



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERIA

**DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN POLÍMEROS Y
MATERIALES**

TESIS

**EVALUACIÓN DE PROPÓLEOS DE URES, SONORA COMO
MATERIAL BIOACTIVO / EFECTO DE LA
TEMPORALIZACIÓN SOBRE SU COMPOSICIÓN QUÍMICA
Y SUS ACTIVIDADES BIOLÓGICAS**

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIA DE MATERIALES

Por:

DORA EDITH VALENCIA RIVERA

Hermosillo, Sonora

Febrero de 2012

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

APROBACIÓN DE TESIS

Los miembros del jurado designado para revisar la tesis de doctorado de **Dora Edith Valencia Rivera** han dictaminado que el trabajo cumple satisfactoriamente como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencia de Materiales otorgado por la Universidad de Sonora.

Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras
(Presidente)

Dr. Enrique Fernando Velázquez Contreras
(Secretario)

Dr. Juan Carlos Gálvez Ruiz
(Vocal)

Dra. Adriana Garibay Escobar
(Vocal)

Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda
(Vocal)

Dr. Javier Hernández Martínez
(Vocal externo)

DEDICATORIAS

A Dios:

Por su infinito amor y bondad....por mantener firme mi fe hasta el final.

A mi amor:

Gracias por tu amor incondicional, por permitir realizarme en todos los aspectos de mi vida, simplemente porque sin tu apoyo no hubiera sido posible esto. Un millón de gracias **MI AMOR** y si te digo mi amor, no es porque que eres mi propiedad, sino porque eres importante para mí. No es decirte una frase hecha, sino renovar las palabras para que signifiquen, a cada instante, que verdaderamente te amo. Porque a cada instante quiero que sepas que eres mi amor, hoy y siempre.

A mis hijos, Clelia Edith, Ángel Hiram y a mi ángel de la guarda Fátimita:

Mis amores gracias por ser el motor que mueve mi vida. Por que de tras de todo este trabajo está el inmenso amor que siento por ustedes.

A mis padres:

Mamita, muchas gracias por el apoyo incondicional durante todos estos años. Gracias por todas tus palabras de aliento en los momentos más difíciles, gracias porque tu has sido mi ejemplo de fortaleza y amor sin límites. Papito, gracias por estar siempre a mi lado, por tu cariño y amor. Dios los bendiga hoy y siempre.

A toda mi familia:

A mi hermana Dulce, Vero y a mi Manita (Brenda), muchas gracias por todo. Porque sin Ustedes no hubiera podido combinar mi faceta de estudiante y mamá.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo económico para la realización de mis estudios de doctorado.

Mis mayores agradecimientos a la Universidad de Sonora por ser mi casa durante tantos años.

Agradezco al Departamento de Polímeros y Materiales (DIPM) de la Universidad de Sonora por todo el apoyo brindado durante mi formación doctoral, a todos mis maestros por todas sus enseñanzas. De manera muy especial extendo mi agradecimiento a Lolita y a Martha por todo su cariño, apoyo y paciencia.

Agradezco al Laboratorio de Biopolímeros del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) por permitirme el uso de sus instalaciones y equipos para la realización de este trabajo. De manera muy especial agradezco a la M.C. Karla Martínez Robinson y a la Q.B. Alma Campa por todo el apoyo técnico que me brindaron de manera incondicional durante la realización de esta investigación.

A los miembros del Cuerpo Académico de Bioquímica y Biología del Departamento de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad de Sonora, gracias por apoyarme siempre, por su amistad; gracias porque de cada uno de ustedes me llevo un aprendizaje de formación.

A los miembros del comité de tesis, Dra. Adriana Garibay Escobar, Dr. Juan Carlos Ruiz Gálvez, Dr. Ramón Robles Zepeda, Dr. Enrique Velázquez Contreras, Dr. Javier Hernández Martínez y Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras por sus valiosas observaciones y por su siempre disposición de apoyarme, gracias por todas sus enseñanzas y sobre todo gracias brindarme su amistad y confianza.

A mi director de tesis, Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras por haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, muchas gracias por toda su paciencia y apoyo, gracias por toda la enseñanza que recibí de Usted, espero que al paso de los años se sienta orgulloso de haber sido parte fundamental en mi formación doctoral.

De manera muy especial agradezco al Dr. Juan Carlos Gálvez por haberme interesado e invitado a formar parte del mundo de los productos naturales. Gracias.

A las maestras Lucila Rascón y Judith Valdez, por su valioso apoyo técnico pero sobre todo por su amistad y cariño, por hacerme sentir siempre como en casa.

A mis “doritos” Efraín, Jorge, Davisela, Sergio, Mario, Lily, Heriberto, Luisa y Zuilma, chicos muchas gracias por haberme permitido aprender junto con ustedes, por darme la oportunidad de conocerlos, por todo su apoyo, amistad y sobre todo gracias por tolerarme siempre.

A mis siempre amigas, “chamacas” Erika, Viviana y Sheyla gracias por su amistad incondicional, por estar siempre dispuestas a escucharme y animarme. Una de las cosas más valiosas que me llevo de los años que pase en la Universidad de Sonora es su amistad. Muchas Gracias.

Agradezco a de manera muy especial a todos mis compañeros de laboratorio que más que compañeros son amigos, Jael, Paola, Ivonne, Adriana, Wences, Iván, Samuel, Lulú, Anhait, Lucía y Ale muchas gracias por todo su apoyo y cariño. Gracias por ser mi segunda familia.

Agradezco a todos los que directa o indirectamente contribuyeron a la realización de este trabajo de investigación.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABLAS	v
RESUMEN	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Propóleos	4
2.2. Composición química de los propóleos	4
2.3. Actividades biológicas de los propóleos	6
2.4. Caracterización química y biológica de propóleos mexicanos	16
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. OBJETIVOS	20
4.1. General	20
4.2. Particulares	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS	21
5.1. Recolección de propóleos y obtención de los extractos metanólicos	21
5.2. Análisis por HPLC	22
5.3. Purificación y caracterización química de los propóleos	22
5.4. Líneas celulares	24
5.5. Evaluación de la actividad antiproliferativa	24
5.6. Determinación de la actividad antioxidante	25
5.7. Cuantificación del contenido de fenoles totales	26
5.8. Contenido de flavonas y flavonoles	26
5.9. Contenido de flavanonas y dihidroflavonoles	27
5.10. Análisis del mecanismo de inducción de muerte celular mediado por apoptosis	27

5.10.1. Marcaje con anexina V/Ioduro de propidio	27
	Página
5.10.2. Reducción del potencial de membrana mitocondrial	28
5.10.3. Evaluación de la actividad de las caspasas	29
5.11. Análisis estadístico	30
6. RESULTADOS	31
6.1. Características organolépticas de los propóleos rerecolectados	31
6.2. Efecto de la temporalización sobre la abundancia relativa de los principales constituyentes químicos identificados en propóleos de Ures, Sonora	31
6.3. Estabilidad en la composición química de los propóleos de la región de Ures, Sonora	34
6.4. Identificación de compuestos químicos presentes en los propóleos de Ures, Sonora	37
6.5. Efecto de la temporalización sobre la actividad antiproliferativa de los propóleos sonorenses	47
6.6. Efecto de la temporalización sobre la actividad antioxidante de los propóleos Sonorenses	52
6.7. Apoptosis inducida por acción de los propóleos de Ures, Sonora	55
6.8. Efecto de los propóleos sobre el potencial de membrana mitocondrial	57
6.9. Inducción de apoptosis por activación de la vía dependiente de caspasas	64
7. DISCUSIÓN	69
8. CONCLUSIONES	77
9. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO	78
10. BIBLIOGRAFÍA	79
11. APÉNDICES	88
12. ANEXOS	98

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Constituyentes químicos de los propóleos con actividad biológica.	15
2	Cromatogramas de HPLC de los propóleos sonorenses recolectados en las diferentes estaciones del año (obtenidos 340 nm).	33
3	Estructuras químicas de los compuestos identificados por HPLC a 340 nm en propóleos de Ures, Sonora.	35
4	Cromatograma de HPLC-MS de la fracción 4 obtenida por cromatografía en columna utilizando sephadex LH-20.	39
5	Cromatograma de HPLC-MS de la fracción 5 obtenida por cromatografía en columna utilizando sephadex LH-20.	40
6	Cromatograma de HPLC-MS de la fracción 6 obtenida por cromatografía en columna utilizando sephadex LH-20.	41
7	Cromatograma de HPLC-MS de la fracción 7 obtenida por cromatografía en columna utilizando sephadex LH-20	42
8	Cromatograma de HPLC-MS de la fracción 8 obtenida por cromatografía en columna utilizando sephadex LH-20.	43
9	Cromatograma de HPLC-MS de la fracción 9 obtenida por cromatografía en columna utilizando sephadex LH-20.	44
10	Cromatograma de HPLC-MS de la fracción 10 obtenida por cromatografía en columna utilizando sephadex LH-20.	45
11	Cromatograma HPLC-MS-QTOF de los propóleos rerecolectados en Ures, Sonora, obtenidos a 340 nm.	48
12	Ampliación del cromatograma HPLC-MS-QTOF de los propóleos recolectados en Ures, Sonora, obtenidos a 340 nm.	49
13	Ampliación del cromatograma HPLC-MS-QTOF de los propóleos recolectados en Ures, Sonora, obtenidos a 340 nm.	50

	Página
14	Espectro de masas del compuesto pinocembrina 5-metil-éter. 51
15	Patrón de fragmentación del compuesto pinocembrina 5-metil-éter. 51
16	Actividad antioxidante de los extractos de propóleos (DPPH). 54
17	Citogramas biparamétricos anexina V-FITC/yoduro de propidio de las células cancerígenas M12.C3.F6 después de 12 horas de incubación con propóleos recolectados durante las diferentes estaciones. 59
18	Cinética de la disminución del potencial de membrana mitocondrial en células M12.C3.F6. 61
19	Cambios en el potencial de membrana mitocondrial. 62
20	Cambios morfológicos observados en la línea celular cancerígena M12.C3.F6 a diferentes tiempos de incubación con CAPE (7.5 μ M) y propóleos recolectados en la temporada de primavera (50 μ g/mL). 63
21	Activación de la caspasa 3 en células M12.C3.F6. 65
22	Activación de la caspasa 9 en células M12.C3.F6. 66
23	Activación de la caspasa 8 en células M12.C3.F6. 68
24	Esquema de señalización de la vía intrínseca y extrínseca de apoptosis. 76

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Origen botánico y composición química de propóleos de diversas regiones del mundo.	7
2	Actividad antiproliferativa de propóleos con distinto origen geográfico.	12
3	Actividad antioxidante de propóleos de distintas regiones del mundo.	17
4	Rendimiento (%) de los extractos metanólicos obtenidos de los propóleos.	32
5	Características organolépticas de los propóleos recolectados.	32
6	Abundancia relativa (%) de los constituyentes químicos presentes en propóleos de Ures, Sonora.	36
7	Fracciones y rendimientos de los propóleos de invierno obtenidos por cromatografía en columna de sephadex LH-20.	38
8	Compuestos identificados en las fracciones obtenidas por cromatografía en columna de sephadex LH-20 de los propóleos de la región de Ures, Sonora.	46
9	Actividad antiproliferativa (IC_{50}) de los propóleos sonorenses.	53
10	Contenido de fenoles totales y flavonoides en los propóleos sonorenses (mg/g).	56
11	Evaluación de apoptosis inducida en células cancerígenas M12.C3.F6 por propóleos recolectados en las diferentes estaciones de año.	58

RESUMEN

Los propóleos son un material resinoso que las abejas recolectan a partir de exudados de hojas y cortezas de diversas plantas. Una vez recolectado, este material es enriquecido con secreciones enzimáticas y salivares de la abeja. Este producto natural es ampliamente utilizado en la medicina tradicional y como aditivo en alimentos en muchas partes del mundo. El objetivo principal de esta investigación fue evaluar el efecto de la temporalización de colecta de los propóleos de la región de Ures, Sonora sobre su composición química y actividades biológicas (actividad antiproliferativa y antioxidante), así como el papel que desempeña la apoptosis en el efecto antiproliferativo de los propóleos. Los propóleos fueron recolectados durante las cuatro estaciones del año. La composición química y las actividades antiproliferativa y antioxidante fueron evaluadas por HPLC, ensayo de reducción del MTT y el método del DPPH, respectivamente. La determinación del papel de apoptosis en la acción antiproliferativa de los propóleos se llevó a cabo por la correlación de resultados encontrados por tres técnicas de citometría de flujo (doble marcaje con anexina V-FITC/ioduro de propidio, determinación de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial con el autoflorocromo JC-1 y la evaluación de la activación de caspasas 3, 8 y 9). La abundancia relativa de los principales constituyentes químicos fue similar en todas las muestra de propóleos analizadas. En contraste, se observó una diferencia significativa en su actividad antiproliferativa sobre las diferentes líneas cancerígenas evaluadas (M12.C3.F6, HeLa, RAW, LS-180 y A-459). Los propóleos recolectados durante primavera mostraron el efecto inhibitorio de crecimiento más alto: primavera > invierno > verano ≈ otoño, manteniendo ese orden de actividad en todas las líneas celulares evaluadas. La actividad antiproliferativa ejercida por los propóleos fue mediada por un mecanismo de apoptosis activada por la vía de dependiente de caspasas. Todas las muestras de propóleos exhibieron baja actividad antioxidante. Los resultados obtenidos indican que la temporalización tiene un efecto importante y evidente sobre la propiedad antiproliferativa de los propóleos sonorenses.

ABSTRACT

Propolis are a resinous material collected by honey bees from exudates of leaves and barks of various plants, once collected, this material is enriched by enzymatic and salivary secretions of the bee. This natural product is extensively used in traditional medicine and as food additive all over the world. The main purpose of this research was to evaluate the effects of seasonality of propolis collected from the Ures, Sonora region on the chemical composition and biological activity (antiproliferative and antioxidant activity), and to elucidation the anticancer mechanism of this natural product. Propolis was collected during the four seasons of the year. The chemical composition, antiproliferative and antioxidant activity were evaluated by HPLC, reduction of MTT assay, and the DPPH method respectively. The elucidation of the mechanism of action was carried out by the correlation of the results obtained by several flow cytometry techniques (annexin V-FITC/Propidium iodide double labeling, determination of the loss of mitochondrial membrane potential with autofluorochrome JC-1, and the assessment of the caspases 3, 8 and 9 activation). The relative abundance of the main chemical constituents was similar in all the analyzed samples of propolis. By contrast, there was a significant difference in their antiproliferative activity on the different cancer cell lines tested (M12.C3.F6, HeLa, RAW, LS-180 y A-459). The Propolis collected during the spring season showed the highest growth-inhibitory effect, spring > winter > summer ≈ fall, maintaining that order of activity in all the cell lines tested. This antiproliferative activity exerted by Propolis was mediated by a caspases-dependant apoptosis mechanism. All the Propolis samples exhibited weak antioxidant activity. The results obtained indicate that seasonality has a significant and evident effect on the antiproliferative activity of sonoran propolis.

1. INTRODUCCIÓN

Los propóleos son un material resinoso elaborado por las abejas a partir de exudados que recolectan de brotes, tallos y hojas de ciertas plantas (Hernandez et al. 2007, Lotti et al. 2010). Este producto natural ha sido utilizado en la medicina tradicional desde tiempos muy remotos, 300 A.C. (Ghisalberti 1979). Los propóleos poseen un amplio espectro de actividades biológicas: anticancerígena (Bufalo et al. 2009, Hernandez et al. 2007, Li et al. 2009), antioxidante (Ahn et al. 2004, Lima et al. 2009, Velazquez et al. 2007), fungicida (Majiene et al. 2007, Sforcin et al. 2001), antibacterial (Jorge et al. 2008, Popova et al. 2005, Sforcin et al. 2000, Velazquez et al. 2007), antiviral (Amoros et al. 1994), antiinflamatoria (Paulino et al. 2003), entre otras. Debido a esta gran variedad de actividades biológicas, este producto natural es ampliamente utilizado en la industria de los alimentos, cosmetología y en productos medicinales alternativos así como remedios caseros. Desafortunadamente, los propóleos pueden causar serios efectos secundarios, ya que se ha demostrado que pueden causar reacciones alérgicas en algunos individuos (Munstedt y Kalder 2009, Walgrave et al. 2005). Estas observaciones enfatizan la necesidad de incrementar el conocimiento sobre la caracterización química y biológica de los propóleos, lo cual contribuiría en el uso apropiado de este producto natural en pro de la salud. En la actualidad, se han identificado más de 300 compuestos como constituyentes químicos de los propóleos de diversas partes del mundo, entre los que destacan ácidos fenólicos, terpenos, ácido cinámico, ácido cafeico, flavonoides y algunos de sus ésteres (Paulino et al. 2003, Salatino et al. 2005, Senedese et al. 2008). La composición química de los propóleos es cualitativa y cuantitativamente variable, la cual depende del tipo de vegetación presente en el área y tiempo de recolección (Ahn et al. 2004, Jorge et al. 2008, Lotti et al. 2010, Piccinelli et al. 2005). Entre los principales constituyentes de los

propóleos con origen geográfico en Europa, China y Norte América destacan flavonoides y ésteres de ácidos fenólicos (Bankova, de Castro y Marcucci 2000, Chen et al. 2004, Lotti et al. 2010), mientras que las principales clases de compuestos que predominan en los propóleos brasileños están diterpenos, lignanos, derivados prenilados del ácido *p*-cúmarico, sesquiterpeno y acetofenonas (Bankova 2005, Piccinelli et al. 2005). En trabajos previos nuestro grupo de investigación ha identificado y cuantificado los principales constituyentes químicos presentes en los propóleos sonorenses, principalmente de tipo flavonoide los cuales poseen una fuerte actividad antiproliferativa sobre diversas líneas celulares cancerígenas, encontrando pautas que sugieren que esta actividad está mediada por apoptosis (Hernandez et al. 2007), así como una potente actividad antibacterial (Velazquez et al. 2007). Actualmente, existe un número limitado de estudios enfocados a evaluar el efecto de la temporalización sobre las diversas actividades biológicas y composición química de los propóleos. Sforcin et al. reportaron que no se presenta un efecto significativo de la temporalización sobre las propiedades antibacteriana e inmunoregulatoria de los propóleos (Sforcin et al. 2000, Sforcin et al. 2001, Sforcin et al. 2002). Se ha reportado el efecto de la temporalización de los propóleos recolectados en Brasil sobre la actividad antioxidante, donde se observa una variación de esta actividad así como del contenido de fenoles totales en dependencia del mes de colección (Teixeira et al. 2010); esta observación concuerda con los datos reportados por Isla et al. y Chen et al. quienes observaron el mismo efecto (Chen et al. 2008, Isla et al. 2009). Adicionalmente, existen reportes en la literatura que demuestran que la temporalización no tiene un efecto sobre la composición química cualitativa de los propóleos, pero que si influye en el perfil químico cuantitativo de éstos (Simoës-Ambrosio et al. 2010). Con base a lo anterior, el presente estudio tuvo como finalidad evaluar el efecto de la temporalización sobre la composición química y actividades biológicas de propóleos recolectados en la región de Ures, Sonora, así como determinar el papel de

apoptosis en la acción antiproliferativa de los propóleos. El conocimiento generado en este trabajo de investigación incidirá significativamente en la caracterización y estandarización de este producto natural, lo cual podría tener impacto en la aplicación práctica de los propóleos en las industrias alimentarias y farmacéuticas.

2. ANTECEDENTES

2.1. Propóleos

El propóleo es una resina cerosa, de composición compleja que las abejas elaboran a partir de exudados resinosos que colectan de diferentes fuentes vegetales y lo utilizan en la construcción, reparación y protección de la colmena (Burdock 1998). Este producto natural ha sido utilizado en la medicina tradicional con diversas finalidades desde los años 300 A.C. (Banskota et al. 2002). Actualmente, se encuentra documentado en la literatura que posee una amplia variedad de actividades biológicas: anticancerígena (Bufalo et al. 2009, Hernandez et al. 2007, Li et al. 2009), antioxidante (Ahn et al. 2004, Lima et al. 2009, Velazquez et al. 2007), fungicida (Majiene et al. 2007, Sforcin et al. 2001), antibacterial (Jorge et al. 2008, Popova et al. 2005, Sforcin et al. 2000, Velazquez et al. 2007), antiviral (Amoros et al. 1994), antiinflamatoria (Paulino et al. 2003), antiparasitaria (Dantas et al. 2006, Abdel-Fattah y Nada 2007, Machado et al. 2007), entre otras. Con base en estas propiedades en las últimas dos décadas, se han realizado importantes avances en el entendimiento de las actividades biológicas y caracterización química de los propóleos, así como sus posibles aplicaciones en industria farmacéutica y alimentaria.

2.2. Composición química de los propóleos

La composición química de los propóleos es cualitativamente y cuantitativamente variable. Esta depende de la estación (temporada climática) y zona geográfica donde las abejas los recolectan, así como la flora local que predomina en ella (Ahn et al. 2004, Piccinelli et al. 2005, Lotti et al. 2010). Estos factores dan lugar a una gran diversidad en la composición química de los propóleos. Actualmente, más de 300 compuestos han sido identificados como principales constituyentes de los propóleos de diferentes zonas geográficas del mundo entre los que se pueden

mencionar ácidos fenólicos, flavonoides, terpenos, ácidos cinámicos, ácido cafeico y algunos de sus ésteres (Paulino et al. 2003, Salatino et al. 2005, Senedese et al. 2008). En los propóleos de las regiones templadas como Europa, Asia y Norte América la principal fuente de las resinas recolectadas por las abejas tienen su origen en distintas especies de árboles de álamo, principalmente, *Populus nigra*. Por lo cual, en su composición química se encuentran reportados principalmente compuestos de tipo fenólicos, como flavonoides agliconas (flavonas y flavanonas), ácidos aromáticos y sus ésteres, los cuales se han encontrado característicamente en especies de *Populus spp* (Bankova et al. 2000). Debido a que la composición química depende fuertemente de las condiciones fitogeográficas de la región, los propóleos de las regiones tropicales son químicamente distintos a los reportados en las zonas templadas. La principal fuente botánica de los propóleos brasileños es *Bacharis drancunculifolia*. Entre los compuestos mayoritarios encontrados en los propóleos brasileños, conocidos como “green propolis”, de la región sureste de Brasil, se han reportado fenilpropanoides prenilados, benzofuranos, monoterenos y sesquiterpenos (Salatino et al. 2005). También se ha reportado la presencia de ácidos p-coumárico prenilados, acetofenonas, lignanos, diterpenos y triterpenos (Bankova et al. 2000). En años recientes, se ha reportado un nuevo tipo de propóleo brasileño, “red propolis”, que contiene compuestos diferentes a los encontrados en el “green propolis”, los cuales incluyen isoflavonoides y benzofenonas preniladas (Li et al. 2008). Los principales componentes reportados en propóleos cubanos (“brown-type propolis”) son benzofenonas polipreniladas, cuyo origen botánico es la especie *Clusia rosea* (Bankova et al. 2000, Piccinelli et al. 2005), que es una especie de árboles ampliamente distribuidos en esa región. De manera contraria, en los llamados propóleos rojos cubanos (“red-type propolis”) se ha reportado como componentes químicos mayoritarios isoflavonoides y pterocarpanos, cuyo origen botánico se ha atribuido a la familia de las leguminosas (Piccinelli et al. 2005); lo que los hace químicamente diferentes a los propóleos de las regiones templadas y propóleos de origen brasileño; en investigaciones realizadas en propóleos rojos mexicanos (“red-mexican propolis”) se ha reportado la presencia de flavanonas,

isoflavonoides y pterocarpanos (Lotti et al. 2010), por lo cual este tipo de compuestos podrían constituir marcadores químicos de propóleos tipo rojo. La composición química de los propóleos de las regiones áridas y semiáridas también es distinta a los propóleos descritos anteriormente. Sin embargo, el trabajo de investigación en propóleos de este tipo de regiones es muy limitado. En propóleos de origen egipcio los principales constituyentes químicos que han sido reportados son ácidos alifáticos, ácidos aromáticos y sus esteres, di y triterpenos, y en cantidades menos significativas algunos flavonoides (Hegazi et al. 2000). Investigaciones de propóleos con origen en regiones áridas y semiáridas del Estado de Sonora han reportado que los compuestos que mayoritariamente constituyen estas resinas son flavonoides y el éster fenetílico del ácido cafeico (Hernandez et al. 2007), y recientemente se han obtenido datos que sugieren que el origen botánico de estas resinas son principalmente especies de álamo (*Populus spp*) (Alday 2012, Tesis de maestría en proceso). En la **tabla 1** se muestra el origen botánico y los principales constituyentes químicos identificados en propóleos recolectados en diversas regiones del mundo (Robles-Zepeda et al. 2012).

A pesar que la composición química de los propóleos no es constante ya que ésta varía en dependencia a las condiciones fitogeográficas de la zona de colección, de manera general están constituidos por 50% resinas, 30% cera, 10% aceites esenciales, 5% pollen y un 5% de otros compuestos orgánicos (Burdock 1998, Miguel et al. 2010).

