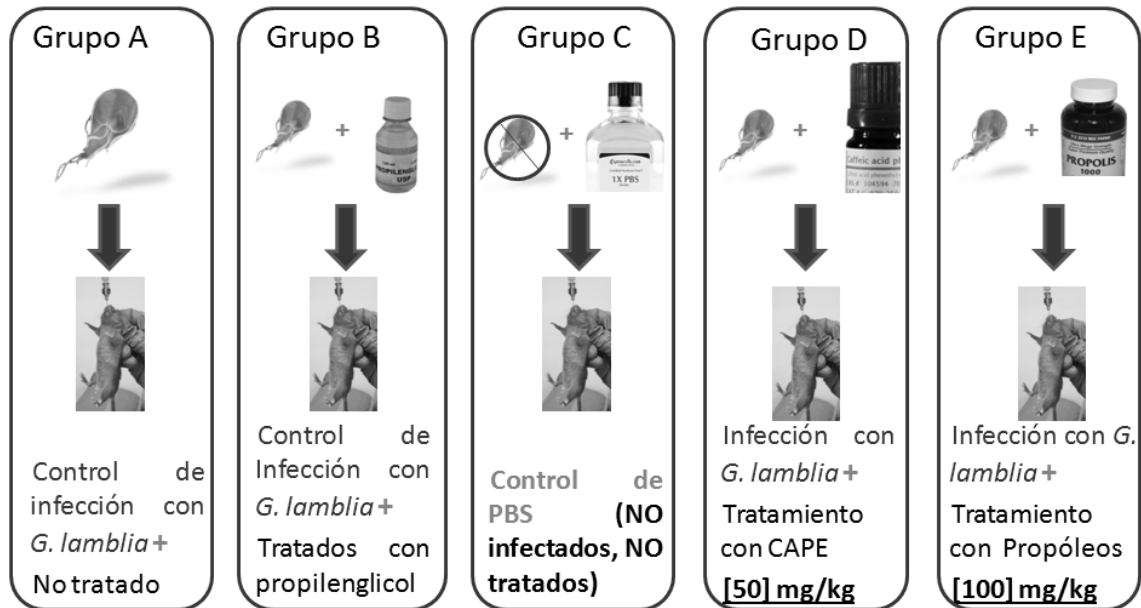
(L-Ascorbic Acid) P.M.= 176 Sigma A5960-25G 065K0181

Citrato férrico amoniacal..... 0.023 gr.

Se ajusta el pH a 6.9 con NaOH y se afora a la cantidad de 1000 mL con agua miliQ, agregar 1000 µl de antibiótico Ceftriaxona (1M, 1 gr. Roche). Suplementar con 100 mL de suero de ternera recién nacida (NBCS. GIBCO. Invitrogen 16010) y filtrar en un sistema con motor al alto vacío con filtro de 0.45 µm.

ANEXO 2

Grupos de trabajo



Grupo A: Grupo control de infección, nos da la cantidad de trofozoítos que logran proliferar en el modelo animal al cabo de 7 días post-infección.

Grupo B: Grupo control de propilenglicol, este grupo no demuestra que el propilenglicol con interfiere con el crecimiento del parásito en el modelo animal, ya que éste es el vehículo en el cual van embebidos los tratamientos (propóleos y CAPE).

Grupo C: Grupo control de PBS, simplemente se demuestra que el PBS utilizado este libre de parásitos y, a la vez demostrar que la manipulación de los animales no se

realiza infección cruzada, ya que el PBS es el vehiculo en el cual se resuspenden los trofozoítos de *G. lamblia*.

Grupo D: Grupo de tratamiento con CAPE [50 mg/kg], tratamiento aplicado al modelo animal a los 2 y 4 días post-infección.

Grupo E: Grupo de tratamiento con Propóleso de Ures, Sonora temporada de verano [100 mg/kg], tratamiento aplicado al modelo animal a los 2 y 4 días post-infección.

ANEXO 3

Evaluación de la proliferación y viabilidad celular utilizando cámara de Neubauer

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

Procedimiento

- 1.- Desprender las células adheridas al intestino en tubos colocados en refrigeración (a 4 °C) por 1 hora.
- 2.- Se transfiere el contenido del tubo de cultivo a un tubo falcón de 15 mL.
- 3.- Se centrifugan a 1800 rpm por 8 minutos a 4° C. Se descarta el sobrenadante.
- 4.- Se resuspender el pellet en 1 mL de medio TYI-S33.
- 5.- Con ayuda de una micropipeta, se toman 10µL y se agregan a un tubo eppendorf al cual previamente se le agregaron 10µL de colorante azul de tripán obteniendo así una dilución 1:2 (factor dilución).
- 6.- Se agita el contenido del tubo eppendorf con una micropipeta, y se toman 10 µL para ser analizados en el hemacitómetro dejando que la suspensión celular fluya por debajo del cubreobjetos hasta llenar el área de la cuadrícula, evitando que se derrame o entren burbujas en el área de conteo, si esto sucede, montar la cámara de nuevo.
- 7.- Una vez montada la cámara dejarla reposar por unos segundos permitiendo que las células se asienten y se observen en el mismo plano.
- 8.- Posteriormente se inicia el conteo de las células contenidas en los 4 cuadrantes.
 - a. Para conocer la viabilidad celular se empleará el colorante azul de tripán. Este es un colorante que penetra a las células muertas es decir a las

células no viables tiñéndolas de color azul; permitiendo distinguir entre las células viables que no son teñidas.

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

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

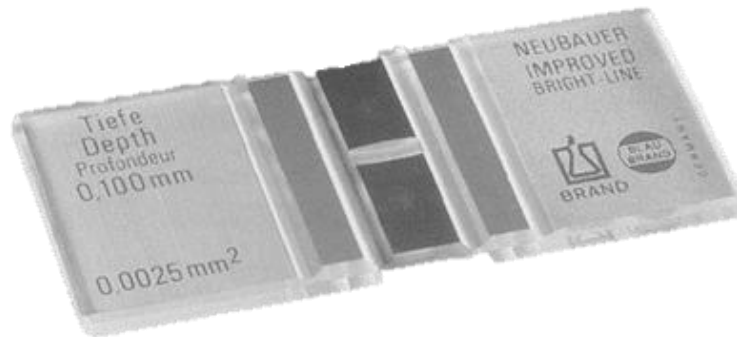
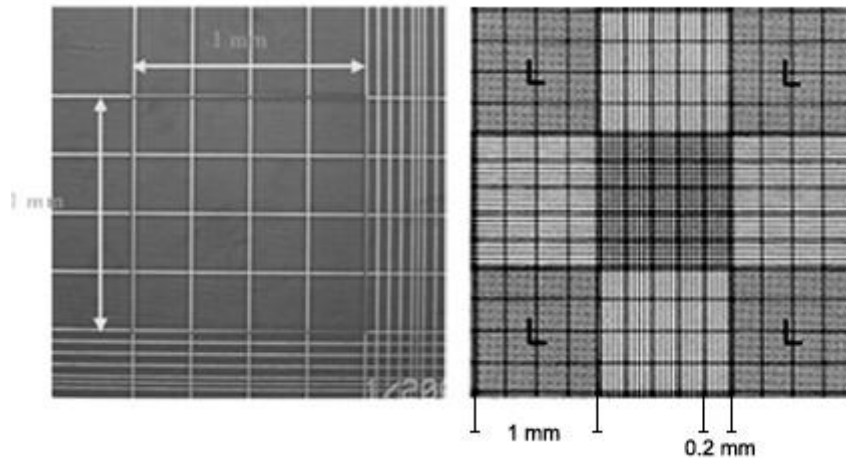


Figura 9. Cámara de Neubauer o hemacitómetro. El conteo celular se lleva a cabo en las áreas marcadas con “L”.