2.3. Actividades biológicas de los propóleos

Las actividades biológicas de los propóleos y de sus constituyentes químicos que se han logrado aislar y caracterizar han sido ampliamente estudiadas. Una de las actividades biológicas más investigadas en propóleos de distinto origen geográfico es la capacidad de inhibición en la proliferación de células cancerígenas, esto debido a la necesidad actual de buscar nuevos compuestos de origen natural

Tabla 1. Origen botánico y composición química de propóleos de diversas regiones del mundo

Fuente geográfica	Compuestos identificados	Fuente botánica
Argentina	Ácido ferúlico, ácido cinámico, ácido gálico, 1,1-dimetil-alil- ácido cafeico, apigenina, crisina, galangina, kaempferol, kaempferide, pinocembrina, pinobanksina, quercetina, tectocrisina, 2',4'-dihidroxichalcona	Desconocida
Brasil	Hiperibona A, benzofurano A, benzofurano B, ácido cumárico, ácido ferúlico, dimetilalil ácido cafeico, pinobanksina, kaempferol, apigenina, isosakuranetina, pinocembrina, 3-acetato de pinobanksina, crisina, galangina, kaempferide, tectocrisina, artepillin C, melliferona, ácido morónico, ácido anwuweizónico, ácido betulónico	<i>B. dracunculifolia</i> , <i>Clusia minor</i> , <i>C. major</i> , <i>Araucaria heterophylla</i> , <i>H. divaricata</i> , <i>Myrceugenia euosma</i>
Bulgaria	Ácido benzoico, ácido <i>p</i> -coumárico, ácido 3,4-dimetoxi-cinámico, ácido ferúlico, ácido isoferúlico, ácido cafeico, bencil cafeato, fenetil cafeato, 3,3-dimetilalil cafeato, isopentil-3-enil cafeato, pinocembrina, galangina, crisina, tectocrisina, quercetina, isoramnetina, kaempferol, pinostrobina, 3-etanoato de pinobanksina, 3-butanoato de pinobanksina, 3-pentanoato de pinobanksina	<i>Populus nigra</i>
Chile	Ácido cafeico; ácido <i>p</i> -coumárico, ácido ferúlico, éster fenético del ácido cafeico, trimerico coniferil alcohol (1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,2-bis{4-[(<i>E</i>)-3-acetoxipropen-1-il]-2 metoxifenoxi}propan-3-ol acetato, 1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-{4-[(<i>E</i>)-3-acetoxipropeno- 1-il]-2 metoxifenoxi}propan-1,3-diol-3 acetato, eritro 1-(4-hidroxi-3 metoxifenil)-2-{4-[(<i>E</i>)-3-acetoxipropen-1-il]-2 metoxifenoxi} propan-1,3-diol 3-acetato, galangina	Desconocida
China	Ácido cafeico, ácido <i>p</i> -coumárico, ácido ferúlico, ácido 3,4-dimetoxicinámico, cinamil cafeato, ácido cinamilideneacético, éster fenético del ácido cafeico, ácido isoferúlico, ácido 3,4-dimetoxicinámico; bencil ferulato; bencil cafeato; pinobanksina-5-metil éter, pinobanksina, crisina, pinocembrina, galangina, 3-acetato de pinobanksina, tectocrisina, 3-O-[(<i>S</i>)-2-metilbutiroil] pinobanksina,	<i>Populus spp.</i>

Continuación tabla 1...

	6-cinamilcrisina, izalpinina, apigenina, pinostrobina, rutina, miricetina, quercetina, kaempferol, apigenina	
Cuba	Ácido gálico, lanosterol, β -amirona, β -amirina, germanicol, α -amirona, α -amirina, lupeol, cicloartenol, acetato de lanosterol, acetato de β -amirina, acetato de lupeol, vesticarpan isoliquiritigenin, liquiritigenin, biochanin A, formononetin, vestitol, neovestitol, 7-O-metillvestitol, medicarpin pterocarpanos, homopterocarpin, 3,8-dihidroxi-9-metoxiptero carpano, 3-hidroxi-8,9-dimetoxipterocarpano, 3,4-dihidroxi-9-metoxipterocarpano, mucronulatol, nemorosona, plukenetiona A	<i>Clusia minor</i> , <i>Clusia rosea</i>
Cyprus	Totarol, trans-cariofileno, óxido de cariofileno	Desconocida
Grecia	Trans-communal, totarol, 13-epi-manool, copalol, ácido trans-comúnico, ácido pimárico, totarolone, ácido 14,15-dinor-13-oxo-8(17)-labden-19-oico, ácido junicedrico, isoramnetin-3-O-rutinosido, totarol, ácido comúnico, ácido cupressico, ácido isocupressico, ácido 14,15-dinor-13-oxo-8(17)-labden-19-oico, isoagatolal, agatadiol	<i>Pinus spp.</i>
India	Pinocembrina, galangina	Desconocida
Irán	Ácido benzoico, ácido trans-4-coumárico, ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido 3,4-dimetoxicinámico, éster de cafeato, éster de coumarato, éster de ferulato, éster de cinamato, pinobanksina, 3-acetato de pinobanksina, pinocembrina, pinostrobina	<i>Populus species</i>
Japón	Propolin A, propolin B, propolin E, 3'-geranil-naringenina, nimfaeol-B, isonimfaeol-B, nimfaeol-A, prokinawan	Desconocida
Kenia	Tetrahidrojusticidin B, 6-metoxidifillin, difillin, 6-hidroxi-justicidin A, fillamiricina,	Desconocida

Continuación tabla 1...

	macarangina, schweinfurthin A, schweinfurthin B	
Korea	Ácido cafeico, ácido <i>p</i> -coumárico, ácido 3,4-dimetoxicinámico, ácido cinamilideneacético, fenetil cafeato, cinamil cafeato, pinobanksina 5-metil-éter, apigenina, kaempferol, pinobanksina, crisina, pinocembrina, galangina, 3-acetato de pinobanksina, tectocrisina	<i>Populus</i> spp.
México	Pinobanksina, pinocembrina, 3-acetato de pinobanksina, CAPE, crisina, galangina, acacetina, xantomicol, naringenina, mucronulatol, arizonicanol A, vestitol, melilotocarpán A, melilotocarpán D, cinamil benzoato, bencil cinamato, cinamil cinamato, pinostrobin, tectocrisina, 3-acetato de alpinona, izalpinin, alpinona, 3-propionato de pinobanksina, 3-isobutirato de pinobanksina, pinobanksina 3-(2-metil)-butirato, 3,7-dihidroxi-5-metoxi flavanona, cinamil <i>p</i> -coumarato, 8-[4-fenetilprop-2-en-1-ona]-4',7-dihidroxi-3',5-dimetoxiflavan-3-ol, 2-acetil-1,3-di-(<i>E</i>)-feruloilglicerol, 4',7-dihidroxi- 3-metoxiflavona	Desconocida
Nueva Zelanda	Ácido cinámico, pinobanksina, pinocembrina, 3-acetato de pinobanksina, ácido 1,1-dimetil-alil-cafeico, crisina, galangina, pinocembrina 7-metil éter, crisina 7-metil éter, galangina 7-metil éter	Desconocida
Polonia	Ácido gálico, ácido clorogénico, ácido vanílico, ácido cafeico, vanilina, ácido coumárico, ácido ferúlico, ácido rosmarinico, ácido cinnamico	Desconocida
España	Episesamin, metil xantoxilol, piperonal, linalil propionato, geraniol, germacrena, ledena	Desconocida
Suiza	Dicoumaroil acetil glicerol, diferuloil acetil glicerol, feruloil coumaroil acetil glicerol, cafeoil coumaroil acetil glicerol, pinocembrina, 3-O-acetato de pinobanksina, galangina	<i>Populus tremula</i>
Taiwán	Propolin A, propolin B	Desconocida

Continuación tabla 1...

		<i>Cistus</i> spp.
Túnez	Miricetina 3,7,4',5'-tetrametil éter; quercetina 3,7,3'-trimetil éter; crisina, galangina, tectocrisina, pinocembrina, pinobanksina, dimetilalil cafeato, fenetil cafeato	
Turquía	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico, vanilina, ácido <i>p</i> -coumárico, ácido gálico, ácido ascórbico, ácido ferúlico, bencil <i>p</i> -coumarato, bencil ferulato, fenetil cafeato, cinamil cinamato, 3,3-dimetilalil cafeato, isopent-3-enil cafeato, ácido cafeico, ácido siringico, ácido ellágico, pinocembrina, pinobanksina, 3-O-acetato de pinobanksina, crisina, galangina, quercetina, pinostrobina, isalpinina, naringenina, α -tocoferol, pirogalol	<i>Populus nigra</i> <i>Populus euphratica</i>
Uruguay	Ácido <i>p</i> -coumárico, ácido cafeico, ácido 3,4-dimetoxicinámico, ácido cinamilideneacético, 2-metil-2-butenil <i>p</i> -coumarato, 3-metil-3-butenil ferulato, fenetil cafeato, 3-(2-metil)butirato, pinobanksina 3-isobutirato, pinobanksina 3-hexanoato, pinobanksina 3-butanoato, pinobanksina 3-propanoato, 3-acetato de pinobanksina, 3-acetilalpinona, pinobanksina 5-metil éter, pinobanksina, pinostrobina, pinocembrina, crisina, tectocrisina, crisina 5-metil éter, galangina, izalpinin, kaempferol, quercetina 3-metil éter	<i>Populus</i> spp.
Venezuela	Scrobiculatona A, scrobiculatona B, 18-etiloxi-17-hidroxi-17,18-dihidroscrobiculatona A, 18-etiloxi-17-hidroxi-17,18-dihidroscrobiculatona B	<i>Clusia scrobiculata</i>

con actividad anticancerígena, los cuales puedan convertirse en candidatos para la aplicación en el tratamiento contra el cáncer.

Se ha reportado que los propóleos con origen geográfico en Europa, Asia y América poseen una importante actividad *in vitro* sobre distintas líneas celulares cancerígenas. Se ha logrado identificar algunos de los constituyentes químicos responsables de dicha actividad (**tabla 2**) (Robles-Zepeda et al. 2012). En propóleos provenientes de América del Sur se han identificados benzofuranos (Banskota et al. 2000), flavonoides (flavonoles, flavanonas, isoflavonas) (Li et al. 2008, Banskota et al. 1998) y benzofenonas poli-isopreniladas (Cuesta-Rubio et al. 2002) como los principales compuestos que contribuyen a la actividad antiproliferativa de estos propóleos. En propóleos recolectados en América del Norte (México), se les ha atribuido esta actividad principalmente a flavonoides y al éster fenético del ácido cafeico (CAPE) (Hernandez et al. 2007, Li et al. 2010). Algunos compuestos derivados del ácido cinámico (benzilcafeato, fenetilcafeato, cinamilcafeato), flavonoides (flavonoles, flavanoles, prenilflavanonas) (Banskota et al. 2002) y algunos triterpenos tipo cicloartanos (Li et al. 2009) son parcialmente responsables del efecto antiproliferativo de los propóleos Europeos y Asiáticos (**figura 1**).

El mecanismo de acción por medio del cual los propóleos ejercen su actividad antiproliferativa sobre las células cancerígenas no se ha descrito completamente. Sin embargo, se han encontrado datos que sugieren que su efecto citotóxico puede deberse a la inducción de apoptosis. Estos datos han sido evidenciados por distintas técnicas, algunas como microscopía convencional (observación de los cambios típicos de apoptosis), electroforesis en gel de agarosa (patrón de fragmentación del ADN), inmunohistoquímica, citometría de flujo, detección *in situ* de la fragmentación del ADN (ensayo de TUNEL) entre otros métodos. Se han identificado algunos constituyentes químicos en los propóleos con capacidad de inducir apoptosis, entre los que se pueden mencionar el CAPE (Chen et al. 2001, Nagaoka et al. 2002), crisina (Khoo et al. 2010, Woo et al. 2004), propolin C (Chen et al. 2004), artipillin C (Kimoto et al. 1998, Kimoto et al. 2001).

Tabla 2. Actividad antiproliferativa de propóleos con distinto origen geográfico

Continente	Fuente geográfica	Línea celular cancerígena		Compuesto responsable de la actividad
		Humano	Murino	
Europa	Turquía Manisa Grecia	Carcinoma colon (HT-29) Fibrosarcoma (HT-1080) Adenocarcinoma de pulmón (A549) Carcinoma de mama (MCF-7) Leucemia linfoblástica aguda de células T (CCFR-CEM)	Colon Carcinoma (26-L5) Melanoma (B16-BL6)	Flavonoides Derivados del ácido cinámico (ej. bencil cafeato, fenetil cafeato, cinamil cafeato) Diterpeno (ej. manool)
América del Sur	Brasil	Fibrosarcoma (HT-1080) Carcinoma laringeal epidermoide (Hep-2) Linfoma histiolítico (U937) Carcinoma colon (CaCo2, HTC-116, HT-29, SW480) Leucemia mieloide (HL-60) Adenocarcinoma de pulmón(A549) Adenocarcinoma de cérvix (HeLa) Cáncer pancreático (PANC-1)	Carcinoma colon (26-L5) Melanoma (B16-BL6) Carcinoma de pulmón Lewis	Derivados de benzofuranos (ej. benzofurano A y benzofurano B) Flavonoides (ej. betuletol, kaempferide, ermanin) Coniferil aldehído Flavanonas (7-hidroxi-6-metoxi-flavanona) Isoflavonas Isoflavona (ej. mucronulatol) (6aR,11aR)-3,8-dihidroxi-9-metoxipterocarpan (DMPC)
	Cuba	Carcinoma de mama (MCF-7) Adenocarcinoma cérvix (HeLa) Carcinoma laringeal epidermoide (Hep-2)		Benzofenonas poliisopreniladas (ej. nemorosona)

Continuación tabla 2...

		Cáncer de próstata (PC-3) Carcinoma bucal (U251)		
	Chile	Cáncer de próstata (DU-145) Carcinoma de colon (CaCo2) Carcinoma bucal (KB)		No reportado
América del Norte	México	Cáncer pancreático (PANC-1) Adenocarcinoma de cérvix (HeLa) Adenocarcinoma de pulmón (A549) Adenocarcinoma colon (LS-180)	Linfoma de células B (M12.C3.F6) Macrofago, transformado por el virus de la leucemia de Abelson (RAW)	Flavonoides[(7''R)-8-[1-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)prop-2-en-1-il]galangina]
Asia	China	Carcinoma colon (CaCo2, HTC-116, HT-29, SW480) Adenocarcinoma de cérvix (HeLa) Fibrosarcoma (HT-1080) Adenocacinoma de pulmón (A549)	Carcinoma colon (26-L5) Melanoma (B16-BL6)	Flavanol (1a, 1b) Flavonoides (ramnetina) Derivados del ácido cinámico (ej. bencil cafeato, fenetil cafeato, cinamil cafeato)
	Taiwán	Glioblastoma (DBTRG-05MG) Cáncer de pulmón (H460) Melanoma (A2058) Carcinoma de mama (MCF-7) Hepatoblastoma (Hep.G2)	C6 glioma Melanoma (B16F10)	Prenilflavanonas (propolin G, propolin H, propolin C)

Continuación tabla 2...

	Carcinoma hepatocelular (Hep.3B) Adenocarcinoma de colon (HT- 29)		
Irán	Cáncer pancreático (PANC-1)	Mieloma (SP20)	Cicloartano tipo triterpenos
Myanmar	Carcinoma de colon(SW620)		[ácido (22Z,24E)-3-oxocicloart-
Tailandia	Adenocarcinoma de cérvix (HeLa) Carcinoma laringeal epidermoide (Hep-2)		22,24-dien-26-oico] Flavonoides

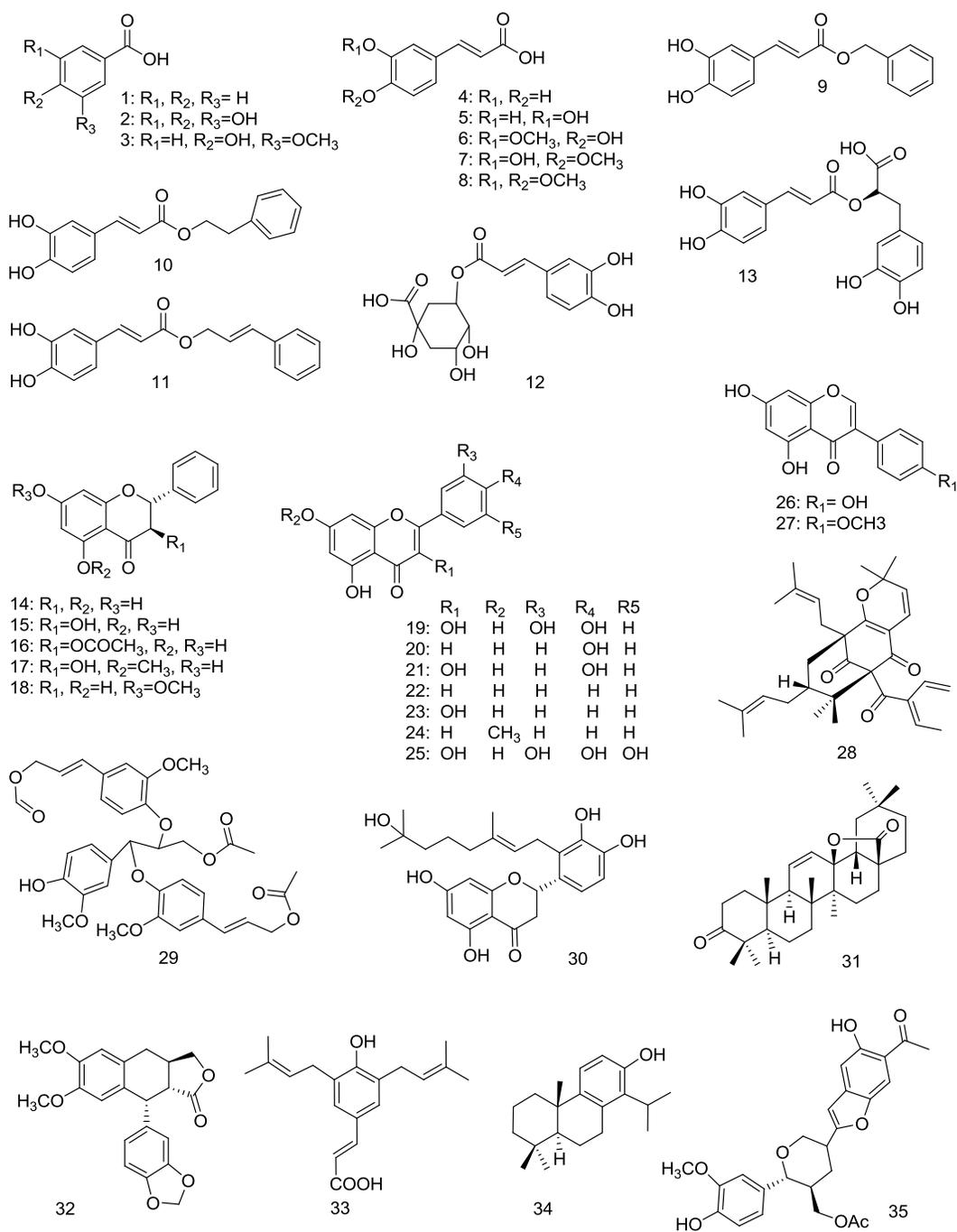


Figura 1. Constituyentes químicos de los propóleos con actividad biológica. 1, ácido benzoico, 2, ácido gálico, 3, ácido vanílico, 4, ácido cinámico; 5, ácido *p*-coumárico; 6, ácido ferúlico; 7, ácido isoferúlico; 8, ácido 3,4-dimetoxicinámico; 9, bencil cafeato, 10, fenetil cafeato, 11, cinamil cafeato; 12, ácido clorogénico; 13, ácido rosmarínico ; 14, pinocembrina; 15, pinobanksina; 16, 3-acetato de pinobanksina; 17, pinobanksina 5-metil éter; 18, pinostrobinina; 19, quercetina; 20, apigenina; 21, kaempferol; 22, crisina; 23, galangina; 24, tectocrisina; 25, miricetina; 26, genisteína; 27, biochanina A; 28, scrobiculatona A; 29 , alcohol acetato coniferil trimérico; 30, propolin A; 31, meliferona; 32, tetrahidrojusticidin B; 33, artepillin C; 34, totarol; 35, propolis-benzofuranos A

Otra de las actividades biológicas que poseen los propóleos que se encuentra ampliamente documentada en la literatura es su actividad antioxidante. Esta actividad biológica de los propóleos ha sido atribuida principalmente a la presencia de flavonoides, derivados del ácido hidroxicinámico así como al ácido cafeico y sus derivados (**tabla 3**) (Robles-Zepeda et al. 2012). Entre los constituyentes químicos que exhiben actividad antioxidante se encuentran algunos flavonoides como galangina, kaempferol, quercetina y rutina (Ahn et al. 2004, Velazquez et al. 2007, Gregoris y Stevanato 2010, Laskar et al. 2010), prenilflavanonas como propolin A, propolin B, prokinawan, nymphaeol A, nymphaeol B y nymphaeol C (Kumazawa et al. 2007, Chen et al. 2001), algunos ácidos hidroxicinámicos entre los que se han reportado el ácido cinámico, ácido coumárico y el ácido ferúlico (Kumazawa et al. 2010, Kalogeropoulos et al. 2009); también se ha reportado importante actividad antioxidante de CAPE (un derivado del ácido cafeico)(Ahn et al. 2007, Velazquez et al. 2007), algunos terpenos como el ácido ursólico (Kalogeropoulos et al. 2009) y se han reportado también que algunas benzofenonas preniladas como xantomicrol y gutiferona E poseen esta actividad (Trusheva et al. 2006) (**figura 1**).

2.4. Caracterización Química y Biológica de Propóleos Mexicanos

Actualmente, la investigación sobre la caracterización química y biológica de los propóleos de origen mexicano es incipiente. Hace pocos años, se caracterizaron químicamente propóleos recolectados en el estado de Campeche, México, en los que se identificaron como principales constituyentes químicos a lactonas, saponinas, fenoles, triterpenos, taninos, alcaloides y flavonoides; adicionalmente la caracterización biológica de éstos indicó una actividad antibacteriana importante (Tolosa et al. 2002). Estudios acerca de la composición química de propóleos rojos del Estado de Yucatán indican que los principales constituyentes de éstos son flavonas, isoflavonas y pterocarpanos. Estos compuestos son propios de la familia Leguminacea, asociándose de esta manera el perfil de composición química de los propóleos rojos de Yucatán al género *Dalbergia* como posible origen botánico

Tabla 3. Actividad antioxidante de propóleos de distintas regiones del mundo

Continente	Fuente geográfica	Compuesto responsable de la actividad
Europa	Grecia Venecia Croacia Portugal Turquía	Ácidos hiroxicinámicos (cinámico y ferúlico) Antraquinonas (emodin) Terpenos (ácido ursólico) Ácido cafeico y sus derivados (CAPE y DMAC) Flavonoides (galangina, kaempferol y quercitina)
Asia	Japón Corea China India Indonesia Taiwán	Ácido cafeico y CAPE Fenetilcafeato Prenilflavanona (Propolin A, propolin B, prokinawan, nymfaeol-A, nymfaeol-B, nymfaeol-C) Flavonoides (Kaempferol, galangina) Ácidos hidroxicinámicos (ácido ferúlico)
América del Sur	Brasil Argentina Chile	Benzofenonas preniladas (Guttiferona E, xantomicrol) Ácidos hidroxicinámico (ácido ferúlico) Ácido cafeico y CAPE Cinamil cafeato Flavonoides (galangina)
América del Norte	Canadá México	Ácidos hiroxicinámicos (coumárico y cinámico) Hidroxiacetofenonas Dihidrochalconas Ácido cafeico y derivados Flavonoides (galangina, rutina)
África	Egipto	No determinada

(Lotti et al. 2010). Estos reportes constituyen parte de los pocos estudios existentes acerca de la caracterización de los propóleos mexicanos. En lo que respecta a los propóleos con origen en el Estado de Sonora, se ha encontrado que en propóleos recolectados en el municipio de Caborca, Sonora los principales constituyentes son flavonoides y flavanonas los cuales poseen actividad antiproliferativa *in vitro* (Li et al. 2010).

En nuestro grupo de investigación se han realizado diversos estudios con el objetivo de caracterizar química y biológicamente propóleos de diferentes regiones del estado de Sonora, México (Pueblo de Álamos, Caborca y Ures) (Hernandez et al. 2007, Velazquez et al. 2007). Entre los constituyentes más abundantes de los propóleos Sonorenses se encontraron pinocembrina, 3-acetato de pinobanksina y crisina (Hernandez et al. 2007). Los propóleos de Sonora, México, hasta ahora estudiados presentan diferentes actividades biológicas como son: antibacteriana (Velazquez et al. 2007), antioxidante (Velazquez et al. 2007), antiparasitaria (datos no publicados) y antiproliferativa *in vitro* (Hernandez et al. 2007). Con base a lo anterior, es necesaria la realización de más trabajos de investigación que permitan contribuir en la caracterización química y biológica de los propóleos de nuestra región, así como determinar el mecanismo de acción mediante el cual éstos efectúan sus actividades.

3. JUSTIFICACIÓN

Los estudios de investigación sobre las actividades biológicas y caracterización química de los propóleos sonorenses realizados en la Universidad de Sonora han demostrado que éstos poseen una potente actividad antiproliferativa, asimismo se ha logrado una caracterización química parcial de ellos. Estas propiedades posicionan a los propóleos como una fuente potencial para la búsqueda de compuestos químicos bioactivos con posibilidad de aplicaciones como nuevos tratamientos contra el cáncer, los cuales se busca que sean más efectivos y con menos efectos secundarios que los que existen actualmente, impactando de manera positiva en el bienestar de los pacientes así como en la continuidad del tratamiento. De manera conjunta es de gran relevancia conocer el mecanismo de acción mediante el cual éstos ejercen su actividad antiproliferativa, ya que esto constituye un punto muy importante en el descubrimiento de nuevas moléculas con actividad biológica. En la actualidad, es necesario incrementar nuestro conocimiento acerca de la composición química de los propóleos del Estado de Sonora, para ello es preciso llevar a cabo la identificación de los compuestos que participan directamente en la actividad antiproliferativa del propóleo. El conocimiento del efecto de la temporalización sobre las propiedades químicas y biológicas contribuye a la caracterización y estandarización de este producto natural lo cual podría ser importante para la aplicación práctica de los propóleos en las industrias farmacéuticas y de alimentos.

4. OBJETIVOS

4.1. General

Evaluar el efecto de la temporalización de los propóleos de la región de Ures, Sonora sobre su composición química y actividades biológicas (antioxidante y anticancerígena).

4.2. Particulares

- 1) Evaluar el efecto de la temporalización sobre el perfil químico de los extractos metanólicos de los propóleos recolectados en la región de Ures, Sonora.
- 2) Identificar y caracterizar mediante HPLC y HPLC-MS-QTOF los compuestos presentes en los propóleos de la región de Ures, Sonora.
- 3) Evaluar el efecto de la temporalización de la recolecta de los propóleos de la región de Ures, Sonora sobre sus actividades biológicas:
 - a) Actividad antiproliferativa en líneas celulares cancerígenas de humano y ratón.
 - b) Actividad antioxidante por medio del método del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).
- 4) Analizar el papel de apoptosis en la acción antiproliferativa inducida por propóleos de Ures, Sonora, sobre células cancerígenas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Recolección de propóleos y obtención de los extractos metanólicos

Los propóleos se recolectaron de doce colmenas ubicadas en el predio San Enrique, en San Rafael de Ures, Sonora, zona conocida como “el coyote” (N 29°27.181', W 110°23.398) en cada una de las estaciones del año comprendido en el periodo 2008-2009. Primavera (21 de marzo 2008 – 21 de junio 2008), verano (22 de junio 2008 – 22 de septiembre 2009), otoño (23 de septiembre – 21 de diciembre 2008) e invierno (22 de diciembre 2008 – 20 de marzo 2009).

En la parte superior de las colmenas se colocaron marcos de madera de 59 x 37 cm, provistos de una malla de polietileno con orificios de 1 mm². Una vez retirados los marcos que contenían las muestras de propóleo se enfriaron a -80 °C para facilitar la recuperación de las muestras. Una vez obtenidas las muestras fueron almacenadas en bolsas de polietileno a -80 °C hasta su procesamiento.

Las muestras de propóleos (5 g) fueron triturados hasta obtener un polvo, que se colocó en un matraz y se le adicionó metanol absoluto en una proporción 1:6 (p:v). La mezcla se mantuvo en agitación constante por un período de 3 días a temperatura ambiente y protegida de la luz. Una vez transcurrido el tiempo se filtró sobre tela de algodón con la finalidad de eliminar sólidos como tallos, astillas de madera, restos de hojas, etc. Posteriormente, se filtró con papel Whatman No.4 para eliminar partículas de menor tamaño como polvo y polen. El filtrado recuperado se concentró en un rotavapor a presión reducida y a temperatura constante la cual fue aproximadamente de 40 °C. Este procedimiento se realizó tres veces. Finalmente, los extractos se secaron al alto vacío obteniendo los extractos metanólicos crudos correspondientes a cada una de las diferentes estaciones climáticas del año. Posteriormente, los extractos metanólicos fueron lavados tres veces con hexano aplicando temperatura (< 40 °C) para remover las ceras. El extracto metanólico libre de ceras fue almacenado en oscuridad a -20 °C hasta su análisis (Hernandez et al. 2007, Velazquez et al. 2007).

5.2. Análisis por HPLC

El análisis de los constituyentes químicos de los propóleos se efectuó en un cromatógrafo Varian ProStar 320 polaris (Walnut Creek, USA) equipado con una columna C-18 fase reversa (5 x 4.6 mm, 100 Å). La columna fue eluída usando un gradiente de agua-ácido fórmico/metanol a un flujo de 1 mL/min. La fase móvil consistió de ácido fórmico 5 % en agua (A) y metanol (B). El gradiente programado fue 30 % B (0-15 min), 40 % B (15-20 %), 45% B (20-30 %), 60 % B (30-50 min), 80 % B (50-65 min) y 100 % B (65-71 min). La elución de los compuestos fue monitoreada a 280 y 340 nm. La identificación de los picos se llevó a cabo utilizando compuestos auténticos, así como por comparación de sus espectros de UV y con patrones de elución de propóleos de la misma región (Hernandez et al. 2007). El área obtenida para cada uno de los picos presentes en los cromatogramas se dividió entre el área total de éstos para calcular la abundancia relativa de cada que cada uno de los picos representa.

5.3. Purificación y caracterización química de los propóleos

La parte de la purificación y caracterización química de las muestras analizadas se realizó en el Laboratorio di Idrologia e Chimica degli Alimenti e Integratori (LICA) de la Universidad de Salerno, Italia. El fraccionamiento de los propóleos se realizó en una columna cromatográfica (3 x 50 cm) utilizando como fase estacionaria 100 g de sephadex LH-20. La cantidad de 2.5 g del extracto de propóleos se disolvieron en metanol absoluto y fue cargada a la columna. Como fase móvil se utilizó metanol absoluto. Posteriormente, se realizó una cromatografía en capa fina (TLC) utilizando cloroformo:metanol en proporción 9:1 para las fracciones obtenidas. Las fracciones que presentaron un patrón de corrimiento similar fueron agrupadas. Una vez realizada la agrupación de las fracciones, éstas fueron concentradas bajo presión reducida a una temperatura de 40°C. Se prepararon soluciones con una concentración de 10 mg/mL de cada una de las fracciones, las

cuales fueron inyectadas para su separación por medio de HPLC preparativa, utilizándose un equipo HPLC R401 con detector de índice de refracción (Waters) con una columna C18 (Phenomex) o con C8 (250x100 mM, 10 μ M, 100 Å, Phenomex), según la naturaleza de cada fracción, en donde se utilizó como fase móvil metanol al 60, 65 o 70 % (isocrático), con tasa de flujo de 2.5 ó 3.0 mL dependiendo de la naturaleza química de la fracción (Lotti et al. 2010). Las fracciones obtenidas por cromatografía en columna con sephadex LH-20 de los propóleos recolectados en la estación de invierno se subfraccionaron por medio de HPLC semi preparativa bajo las siguientes condiciones: fracción 4, una columna C8 y eluyente metanol al 65 % con un flujo de 3.0 mL/min, fracción 5, una columna C8 y eluyente metanol al 70 % con un flujo de 3.0 mL/min, fracción 6 fracción 7, una columna C8 y eluyente metanol 60 % con un flujo de 3.0 mL/min, fracción 8 y 9, una columna C18 y eluyente metanol al 60 % con un flujo de 2.5 mL/min y para la fracción 10, una columna C8 y eluyente metanol al 60 % con un flujo de 3.0 mL/min.

Las subfracciones obtenidas se analizaron por espectrometría de masas con ionización electrospray empleando el equipo Finnigan, LCQ Deca (Thermo electron corporation) por medio del software Xcalibur 2.0. Las muestras se prepararon a la concentración inicial de 1 mg/mL, de esta solución se tomó una alícuota de 10 μ L añadiéndola a un vial con una mezcla de agua grado MS (Fluka) y Metanol LC-MS (Fluka) 1:1 (500:500 μ L). Todos los compuestos fueron disueltos en Metanol-Agua (1:1) e inyectados en la fuente de ESI por medio de una inyección de bomba, la tasa de flujo fue 5 μ L/min. Se utilizó el mismo método de gradiente programado que en el análisis RP-HPLC. Los espectros de masa completa y de disociación de colisión inducida (CID) MS/MS fueron adquiridos en modos positivos y negativos. Las masas exactas fueron medidas por el instrumento Q-TOF premier. Los parámetros instrumentales fueron ajustados para cada compuesto investigado. El voltaje capilar estuvo fijado a 3 V, el voltaje de spray a 5.10 kV, y la temperatura capilar a 220 °C.

5.4. Líneas celulares

Para la evaluación de la inhibición de la proliferación se utilizaron las líneas celulares cancerígenas, M12.C3.F6 (linfoma de células B murino) y RAW (macrófago de murino transformado por el virus de la leucemia de Abelson), las cuales fueron gentilmente donadas por el Dr. Emil R. Unanue (Departamento de patología e inmunología, Universidad Washington, St. Louis, MO, USA); HeLa (carcinoma de cérvix humano), A-549 (carcinoma de pulmón humano), LS-180 (adenocarcinoma de colon humano), así como en la línea celular normal L-929 (tejido conectivo subcutáneo) las cuales fueron adquiridas de ATCC (American Type Collection, Rockville, MD, USA). Los cultivos se mantuvieron en el medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado al 5 % con suero fetal bovino (SFB) a una temperatura de 37 °C, en una atmósfera de 5 % de CO₂ y una humedad relativa de 80-90 % en una incubadora Isotherm (Fisher Scientific, USA).

5.5. Evaluación de la actividad antiproliferativa

Para evaluar el efecto antiproliferativo de los diferentes extractos de los propóleos sobre las distintas líneas celulares, se utilizó el método estándar de las sales de tetrazolio (MTT) (Mosmann 1983) con ligeras modificaciones (Hernandez et al. 2007). Los ensayos se realizaron utilizando cultivos celulares en fase de crecimiento logarítmico. Se obtuvieron suspensiones celulares de 200,000 células/mL, las cuales fueron incubadas en placas de 96 pozos de fondo plano (Costar, Corning, N.Y. USA) (1 x 10⁴ células por pozo, 50 µL) en presencia de diferentes concentraciones de los extractos a evaluar. Los cultivos se incubaron a una temperatura de 37 °C, en una atmósfera de 5 % de CO₂ y una humedad relativa de 80- 90 % en una incubadora Isotherm (Fisher Scientific, USA) por 48 h. En experimentos preliminares, se estableció que el uso de DMSO en un rango de 0.06 – 2.0 % no causa daño en las células. Previamente, los extractos de los propóleos se disolvieron en DMSO y subsecuentemente disueltos en medio de cultivo. Se

utilizaron como controles positivos en los ensayos de actividad antiproliferativa las drogas citotóxicas 5-FU, doxorubicina, colchicina y CAPE (constituyente químico de los propóleos de la región de Ures, Sonora). En las últimas 4 horas de incubación se adicionaron 10 μ L de MTT (5 mg/mL) para determinar la proliferación celular. El ensayo de MTT es un método colorimétrico que mide la proliferación y viabilidad de un cultivo celular. Se basa en la habilidad de las enzimas mitocondriales deshidrogenasas (reductasas), presente solo en células viables, de unirse a los anillos de la sal de tetrazolio (MTT) de coloración amarilla [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5difeniltetrazolio], para reducirlo a cristales de formazán de color azul-púrpura; dichos cristales son impermeables a la membrana celular, dando como resultado una acumulación de éstos dentro de las células sanas. La reducción de esta sal sólo se realiza en células vivas y la cantidad de formazán es proporcional al número de células vivas. Los cristales de formazán resultantes se solubilizaron con isopropanol ácido y la absorbancia de la solución colorida se obtuvo a 570 nm – 655 nm en un lector de ELISA (Multiskan EX, ThermoLabSystem).

5.6. Determinación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los propóleos se determinó de acuerdo al procedimiento descrito por Usia et al., 2002 con ligeras modificaciones (Usia et al. 2002, Blois 1985). Las muestras de los propóleos previamente se disolvieron en etanol absoluto y se mezclaron volúmenes iguales de muestra (600 μ L) con una solución de DPPH (300 μ M). Esta mezcla se agitó vigorosamente e incubó por 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 517 nm utilizando como blanco control etanol absoluto. Como control de referencia se utilizó vitamina C (70 μ M), CAPE (35 μ M) y BHT (140 μ M). Los resultados fueron expresados en porcentaje de actividad antioxidante en base a la proporción de degradación de DPPH comparada con el control estándar (mezcla 1:1, etanol:DPPH) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$\frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del estándar}} \times 100 = \% \text{ inhibición}$

$100 \% - \% \text{ Inhibición} = \% \text{ de actividad antioxidante}$

5.7. Cuantificación del contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles totales presente en los propóleos se determinó utilizando el método descrito por Popova y col. con ligeras modificaciones (Popova et al. 2004, Singleton and Rossi 1965, Woisky and Salatino 1998). Cuarenta microlitros de propóleo se diluyeron con 300 μL de agua destilada, posteriormente se adicionan 80 μL del reactivo de Folin y 120 μL de carbonato de sodio al 20 %, la mezcla se llevó a un volumen final de 1 mL con agua destilada. La mezcla de reacción se incubó 2 horas en la oscuridad a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 760 nm en un espectrofotómetro (Aquamate Plus UV-Vis, Thermo Scientific). El contenido total de fenoles se estimó utilizando una curva estándar de pinocembrina:galangina (2:1, p:p).

5.8. Contenido de flavonas y flavonoles

La cuantificación de flavonas y flavonoles fue estimado por el método colorimétrico basado en la formación de un complejo entre el ión aluminio y los grupos carbonilo e hidroxilo de los flavonoides descrito por Popova et. al (Popova et al. 2004). Cuarenta microlitros de una solución de propóleo (20 mg/mL) se diluyeron con 400 μL de metanol, posteriormente se adicionaron 20 μL de AlCl_3 5 % (p/v). La mezcla de reacción se aforó a 1 mL con metanol absoluto. La mezcla se incubó por 30 minutos y la absorbancia se midió a 425 nm en un espectrofotómetro (Aquamate Plus UV-Vis, Thermo Scientific). Los resultados se expresaron como mg/g de propóleo como equivalentes del flavonol rutina.

5.9. Contenido de flavanonas y dihidroflavonoles

El contenido de flavanonas y dihidroflavonoles en las muestras de propóleos se determinó utilizando el método espectrofotométrico de Das Deutshe Arzneibuch 9 (Popova et al. 2004, Arzneibuch 1986), el cual se basa en la interacción de estos compuestos con la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNP) en medio ácido para formar fenilhidrazinas coloridas. Cuarenta microlitros de los extractos metanólicos de propóleo se mezclaron con 80 μ L de una solución de DNP (50 mg DNP en 100 μ L de ácido sulfúrico 96 %, diluido en 5 mL de metanol, lo cual se calentó 50 min a 50 °C). Esta mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con 400 μ L de KOH al 10 % en metanol (p/v). Finalmente, 20 μ L de la solución resultante se llevó a 1 mL con metanol absoluto. La absorbancia se midió a 486 nm en un espectrofotómetro (Aquamate Plus UV-Vis, Thermo Scientific). El contenido de flavanonas y dihidroflavonoles se estimó utilizando una curva de calibración de pinocembrina.

5.10. Análisis del mecanismo de inducción de muerte celular mediado por apoptosis

Para llevar a cabo el análisis del papel de apoptosis en la inhibición de la proliferación celular se utilizaron distintas tinciones que fueron analizadas por citometría de flujo, utilizando un equipo BD FACS Canto II.

5.10.1. Marcaje con anexina V/yoduro de propidio

Para discernir entre células apoptóticas y/o células necróticas, se realizó un marcaje doble con anexina V-FITC/yoduro de propidio (Sigma-Aldrich). Suspensiones celulares de 200,000 células/mL fueron incubadas en placas de 6 pozos de fondo plano (Costar, Corning, N.Y. USA) (6×10^5 células por pozo, 3 mL) con los extractos de los propóleos correspondientes a cada una de las estaciones a una concentración de 50 μ g/mL por 12 h. Los cultivos se mantuvieron a una

temperatura de 37 °C, en una atmósfera de 5 % de CO₂ y una humedad relativa de 80- 90 % en una incubadora Isotherm (Fisher Scientific, USA). Como control positivo de inducción de apoptosis se utilizó CAPE a una concentración de 7.5 µM. Una vez transcurrido el tiempo de inducción de apoptosis, las células fueron cosechadas con ayuda de un gendarme, posteriormente se lavaron dos veces con PBS frío (1700 rpm, 7 min, 4°C). El botón celular fue resuspendido en 50 µL de solución reguladora (binding buffer) que contenía anexina V a una concentración de 1 µg/mL. Esta solución reguladora contiene altas concentraciones de calcio lo que favorece la unión de la anexina V a la fosfatidilserina. Las células fueron incubadas 10 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 2.5 µL de yoduro de propidio con una concentración de 10 µg/mL, obteniéndose una concentración final de tinción de 0.5 µg/mL. Las células fueron incubadas 10 minutos en la oscuridad. Finalmente, las células fueron lavadas 2 veces con solución reguladora (1700 rpm, 7 min, 4 °C) y resuspendidas en 200 µL de ésta y analizadas por citometría de flujo de manera inmediata.

5.10.2. Reducción del potencial de membrana mitocondrial

Para evaluar la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial, se utilizó el colorante lipofílico JC-1 (yoduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbencimidazolcarbocianina), el cual es un molécula con autofluorescencia dual. Cuando se encuentra en forma de agregados (JC-agregados) flúoresce rojo (acumulado dentro de la mitocondria) y cuando se encuentra en forma de monómero (disuelto en el citosol) presenta un desplazamiento de su fluorescencia hacia al verde. Este desplazamiento en su florescencia está directamente asociado a la reducción del potencial de la membrana mitocondrial (Zamzami et al. 1995). Cuatrocientos cincuenta mil células por pozo (200,000 células/mL) fueron incubadas en placas de 6 pozos de fondo plano (Costar, Corning, N.Y. USA) e incubadas con extracto metanólico de los propóleos correspondientes a primavera a diferentes tiempos (0.25, 1,3, 6, 12 y 24 h). Como control positivo se utilizó CAPE (7.5 µM). Las

células fueron cosechadas y lavadas dos veces con PBS frío (1700 rpm, 7 minutos, 4 °C). El botón celular fue resuspendido en una solución de tinción (JC-1 10 µg/mL en medio de cultivo), se mantuvo en incubación por 15 minutos a 37 °C, en una atmósfera de 5 % de CO₂ y una humedad relativa de 80- 90 % en una incubadora Isoterm (Fisher Scientific, USA). Finalmente, se realizaron 2 lavados con medio de cultivo utilizando las mismas condiciones de centrifugación y las células fueron resuspendidas en 400 µL de D5F (DMEM suplementado con 5 % de suero fetal bovino) para su análisis inmediato por citometría de flujo.

5.10.3. Evaluación de la actividad de las caspasas

La evaluación de la activación de las caspasas 3, 8 y 9 se llevó a cabo utilizando Kits comerciales adquiridos en la compañía Abcam. Fluorescein Active Caspase 3 Staining Kit, Fluorescein Active Caspase 8 Staining Kit y Fluorescein Active Caspase 9 Staining Kit fueron utilizados para la detección de la activación de cada una de estas proteínas respectivamente, siguiéndose las indicaciones del fabricante con ligeras modificaciones (www.abcam.com/technical). Las células fueron cultivadas en placas de 6 pozos con una densidad celular de 200,000 células/mL (6 x 10⁵ células por pozo, 3 mL) en presencia de los propóleos (50 µg/mL) por 0.25, 1, 3, 6 y 12 h, utilizando CAPE (7.5 µM) como control positivo de inducción de activación. Posteriormente, las células fueron cosechadas y lavadas con D5F frío (dos veces), el botón celular se resuspendió en 300 µL de medio de cultivo y se adicionó 1 µL del inhibidor de caspasa (el cual se encuentra marcado con FITC, utilizando una dilución 1:20 del reactivo proporcionado en el kit comercial, FITC-DEVD-FMK, FITC-IETD-FMK, FITC-LEHD-FMK para caspasa 3, 8 y 9 respectivamente). Se incubaron 1 h a una temperatura de 37 °C, 5 % de CO₂ y una humedad relativa de 80- 90 % en una incubadora Isoterm (Fisher Scientific, USA). Posteriormente, las células fueron lavadas dos veces con 300 µL de buffer de lavado (wash buffer, el cual fue proporcionado por la casa comercial). Para finalmente ser resuspendidas en 300 µL

de este mismo para ser analizadas por citometría de flujo. Las células se mantuvieron en hielo hasta su análisis.

5.11. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) utilizando las pruebas de comparación múltiple Tukey-Kramer y Duncan's (Number Cruncher Statistical Software, NCSS 2000).

6. RESULTADOS

6.1. Características organolépticas de los propóleos recolectados

La recolección de los propóleos se realizó en la región de Ures, Sonora (zona conocida como “el coyote”, ubicada en el municipio de Ures, Sonora; N 29°27.181', W 110°23.398). Se analizaron doce colmenas ubicadas en un mismo apiario durante el periodo comprendido del 21 de marzo al 21 de junio del 2008 (primavera), del 22 de junio al 22 de septiembre del 2008 (verano), del 23 de septiembre al 21 de diciembre del 2008 (otoño) y del 22 de diciembre del 2008 al 20 de marzo del 2009 (invierno). Se eligió esta zona de recolección porque en estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación se reportó que los propóleos de esta zona presentan fuerte actividad antiproliferativa sobre diferentes líneas celulares cancerígenas (Hernandez et al. 2007). La mayor cantidad colectada de propóleos se obtuvo durante el periodo de verano [verano (245 g) > otoño (45 g) > primavera (45 g) > invierno (8 g)]. Sin embargo, el rendimiento del extracto metanólico obtenido después de la eliminación de ceras y partículas sólidas fue similar para todas las muestras recolectadas, excepto para la temporada de invierno en la cual se obtuvo el menor rendimiento (primavera 66.0 % \approx verano 66.6 % \approx otoño 65.8 % > invierno 48.7 %) (**tabla 4**). Las características organolépticas de los propóleos exhibieron variaciones notables (**tabla 5**).

6.2. Efecto de la temporalización sobre la abundancia relativa de los principales constituyentes químicos identificados en propóleos de Ures, Sonora

Con el objetivo de comparar la composición química de los propóleos recolectados durante las diferentes estaciones del año, los extractos metanólicos fueron analizados por HPLC. La **figura 2** muestra los cromatogramas correspondientes a los extractos metanólicos de otoño, invierno, primavera y

Tabla 4. Rendimiento (%) de los extractos metanólicos obtenidos de los propóleos

Temporada	Cantidad de material recolectado (g)	Cantidad de extracto metanólico obtenido (g)	Rendimiento (%)
Primavera	45.0	27.0	60.0
Verano	245.0	163.3	66.6
Otoño	60.0	39.5	65.8
Invierno	8.0	3.9	48.7

Tabla 5. Características organolépticas de los propóleos recolectados

Temporada	Aspectos físicos	Color	Consistencia
Primavera	Terroso	Café – verde (ocre)	Pegajosa
Verano	Hojuelas	Café – verde (ocre)	No pegajosa
Otoño	Terroso	Café - amarillo	Pegajosa
Invierno	Astiloso	Café claro - verde	Muy pegajosa

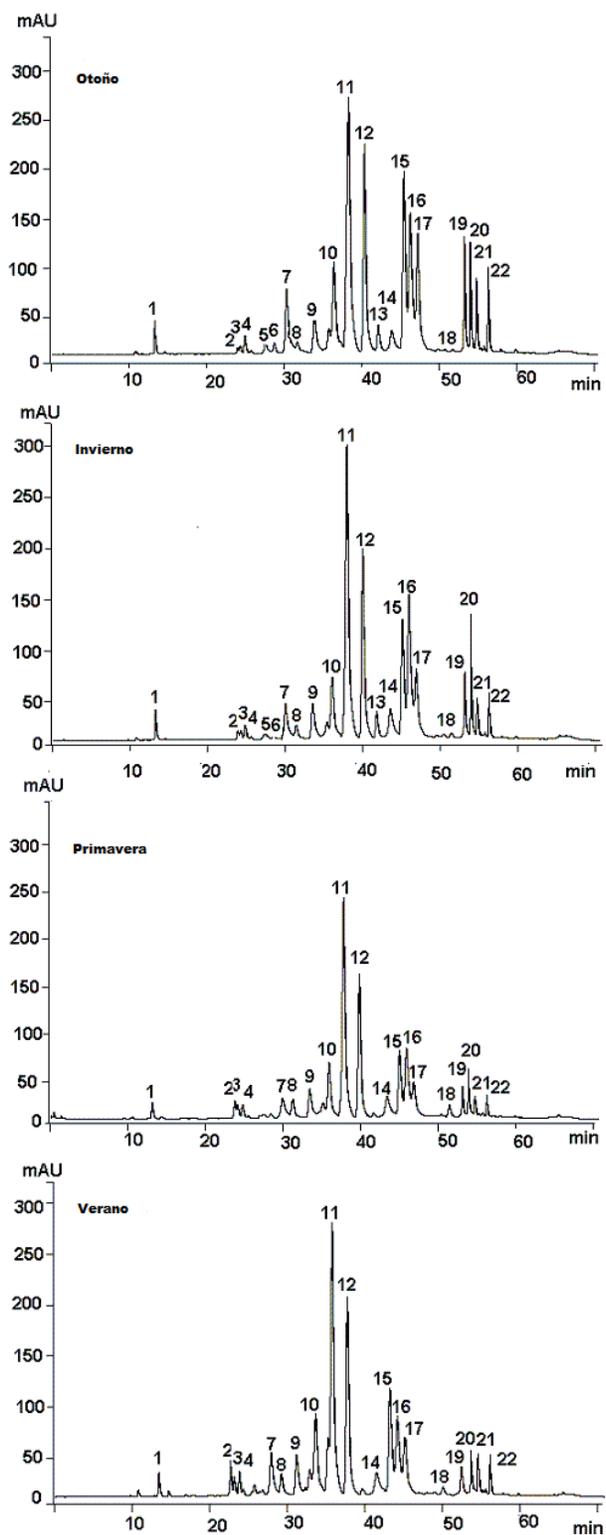


Figura 2. Cromatogramas de HPLC de los propóleos sonorenses recolectados en las diferentes estaciones del año (obtenidos 340 nm).

verano obtenidos a 340 nm. Los perfiles cromatográficos obtenidos para cada uno de los extractos analizados muestran mucha similitud entre ellos.

Los picos principales fueron identificados utilizando compuestos auténticos y comparando con los patrones de elución obtenidos previamente por nuestro grupo de investigación en propóleos recolectados en la misma región (Hernandez et al. 2007). Se identificaron seis de los constituyentes químicos mayoritarios presentes en los propóleos de Ures, Sonora (pinocembrina, acetato de pinobanksina, crisina, CAPE, acacetina y galangina), los cuales han sido reportados previamente en propóleos sonorenses (Hernandez et al. 2007). Las estructuras químicas de los compuestos identificados se muestran en la **figura 3**. Posteriormente, se determinó la abundancia relativa (%) de los principales picos en cada uno de los cromatogramas correspondientes a los propóleos recolectados en las distintas temporadas del año (**tabla 6**). Los constituyentes químicos más abundantes fueron pinocembrina, acetato de pinobanksina y crisina. La abundancia relativa de los compuestos, tanto de los identificados y como de los no identificados, fue muy similar en las cuatro muestras de propóleos analizadas, sugiriendo que el tiempo de recolecta de los propóleos no tiene un efecto significativo sobre la composición química, al menos de los constituyentes más abundantes, de los propóleos de Ures, Sonora.