ANEXO 4

Estructura química de los constituyentes evaluados sobre el crecimiento *in vitro* de trofozoítos de *G. lamblia*.

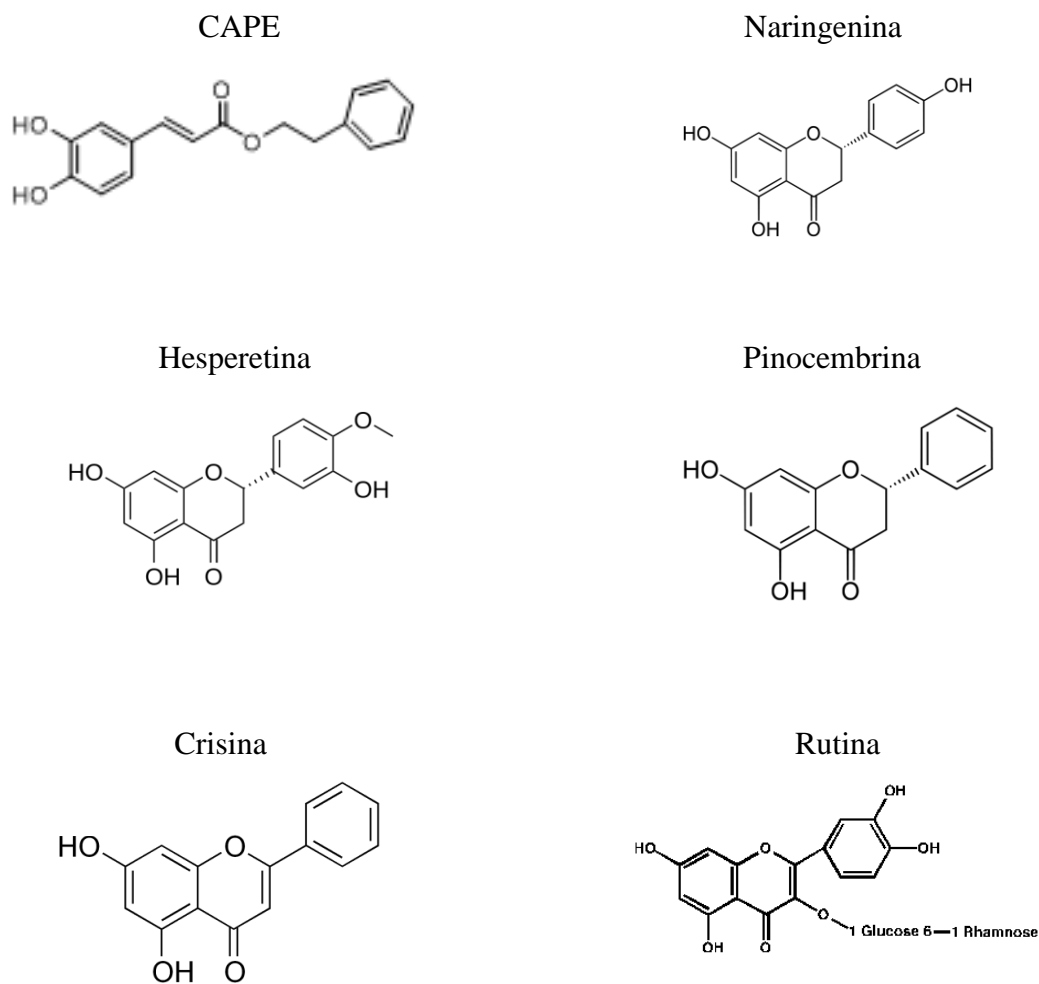


Figura 10. Estructura química de algunos de los constituyentes de propóleos sonorenses evaluados sobre el crecimiento *in vitro* de trofozoítos de *G lamblia* (Robles-Zepeda y col., 2012; Jaganath, y col. 2010).



Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Planta Medica*.

Manuscript ID: PLAMED-2014-12-1332-OP

Title: Sonoran Propolis and Some of Its Chemical Constituents Inhibit in vitro Growth of *Giardia lamblia* trophozoites

Alday-Provencio, Samuel
Diaz, Gabriela
Rascon, Lucila
Quintero, Jael

Authors: Robles-Zepeda, Ramón
Garibay-Escobar, Adriana
Astiazaran-García, Humberto
Hernández, Javier
Velazquez, Carlos

Date Submitted: 05-Dec-2014



Print



Return to Dashboard

© Thomson Reuters | © ScholarOne, Inc., 2014. All Rights Reserved.

ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.

ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

@ScholarOneNews | System Requirements | Privacy Statement | Terms of Use

Sonoran Propolis and Some of Its Chemical Constituents Inhibit in vitro Growth of Giardia lamblia trophozoites

Journal:	<i>Planta Medica</i>
Manuscript ID:	PLAMED-2014-12-1332-OP
Manuscript Type:	Original Papers
Date Submitted by the Author:	05-Dec-2014
Complete List of Authors:	Alday-Provencio, Samuel Diaz, Gabriela Rascon, Lucila Quintero, Jael Robles-Zepeda, Ramón Garibay-Escobar, Adriana Astiazaran-García, Humberto Hernández, Javier Velazquez, Carlos; University of Sonora, Chemistry-Biology
Keywords:	Antiparasitic < Molecular Targets and Activities, Flavonoids < Phenolics < Natural Products Classes, Phenolics < Natural Products Classes, Higher Plants < Sources of Compounds and Bioactivity

SCHOLARONE™
Manuscripts

December 5, 2014

1
2
3
4
5 **Prof. Dr. Luc Pieters**
6 **Department of Pharmaceutical Sciences, University of Antwerp**
7 **Editor in Chief**
8 **Planta Medica**
9

10
11
12
13
14 **Dear Dr. Luc Pieters,**
15

16 I am Submitting the manuscript "**Sonoran Propolis and Some of Its Chemical Constituents**
17 **Inhibit *in vitro* Growth of *Giardia lamblia* trophozoites**", to be considered for publication
18 in **Planta Medica**.
19

20
21
22
23
24 Sincerely,
25

26
27
28 **Dr. Carlos Velazquez**
29 Department of Chemistry-Biology
30 University of Sonora
31 Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n
32 Hermosillo, Sonora 83000, México
33 e-mail: velaz@guayacan.uson.mx
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 **Sonoran Propolis and Some of Its Chemical Constituents Inhibit *in vitro* Growth of**
4 ***Giardia lamblia* trophozoites**
5
6
7

8 Alday-Provencio S¹, Díaz G², Rascón L¹, Quintero J¹, Robles-Zepeda R¹, Garibay-Escobar
9 A¹, Astiazarán-García H³, Hernández J⁴ and Velazquez C^{1*}.
10
11

12
13 ¹*Department of Chemistry-Biology, University of Sonora, Hermosillo, Sonora, Mexico.*

14 ²*Department of Chemistry-Biology and Agricultural, University of Sonora, Navojoa, Sonora, Mexico.*

15 ³*Department of Nutrition and Metabolism, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C.*
16 *Hermosillo, Sonora, México.*

17
18 ⁴*Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz,*
19 *México.*
20
21

22
23
24
25
26 **Corresponding author: Carlos Velazquez, Department of Chemistry–Biology, University*
27 *of Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n. Hermosillo, Sonora 83000, Mexico (e-mail:*
28 velaz@guayacan.uson.mx*).*
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7 Key Words: *Giardia lamblia*, Propolis, Seasonal Effect, Chemical Compounds
8
9

10 Abbreviations:

11 CP: Caborca propolis

12 PAP: Pueblo de Alamos propolis

13 UP: Ures propolis

14 SP: Spring propolis

15 SuP: Summer propolis

16 AP: Autumn propolis

17 WP: Winter propolis

18 CAPE: Caffeic acid phenethyl ester

19 DMSO: Dimethyl Sulfoxide

20 HPLC-DAD-MS: High Performance Liquid Chromatography with Diod-Array detection

21 Mass Spectrometry
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ABSTRACT

Propolis is a cereus resin of complex composition with a wide range of biological activities. The chemical composition of propolis plays a significant role in its biological properties and it depends on the vegetal species used by the bees as a source of resins, as well as, season of propolis collection. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* anti-*Giardia lamblia* activity of Sonoran propolis and some of its chemical constituents collected from three different areas of Sonoran Desert in northwestern Mexico (Caborca [CP], Pueblo de Alamos [PAP] and Ures [UP]). Additionally, we also analyzed the seasonal effect on the anti-*G. lamblia* activity of Sonoran propolis. *G. lamblia* trophozoite cultures were treated with different concentration of propolis or chemical compounds (0, 25, 50, 100 and 200 µg/mL) during 48 h, and cell proliferation and cell viability were determined by using a Neubauer chamber and by trypan blue dye exclusion assay, respectively. To evaluate the seasonal effect of propolis, it was collected during the four seasons of the year from the region of Ures, Sonora. The UP propolis showed the highest inhibitory activity against *G. lamblia* (IC₅₀ 63.8 ± 7.1 µg/mL) in a concentration-dependent manner (UP>>PAP>CP). Season had an important effect on the *in vitro* anti-*G. lamblia* activity of Sonoran propolis. Summer Propolis showed the highest effect on the *G. lamblia* trophozoite growth (IC₅₀ 23.8 ± 2.3 µg/mL), followed by propolis collected during winter (IC₅₀ 59.2 ± 34.7 µg/mL), spring (IC₅₀ 102.5 ± 15.3 µg/mL) and autumn (IC₅₀ 125.0 ± 3.1 µg/mL). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), a UP propolis constituent, had very high growth-inhibitory activity towards *G. lamblia* (IC₅₀ 63.1 ± 0.9 µg/mL). To our knowledge, this is the first study showing that CAPE possesses a strong antiparasitic activity against *G. lamblia*. Naringenin (IC₅₀ 125.7 ± 20.7 µg/mL), hesperetin (IC₅₀ 149.6 ± 24.8 µg/mL) and pinocembrin (IC₅₀ 174.4 ± 26.0 µg/mL) showed moderate anti-*G. lamblia* activity. The flavonoids chrysin and rutin did not show significant antiparasitic activity. In conclusion, our results suggest that Sonoran propolis and some of its chemical constituents had inhibitory effects on the *in vitro* growth of *G. lamblia* trophozoites. Additionally, Season had a significant effect on the anti-*G. lamblia* activity of Sonoran propolis.

INTRODUCTION

G. lamblia (syn. *G. intestinalis*, *G. duodenalis*) is a flagellated protozoan that inhabits the upper small intestine of humans and other mammals and is the causal agent for giardiasis [1], and one of the most frequent cause of intestinal disease worldwide [2]. This parasitosis has clinical manifestation that varies from asymptomatic infection, to acute or chronic infection, associated with diarrhea, flatulence and abdominal pain, among others. *G. lamblia* infection is transmitted by contaminated water or food ingestion with *G. lamblia* cysts (infective form). The excystation process initiates in the stomach when trophozoites (vegetative form) colonize duodenum. Trophozoite attaches to the intestinal epithelium cells affecting microvilli and inducing nutriment malabsorption syndrome [3]. Among drugs used to control this parasitic infection are the members of the imidazole family, such as, albendazole, metronidazole and imidazole; 5-nitrofuranes, acrydines, quinolones and aminoglycosides are also used [4]. These drugs can have high antiparasitic effect on *G. lamblia*, however, in underdeveloped countries; the hygiene conditions are not favorable and lead to recurrent infections, mainly in pediatric populations. Additionally, these drugs can have side effects, such as metallic taste in the mouth, nausea, headache, anorexia, diarrhea and occasionally vomiting [5]. The high prevalence of giardia infections, as well as, the inadequate drug administration could favor the emergence of resistant Giardia strains [6,7]. Due to this reason, the identification of potential new drug candidates anti-*G. lamblia* is of paramount importance [4,8].

Propolis is a resinous material collected by bees (*Apis mellifera*) from different plants exudates [9], it has been used by alternative medicine to prevent and treat several diseases such as: cancer, diabetes, bacterial infections of respiratory and intestinal tract. Propolis has also been used as immune system reinforcement, or in skin burn treatment, among others [10,11].