6.3. Estabilidad en la composición química de los propóleos de la región de Ures, Sonora

Con la finalidad de evaluar la estabilidad de la composición química de los propóleos de la región de Ures, Sonora, con respecto al tiempo de recolección, en nuestro grupo de investigación se procedió a recolectar propóleos en la misma región (N 29°27.181', W 110°23.398, en el mismo apiario ubicado en la zona llamada "el coyote") durante el periodo del año 2009-2010 (Alday 2012, Tesis en proceso). Los perfiles cromatográficos para la temporalización 2009-2010 fueron muy similares a los perfiles obtenidos para las muestras colectadas durante el año 2008-2009 (**apéndice A**). Esta observación indica que la estabilidad en la abundancia relativa

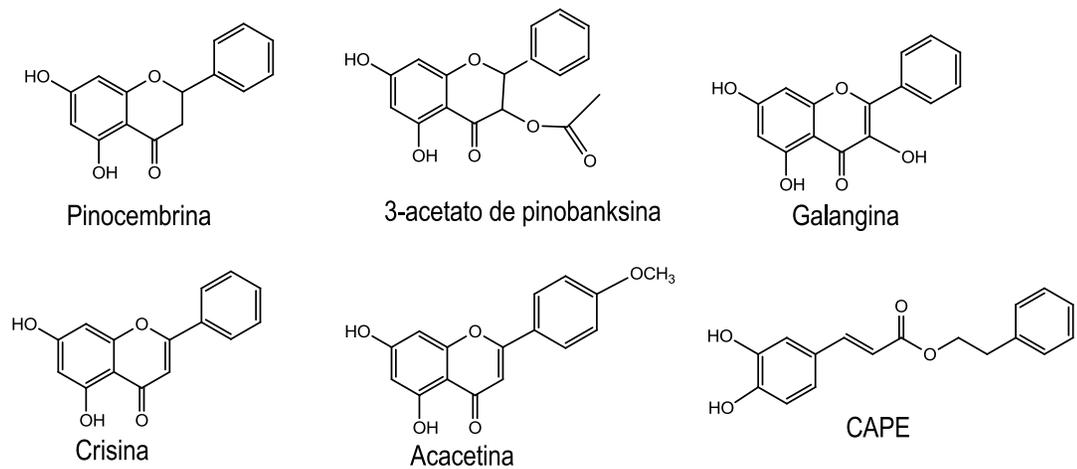


Figura 3. Estructuras químicas de los compuestos identificados por HPLC a 340 nm en propóleos de Ures, Sonora.

Tabla 6. Abundancia relativa (%) de los constituyentes químicos presentes en propóleos de Ures, Sonora.

No. pico	Tiempo de Retención	Abundancia Relativa (%)			
		Verano	Otoño	Invierno	Primavera
1	13.4 ^(v) , 13.3 ^(o) , 13.5 ⁽ⁱ⁾ , 13.1 ^(p)	0.9	0.9	1.0	0.9
2	22.6 ^(v) , 23.9 ^(o) , 23.8 ⁽ⁱ⁾ , 23.8 ^(p)	1.5	0.2	0.3	1.2
3	23.2 ^(v) , 24.3 ^(o) , 24.2 ⁽ⁱ⁾ , 24.1 ^(p)	0.8	0.3	0.6	0.9
4	23.7 ^(v) , 24.9 ^(o) , 24.8 ⁽ⁱ⁾ , 24.8 ^(p)	1.1	0.8	0.8	1.1
5	(-) ^(v) , 27.6 ^(o) , 27.4 ⁽ⁱ⁾ , (-) ^(p)	(-)	0.8	0.7	(-)
6	(-) ^(v) , 28.7 ^(o) , 28.5 ⁽ⁱ⁾ , (-) ^(p)	(-)	0.7	0.5	(-)
7	27.9 ^(v) , 30.3 ^(o) , 30.0 ⁽ⁱ⁾ , 29.9 ^(p)	3.7	4.9	3.2	3.0
8	29.2 ^(v) , 31.7 ^(o) , 31.4 ⁽ⁱ⁾ , 31.2 ^(p)	1.8	0.8	1.3	2.3
9	31.2 ^(v) , 33.9 ^(o) , 33.5 ⁽ⁱ⁾ , 33.4 ^(p)	3.5	2.7	3.2	3.7
10	33.6 ^(v) , 36.4 ^(o) , 36.0 ⁽ⁱ⁾ , 35.8 ^(p)	7.5	7.1	5.5	6.4
11 (Pinocebrina)	35.7 ^(v) , 38.3 ^(o) , 37.9 ⁽ⁱ⁾ , 37.8 ^(p)	21.0	20.3	23.1	22.6
12 (Acetato de pinobanksina)	37.7 ^(v) , 40.3 ^(o) , 40.0 ⁽ⁱ⁾ , 39.8 ^(p)	14.3	12.2	12.8	13.6
13	(-) ^(v) , 42.1 ^(o) , 41.8 ⁽ⁱ⁾ , (-) ^(p)	(-)	1.7	1.9	(-)
14 (CAPE)	41.5 ^(v) , 43.8 ^(o) , 43.5 ⁽ⁱ⁾ , 43.4 ^(p)	3.3	2.4	3.7	4.3
15 (Crisina)	43.2 ^(v) , 45.4 ^(o) , 45.1 ⁽ⁱ⁾ , 45.0 ^(p)	8.2	10.6	7.9	6.6
16 (Galangina)	44.2 ^(v) , 46.2 ^(o) , 45.9 ⁽ⁱ⁾ , 45.9 ^(p)	7.3	10.2	11.9	8.6
17 (Acacetina)	45.1 ^(v) , 47.2 ^(o) , 46.9 ⁽ⁱ⁾ , 46.8 ^(p)	6.8	8.9	7.2	6.0
18	50.0 ^(v) , 51.7 ^(o) , 51.4 ⁽ⁱ⁾ , 51.4 ^(p)	0.7	0.1	0.6	1.6
19	52.4 ^(v) , 53.2 ^(o) , 53.1 ⁽ⁱ⁾ , 53.1 ^(p)	1.9	3.5	2.8	2.2
20	53.6 ^(v) , 54.0 ^(o) , 53.9 ⁽ⁱ⁾ , 53.9 ^(p)	1.4	2.5	3.3	2.1
21	54.5 ^(v) , 54.7 ^(o) , 54.7 ⁽ⁱ⁾ , 54.7 ^(p)	1.6	2.4	1.6	1.4
22	56.1 ^(v) , 56.3 ^(o) , 56.3 ⁽ⁱ⁾ , 56.3 ^(p)	1.3	2.1	1.9	1.2
23	Picos no asignados	11.4	3.9	4.2	10.3

(-) No detectado. (v) Verano. (o) Otoño. (i) Invierno. (p) Primavera

de los constituyentes químicos de propóleos sonorenses es muy alta. Adicionalmente, los perfiles cromatográficos obtenidos son muy similares al reportado previamente por nuestro grupo de investigación para propóleos de Ures recolectados durante el periodo 2003-2004 (Hernandez et al. 2007).

6.4. Identificación de compuestos químicos presentes en los propóleos de Ures, Sonora

Con la finalidad de avanzar en la caracterización de los propóleos de la región de Ures, Sonora se procedió a la identificación y aislamiento de los compuestos presentes en éstos. Para lo cual, se llevó a cabo una cromatografía en columna de baja presión utilizando como fase estacionaria sephadex LH-20 y como fase móvil metanol absoluto. Se obtuvieron un total de 70 fracciones de las cuales por semejanza en su patrón de corrimiento en TLC se reagruparon en 10 fracciones. En la **tabla 7** se muestran los rendimientos en peso para cada una de estas fracciones (fijando como 100 % la cantidad total de muestra utilizada en la columna, 2.5 g).

Se procedió a realizar el análisis de cada una de estas fracciones por HPLC-MS, los espectros obtenidos para las fracciones se muestran en las **figuras 4-10**, respectivamente. Posteriormente, se procedió a la purificación de dichas fracciones por medio de HPLC preparativa. Se colectó cada uno de los picos registrados, inyectándose de 3-9 veces cada fracción con una concentración de 0.1 mg/ μ L. Cada una de las fracciones colectadas se analizó por HPLC-MS-QTOF. Se lograron identificar y caracterizar 13 compuestos de los propóleos de Ures, Sonora, pinobanksina 5-metil-éter, pinocembrina 5-metil-éter, 3-propanoato de pinobanksina, 3-butirato de pinobanksina, 3-pentanoato de pinobanksina, 3-hexanoato de pinobanksina, luteolina 5-metil-éter, quercetina 5,7-dimetil-éter, pinobaksina, crisina, pinocembrina, galangina y 3-acetato de pinobanksina, de los cuales los últimos 5 previamente han sido reportados en propóleos de esta región (Hernandez et al. 2007). En la **tabla 8** se muestran los compuestos identificados en las fracciones

Tabla 7. Fracciones y rendimientos de los propóleos de invierno obtenidos por cromatografía en columna de sephadex LH-20.

Fracciones totales	Fracciones	Cantidad (g)	Rendimiento (%)
1-13	1	0.50	20.0
14-16	2	0.10	4.0
17-17	3	0.10	4.0
20-21	4	0.07	2.8
22-24	5	0.04	1.6
25-28	6	0.35	14.0
29-35	7	1.10	44.0
36-40	8	0.05	2.0
41-46	9	0.06	2.4
47-70	10	0.11	4.4

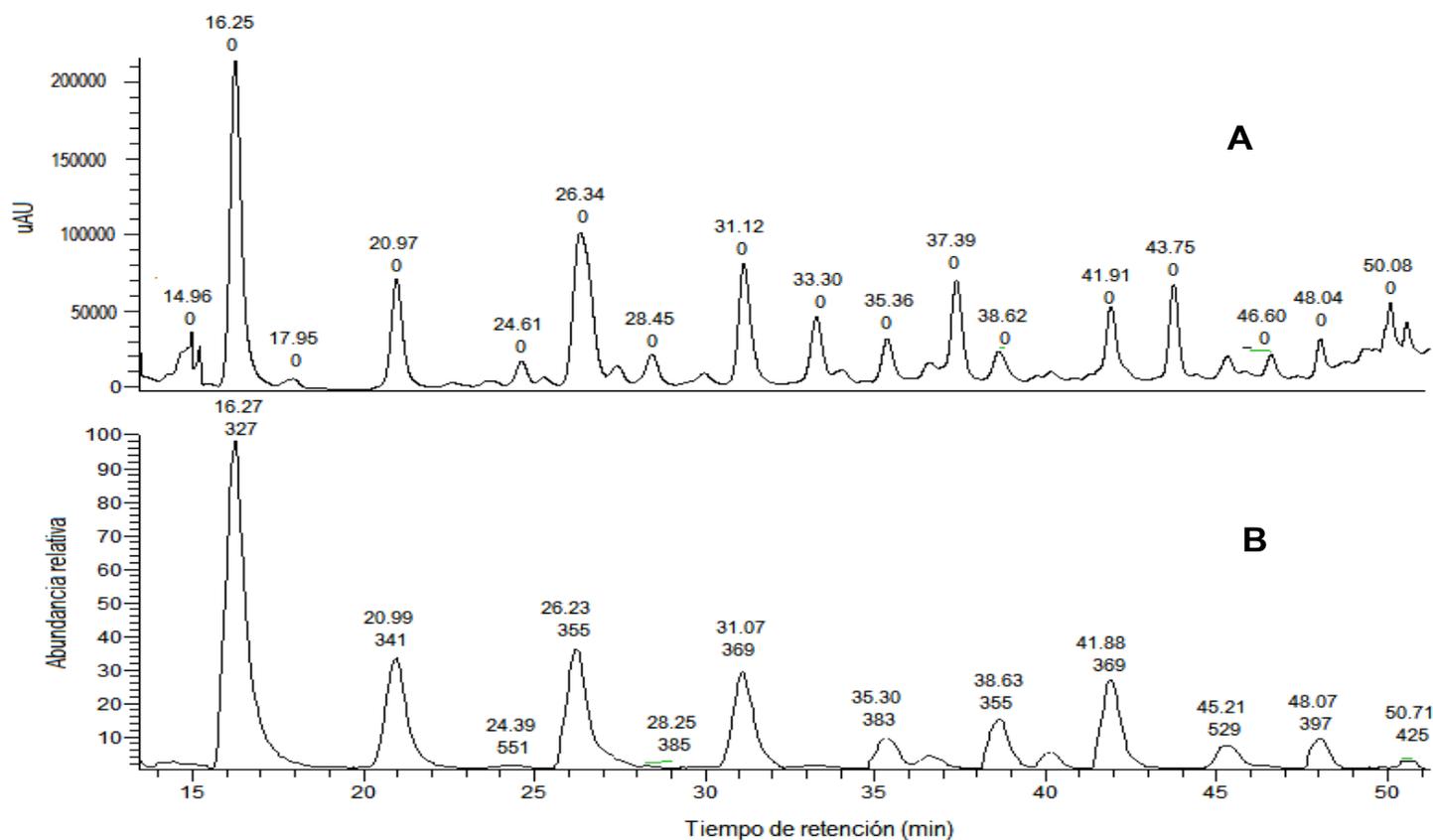


Figura 4. Cromatograma de HPLC-MS de la fracción 4 obtenida por cromatografía en columna utilizando sephadex LH-20. A) Se muestra el cromatograma de HPLC obtenido a 340 nm indicando el tiempo de retención. B) Se muestra el espectro de masas indicando el tiempo de retención para cada pico y su respectiva masa molecular $[M-H]^{-1}$.

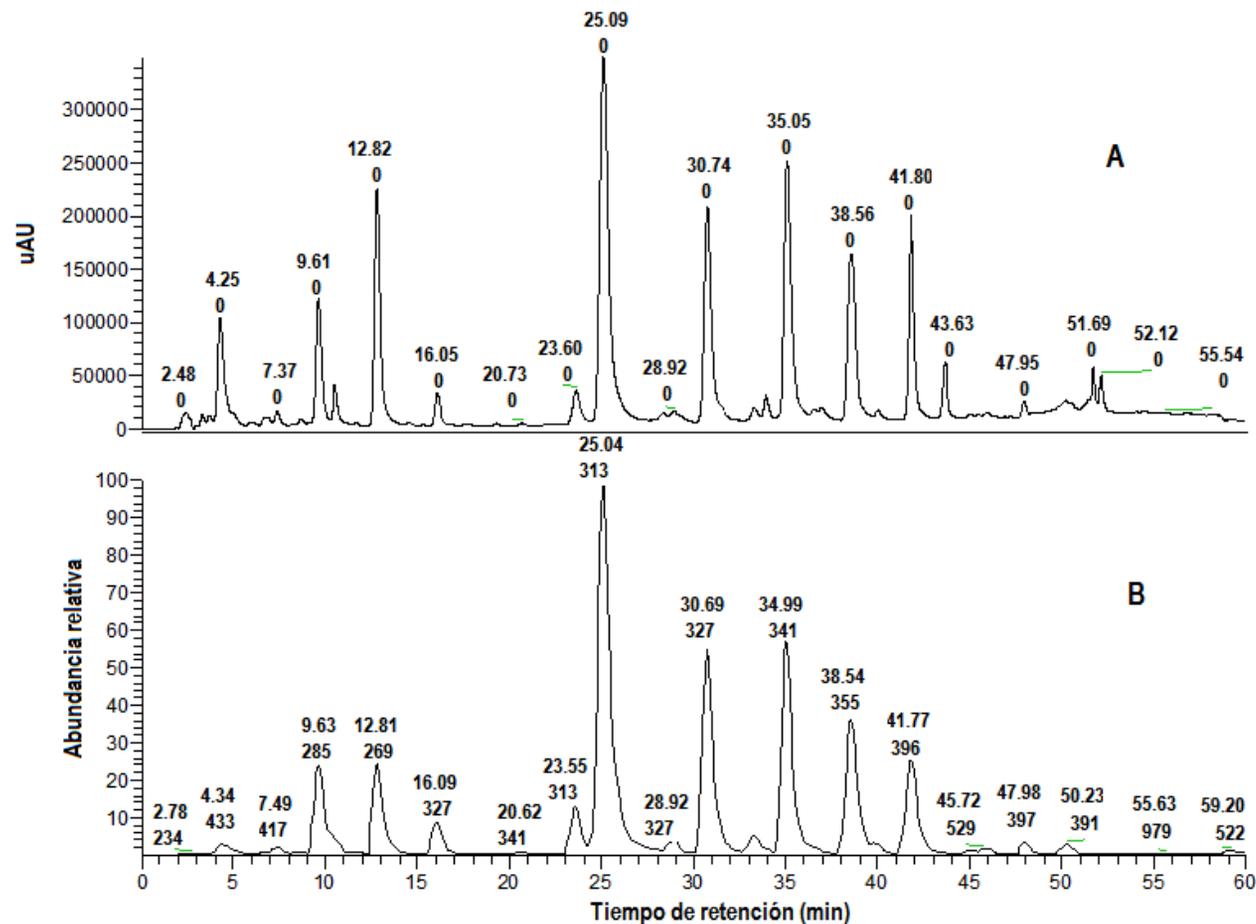


Figura 5. Cromatograma de HPLC-MS de la fracción 5 obtenida por cromatografía en columna utilizando sephadex LH-20. A) Se muestra el cromatograma de HPLC obtenido a 340 nm indicando el tiempo de retención. B) Se muestra el espectro de masas indicando el tiempo de retención para cada pico y su respectiva masa molecular $[M-H]^{-1}$.

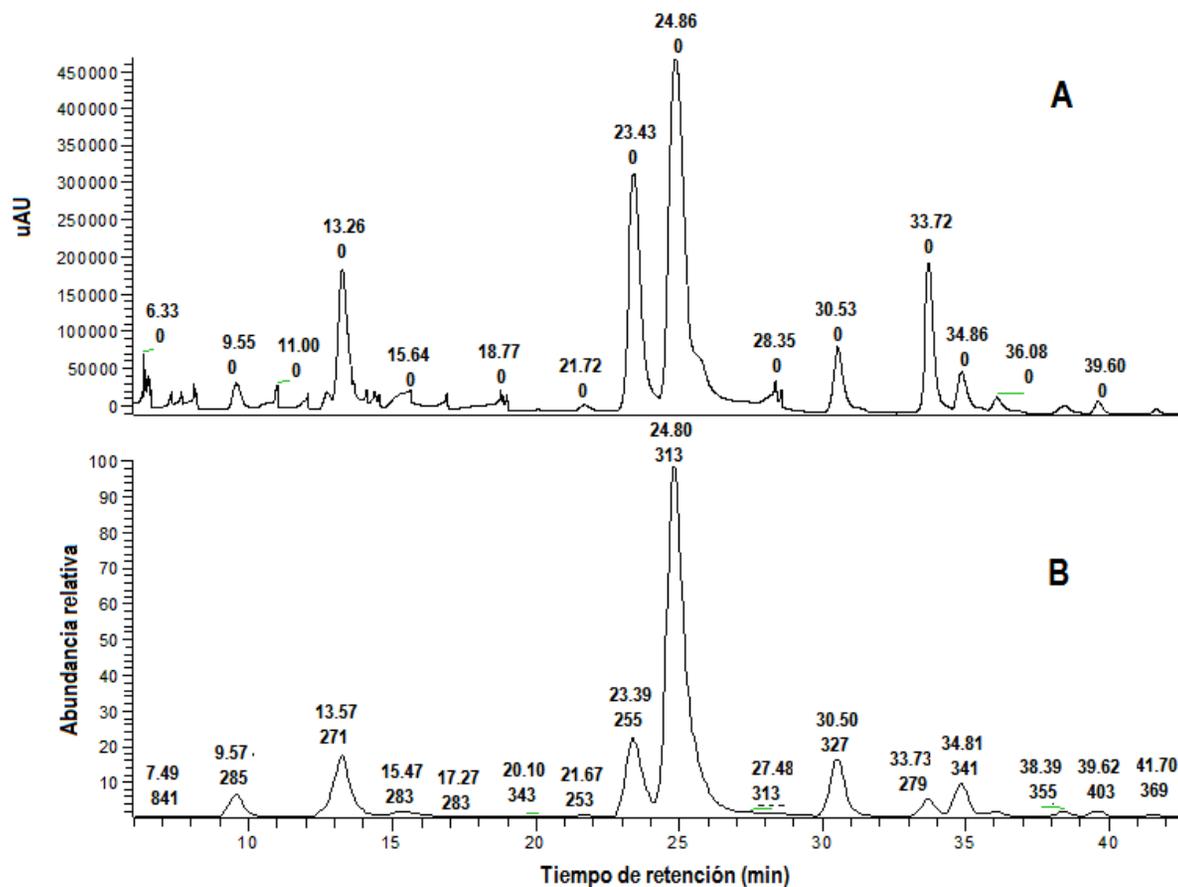


Figura 6. Cromatograma de HPLC-MS de la fracción 6 obtenida por cromatografía en columna utilizando sephadex LH-20. A) Se muestra el cromatograma de HPLC obtenido a 340 nm indicando el tiempo de retención. B) Se muestra el espectro de masas indicando el tiempo de retención para cada pico y su respectiva masa molecular $[M-H]^{-1}$.

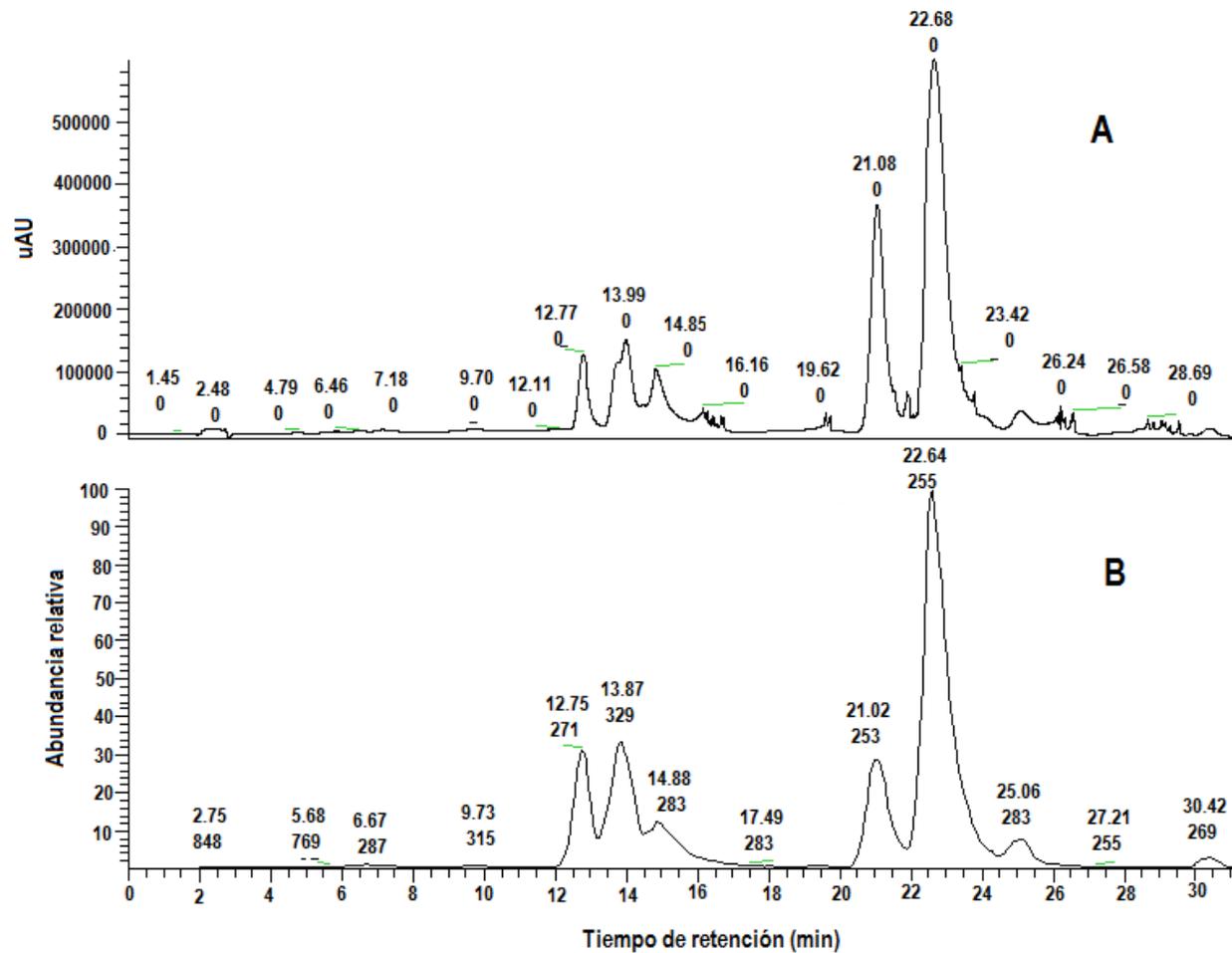


Figura 7. Cromatograma de HPLC-MS de la fracción 7 obtenida por cromatografía en columna utilizando sephadex LH-20. A) Se muestra el cromatograma de HPLC obtenido a 340 nm indicando el tiempo de retención. B) Se muestra el espectro de masas indicando el tiempo de retención para cada pico y su respectiva masa molecular $[M-H]^{-1}$.