Propolis is constituted by: 50 % resins and vegetal balsams, 30 % wax, 10 % essential oils and aromatics, 5 % pollen and 5 % of other substances. It has been identified over 300 chemical compounds in propolis, among them are aglycans flavonoids, phenolic acids and esters, p-cumaric prenylated acids and ketophenones. Other identified compounds in propolis are lignans, di- and three-terpenic acids, caffeoylquinic acids, monoterpens,

1
2
3 sesquiterpens, isoflavonoids, chalcones and pterocarpanes [12-14]. Propolis has a wide
4 spectrum of biological activities such as: anti-inflammatory, anticancer, antimicrobial,
5 antioxidant, antiparasitic, among others [13-19]. Previously, we have shown that, Sonoran
6 propolis possesses a strong antiproliferative activity against different cancer cell lines
7 [16,20].
8
9

10
11
12
13 Chemical composition of propolis varies according to the vegetation around the
14 collection area [14]. The main botanical resin source of propolis from temperate zones,
15 such as European and North American, are *Populus ssp* [14,17], acting as one of the main
16 botanic source of Sonoran propolis [21]. In tropical regions, such as Brazil, it has been
17 found a great variety of vegetal sources that are used by bees to elaborate propolis, such as
18 *Baccharis dracunculifolia*, *Clusia minor*, *Clusia major*, *Araucaria heterophylla*, *Hyptis*
19 *divaricata*, *Myrceugenia euosm*, among others [14,22-27]. Propolis presents a very
20 different chemical composition depending in the geographic collection area. Additionally,
21 the chemical composition of propolis can vary during the different seasons of the year,
22 which could modify its biological activities [20,28-29].
23
24
25
26
27
28
29
30

31
32 There are limited data available about the antiparasitic activities of propolis. It has been
33 reported that Brazilian propolis inhibited the growth of *Trypanosoma cruzi* and
34 *Trichomonas vaginalis*, as well as it had immunoregulatory properties on peripheral blood
35 mononuclear cells from leishmaniasis patients [9,17,30-33]. It has been also reported that
36 Brazilian propolis inhibited the *in vitro* proliferation of *G. lamblia* trophozoites [18].
37
38
39
40

41
42 The aim of the present study was to evaluate the antiparasitic activity of Sonoran
43 propolis and some of its chemical constituents collected in three different geographic areas
44 of Sonora, Mexico, as well as, analyze the seasonal effect on the anti-*G. lamblia* activity of
45 Sonoran propolis.
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

RESULTS

Antiparasitic Activity of Sonoran Propolis

In order to evaluate the antiparasitic activity of propolis on *G. lamblia* trophozoites, we used several concentration of propolis extracts (0, 25, 50, 100 and 200 µg/mL). UP propolis showed the highest growth inhibition of *G. lamblia* trophozoites ($IC_{50} 63.8 \pm 7.1$ µg/mL), followed by PAP, ($IC_{50} 222 \pm 68.4$ µg/mL). The CP extract did not show any significant effect on *G. lamblia* proliferation. The antiparasitic drug albendazole inhibited more than 90 % of the trophozoite proliferation. DMSO (to the highest concentration used [0.06 %]) did not show any significant effect on proliferation or viability of *G. lamblia* trophozoites (Figure 1).

Microscopic analysis showed that UP propolis induced morphological changes evident on *G. lamblia* trophozoites. Control *G. lamblia* cultures showed trophozoites monolayers attached to the surface tubes, showing slightly elongated trophozoites (Figures 2A and 2B). After incubation (48 h) with albendazole (10 µM) (Figure 2C) and UP propolis (Figure 2D-2G), trophozoites were detached from the surface of the culture tubes, and some of them, acquired a round and elongated form. The trophozoite movement diminished considerably. We observed abundant cellular debris, mainly at the highest propolis concentration tested (200 µg/mL). Swollen trophozoites with slow movements and detached of the tube surface (60-80 %) were observed at the highest concentration evaluated (200 µg/mL). PAP and CP extract did not show evident morphologic changes on trophozoites at the propolis concentrations tested (data not showed).

Seasonal Effect on the Growth-Inhibitory Activity of Propolis on *G. lamblia* Trophozoites

To investigate the seasonal effect on the anti-*G. lamblia* activity of propolis, we collected propolis at the different seasons of the year in the region of Ures, Sonora (See materials and methods). The propolis collected (SP, SuP, AP and WP) were evaluated at different concentrations (0, 25, 50, 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). All propolis extracts showed antiparasitic activity. SuP extract showed the highest anti-*G. lamblia* activity (IC_{50} 23.8 ± 2.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) followed by WP extract (IC_{50} 59.2 ± 34.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$), SP (IC_{50} 102.5 ± 15.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and AP (IC_{50} 125.0 ± 3.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The highest DMSO concentration (0.06 %) used did not affect the *G. lamblia* trophozoite growth. Albendazole (10 μM) inhibited over 90 % of the parasite proliferation (Figure 3).

Antiparasitic Effect of Sonoran Propolis Constituents

We previously characterized the chemical composition of Sonoran propolis, which present polyphenolic compounds, principally flavonoids [16]. The anti-parasitic effect of several chemical constituents identified in Sonoran propolis (CAPE, naringenin, hesperetin, pinocembrin, chrysin and rutin) was evaluated. The chemical constituent that showed the highest anti-*G. lamblia* activity was CAPE (IC_{50} 63.1 ± 0.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$), followed by naringenin (IC_{50} 125.7 ± 20.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Herperetin and pinocembrin had a moderated inhibitory activity (IC_{50} 149.6 ± 24.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and IC_{50} 174.4 ± 26.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively). In contrast, chrysin and rutin did not show antiparasitic activity at the concentration evaluated (Figure 4).

DISCUSSION

In this study, we evaluated the antiparasitic activity of propolis and some of its chemical constituents, collected from three different areas of Sonora, Mexico. Additionally, we analyzed the seasonal effect on the growth-inhibitory activity of Sonoran propolis on *G. lamblia* trophozoites. Our data showed that UP had the highest growth-inhibitory activity on *G. lamblia* trophozoites, followed by PAP with moderate activity, and finally CP, which did not show any anti-*G. lamblia* activity. The different biological activities of propolis can be influenced by the diversity of surrounding flora and climatic conditions that exist in each propolis collection area; these conditions could modify the production of secondary metabolites by plants present on the collection areas, and consequently, it can induce different biological activity of propolis.

Season had an important effect on the anti-*G. lamblia* activity of propolis. Previous study from our group, showed an evident seasonal effect on the anti-proliferative activity of propolis from Ures, Sonora on cancer cell lines [16,20]. In the present study, we evaluated the seasonal effect on the anti-*G. lamblia* activity of Sonoran propolis and some of its chemical constituents. Propolis collected on summer (SuP), showed the highest parasite growth-inhibitory activity, followed by WP > SP > AP. The chemical profile (HPLC) of UP propolis samples collected during the four seasons of the year, showed that season did not have a significant effect on the relative abundance of the main chemical constituents of propolis [20,29], which is very interesting, due to the differences found in anti-*G. lamblia* activity of propolis samples. Probably, those differences could be due to small quantitative variations in the propolis constituents, which could influence the antiparasitic activity of propolis. Another possible explanation for those observations could be that unidentified compounds with potent anti-*G. lamblia* are present in different abundance in the propolis samples tested. Additional experiments are needed to know the chemical basis of the seasonal effect on the anti-*G. lamblia* activity of Sonoran propolis.