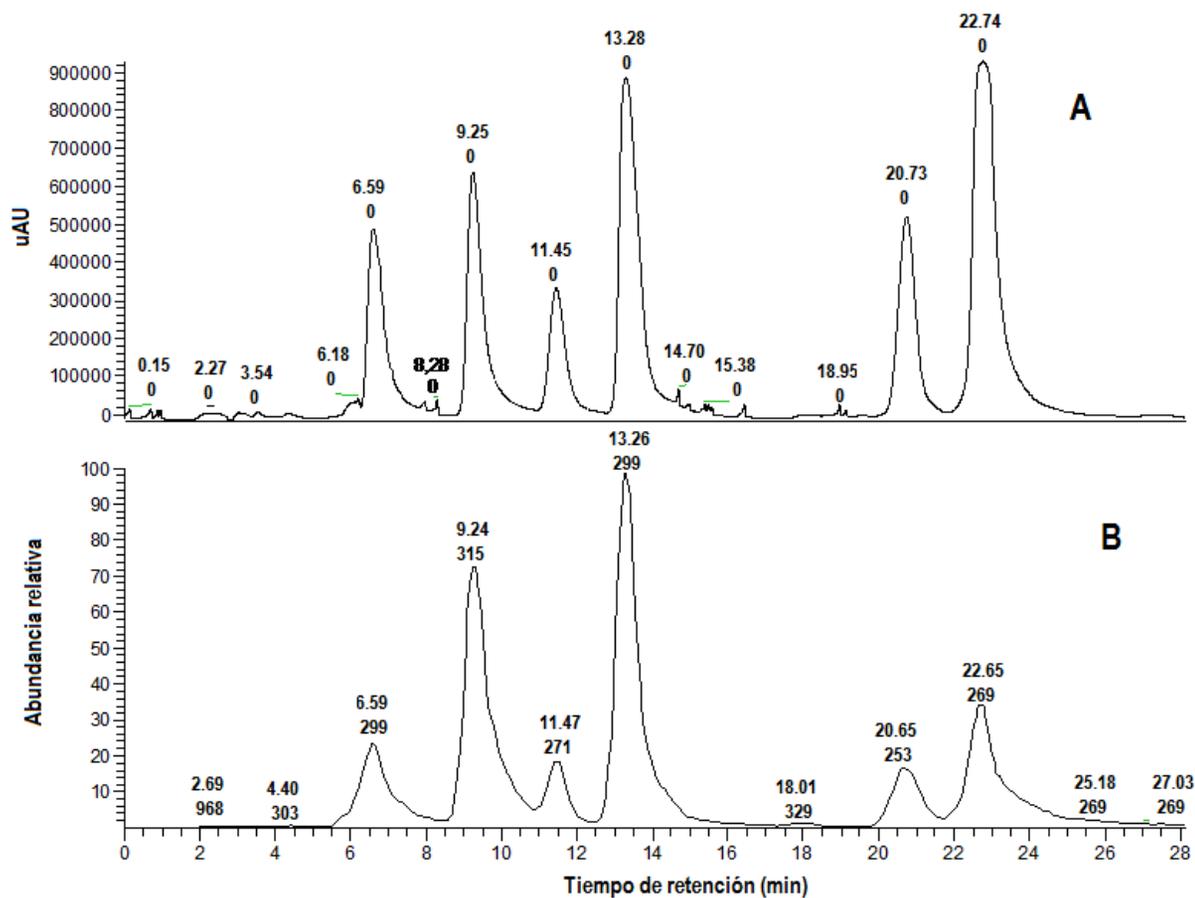


Figura 8. Cromatograma de HPLC-MS de la fracción 8 obtenida por cromatografía en columna utilizando sephadex LH-20. A) Se muestra el cromatograma de HPLC obtenido a 340 nm indicando el tiempo de retención. B) Se muestra el espectro de masas indicando el tiempo de retención para cada pico y su respectiva masa molecular $[M-H]^{-1}$.

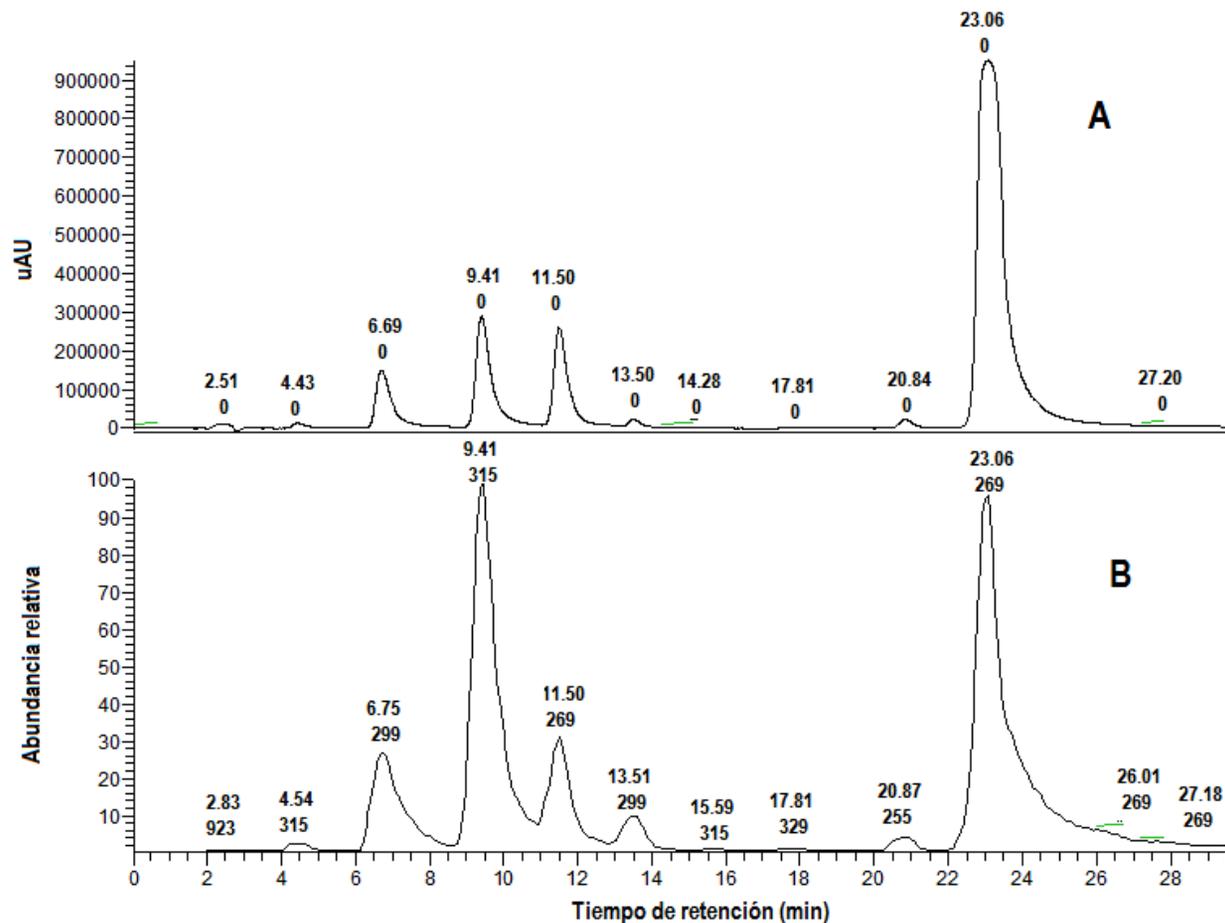


Figura 9. Cromatograma de HPLC-MS de la fracción 9 obtenida por cromatografía en columna utilizando sephadex LH-20. A) Se muestra el cromatograma de HPLC obtenido a 340 nm indicando el tiempo de retención. B) Se muestra el espectro de masas indicando el tiempo de retención para cada pico y su respectiva masa molecular $[M-H]^{-1}$.

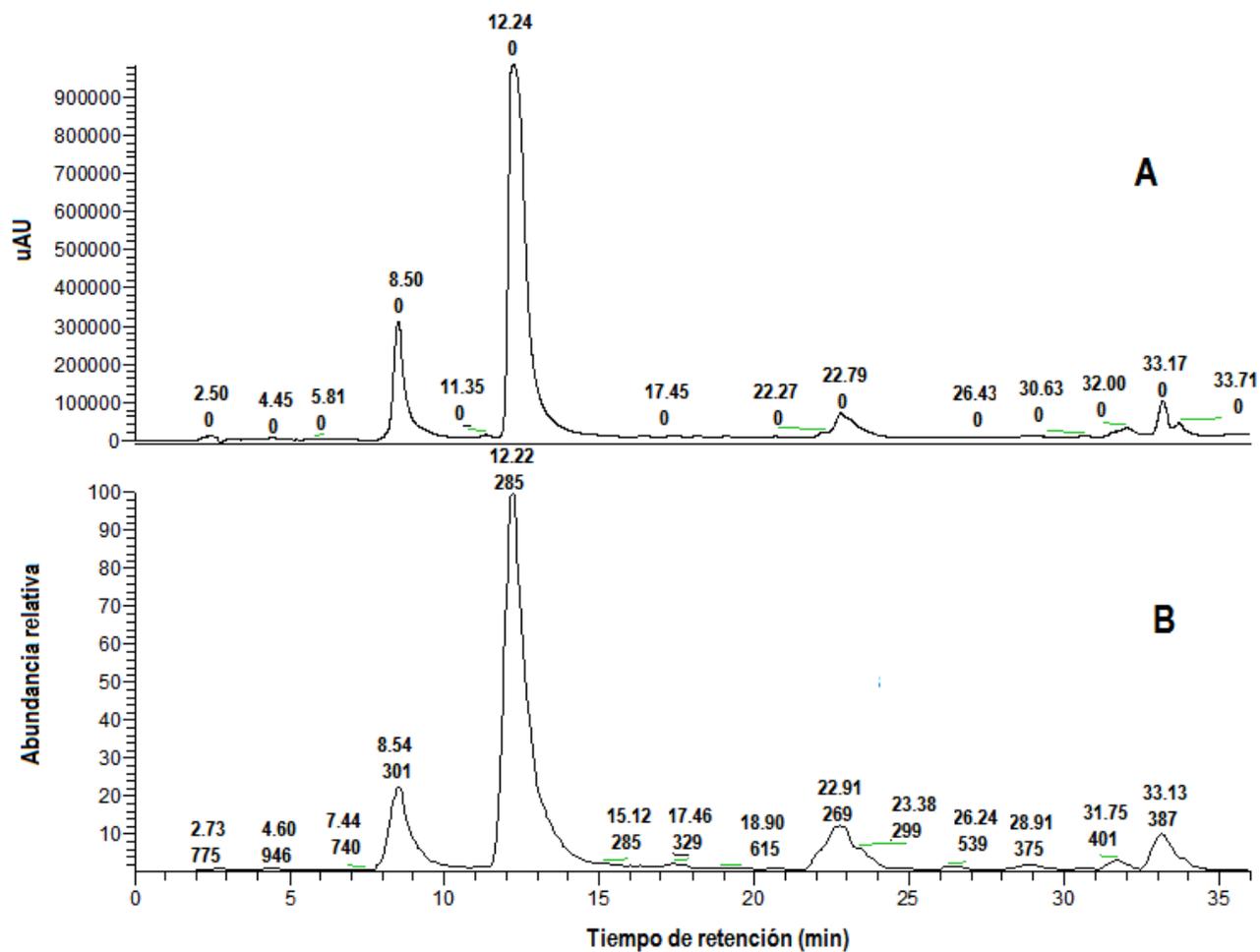


Figura 10. Cromatograma de HPLC-MS de la fracción 10 obtenida por cromatografía en columna utilizando sephadex LH-20. A) Se muestra el cromatograma de HPLC obtenido a 340 nm indicando el tiempo de retención. B) Se muestra el espectro de masas indicando el tiempo de retención para cada pico y su respectiva masa molecular $[M-H]^{-1}$.

Tabla 8. Compuestos identificados en las fracciones obtenidas por cromatografía en columna de sephadex LH-20 de los propóleos de la región de Ures, Sonora.

No. de fracción	Compuesto identificado	Tiempo de retención (min)	[M-H] ⁻¹
5,6	Pinobanksina-5-metil-éter	10.19	285
5	Pinocembrina -5-metil-éter	13.40	269
6,7	Pinobanksina	13.91	271
7,8	Luteolina-5-metil-éter	14.89	299
7	Quercitina.5,7.metil-éter	15.17	329
7,8	Crisina	22.47	253
6,7	Pinocembrina	24.23	255
8,9	Galangina	24.23	269
5,6	3-acetato de pinobanksina	25.62	313
5,6	3-propanoato de pinobaksina	31.12	327
5,6	3-butirato de pinobanksina	35.37	341
4,5	3-pentanoato de pinobanksina	38.83	355
4,5	3-hexanoato de pinobanksina	42.07	369

analizadas, así como su tiempo de retención y masa molecular. En la **figura 11, 12 y 13** se muestra el cromatograma de HPLC-MS donde se indica la asignación de los 13 compuestos identificados.

En la **figura 14** se observa el espectro de masas de pinocembrina-5-metil-éter obtenido mediante electrospray, los espectros correspondientes al resto de los compuestos identificados se encuentran en el **apéndice B**. El patrón de fragmentación de pinocembrina-5-metil-éter, muestra al ion molecular (M^{-1}) con una relación masa/carga (m/z) con un 99 % de abundancia relativa. Se observan tres fragmentaciones claras, $m/z = 165$ (18 %), $m/z=227$ (83 %) y $m/z = 254$ (47 %). El origen de la fragmentación se muestra en la **figura 15**. Estos datos de masa permitieron la caracterización de pinocembrina-5-metil-éter.

6.5. Efecto de la temporalización sobre la actividad antiproliferativa de los propóleos sonorenses

Para evaluar la actividad antiproliferativa de los propóleos recolectados durante el período 2008-2009, se realizaron ensayos *in vitro* utilizando las líneas celulares cancerígenas: M12.C3.F6, HELA, Raw, A-549 y LS-180, así como la línea celular normal L-929. Todas las muestras de propóleos mostraron actividad antiproliferativa sobre las líneas celulares cancerígenas utilizadas, siendo el extracto correspondiente al propóleo colectado en primavera el que mostró mayor actividad antiproliferativa sobre las líneas celulares evaluadas. De manera general, el orden de actividad antiproliferativa de los extractos de los propóleos en todas las líneas celulares cancerígenas fue: primavera > invierno > verano \approx otoño. Sin embargo en el caso de las líneas celulares A-549 y LS-180 se observaron valores de IC_{50} mayores para el propóleo de invierno (semejantes a los valores obtenidos para los propóleos de verano y otoño) lo que indica mayor resistencia por parte de estas líneas celulares, sin embargo se conservó la actividad para los propóleos correspondiente a los propóleos de primavera; los valores de IC_{50} para la línea celular A-549 fueron primavera ($9.9 \pm 1.9 \mu\text{g/mL}$) < invierno ($53.6 \pm 5.0 \mu\text{g/mL}$) \approx verano (51.0 ± 3.3

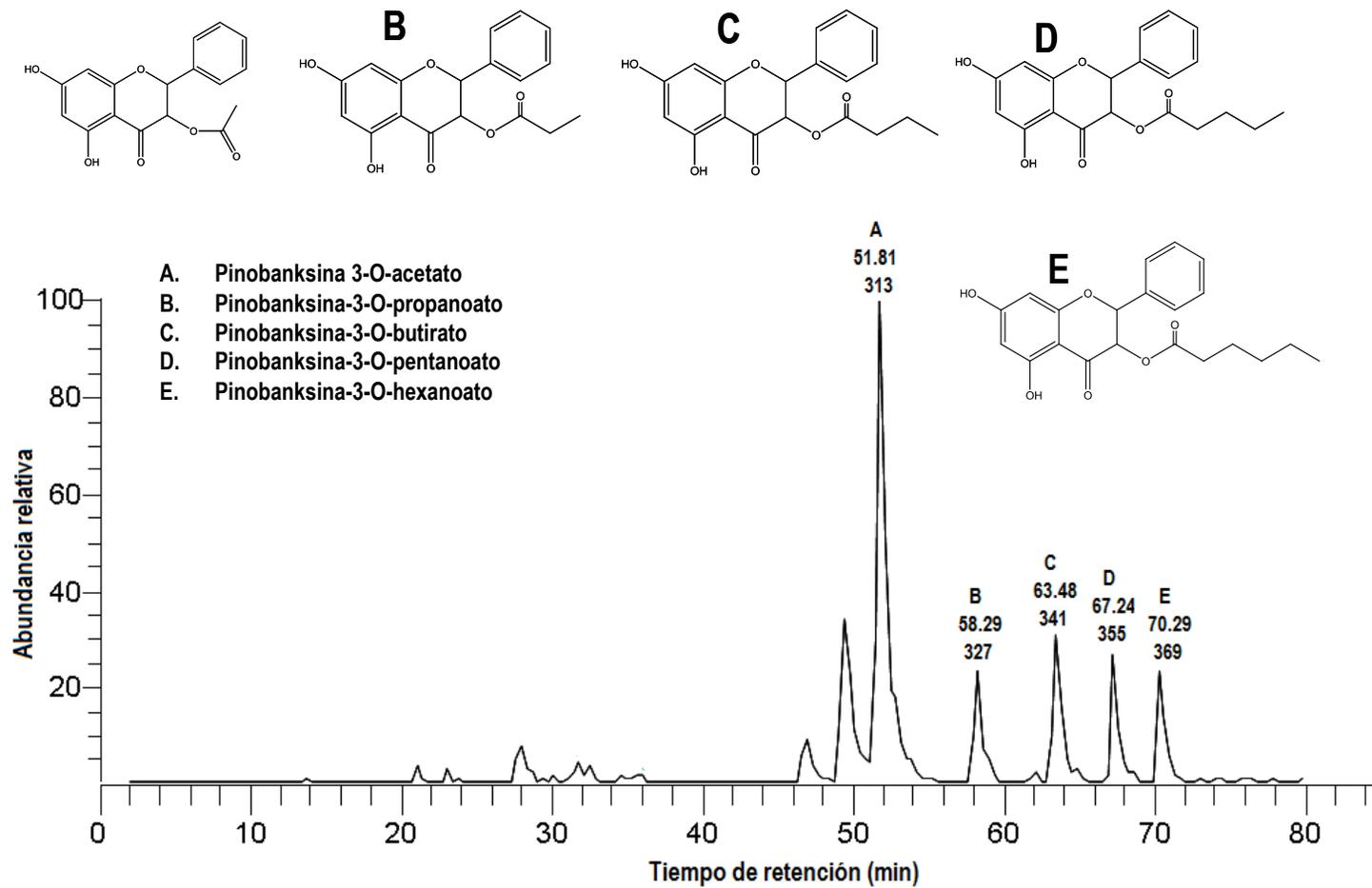


Figura 11. Cromatograma HPLC-MS-QTOF de los propóleos rerecolectados en Ures, Sonora, obtenidos a 340 nm y se incluye el tiempo de retención (min) y la relación masa/carga (m/z) en el modo negativo.

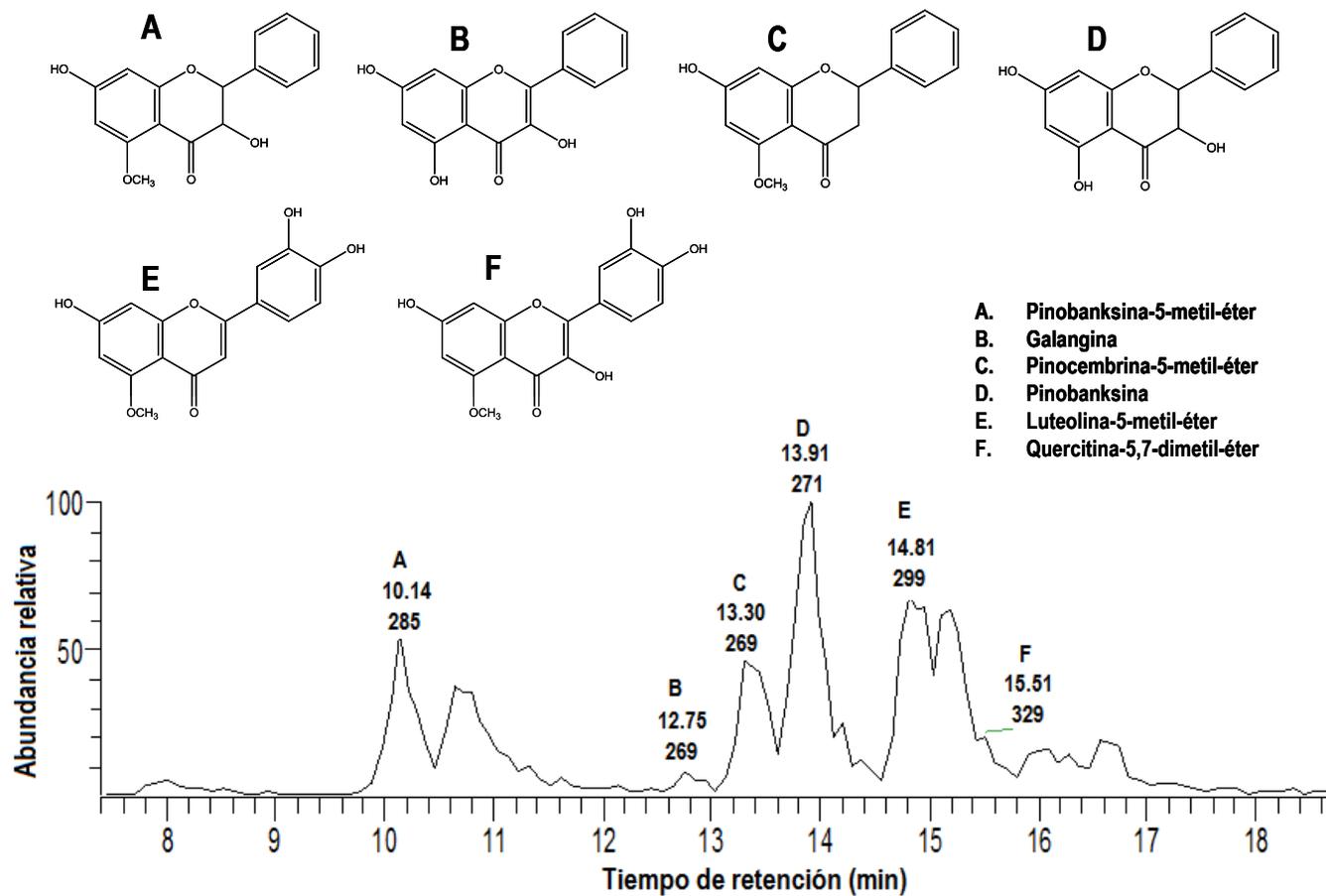


Figura 12. Ampliación del cromatograma HPLC-MS-QTOF de los propóleos recolectados en Ures, Sonora, obtenidos a 340 nm y se incluye el tiempo de retención (min) y la relación masa/carga (m/z) en el modo negativo.

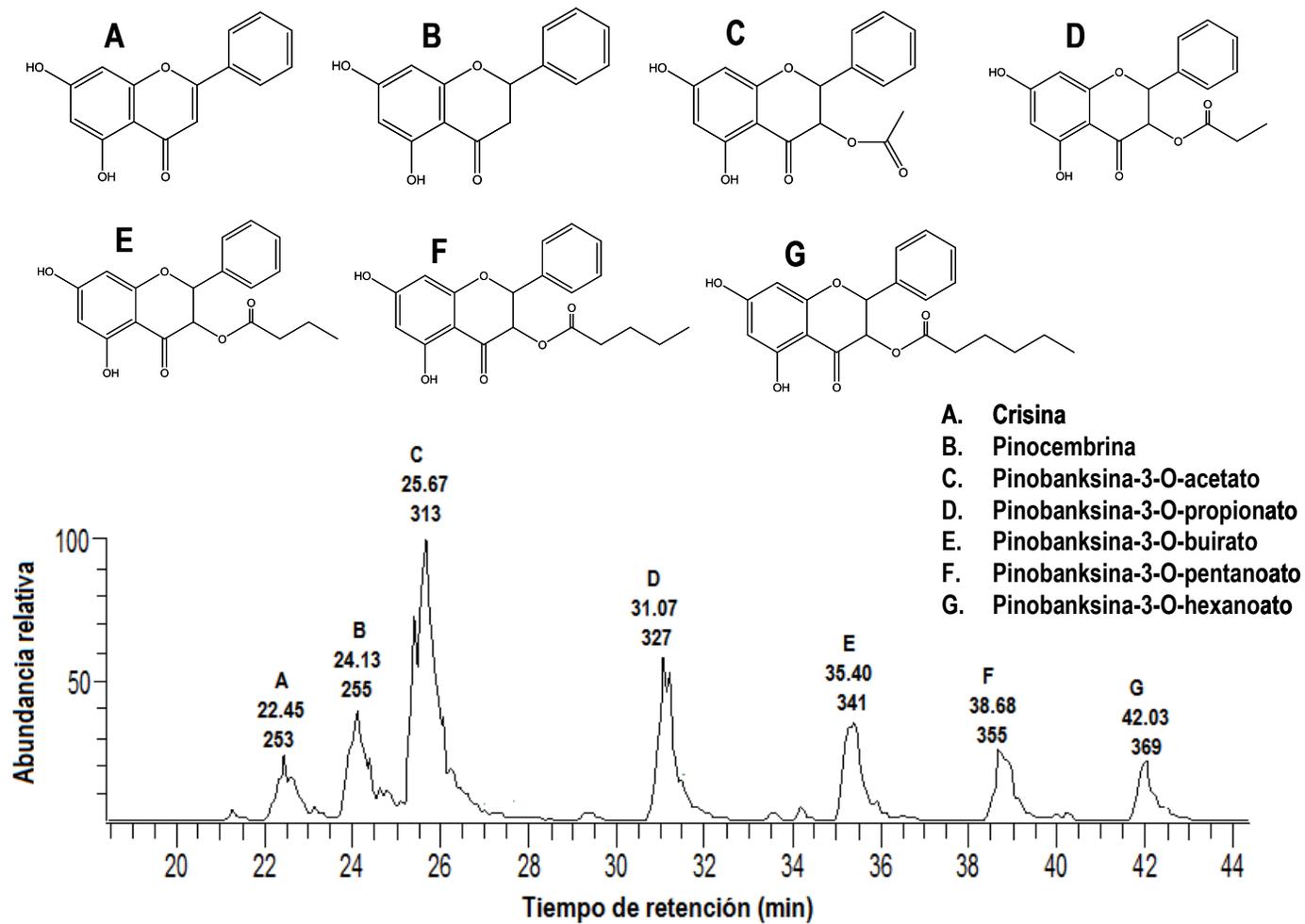


Figura 13. Ampliación del cromatograma HPLC-MS-QTOF de los propóleos recolectados en Ures, Sonora, obtenidos a 340 nm y se incluye el tiempo de retención (min) y la relación masa/carga (m/z) en el modo negativo.