The chemical composition of propolis is directly related to the surrounding flora of the collection area, and it depends on the geographic area and climatic conditions. For this reason, the chemical composition of propolis and their biological activities are highly variable [25,34-38]. The principal propolis chemical constituent collected in temperate

1
2
3 areas with different geographic origin belong to the flavonoids family, organic acids, esters,
4 alcohols and aldehydes, among others [15,16,25,36,38]. Some Sonoran propolis chemical
5 constituents evaluated in the present study showed inhibitory activity on the *in vitro* growth
6 of *G. lamblia* trophozoites, among them are: CAPE, naringenin, hesperetin and
7 pinocembrin. Contrarily, chrysin and rutin did not show antiparasitic effect at the evaluated
8 conditions.
9

10
11
12
13
14 CAPE, identified commonly in temperate propolis, was the UP chemical constituent
15 that showed the highest inhibitory activity on *G. lamblia* trophozoites. CAPE possesses
16 highly antibacterial activity against gram (+) bacteria, such as *Staphylococcus aureus*, as
17 well as has a potent antiproliferative activity on human and mouse cancer cell lines [16,20].
18 Our data suggests that CAPE may be one of the chemical constituent responsible of the
19 anti-*G. lamblia* activity of Sonoran propolis. To our knowledge this is the first work that
20 reported the antiparasitic activity of CAPE.
21
22
23
24
25
26

27
28 Flavonoids are a widely distributed group of natural products and most commonly
29 found as secondary metabolites of plants, structurally are polyphenolic consisting of three
30 rings and a heterocyclic pyran or ring pyran surrounded by rings of benzene on each side.
31 Being grouped into 6 classes: Flavones (chrysin), flavanones (naringenin, hesperetin and
32 pinocembrin), flavonols (rutin), antioxidant, isoflavones and anthocyanins, based on the
33 oxidative state, as well as the number and type of the heterocyclic ring substituents. The
34 addition of hydroxyl groups to the benzene ring, methylation and glycosylation have
35 resulted in the generation of structures more diverse and therefore different biological
36 activities [39]. Naringenin, hesperetin and pinocembrin showed activity anti-*G. lamblia* and
37 belong to the class of the flavonones, sharing structural similarity. Chrysin and rutin
38 belong to the class of the flavones and flavonols, which showed no activity anti-*G. lamblia*.
39 Pinocembrin, is widely distributed in nature, it has been isolated from different plant
40 species, and it is one of the main components of propolis of various geographic areas,
41 which presents a broad spectrum of biological activities (antibacterial, antiproliferative,
42 antioxidant, anti-inflammatory, among others) [13,40-41]. Naringenin and pinocembrin
43 have been found in the fractionation of oregano (*Lippia graveolens*), which inhibited the
44 proliferation of *G. lamblia* trophozoites, breaking the nuclear membrane and damaging the
45 ventral disc [42].
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

It is difficult to draw a structural-activity relationship from this limited number of flavonoid compounds, but it may be noted that naringenin ($IC_{50} 125.7 \pm 20.7 \mu\text{g/mL}$) showed higher anti-*G. lamblia* activity than pinocembrin ($IC_{50} 174.4 \pm 26.0 \mu\text{g/mL}$). This difference could be due to the presence of a hydroxyl group on the carbon 4' of the "B" ring of naringenin that could make it more active. In addition, chrysin did not have *in vitro* activity on the growth of this parasite. This lack of activity could be due to that chrysin presents a simple double bond between carbons 2-3 of the ring "C" as compared to pinocembrin, which not presents this double bond and inhibits the *G. lamblia* growth, possibly the presence of this dual-link may cause a decrease in anti-*G. lamblia* activity [16]. Future studies will be needed to determine the structural-activity relationship of these chemical compounds of Sonoran propolis.

In conclusion, our results suggest that Sonoran propolis and some chemical constituents had effect on the *in vitro* growth of *G. lamblia* trophozoites. Additionally, Season had significant effect on the anti-*G. lamblia* activity of Sonoran propolis. To our knowledge this is the first paper reporting the antiparasitic activity of propolis collected from arid and semi-desert areas of Sonora, Mexico.

MATERIALS AND METHODS

G. lamblia Culture

G. lamblia trophozoites were obtained from American Type Culture Collection (GS/M-83-H7, ATCC 50581), and were axenically maintained in TYI-S-33 culture medium supplemented with 10 % of new born calf serum (NBCS) (Gibco) with antibiotics (ceftriaxone 100 µg/mL) at 37° C [43].

Propolis and Methanolic Extracts from Propolis

Sonoran propolis was collected in different arids and semi-arids regions in northwest Mexico (Sonora), in Pueblo de Alamos (PAP), Caborca (CP) and Ures (UP) regions. PAP was collected during June 2001 to February 2003 (N29°15'W109°59'), CP (N30°46'W112°05') was collected between March and June 2006, and UP (N29°27'W110°22'398) was collected during March 2008 to March 2009. To evaluate the seasonal effect on the antiparasitic activity of Sonoran propolis, UP propolis was collected in the different seasons of the year (summer propolis (SuP, June 22, 2008 to September 22, 2008), spring propolis (SP, March 21, 2008 to June 21, 2008), autumn propolis (AP, September 23, 2008 to December 21, 2008) and winter propolis (December 22, 2008 to March 20, 2009)). Seasonal propolis was collected from several hives near to the property "San Enrique" located in the community "El Coyote" (N 29°27'181", W 110°23'398"). To collect propolis, traps (wooden frames of 59 X 37 cm, with a polyethylene mesh with a pore size of 1 mm²) were placed on top of the hives. Once removed the traps that contained the propolis samples, they were cooled to -80 °C to facilitate their recovery and subsequent storage (-80 °C). The propolis extractions were performed grinding the resin to obtain powder, which was put in contact with absolute methanol (1:6 w/v) at 25 °C in darkness and constant stirring for a period of three days. After this incubation time, the mixture was filtered in fabric cotton to remove solid materials. Then, the extracts were filtered through Whatman grade No. 4 filter paper and concentrated on a rotary evaporator (Yamato RE300) at 40 °C under reduced pressure for subsequent storage at -20 °C [15,16,20].

Sonoran Propolis Chemical Compounds

The following authentic flavonoids standards: naringenin, hesperetin, chrysin and rutin were commercially acquired from INDOFINE (Chemical Co., Inc., USA.). Albendazole was acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Pinocembrin was purified from Ures propolis (Ures, Sonora) in our lab (HPLC-DAD-MS). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) was synthesized by our group based in the procedure from Grunberger *et. al.* 1988.