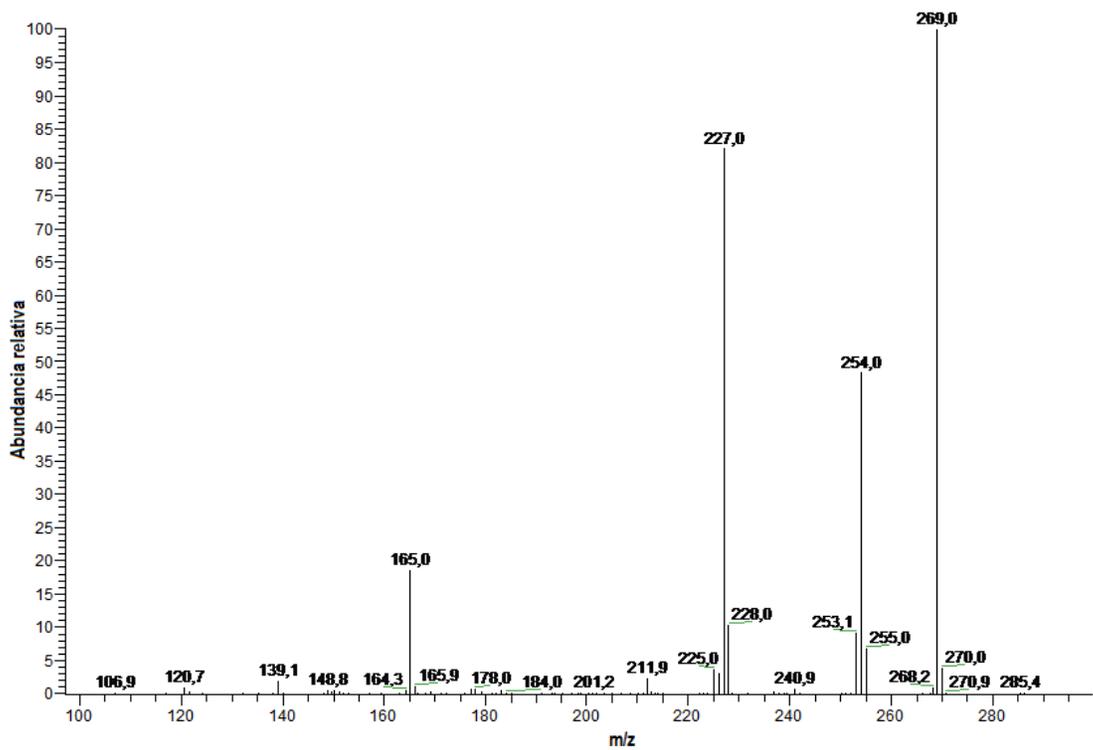


Figura 14. Espectro de masas del compuesto pinocembrina 5-metil-éter.

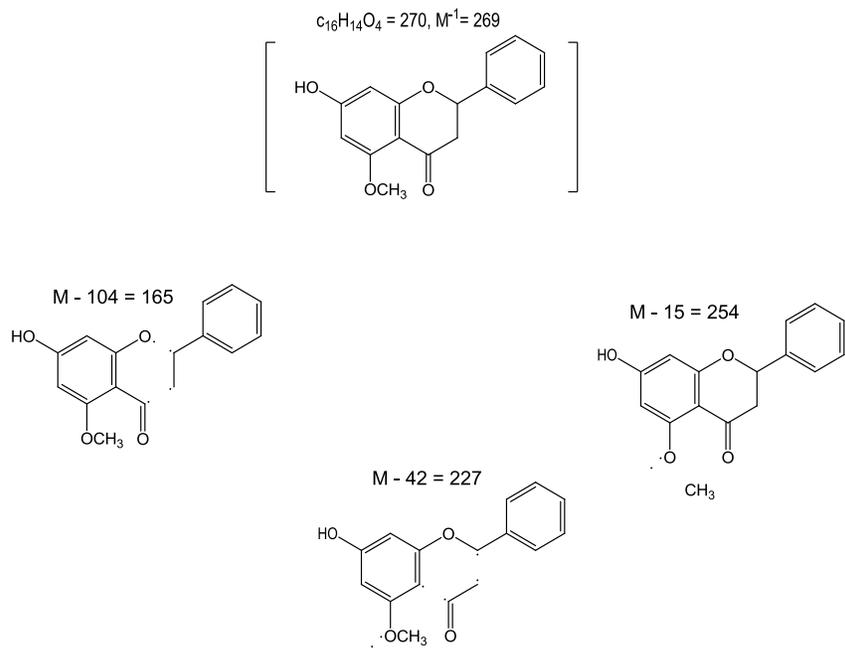


Figura 15. Patrón de fragmentación del compuesto pinocembrina 5-metil-éter.

$\mu\text{g/mL}$) \approx otoño ($39.1 \pm 5.2 \mu\text{g/mL}$); para la línea celular LS-180 primavera ($16.9 \pm 1.4 \mu\text{g/mL}$) $<$ invierno ($45.2 \pm 4.6 \mu\text{g/mL}$) \approx verano ($45.0 \pm 4.1 \mu\text{g/mL}$) \approx otoño ($40.3 \pm 5.7 \mu\text{g/mL}$). La línea celular cancerígena LS-180 presentó la mayor resistencia al efecto antiproliferativo de los propóleos, de manera contraria la línea celular que resultó ser más susceptible a dicho efecto fue Raw presentando alta susceptibilidad a los propóleos recolectados durante primavera ($\text{IC}_{50} 4.9 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$). Todos los extractos evaluados mostraron menor actividad antiproliferativa sobre la línea normal de murino L-929 ($\text{IC}_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$), lo cual es un efecto deseable, ya que esta línea celular es una línea celular normal, por lo tanto, el efecto antiproliferativo sugiere ser selectivo para líneas celulares cancerígenas. En la **tabla 9** se muestran los valores de IC_{50} para cada uno de los extractos evaluados en las líneas celulares mencionadas. CAPE (constituyente químico de los propóleos de Ures, Sonora) y las drogas citotóxicas 5-fluorouracilo, doxorubicina y colchicina fueron incluidos como controles positivos de actividad antiproliferativa obteniéndose valores de IC_{50} entre 0.2-21.5 $\mu\text{g/mL}$ sobre las distintas líneas celulares evaluadas. Adicionalmente, los cultivos celulares incubados con DMSO (0.06-0.5 %) no mostraron ninguna evidencia de daño celular.

6.6. Efecto de la temporalización sobre la actividad antioxidante de los propóleos sonorenses

Con la finalidad de evaluar el efecto de la temporalización sobre la capacidad de los propóleos para neutralizar radicales libres, se determinó la capacidad antioxidante de cada una de las muestras utilizando el método espectrofotométrico del DPPH. Como antioxidantes estándares se utilizaron vitamina C, BHT y CAPE. La actividad antioxidante de los extractos metanólicos de los propóleos se ilustra en la **figura 16**. Todos los extractos de propóleos evaluados mostraron una actividad antioxidante débil (primavera $16.2 \% \pm 0.35$, verano $17.0 \% \pm 0.22$, otoño $19.7 \% \pm 0.59$ e invierno $18.53 \% \pm 0.19$, a $100 \mu\text{g/mL}$) en comparación con los antioxidantes

Tabla 9. Actividad antiproliferativa (IC₅₀)^a de los propóleos sonorenses

Propóleo o compuesto	Líneas celulares					
	M12.C3.F6	HELA	Raw	A-549	LS-180	L-929
Primavera	11.6 ± 4.6	6.1 ± 0.6	4.9 ± 0.5	9.9 ± 1.9	16.9 ± 1.4	56.7 ± 13.2
Invierno	26.6 ± 11.5	11.7 ± 0.6	9.8 ± 2.4	53.6 ± 5.0	45.2 ± 4.6	50.7 ± 7.6
Verano	49.7 ± 1.4	39.1 ± 3.1	30.3 ± 2.6	51.0 ± 3.3	45.0 ± 4.1	51.0 ± 3.0
Otoño	54.5 ± 2.5	41.3 ± 2.1	29.1 ± 3.2	39.1 ± 5.2	40.3 ± 5.7	54.6 ± 5.1
CAPE	0.5 ± 0.1	> 30	0.8 ± 0.1	21.5 ± 2.7	16.3 ± 0.7	> 30
Colchicina	ND	ND	0.02 ± 0.001	ND	ND	> 40
5-FU	0.2 ± 0.06	> 10	0.07 ± 0.01	> 10	> 10	> 10
Doxorubicina	0.3 ± 0.01	1.3 ± 0.2	0.5 ± 0.1	1.0 ± 0.3	1.4 ± 0.2	ND

ND (no determinado). ^a IC₅₀. Los valores de extractos de propóleos (µg/mL) representan la media de por lo menos tres experimentos independientes ± la desviación estándar. ^b CAPE, 5-fluorouracil, colchicina y doxorubicina fueron utilizados como controles positivos en los ensayos de antiproliferación celular

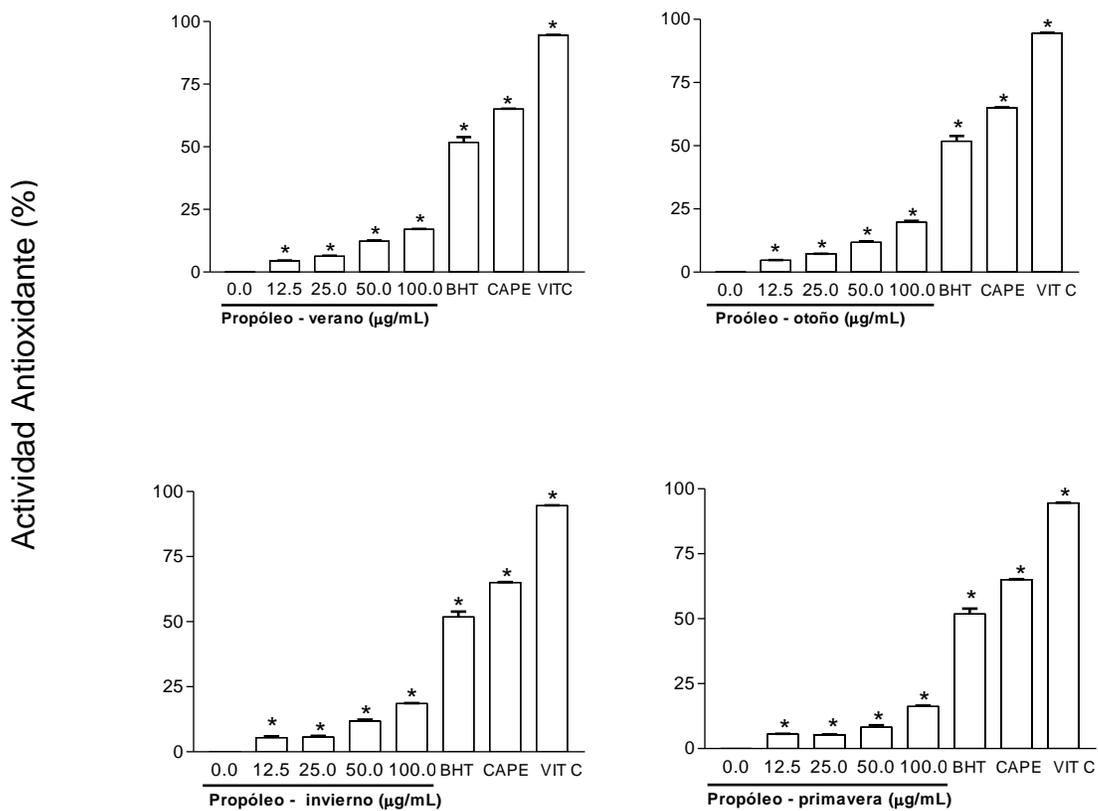


Figura 16. Actividad antioxidante de los extractos de propóleos (DPPH). Diferentes concentraciones de propóleos fueron utilizadas (0-100 µg/mL). Vitamina C (70 µM), BHT (140 µM) y CAPE (35 µM) fueron utilizados como antioxidantes estándar. Los resultados son representativos de por lo menos tres experimentos independientes. Todos los valores representan el promedio de tres determinaciones ± desviación estándar. Las diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto al control se marcan con asterisco.

estándares (BHT 51.78 % \pm 2.1 a 140 μ M; CAPE 65.01 % \pm 0.16 a 35 μ M; vitamina C 94.56 % \pm 0.11 a 70 μ M).

Algunas de las actividades biológicas de los propóleos sonorenses puede deberse a la presencia de diversos compuestos incluyendo polifenoles, principalmente de tipo flavonoides (Banskota et al. 2001). Por lo cual, se realizó la cuantificación de los principales grupos de estas sustancias bioactivas (flavonas y flavonoles, flavanonas y dihidroflavonoles, y fenoles totales) utilizando diversos métodos espectrofotométricos (Popova et al. 2004). Los resultados obtenidos se resumen en la **tabla 10**. Los propóleos correspondientes a la temporada de verano y otoño muestran un mayor contenido de flavonoides y fenoles totales que los encontrados en las muestras colectadas durante invierno y primavera.

6.7. Apoptosis inducida por acción de los propóleos de Ures, Sonora

Con el objetivo de establecer el mecanismo de acción mediante el cual los propóleos de la región de Ures, Sonora ejercen su efecto antiproliferativo y con base en los resultados obtenidos previamente por nuestro grupo de investigación (Hernandez et al. 2007), los cuales sugieren que la actividad citotóxica es mediada por apoptosis, se realizó de manera simultánea una tinción con anexina

V-FITC (AN) y yoduro de propidio (IP), la cual permite discrimina si la muerte celular inducida por los propóleos está mediada por apoptosis o necrosis. La translocación de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana celular es un fenómeno típico que ocurre en las etapas tempranas de la muerte celular mediada por apoptosis, en la cual la membrana celular se mantiene íntegra; anexina V presenta una alta afinidad de unión hacia este fosfolípido. De manera contraria, cuando la muerte celular es mediada por necrosis, ésta va acompañada de la pérdida de la integridad de la membrana y de la liberación de constituyentes celulares al medio extracelular, por lo tanto, las células apoptóticas excluyen al yoduro de propidio, mientras que las células necróticas no lo excluyen. Las células sanas deberán por lo tanto, ser negativas a ambas tinciones (AN⁻/IP⁻), mientras que

Tabla 10. Contenido de fenoles totales y flavonoides en los propóleos sonorenses (mg/g)

	Verano	Otoño	Invierno	Primavera
Flavanonas y dihidroflavonoles*	305.9 ± 5.8	246.2 ± 9.2	228.0 ± 3.9	237.1 ± 7.4
Flavonas y flavonoles ^Δ	185.9 ± 3.2	133.0 ± 2.2	104.5 ± 3.3	96.8 ± 0.3
Fenoles totales ⁺	601.8 ± 8.2	629.6 ± 9.1	532.3 ± 6.7	427.9 ± 9.9

* Expresado como equivalentes de pinocembrina

^Δ Expresado como equivalentes de rutina

⁺ Expresado como equivalentes de pinocembrina/galangina

Los resultados son representativos de por lo menos tres experimentos independientes. Todos los valores representan la media de tres experimentos independientes ± desviación estándar.

las células apoptóticas serán AN⁺/IP⁻ y se consideran las células necróticas como AN⁺/IP⁺. Todas las muestras de propóleos evaluadas (50 µg/mL, 12 h de incubación con propóleos) indujeron apoptosis en las células cancerígenas M12.C3.F6, ya que éstas mostraron un aumento en el porcentaje de células apoptóticas (AN⁺/IP⁻) con referencia al % observado en las células control (6.2 ± 3.95 %), siendo el propóleo correspondiente a primavera el que indujo mayor porcentaje de células apoptóticas (23.0 ± 8.1 %). De manera general, el orden en la intensidad de la inducción de apoptosis fue primavera (23.0 ± 8.1 %) > invierno (20.6 ± 11.8 %) > verano (13.2 ± 4.6 %) ≈ otoño (12.0 ± 4.0 %) (**tabla 11**).

En la **figura 17** se muestra las gráficas biparamétricas anexina V-FITC/yoduro de propidio de las células cancerígenas M12.C3.F6 después de haber sido incubadas por 12 h con los extractos metanólicos correspondientes a cada una de las estaciones del año. El cuadrante inferior izquierdo (Q3) en los citogramas muestra las células viables las cuales excluyeron al IP (yoduro de propidio) y fueron negativas a la unión de anexina V-FITC; el cuadrante superior derecho (Q2) representa las células necróticas (incorporaron IP en su DNA y unieron anexina V-FITC); en el cuadrante inferior derecho (Q4) se observan las células apoptóticas, que debido a su integridad en la membrana plasmática excluyeron al IP y debido al fenómeno típico de la translocación del fosfolípido fosfatidilserina en la muerte inducida por apoptosis unieron anexina V, la cual es una proteína que se une con alta afinidad a este fosfolípido.

6.8. Efecto de los propóleos sobre el potencial de membrana mitocondrial

El proceso de muerte celular mediada por apoptosis, puede iniciarse por dos vías distintas de señalización; una vía extrínseca la cual inicia con la señal pro-apoptótica que se desencadena por la unión de Fas (CD95, receptor de muerte celular) a su ligando (FasL), esta unión provoca el reclutamiento de DISC (death inducing signaling complex) el cual contiene proteínas adaptadoras que

Tabla 11. Evaluación de apoptosis inducida en células cancerígenas M12.C3.F6 por propóleos recolectados en las diferentes estaciones de año.

	Células sanas	Células muertas	Células en apoptosis temprana	Células en apoptosis tardía (Necrosis secundaria)	Total de células apoptóticas
Control de crecimiento normal	85.4 ± 2.2	2.8 ± 1.0	4.0 ± 1.9	7.8 ± 1.0	11.8 ± 2.9
Control de disolvente (ETOH)	83.3 ± 4.5	5.9 ± 0.8	6.2 ± 3.9	6.6 ± 1.7	12.8 ± 5.4
CAPE	16.0 ± 0.4	3.0 ± 1.3	7.5 ± 5.3	74.5 ± 4.6	81.9 ± 0.8
Verano	70.8 ± 2.8	3.0 ± 2.5	13.2 ± 4.6	14.3 ± 3.8	27.5 ± 2.3
Otoño	72.1 ± 3.1	2.8 ± 2.5	12.0 ± 4.0	14.1 ± 4.5	26.1 ± 2.6
Invierno	63.3 ± 9.0	4.2 ± 3.0	20.6 ± 11.8	13.4 ± 3.8	34.0 ± 9.6
Primavera	49.7 ± 4.7	6.4 ± 4.6	23.0 ± 8.1	23.2 ± 9.1	46.2 ± 1.5

ETOH fue utilizado como control de disolvente. CAPE fue utilizado como inductor positivo de apoptosis (7.5 μM). Los propóleos fueron evaluados a 50 μg/mL. Todos los valores representan la media de tres experimentos independientes ± desviación estándar.

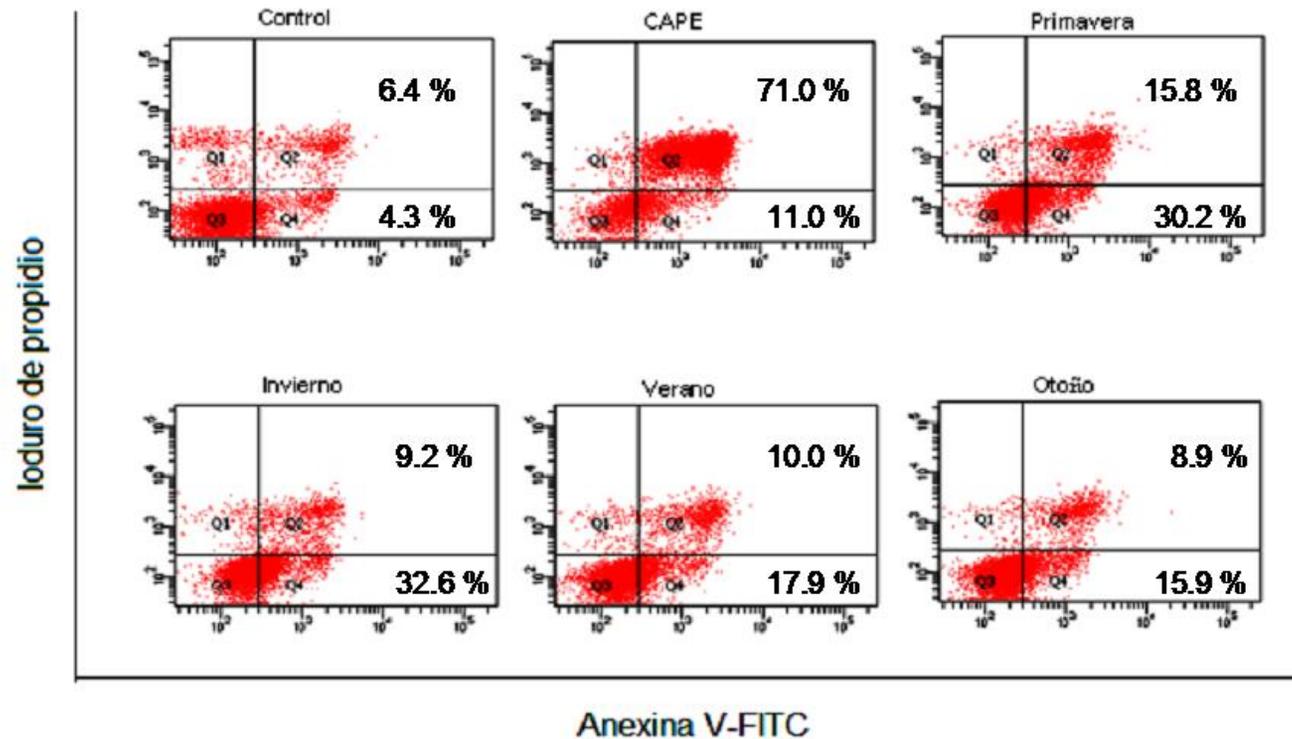


Figura 17. Citogramas biparamétricos anexina V-FITC/yoduro de propidio de las células cancerígenas M12.C3.F6 después de 12 horas de incubación con propóleos recolectados durante las diferentes estaciones. Esta figura es representativa de al menos tres experimentos independientes.

favorecen la activación de la pro-caspasa 8 permitiendo de esta manera la activación de esta vía. La otra vía de señalización existente se denomina vía intrínseca o mitocondrial, la cual se activa por estrés y otras señales que provocan la translocación a la mitocondria de miembros pro-apoptóticos; lo anterior provoca la liberación de citocromo C al citosol que se acompaña de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y desestabilización de la membrana externa de la mitocondria. Por lo tanto, la disminución del potencial de membrana mitocondrial está asociada con eventos tempranos de la activación de la vía intrínseca de la apoptosis.