Antiparasitic Activity of Sonoran Propolis and Chemical Constituent

In order to evaluate the growth inhibitory capacity of propolis or chemical compounds against *G. lamblia* trophozoites, we used propolis obtained from three different Sonoran regions (PAP, CP and UP) and some of its main chemicals constituents (CAPE, naringenin, hesperetin, pinocembrin, chrysin and rutin). *G. lamblia* trophozoites cultures (1×10^5 /tube) were incubated at 37 °C for a period of 12 h, in a 13 X 100 glass tubes with screw cap. Then, trophozoite cultures were treated with different concentrations of propolis or chemical compounds (0, 25, 50, 100 and 200 µg/mL) during 48 h. Each experiment was performed in triplicate, and at least two experiments were done in each condition evaluated. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as a solvent control, and albendazole (10µM) as a positive control for parasite inhibition. Cell proliferation and cell viability were determined by using a Neubauer chamber and by trypan blue dye exclusion assay, respectively. The results were analyzed using GraphPad Prism v3.02.32 software.

Analysis of Optical Microscopy

Morphologic changes induced by Sonoran propolis on *G. lamblia* trophozoites were observed and photographed at 100 X on a Nikon inverted optical microscope (Inverses Mikroskop Eclipse TS 100) and analyzed with Lumera Corporation Infinity Analyze software (Current revision 6.0.0).

Statistical Analysis

Data were processed and analyzed by the non-parametric method of Kruskal-Wallis. The statistical analyses were made in SPSS software. Statistical significance was accepted when $P < 0.05$.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the professional beekeeper Gilberto Valenzuela for all the facilities provided during the collection of propolis. We appreciate the support provided for the partial realization of this work to the project of CONACYT (CB-2010-01/ 155224).

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that they have no financial or nonfinancial competing interests.

For Peer Review

REFERENCES

1. Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 447-475.
2. Lujan HD. Giardia y giardiasis. *Medicina (B Aires)* 2006; 66: 70-74.
3. Lalle M. Giardiasis in the post genomic era: treatment, drug resistance and novel therapeutic perspectives. *Infect Disord Drug Targets* 2010; 10: 283–294.
4. Watkins R, Eckmann L. Treatment of giardiasis: Current status and future directions. *Curr Infect Dis Rep* 5 February 2014; doi: 10.1007/s11908-014-0396-y.
5. Granados CE, Reveiz I, Uribe LG, Criollo CP. Drugs for treating giardiasis. *Cochrane Database Sys Rev*. 2012; 6: 1-73.
6. Lemée V, Zaharia I, Nevez G, Rabodonirina M, Brasseur P, Ballet JJ, Favennec L. Metronidazole and albendazole susceptibility of 11 clinical isolates of *Giardia duodenalis* from France. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46: 819-821.
7. Busatti HG, Santos JF, Gomes MA. The old and new therapeutic approaches to the treatment of giardiasis: Where are we?. *Biol. Targets Ther.* 2009; 3: 273-287.
8. Karabay O, Tamer A, Gunduz H, Kayas D, Arnic H, Celebi H. Albendazole versus metronidazole treatment of adult giardiasis: An open randomized clinical study. *World J Gastroentero* 2004; 10: 1215-1217.
9. da Silva Cunha I, Salomão K, Shimizu M, Bankova V, Ramalho CA, Lisboa de Castro S, Marcucci M. Antitrypanosomal activity of brazilian propolis from *Apis mellifera*. *Chem Pharm Bull* 2004; 52: 602-604.
10. Bankova VL, de Castro S, Mrcucci MC. Propolis: Recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 2000; 31: 3-15.
11. Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res* 2001; 15: 561-571.
12. Parolia A, Thomas MS, Kundabala M, Mohan M. Propolis and its potential uses in oral health. *Int J Med Sci* 2010; 2: 210-215.
13. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (Propolis). *Food Chem Toxicol* 1998; 36: 347-363.

- 1
2
3 14. Robles-Zepeda R, Hernández J, Garibay A, Valencia D, Velázquez C. 18 Botanical
4 origin and biological activity of propolis. *Medicinal Plants: Biodiversity and Drugs*.
5 *Science Publishers*; 2012: ISBN 978-1-57808-000-0.
6
7
8
9 15. Velazquez C, Navarro M, Acosta A, Angulo A, Dominguez Z, Robles R, Robles-
10 Zepeda R, Lugo E, Goycoolea FM, Velazquez EF, Astiazaran H, Hernandez J.
11 Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *J Appl*
12 *Microbiol* 2007; 103: 1747-1756.
13
14
15
16 16. Hernández J, Goycoolea FM, Quintero J, Acosta A, Castañeda M, Dominguez Z,
17 Robles R, Vázquez-Moreno L, Velázquez EF, Astiazarán H, Lugo E, Velázquez C.
18 Sonoran propolis: Chemical composition and antiproliferative activity on cancer cell
19 lines. *Planta Med* 2007; 73: 1469-1474.
20
21
22
23 17. Salomão K, Souza EM, Henriquez-Pons A, Barbosa HS, Solange L. de Castro.
24 Brazilian green propolis: Effects *in vitro* and *in vivo* on *Trypanosoma cruzi*. *Evid*
25 *Based Complement Alternat Med* 13 February 2011; doi: 10.1093/ecam/nep014.
26
27
28 18. Freitas SF, Shinohara L, Sforcin JM, Guimarães S. *In vitro* effects of propolis on
29 *Giardia duodenalis* trophozoites. *Phytomedicine* 2006; 13:170-175.
30
31
32
33 19. Santos FA, Bastos EMA, Uzeda M, Carvalho MAR, Farias LM, Moreira ESA, Braga
34 FC. Antibacterial activity of brazilian propolis and fractions against oral anaerobic
35 bacteria. *J Ethnopharmacol* 2002; 80: 1-7.
36
37
38
39 20. Valencia D, Alday E, Robles-Zepeda R, Garibay-Escobar A, Galvez-Ruiz JC, Salas-
40 Reyes M, Jiménez-Estrada M, Velazquez-Contreras E, Hernandez J, Velazquez C.
41 Seasonal effect on chemical composition and biological activities of sonoran propolis.
42 *Food Chem* 2012; 131: 645–651.
43
44
45
46 21. Wollenweber E, Buchmann SL. Feral honey bees in the Sonoran Desert: Propolis
47 sources other than poplars (*Populu spp.*). *Z Naturforsch* 1997; 52: 530-535.
48
49
50 22. Marcucci MC. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic
51 activity. *Apidologie*. 1995; 26: 83-99.
52
53
54
55 23. Banskota AH, Tezuka Y, Prasain JK, Matsushige K, Saiki I, Kadota S. Chemical
56 constituents of brazilian propolis and their cytotoxic activities. *J Nat Prod* 1998; 61:
57
58
59
60

- 1
2
3 896–900.
4
5
6 24. Marcucci MC, Ferreres F, Garcia-Viguera C, Bankova VS, De Castro SL, Dantas AP,
7 Valente PH, Paulino N. Phenolic compounds from brazilian propolis with
8 pharmacological activities. *J Ethnopharmacol* 2001; 74: 105–112.
9
10
11 25. Bankova V. Recent trends and important developments in propolis research. *Evid-*
12 *Based Compl Alt* 2005; 2: 29-32.
13
14
15 26. Park YK, Alencar SM, Aguiar CL. Botanical origin and chemical composition of
16 brazilian propolis. *J Agr Food Chem* 2002; 50: 2502–2506.
17
18
19 27. Park YK, Paredes-Guzman JF, Aguiar CL, Alencar SM, Fujiwara FY. Chemical
20 constituents in *Baccharis dracunculifolias* the main botanical origin of southeastern
21 brazilian propolis. *J Agr Food Chem* 2004; 52: 1100–1103.
22
23
24 28. Sforcin JM, Fernandes JrA, Lopes CAM, Bankova V, Funari SRC. Seasonal effect on
25 brazilian propolis antibacterial activity. *J Ethnopharmacol* 2000; 73: 243 – 249.
26
27
28 29. Teixeira EW, Message D, Negri G, Salatino A, Stringheta PC. Seasonal variation,
29 chemical composition and antioxidant activity of brazilian propolis samples. *Evid*
30 *Based Complement Alternat Med* 2010; 7: 307-315.
31
32
33 30. Amarante MK, Watanabe MA, Conchon-Costa, Fiori LL, Oda JM, Búfalo MC, Sforcin
34 JM. The effect of propolis on CCL5 and IFN- γ expression by peripheral blood
35 mononuclear cells from leishmaniasis patients. *J Pharm Pharmacol* 18 November
36 2011; doi: 10.1111/j.2042-7158.2011.01385.x.
37
38
39 31. Ferreira FM, Castro RA, Batista MA, Rossi FM, Silveira-Lemos D, Frézard F, Moura
40 SA, Rezende SA. Association of water extract of green propolis and liposomal
41 meglumine antimoniate in the treatment of experimental visceral leishmaniasis.
42 *Parasitol Res* 30 November 2013; doi: 10.1007/s00436-013-3685-8.
43
44
45 32. Santana LC, Carneiro SM, Caland-Neto LB, Arcanjo DD, Moita-Neto JM, Citó
46 AM, Carvalho FA. Brazilian brown propolis elicits antileishmanial effect against
47 promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. *Nat Prod Res* 21
48 November 2012; doi: 10.1080/14786419.2013.856904.
49
50
51 33. Monzote FL, Sariego RI, García PM, Cuesta-Rubio O, Márquez HI, Campo F
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 M, Piccinelli AL, Rastrelli L. Activity of Cuban propolis extracts on *Leishmania*
4 *amazonensis* and *Trichomonas vaginalis*. *Nat Prod Commun* 2011; 6: 973-976.
5
6
7 34. Falcão SI, Vilas-Boas M, Estevinho LM, Barros C, Domingues MR, Cardoso SM.
8 Phenolic characterization of northeast portuguese propolis: usual and unusual
9 compounds. *Anal Bioanal Chem* 10 November 2009 doi: 10.1007/s00216-009-3232-8.
10
11 35. Ghedira K, Goetz P, Le Jeune R. Propolis. *Matière Médicale Pratique. Phytothérapie*
12 2009; 7: 100–105.
13
14 36. Lotti C, Campo Fernandez M, Piccinelli AL, Cuesta-Rubio O, Marquez Hernandez I,
15 Rastrelli L. Chemical constituents of red mexican propolis. *J Agric Food Chem* 2010;
16 58: 2209-2213.
17
18 37. Salatino A, Teixeira EW, Negri G, Message D. Origin and Chemical Variation of
19 Brazilian Propolis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2005; 2: 33-38.
20
21 38. Weinstein E. Seasonal Variation, Chemical Composition and Antioxidant Activity of
22 Brazilian Propolis Samples. *Evid based Complement Alternat Med*. 2008; 10: 1093-
23 1102.
24
25 39. Lakshmi V, Joseph SK, Srivastava S, Verma SK, Sahoo MK, Dube V, Mishra SK,
26 Murthy PK. Antifilarial activity *in vitro* and *in vivo* of some flavonoides tested against
27 *Brugia malayi* 6 July 2010; doi: 10.1016/j.actatropica.
28
29 40. Diaz NG, Carpinella MC, Palacios SM. Antifeedant activity of ethanolic extract from
30 *Flourensia oolepis* and isolation of pinocembrin as its active principle compound.
31 *Bioresource Technol* 2009; 100: 3669–3673.
32
33 41. Rasul A, Millimouno FM, Eltayb WA, Muhammad A, Li J, Li X. Pinocembrin: A
34 novel natural compound with versatile pharmacological and biological activities.
35 *Biomed Res Int* 5 August 2013; doi: 10.1155/2013/379850.
36
37 42. Rufino-Gonzalez Y, Pone-Macotela M, Gonzalez-Maciél A, Reynoso-Robles R,
38 Jimenez-Estrada M, Sanchez-Contreras A, Martinez-Gordillo M. *In vitro* activity of the
39 F-6 fraction of oregano against *Giardia intestinalis*. *Parasitology* 2012; 139: 434-440.
40
41 43. Keister DB. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented
42 with bile. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1983; 77: 487-488.
43
44 44. Grunberger D, Banerjee R, Eisinger K, Oltz EM, Efros L, Caldwell M. Preferential
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis.
Experientia 1988; 44: 230–232.

For Peer Review

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Antiparasitic activity of Sonoran Propolis. The antiparasitic activity of the Sonoran propolis was evaluated on the *in vitro* growth of *G. lamblia* trophozoites at different concentrations (0, 25, 50, 100 and 200 µg/mL). Propolis tested: **A)** UP, **B)** PAP, **C)** CP. Albendazole was used as a growth inhibition control, which inhibited more than 90% (10 µM) of the trophozoite proliferation. The tests were performed in triplicate (±SD) and at least two experiments in each condition were done. The antiparasitic activity was evaluated at 48 h after the addition of propolis extract. The asterisks on the bars show significant differences ($P < 0.05$) with respect to the control culture.

Figure 2. Morphological changes induced by UP on *G. lamblia* trophozoites. In order to observe the morphological changes induced by UP on *G. lamblia* trophozoites, photographs were taken in an inverted optical microscope (100 X, total magnification). **A)** Cells in monolayer, **B)** control DMSO (0.06 %), **C)** albendazole (10 µM), **D)** UP, 200 µg/mL, **E)** UP, 100 µg/mL, **F)** UP, 50 µg/mL and **G)** UP, 25 µg/mL.