Con el objetivo de medir el colapso electroquímico del gradiente a través de la membrana mitocondrial, se realizó la tinción con el colorante catiónico JC-1, un autofluorocromo dual, utilizando células cancerígenas M12.C3.F6 las cuales previamente habían sido tratadas con propóleos (50 µg/mL) e incubadas con éstos a diferentes tiempos. Se utilizó CAPE como control positivo de inducción de apoptosis. El JC-1 en células sanas se acumula en las mitocondrias en forma de JC-agregados, emitiendo una fluorescencia roja, mientras que en células que han sufrido pérdida del potencial de la membrana mitocondrial éste se libera hacia el citosol en forma de monómero exhibiendo una fluorescencia verde. La **figura 18** muestra la cinética de la disminución en la relación de la fluorescencia roja/verde en células M12.C3.F6, lo cual indica una despolarización de la membrana mitocondrial. Esta pérdida del potencial de membrana es dependiente del tiempo. En el **panel A** de la **figura 18** se observa la relación de intensidad de fluorescencia roja/verde para células que han sido tratadas con los propóleos recolectados durante la temporada de primavera, de manera general se observa que la pérdida de potencial de membrana es dependiente al tiempo de inducción de apoptosis y en el **panel B** se muestra esta misma tendencia mostrada por el inductor positivo de apoptosis (CAPE). En la **Figura 19** se muestran los citogramas biparamétricos correspondientes a la fluorescencia dual de JC-1. Se puede observar un desplazamiento de la fluorescencia roja hacia la fluorescencia verde, lo cual indica una disminución gradual e inminente de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial. De manera adicional en la **figura 20** se muestran los cambios morfológicos característicos de apoptosis inducidos en las

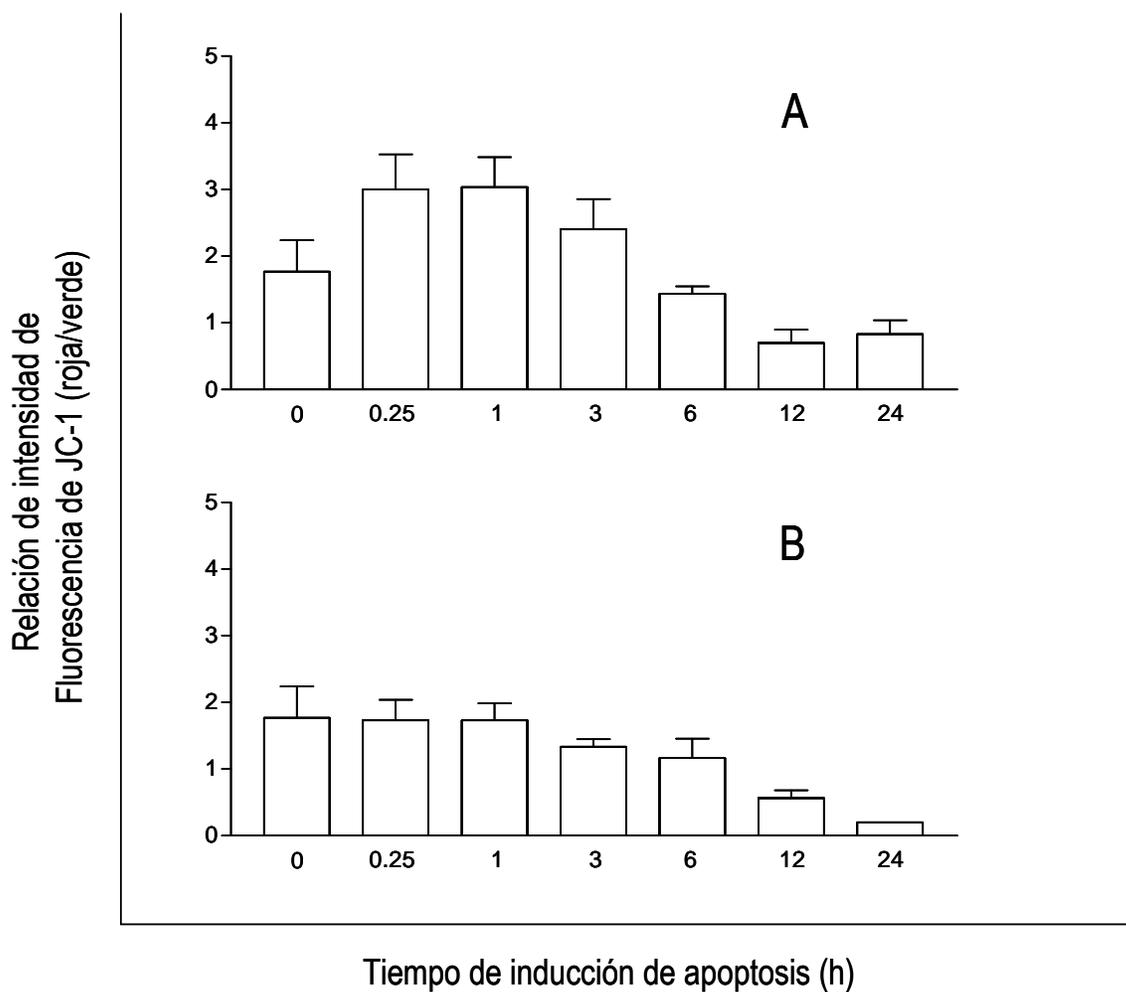
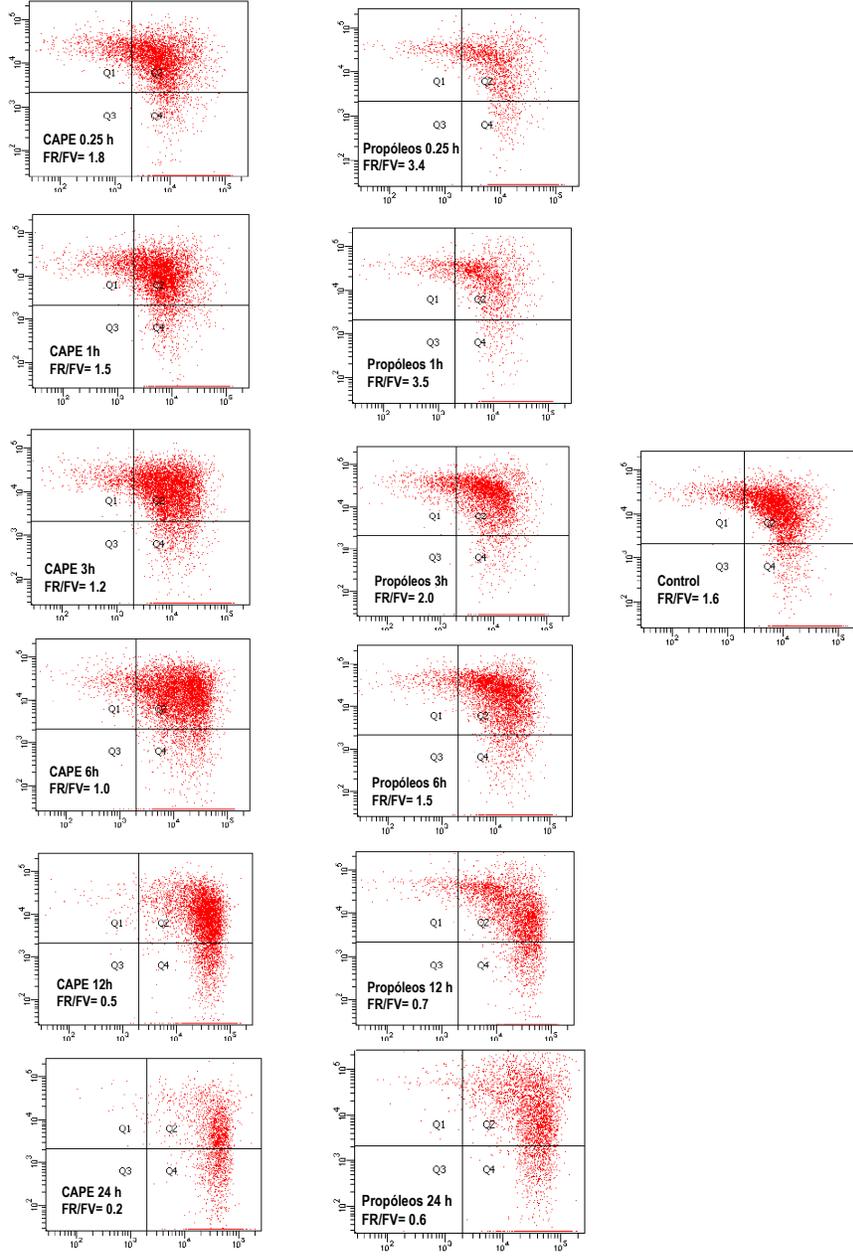


Figura 18. Cinética de la disminución del potencial de membrana mitocondrial en células M12.C3.F6. En A se muestra relación de la intensidad de fluorescencia de JC-1 (roja/verde) para células que han sido tratadas con los propóleos recolectados durante la temporada de primavera y en B se muestra relación de la intensidad de fluorescencia de JC-1 (roja/verde) para células que han sido tratadas con el inductor positivo de apoptosis (CAPE). Los resultados son representativos de por lo menos tres experimentos independientes. Todos los valores representan el promedio de tres determinaciones \pm desviación estándar.

Fluorescencia roja (células sanas)



Fluorescencia verde (células apoptóticas: despolarización en su membrana mitocondrial)

Figura 19. Cambios en el potencial de membrana mitocondrial. Células M12.C3.F6 tratadas con CAPE (7.5 μ M) y propóleo colectado en primavera (50 μ g/mL) a diferentes tiempos de exposición al inductor de apoptosis. Esta figura es representativa de al menos tres experimentos independientes.

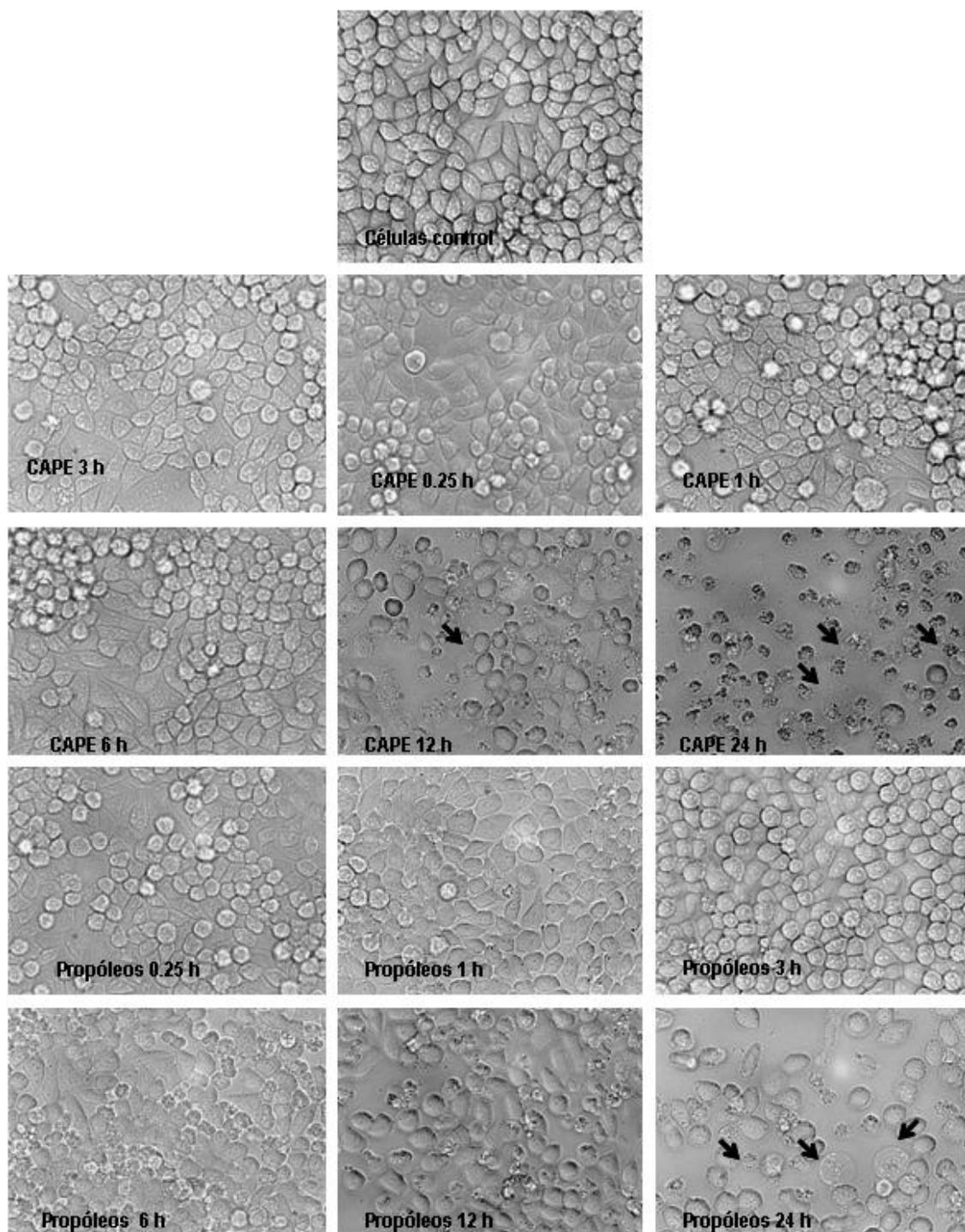


Figura 20. Cambios morfológicos observados en la línea celular cancerígena M12.C3.F6 a diferentes tiempos de incubación con CAPE (7.5 μ M) y propóleos recolectados en la temporada de primavera (50 μ g/mL). Las flechas indican cambios morfológicos típicos de la muerte celular mediada por apoptosis.

células cancerígenas M12.C3.F6, algunos como la condensación de la cromatina hacia un polo de la célula (que da la apariencia de una célula vacía), la disminución del tamaño, presencia de cuerpos apoptóticos. Dichos cambios aparecen también de manera gradual dependientes del tiempo de inducción de apoptosis. En los tiempos iniciales de la inducción (0.25, 1, 3 y 6 h) la morfología de las células es muy similar a la morfología observada en las células control (morfología similar a fibroblastos, alargadas, con núcleo definido y adheridas a la superficie de cultivo). Los cambios morfológicos hacia células con apariencia apoptótica empieza a ser evidente a las 12 h de incubación con los propóleos (50 µg/mL) y CAPE (7.5 µM).

6.9. Inducción de apoptosis por activación de la vía dependiente de caspasas

La activación de apoptosis mediada por la vía dependiente de la mitocondria (vía intrínseca) está generalmente asociada a la activación de las caspasa 9 (iniciadora) y la subsecuente activación de la caspasa 3 (efectora). Con la finalidad de determinar si en la actividad citotóxica de los propóleos está involucrada la activación de estas moléculas, las células M12.C3.F6 fueron incubadas con propóleo (50 µg/mL) colectado durante primavera a diferentes tiempos (0.25 – 12 h), utilizando como control positivo de activación de caspasa 3 CAPE (7.5 µM). La activación de ambas caspasas incrementó (con referencia a la activación basal que presentaron las células control) de manera notable a las 3 h de incubación con los propóleos, siendo este incremento más evidente a las 6 h de tratamiento. En las células tratadas con el inductor positivo la activación de estas proteínas fue perceptible a partir de 1 h de tratamiento. El comportamiento de la activación de la caspasa 3 y 9 se observa en la **figura 21 y 22**, respectivamente.

La caspasa 8 es la proteína encargada de iniciar la vía de señalización para desencadenar el proceso de apoptosis mediado por la vía extrínseca, ya que tiene la capacidad de activar a las caspasas 3, 6 y 7 (efectoras), que tienen como objetivo activar las proteínas responsables de todos los eventos bioquímicos y morfológicos que ocurren durante la muerte celular por apoptosis. Con el objetivo de determinar si

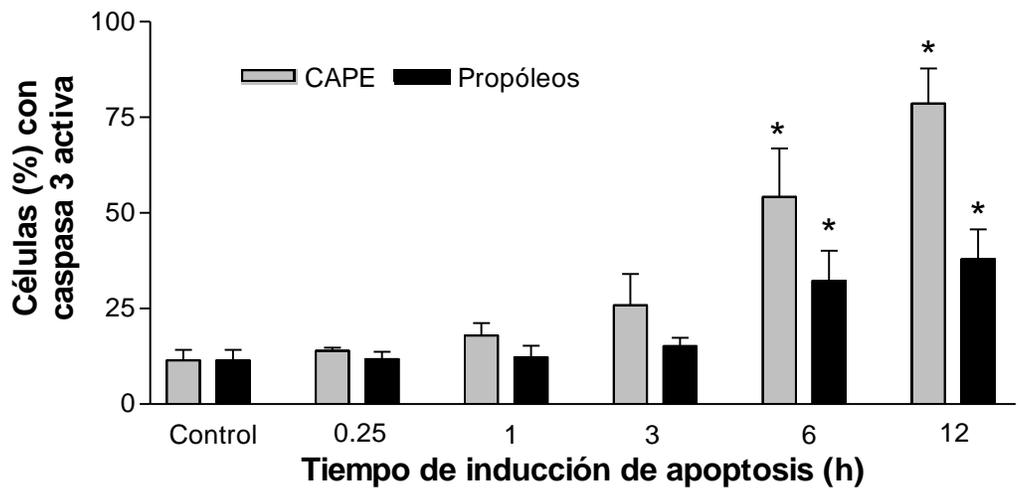


Figura 21. Activación de la caspasa 3 en células M12.C3.F6. La concentración de propóleo utilizada fue 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CAPE se utilizó a una concentración de 7.5 μM . Los resultados son representativos de por lo menos tres experimentos independientes. Todos los valores representan el promedio de tres determinaciones \pm desviación estándar. Las diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto al control se marcan con asterisco.

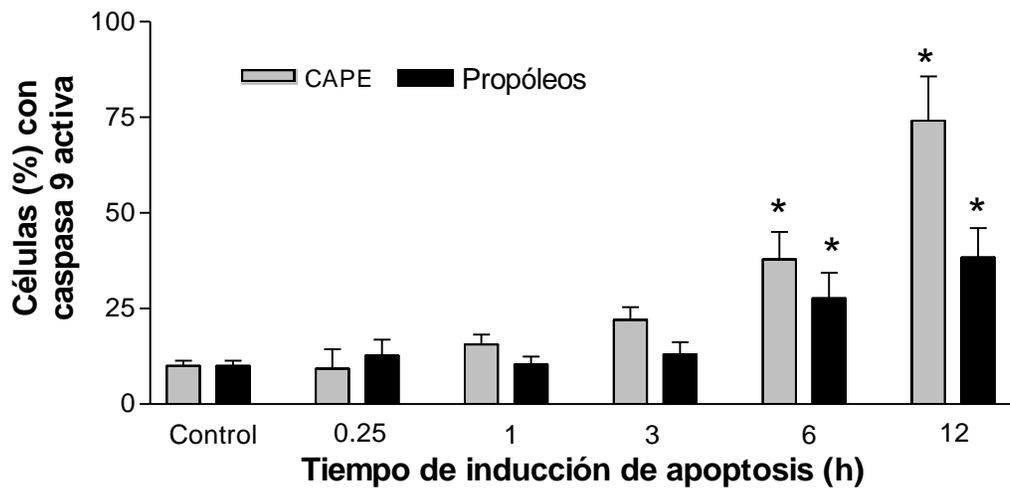


Figura 22. Activación de la caspasa 9 en células M12.C3.F6. La concentración de propóleo utilizada fue 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CAPE se utilizó a una concentración de 7.5 μM . Los resultados son representativos de por lo menos tres experimentos independientes. Todos los valores representan el promedio de tres determinaciones \pm desviación estándar. Las diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto al control se marcan con asterisco.

la vía extrínseca fue activada por efecto de los propóleos se evaluó la actividad de la caspasa 8. La activación más evidente de la caspasa 8 se observó a las 6 h, el mismo tiempo de inducción de apoptosis que el observado para la activación de la caspasa 9, encontrándose mayor evidencia de activación para las células con 6 h de inducción de apoptosis (**figura 23**). De manera general, no es posible discernir cual de las vías (intrínseca o extrínseca) es activada inicialmente, por lo cual es necesario realizar la evaluación de la activación de otras proteínas mediadoras de apoptosis. Un dato inequívoco es que la actividad antiproliferativa ejercida por los propóleos es mediada por un mecanismo de apoptosis la cual es activada por la vía de dependiente de caspasas.

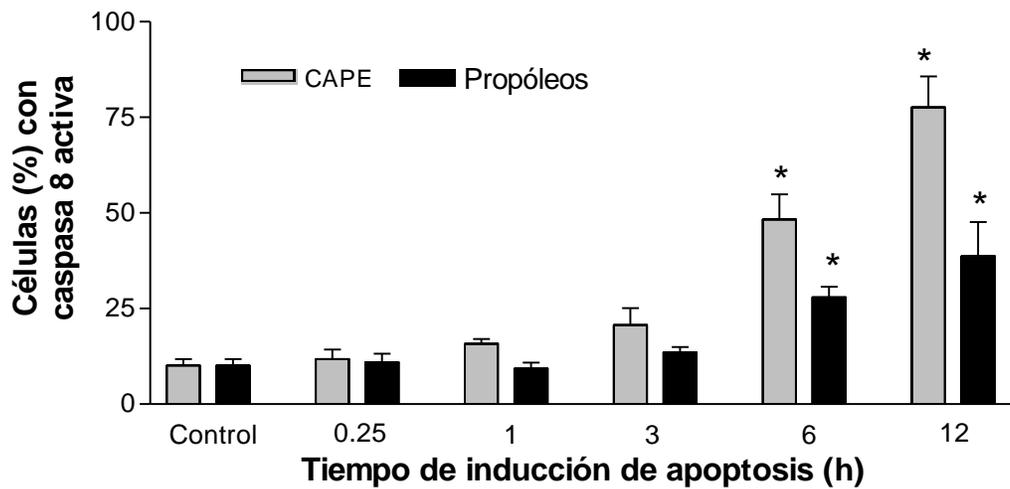


Figura 23. Activación de la caspasa 8 en células M12.C3.F6. La concentración de propóleo utilizada fue 50 µg/mL, CAPE se utilizó a una concentración de 7.5 µM. Los resultados son representativos de por lo menos tres experimentos independientes. Todos los valores representan el promedio de tres determinaciones ± desviación estándar. Las diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto al control se marcan con asterisco.

7. DISCUSIÓN

El cáncer es una de las causas más frecuentes de morbilidad y mortalidad a nivel mundial (Anand et al. 2008, Motomura et al. 2008), ocupando el segundo lugar después de las enfermedades cardiovasculares, motivo por el cual el objetivo de las investigaciones en productos naturales se han centrado en la búsqueda de compuestos que puedan ser utilizados en la prevención o tratamiento de este padecimiento. En la actualidad se puede considerar a los propóleos como un producto natural con una potencial fuente de agentes anticancerígenos. La composición química de los propóleos es cualitativa y cuantitativamente variable, esto en dependencia a la vegetación disponible en el área circundante a la colmena así como al tiempo de recolección de los mismos (Ahn et al. 2004, Lotti et al. 2010, Piccinelli et al. 2005).

En este trabajo de investigación, se analizó el efecto de la temporalización sobre la composición química y actividades biológicas (antiproliferativa y antioxidante) de los propóleos recolectados en la región de Ures, Sonora durante las cuatro estaciones del año comprendido en el periodo 2008-2009. Así como el análisis del papel que desempeña el mecanismo de apoptosis en la muerte celular inducida por los propóleos. La abundancia relativa de los constituyentes químicos mayoritarios de los propóleos fue similar en las cuatro estaciones del año. Sin embargo, se observó un efecto muy importante de la temporalización de la recolección de los propóleos sobre la actividad antiproliferativa de éstos.

La mayor cantidad de propóleos recolectada se obtuvo durante el verano (**tabla 1**), esto pudiera ser debido a que la recolección de resinas por parte de las abejas es más frecuente a finales del verano y durante el otoño justamente cuando la producción de miel se reduce. Existe la hipótesis de que la recolección de propóleos por parte de la abeja se incrementa a final del verano e inicio del otoño debido al efecto de cambios estacionales en el comportamiento de las abejas para la búsqueda de alimento, y no como respuesta a cambios climáticos o a la necesidad de éstas de preparar su colmena para la llegada del invierno (Ghisalberti 1979,

Simone-Finstrom et al. 2010). La temporalización no tiene efecto sobre la abundancia relativa de los constituyentes químicos más abundantes presentes en los propóleos de la región de Ures, Sonora. Los extractos de los propóleos correspondientes a cada una de las estaciones del año presentaron un perfil cromatográfico de HPLC cualitativo muy similar, sólo se observaron ligeras diferencias en la abundancia relativa de algunos de los compuestos (**tabla 3**). Esta observación concuerda con reportes que muestran que la temporalización no tienen un efecto significativo en la composición química de los propóleos (perfil cromatográfico cualitativo), pero que si influye en el perfil cromatográfico cuantitativo (Simoës-Ambrosio et al. 2010). En las cuatro muestras analizadas (correspondientes a cada una de las estaciones del año) fueron identificados los siguientes compuestos: pinocembrina, 3-acetato de pinobanksina, crisina, CAPE, acacetina y galangina, los cuales son constituyentes químicos previamente reportados en propóleos de esta región (Hernandez et al. 2007). Adicionalmente, los cromatogramas de HPLC obtenidos para las muestras analizadas fueron muy similares a los obtenidos de muestras de propóleos colectadas en la misma área durante el invierno 2003-2004 (Hernandez et al. 2007). Estos resultados sugieren que la composición química de los propóleos de la región de Ures, Sonora es muy estable, y también indica que la principal fuente botánica para la formulación de este producto natural está disponible durante las cuatro estaciones del año. Datos obtenidos recientemente por nuestro grupo de investigación (Alday 2012, Tesis de maestría en proceso,) revelan que el perfil cromatográfico del extracto metanólico de *Populus fremontii* y los propóleos de la región de Ures, Sonora son sumamente similares, lo que permite asumir que esta especie vegetal es la principal fuente de resinas para la elaboración de los propóleos de ésta región, además de que éste árbol es una especie perene ampliamente distribuida en la zona de recolección de los propóleos analizados. Adicionalmente, la presencia en mayor abundancia de flavonoides como pinocembrina, 3-acetato de pinobanksina y crisina (**tabla 3**) sustenta esta idea, ya que en la literatura se encuentra reportado que la presencia de estos flavonoides son marcadores químicos que sugieren que el origen botánico es principalmente *Populus fremontii* (Bankova

2005, Bankova et al. 2000, Garcaviaguera et al. 1993). Las rutas biosintéticas de flavonoides en las especies de *Populus spp.* han sido descritas ampliamente en la literatura (Cervera et al. 2001, Morreel et al. 2006 y Birtaş et al. 2010). El constituyente químico más abundante en los propóleos analizados fue pinocembrina, lo cual concuerda con reportes donde se ha encontrado una sobre expresión de pinocembrina tanto en exudados de especies de *Populus spp.* como en muestras de propóleos, la cual se debe a su importancia como precursor central de flavononas, dihidroflavanoles y flavanoles en especies vegetales (Birtaş et al. 2010 y Morreel et al. 2006), aspecto que permite corroborar que especies de *Populus* constituyen la principal fuente botánica del los propóleos de la región de Ures, Sonora. En relación a los resultados de caracterización química de los propóleos, se ha evidenciado la presencia de constituyentes químicos descritos en la literatura como productos de la biosíntesis particular de las especies de *Populus ssp.*, algunos como los flavonoides: pinocembrina, pinobanksina-3-acetato, crisina, quercitina-3-metil-éter, galangina, entre otros (Morrel y col., 2005; Bankova y col., 2005). Adicionalmente se identificó una serie de ésteres de la pinobanksina, la presencia de éstos ésteres ha sido reportada en propóleos con origen geográfico en Bulgaria y Uruguay (Kumazawa et al. 2002, Prytyk et al. 2003), cuyo origen botánico son distintas especies de *Populus*. Bankova y colaboradores reportan la presencia de ésteres de pinobanksina como compuestos biosintetizados por las especies de *Populus*, apoyando la idea de que el origen botánico principal es *Populus fremontii*.