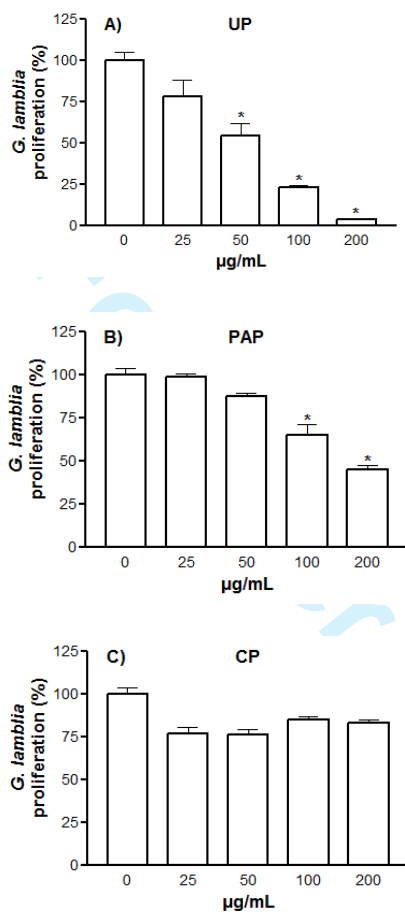
Figure 3. Seasonal effect on the growth-inhibitory activity of propolis on *G. lamblia* trophozoites. The seasonal effect was evaluated by using extracts of propolis, collected during different seasons of the year. Propolis was evaluated at different concentrations (0, 25, 50, 100 and 200 µg/mL). The propolis collected in **A)** SuP, **B)** WP, **C)** SP and **D)** AP inhibited the growth of *G. lamblia* trophozoites. Albendazole was used as a growth inhibition control, which inhibited more than 90% (10 µM) of the trophozoite proliferation. The tests were performed in triplicate (±SD) and at least two experiments in each condition were done. The antiparasitic activity was evaluated at 48 h after the addition of propolis extract. The asterisks on the bars show significant differences ($P < 0.05$) with respect to the control culture.

1
2
3 **Figure 4. Antiparasitic Activity of Sonoran Propolis Chemical Constituents.** The anti-
4 *G. lamblia* activity of several chemical constituents of Sonoran propolis were evaluated at
5 different concentrations (0, 25, 50, 100 and 200 µg/mL). **A)** CAPE, **B)** naringenin, **C)**
6 hesperetin, **D)** pinocembrin, **E)** chrysin and **F)** rutin. Albendazole was used as a growth
7 inhibition control, which inhibited more than 90% (10 µM) of the trophozoite proliferation.
8 The tests were performed in triplicate (±SD) and at least two experiments in each condition
9 were done. The antiparasitic activity was evaluated at 48 h after the addition of propolis
10 extract. The asterisks on the bars show significant differences ($P < 0.05$) with respect to the
11 control culture.
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

FIGURES

FIGURE 1



Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

FIGURE 2

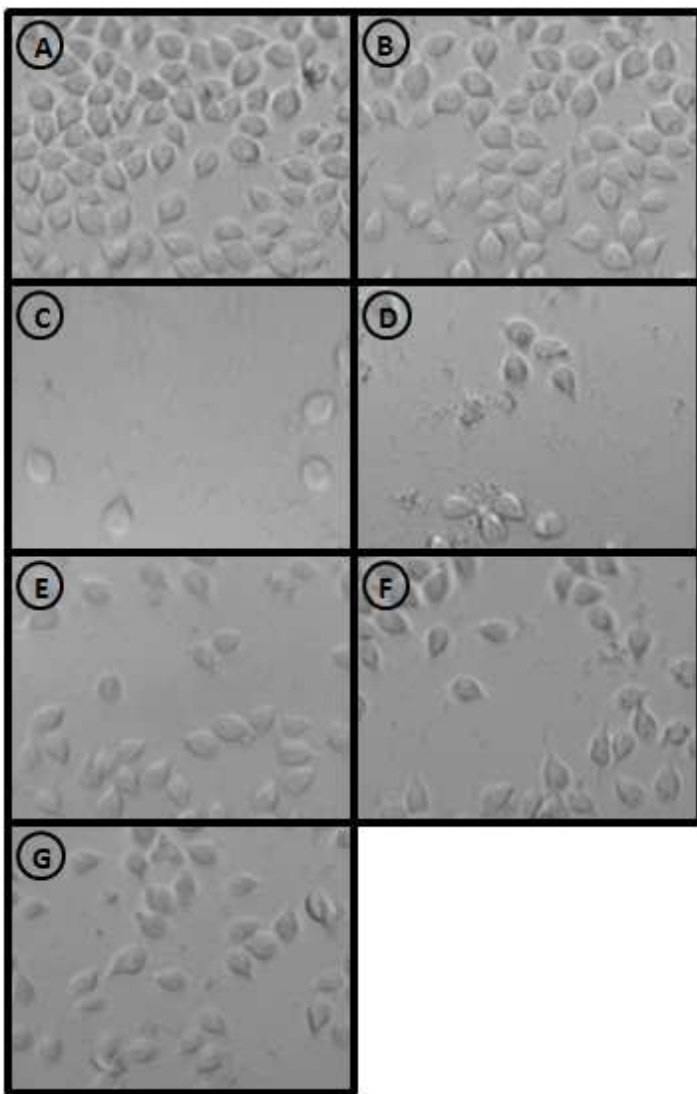


FIGURE 3

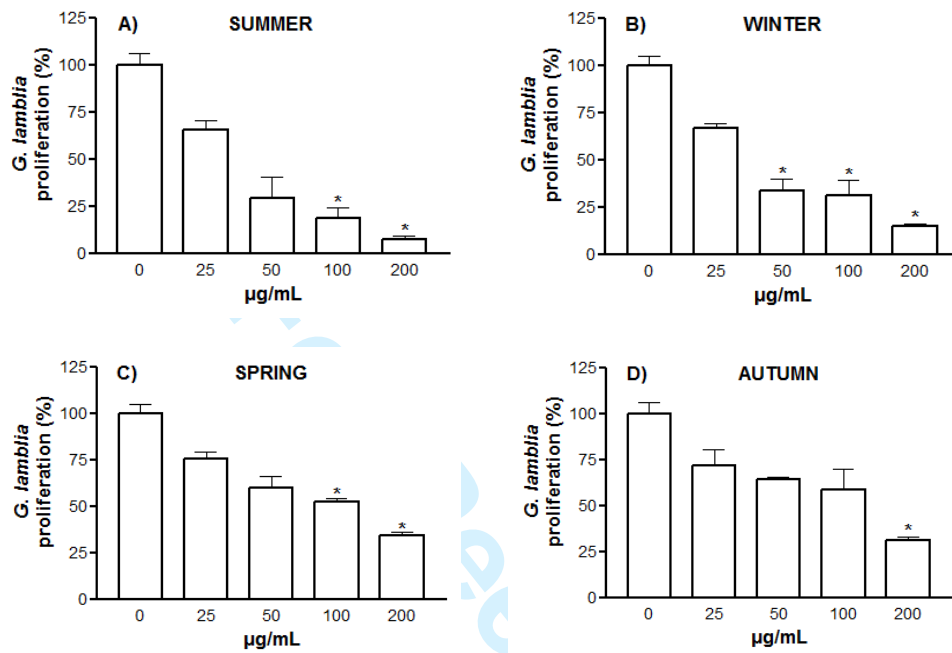


FIGURE 4