En lo que concierne al efecto de la temporalización sobre las actividades biológicas, se observó un efecto muy evidente de la temporalización de la recolecta de los propóleos sobre la actividad antiproliferativa de éstos en las líneas cancerígenas evaluadas; esto a pesar de encontrar un perfil químico muy similar en las diferentes muestras de propóleos estudiadas. Este efecto podría deberse a pequeñas variaciones cuantitativas en los constituyentes químicos presentes en los propóleos recolectados en las diferentes estaciones del año. Otra explicación posible para esta observación podría ser el hecho que alguno de los compuestos no identificados (compuesto minoritario) posea un potente efecto antiproliferativo y que

su abundancia sea distinta en cada una de las estaciones o bien que solo estén presentes en los propóleos recolectados durante la primavera e invierno, ya que éstos mostraron una actividad antiproliferativa superior a la ejercida por los propóleos correspondientes a verano y otoño. Con base a lo anterior, es importante la realización de estudios más detallados para dilucidar el efecto de la temporalización sobre la actividad antiproliferativa de los propóleos de Ures, Sonora. Para nuestro conocimiento este es el primer estudio que demuestra un efecto significativo de la temporalización sobre la actividad antiproliferativa de propóleos, asimismo en nuestro grupo de investigación se ha reportado este mismo efecto en la actividad antiparasitaria (anti-giardia) (Díaz-Reyes 2010, Tesis de Maestría). Es pertinente mencionar que no se ha encontrado un efecto de la temporalización sobre las actividades inmunoreguladora, antibacteriana y antifúngica de este producto natural (Sforcin et al. 2000, Sforcin et al. 2001).

Otro aspecto importante evaluado en éste estudio, fue el efecto de actividad antiproliferativa de los propóleos recolectados en las diferentes estaciones del año sobre diferentes estirpes celulares. Se utilizaron líneas cancerígenas con diferente tejido de origen, Raw macrófago de ratón transformado por el virus de la leucemia de Abelson, M12.C3.F6 procedente de linfoma de células B de ratón, Hela células de adenocarcinoma de cérvix de humano, LS-180 con origen el tejido canceroso de colon humano y la línea celular A-549 proveniente de adenocarcinoma de pulmón de humano; todas ellas con tasas de crecimiento distintas, debido a que difieren en su ciclo celular, así como en la expresión de moléculas y mecanismos de control de éste proceso. Debido a estas características específicas de cada una de las diferentes líneas celulares podría ser el motivo por el cual los propóleos mostraron citotoxicidad preferencial hacia algunas líneas celulares, siendo Raw y M12.C3F6 las líneas celulares con mayor susceptibilidad a los extractos de propóleos.

Otra de las actividades biológicas de suma importancia de los propóleos, es su actividad antioxidante, debido a que los compuestos antioxidantes brindan protección contra el efecto del estrés oxidativo de las células, el cual está estrechamente relacionado con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, así como cáncer y

otros padecimientos degenerativos (Isla et al. 2009). La función de los antioxidantes es la defensa del organismo contra radicales libres, algunos como especies reactivas de oxígeno (ROS). Algunas enzimas como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa constituyen el principal sistema que combate del estado oxidativo de la célula, pero si la producción de radicales libres excede la capacidad antioxidante de estos sistemas enzimáticos, la segunda línea de defensa esta constituida por compuestos químicos antioxidantes, como lo son algunas vitaminas (vitamina C y E), así como los compuestos fenólicos y flavonoides (Mohammadzadeh et al. 2007). Al evaluar la capacidad de los propóleos para neutralizar radicales libres, mediante el método espectrofotométrico del DPPH encontramos diferencias significativas [$p < 0.05$, a la concentración más alta de propóleo evaluada (100 $\mu\text{g/mL}$)] en la actividad antioxidante de los propóleos sonorenses, encontrándose una correlación directa de la cuantificación de fenoles totales con la actividad antioxidante observada, siendo los propóleos correspondientes a otoño los que presentaron mayor contenido de fenoles totales y la mayor actividad antioxidante. Esta observación concuerda con datos reportados en la literatura donde se muestra un efecto de la temporalización sobre la actividad antioxidante de los propóleos (Chen et al. 2008, Isla et al. 2009, Teixeira et al. 2010). Esta diferencia en la actividad antioxidante apoya la idea de que ligeras modificaciones en la composición química de los propóleos inciden de manera muy importante en sus actividades biológicas. De manera general, los propóleos de la región de Ures, Sonora mostraron una actividad antioxidante débil en comparación con reportes de actividad antioxidante de propóleos de la región de Caborca los cuales exhiben una potente actividad antioxidante (Velazquez et al. 2007), esto probablemente debido a las diferencias químicas encontradas en los propóleos de esta región con respecto a la composición de los propóleos de la región de Ures, Sonora (Hernández, 2007).

Es importante destacar que en trabajos previos nuestro grupo de investigación ha reportado que cultivos de líneas celulares cancerígenas que han sido tratadas con propóleos sonorenses y CAPE (constituyente químico de los propóleos sonorenses) exhiben cambios morfológicos y el patrón de escalera de la fragmentación del DNA

genómico característicos de apoptosis (Hernandez et al. 2007), observaciones que han sido reportadas también por otros autores quienes muestran que CAPE induce apoptosis en algunas líneas celulares cancerígenas (Xiang et al. 2006, Chen et al. 2001). Con base en los datos anteriores se procedió a evaluar el mecanismo molecular mediante el cual los propóleos sonorenses inducen apoptosis. Los resultados obtenidos de la tinción doble con anexina-V/yoduro de propidio indican que los propóleos efectivamente inducen apoptosis en las células cancerígenas M12.C3.F6, excluyendo la posibilidad de que la muerte celular esté mediada por necrosis, estos datos se pueden observar claramente en la **tabla 7**. Uno de los eventos tempranos que se presentan en células que están experimentando apoptosis es la disminución en el potencial de membrana mitocondrial, el cual indica que el mecanismo de apoptosis está mediado por activación de la vía dependiente a la mitocondria, que se asocia a la subsecuente activación de caspasa 9 y posteriormente de la caspasa 3. Los datos relacionados a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial indican que la despolarización de la mitocondria ocurre de manera gradual y dependiente al tiempo (**figura 20**); este efecto dependiente al tiempo de inducción de apoptosis concuerda con el comportamiento en la pérdida de potencial de membrana mitocondrial reportada por otros autores para propóleos de origen asiático (Xuan et al. 2011) así como para otro tipo compuestos como el cirpofloxacin (Herold et al. 2002).

Recientemente, muchos reportes en la literatura sugieren que la familia de las caspasas desarrolla un papel muy importante en la apoptosis (Cohen 1997, Chen et al. 2002). Nuestros resultados indican que los propóleos correspondientes a primavera inducen la activación de las caspasas 3, 9 y 8 (**figura 22, 23 y 24**, respectivamente). La vía extrínseca de la apoptosis puede ser iniciada con la señal pro-apoptótica de Fas a su ligando, esta unión provoca el reclutamiento del complejo DISC, el cual posee proteínas adaptadoras que promueven la autoactivación de la caspasa 8 (iniciadora de la vía extrínseca), que posteriormente activa las caspasas efectoras, entre las que se encuentra la caspasa 3 (Hengartner 2000, Nagata 1999). Adicionalmente, la caspasa 8 puede activar a Bid (miembro pro-apoptótico de la

familia Bcl-2) y éste inducir la liberación de proteínas mitocondriales (citocromo C y Apaf-1) que conducen a la activación de la caspasa 9 (iniciadora de la vía intrínseca) (Nagata 1999), coexistiendo un entrecruzamiento de la vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis (**figura 24**). El hecho de la activación indistinta de las caspasas iniciadoras 8 y 9 de las vías extrínseca e intrínseca, respectivamente, podría sugerir que el efecto apoptótico ejercido por los propóleos de la región de Ures, Sonora está mediado en primera instancia por la vía extrínseca y que posteriormente es activada la vía intrínseca debido a la liberación de proteínas mitocondriales que favorecen la activación de la caspasa 9, así como la posterior despolarización de la membrana mitocondrial. Sin embargo, para poder confirmar lo anterior, son necesarios estudios más detallados donde se evalúe la activación de otras moléculas involucradas en la muerte celular mediada por apoptosis, tales como Bid, la liberación de citocromo C, así como la expresión de proteínas como Fas y FasL.

En resumen, la temporalización en la recolecta de los propóleos no tiene un efecto significativo sobre la composición química de éstos, al menos en lo que respecta a sus constituyentes químicos más abundantes; de manera contraria, hubo un efecto muy marcado sobre la actividad antiproliferativa de este producto natural, la cual es mediada por mecanismo de apoptosis activando la vía dependiente de caspasas. Estos datos evidencian la necesidad de estudios más detallados que involucren la evaluación de otras moléculas involucradas en la muerte celular mediada por apoptosis, que nos permitan aseverar la vía inicial de activación, con la finalidad de tener un mejor entendimiento de su actividad biológica y su uso potencial como terapia antitumoral alternativa.

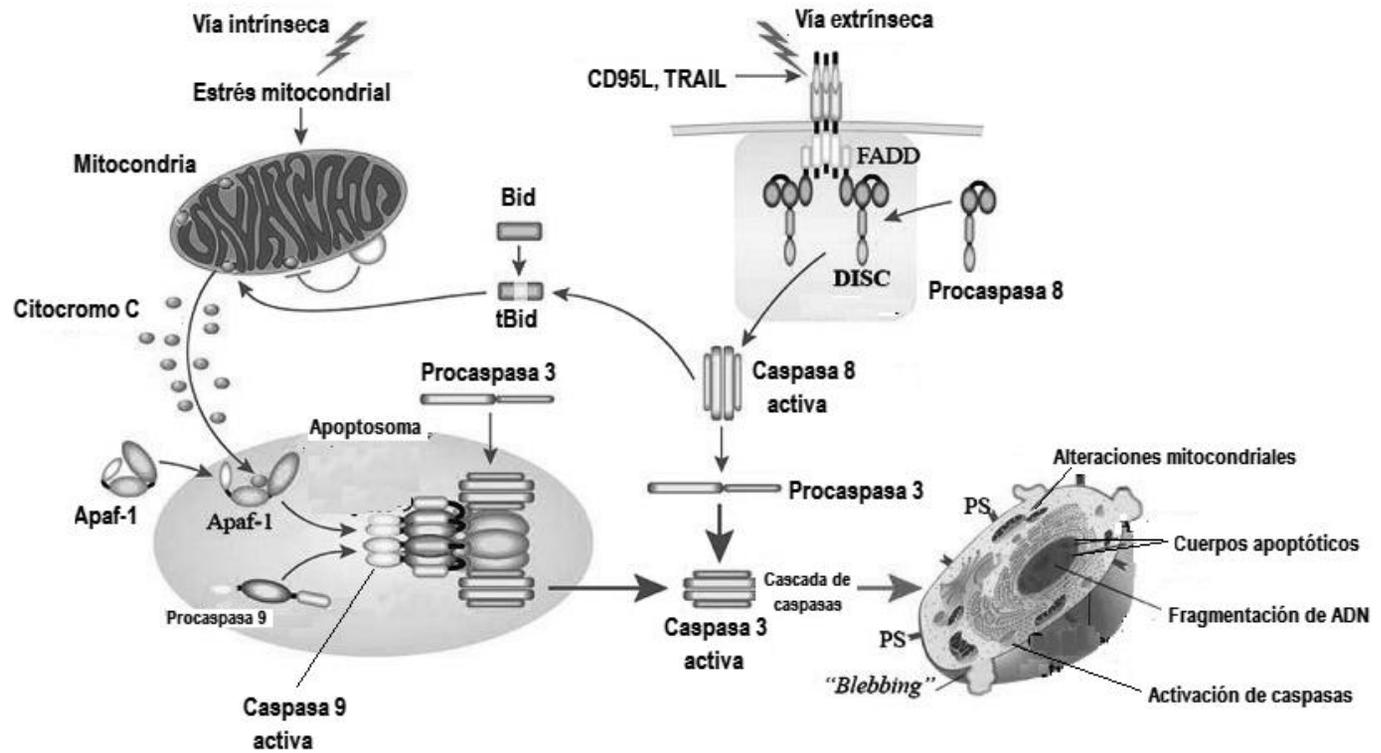


Figura 24. Esquema de señalización de las vías intrínseca e intrínseca de apoptosis.

8. CONCLUSIONES

- La estación en la cual se colectan los propóleos influye en la cantidad de éstos, así como en sus características organolépticas.
- El tiempo de recolecta de los propóleos (temporalización) no tiene efecto significativo sobre la composición química, al menos de los constituyentes más abundantes, de los propóleos de Ures, Sonora.
- La temporalización tiene un efecto significativo sobre sus actividades biológicas: antiproliferativa y antioxidante.
- Todas las muestras de propóleos mostraron actividad antiproliferativa sobre las líneas celulares cancerígenas utilizadas, siendo el extracto correspondiente al propóleo colectado en primavera el que mostró mayor actividad antiproliferativa sobre las líneas celulares evaluadas.
- Todas las muestras de propóleos analizadas mostraron una débil actividad antioxidante.
- Los propóleos de la región de Ures, Sonora, ejercen su actividad antiproliferativa mediante apoptosis utilizando el mecanismo celular dependiente de caspasas.

9. PERSPECTIVAS

- Continuar con la caracterización química y biológica de los constituyentes menores presentes en los propóleos sonorenses, a través de estudios cualitativos y cuantitativos más detallados.
- Evaluar las actividades biológicas de los nuevos compuestos químicos identificados y caracterizados de los propóleos de la región de Ures, Sonora.
- Evaluar la activación de otras moléculas involucradas en la muerte celular mediada por apoptosis, algunos como Bid, la liberación del citocromo C, así como la expresión de proteínas como Fas y FasL para identificar concretamente si la apoptosis se dispara por la activación de la vía extrínseca o intrínseca.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Fattah, N. S. and O. H. Nada. 2007. Effect of propolis versus metronidazole and their combined use in treatment of acute experimental giardiasis. *J. Egypt Soc Parasitol.* 37: 691-710.
- Ahn, M.R., S. Kumazawa, T. Hamasaka, K. S. Bang and T. Nakayama. 2004. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. *J. Agric. Food Chem.* 52: 7286-7292.
- Ahn, M.R., S. Kumazawa, Y. Usui, J. Nakamura, M. Matsuka, F. Zhu and T. Nakayama. 2007. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chem.* 101: 1383-1392.
- Alday-Noriega, E. 2012. Tesis de maestria en proceso. Origen botánico de propóloes de la región de Ures, Sonora. Maestria en Ciencias de la Salud, Departamento de Ciencias químico-biológicas. Universidad de Sonora.
- Amoros, M., E. Lurton, J. Boustie, L. Girre, F. Sauvager and M. Cormier. 1994. Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-but-2-enyl caffeate. *J. Nat. Prod.* 57: 644-647.
- Anand, P., A. B. Kunnumakara, C. Sundaram, K. B. Harikumar, S. T. Tharakan, O. S. Lai, B. Sung and B. B. Aggarwal. 2008. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical Research.* 25: 2097-2116.
- Arzneibuch, Das. Deutsche. 1986. Flavanone. *Kommentar.* 3: 2226.
- Bankova, V.S., S. L. de Castro and M.C. Marcucci. 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie.* 31: 3-15.
- Bankova, V. 2005. Recent trends and important developments in propolis research. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2: 29-32.
- Banskota, A. H., Y. Tezuka, J. K. Prasain, K. Matsushige, I. Saiki and S. Kadota. 1998. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. *J. Nat. Prod.* 61: 896-900.

- Banskota, A. H., Y. Tezuka, K. Midorikawa, K. Matsushige and S. Kadota. 2000. Two novel cytotoxic benzofuran derivatives from Brazilian propolis. *J. Nat. Prod.* 63: 1277-9.
- Banskota, A. H., Y. Tezuka and S. Kadota. 2001. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research.* 15: 561-571.
- Banskota, A. H., T. Nagaoka, L. Y. Sumioka, Y. Tezuka, S. Awale, K. Midorikawa, K. Matsushige and S. Kadota. 2002. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *J Ethnopharmacol.* 80: 67-73.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* 181: 1199–1200.
- BIRTAŞ,G., L. Marghitaş, D. Dezmirean, O. Stanciu and M. Tămas. 2010. Spectrophotometric evaluation of flavonoid content of propolis and poplar buds by ZrOCl₂ reagent. *Bulletin UASVM Animal Sci and Biotech.* 67: 85-90.
- Bufo, M. C., J. M. G. Candeias and J. M. Sforcin. 2009. In vitro cytotoxic effect of Brazilian green propolis on human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 6: 483-487.
- Burdock, G. A. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem. Toxicol.* 36: 347-363.
- Cervera, M. V. Strome, B. Ivens, J. Gusmão, B. Liu, V. Hostyn, J. Van Slycken, M. Van Montagu W. Boerjan. 2001. Dense genetic linkage maps of three *Populus* Species (*Populus deltoides*, *P. nigra* and *P. trichocarpa*) Based on AFLP and Microsatellite Markers. *Genetics Society of America. Genetics.* 158: 787–809.
- Chen, Y. J., M. S. Shiao, M. L. Hsu, H. T. Tsai and S. Y. Wang. 2001. Effect of caffeic acid phenethyl ester, an antioxidant from propolis, on inducing apoptosis in human leukemic HL-60 cells. *J. Agric. Food Chem.* 49: 5615-5619.
- Chen, Y. L., J. Y. Wang, S. H. Chen and B. C. Yang. 2002. Granulocytes mediate the Fas-L-associated apoptosis during lung metastasis of melanoma that determines the metastatic behaviour. *British J Cancer.* 87: 359-365.

- Chen, C. N., M. S. Weng, C. L. Wu and J. K. Lin. 2004. Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by Taiwanese Propolis from different sources. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 1: 175-185.
- Chen, Y. W., S. W. Wu, K. K. Ho, S. B. Lin, C. Y. Huang and C. N. Chen. 2008. Characterisation of Taiwanese propolis collected from different locations and seasons. *J. Sci Food Agric.* 88: 412-419.
- Cohen, G. M. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *J. Biochem.* 326: 1-16.
- Cuesta-Rubio, O., B. A. Frontana-Urbe, T. Ramírez-Apan and J. Cárdenas. 2002. Polyisoprenylated benzophenones in cuban propolis; biological activity of nemorosone. *Z Naturforsch C.* 57: 372-8.
- Dantas, A. P., K. Salomão, H. S. Barbosa and S. L. De Castro. 2006. The effect of Bulgarian propolis against *Trypanosoma cruzi* and during its interaction with host cells. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 101: 207-11.
- 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. Maestría en Ciencias de la Salud, Departamento de Ciencias químico-biológicas. Universidad de Sonora.
- Garciaviguera, C., F. Ferreres and F. A. Tomasbarberan. 1993. Study of canadian propolis by gc-ms and hplc. *Z. Fur Naturforsch.C.* 48: 731-735.
- Ghisalberti, E. L. 1979. Propolis: a review. *Bee World.* 60: 59-84.
- Gregoris, E. and R. Stevanato .2010. Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian propolis. *Food Chem. Toxicol.* 48: 76-82.
- Hegazi, A. G., F. K. Abd El Hady and F. A. M. Abd Allah. 2000. Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Z. Fur Naturforsch.C.* 55: 70-75.
- Hengartner, M. O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 407: 770-776.
- Hernandez, J., F. M. Goycoolea, J. Quintero, A. Acosta, M. Castaneda, Z. Dominguez, R. Robles, L. Vazquez-Moreno, E. F. Velazquez, H. Astiazaran, E.

- Lugo and C. Velazquez .2007. Sonoran propolis: Chemical composition and antiproliferative activity on cancer cell lines. *Planta Med.* 73: 1469-1474.
- Herold, C., M. Ocker, M. Ganslmayer, H. Gerauer, E. G. Hahn and D. Schuppan. 2002. Ciprofloxacin induces apoptosis and inhibits proliferation of human colorectal carcinoma cells. *British Journal of Cancer.* 86: 443-448.
- Isla, M. I., I. C. Zampini, R. M. Ordonez, S. Cuello, B. C. Juarez, J. E. Sayago, M. I. N. Moreno, M. R. Alberto, N. R. Vera, E. Bedascarrasbure, A. Alvarez, F. Ciocchini and L. M. Maldonado. 2009. Effect of seasonal variations and collection form on antioxidant activity of propolis from San Juan, Argentina. *J. Med. Food.* 12: 1334-1342.
- Jorge, R., N. Furtado, J. P. B. Sousa, A. A. da Silva, L. E. Gregorio, C. H. G. Martins, A. E. E. Soares, J. K. Bastos, W. R. Cunha and M. L. A. Silva. 2008. Brazilian Propolis: seasonal variation of the prenylated p-coumaric acids and antimicrobial activity. *Pharmaceutical Biol.* 46: 889-893.
- Kalogeropoulos, N., S.J. Konteles, E. Troullidou, I. Mourtzinou and V.T. Karathanos. 2009. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chem.* 116: 452–461.
- Khoo, B. Y., S. L. Chua and P. Balaram. 2010. Apoptotic effects of chrysin in human cancer cell lines. *Int J Mol Sci.* 11: 2188-99.
- Kimoto, T., S. Arai, M. Kohguchi, M. Aga, Y. Nomura, M. J. Micallef, M. Kurimoto and K. Mito. 1998. Apoptosis and suppression of tumor growth by artemillin C extracted from Brazilian propolis. *Cancer Detect Prev.* 22: 506-15.
- Kimoto, T., M. Aga, K. Hino, S. Koya-Miyata, Y. Yamamoto, M. J. Micallef, T. Hanaya, S. Arai, M. Ikeda and M. Kurimoto. 2001. Apoptosis of human leukemia cells induced by Artemillin C, an active ingredient of Brazilian propolis. *Anticancer Res.* 21: 221-8.
- Kumazawa, S., K. Hayashi, K. Kajiya, T. Ishii, T. Hamasaka and T. Nakayama. 2002. Studies of the constituents of Uruguayan propolis. *J. Agric. Food Chem.* 50: 4777–4782.

- Kumazawa, S., R. Ueda, T. Hamasaka, S. Fukumoto, T. Fujimoto and T. Nakayama. 2007. Antioxidant prenylated flavonoids from propolis collected in Okinawa, Japan. *J. Agric. Food Chem.* 55: 7722-5.
- Kumazawa, S., M. R. Ahn, T. Fujimoto and M. Kato. 2010. Radical-scavenging activity and phenolic constituents of propolis from different regions of Argentina. *Nat. Prod. Res.* 24: 804-12.
- Laskar, R.A., I.S.K, N. Roy and N.A. Begum. 2010. Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. *Food Chem.* 122: 233–237.
- Li, F., S. Awale, Y. Tezuka and S. Kadota. 2008. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. *Bioorg Med Chem.* 16: 5434-40.
- Li, F., S. Awale, H. Y. Zhang, Y. Tezuka, H. Esumi and S. Kadota. 2009. Chemical constituents of propolis from Myanmar and their preferential cytotoxicity against a human pancreatic cancer cell line. *J. Nat. Prod.* 72: 1283-1287.
- Li, F., S. Awale, Y. Tezuka, H. Esumi and S. Kadota. 2010. Study on the constituents of Mexican propolis and their cytotoxic activity against PANC-1 human pancreatic cancer cells. *J. Nat. Prod.* 73: 623-7.
- Lima, B., A. Tapia, L. Luna, M. P. Fabani, G. Schmeda-Hirschmann, N. S. Podio, D. A. Wunderlin and G. E. Feresin. 2009. Main flavonoids, DPPH activity, and metal content allow determination of the geographical origin of propolis from the Province of San Juan (Argentina). *J. Agric. Food Chem.* 57: 2691-2698.
- Lotti, C., M. C. Fernandez, A. L. Piccinelli, O. Cuesta-Rubio, I. M. Hernandez and L. Rastrelli. 2010. Chemical constituents of red mexican propolis. *J. Agric. Food Chem.* 58: 2209-2213.
- Machado, G. M., L. L. Leon and S. L. De Castro. 2007. Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of *Leishmania*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 102: 73-7.
- Majiene, D., S. Trumbeckaite, A. Pavilonis, A. Savickas and D. M. Martirosyan. 2007. Antifungal and antibacterial activity of propolis. *Current Nutrition and Food Science.* 3: 304-308.

- Miguel, M. G., S. Nunes, S. A. Dandlen, A. M. Cavaco and M. D. Antunes. 2010. Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, south of Portugal. *Food Chem. Toxicol.* 48: 3418-3423.
- Mohammadzadeh, S., M. Sharriatpanahi, M. Hamedi, Y. Amanzadeh, E.S.E. Sadat and S.N. Ostad. 2007. Antioxidant power of Iranian propolis extract. *Food Chem.* 103:729–733.
- Morreel, K., G. Goeminne, V. Storme, L. Sterck, J. Ralph, W. Coppieters, P. Breyne, M. Steenackers, M. Georges, E. Messens and Wout Boerjan. 2006. Genetical metabolomics of flavonoid biosynthesis in *Populus*: a case study. *The Plant Journal.* 47:224–237.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival - application to proliferation and cyto-toxicity assays. *J. Immunol Methods.* 65: 55-63.
- Motomura, M., K. M. Kwon, S.-J. Suh, Y.-C. Lee, Y.-K. Kim, I.-S. Lee, M.-S. Kim, D. Y. Kwon, I. Suzuki and C. H. Kim. 2008. Propolis induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemic U937 cells through Bcl-2/Bax regulation. *Environmental Toxicol. Pharmacol.* 26: 61-67.
- Munstedt, K. and M. Kalder. 2009. Contact allergy to propolis in beekeepers. *Allergologia Et Immunopathologia.* 37: 298-301.
- Nagaoka, T., A. H. Banskota, Y. Tezuka, I. Saiki and S. Kadota. 2002. Selective antiproliferative activity of caffeic acid phenethyl ester analogues on highly liver-metastatic murine colon 26-L5 carcinoma cell line. *Bioorg Med. Chem.* 10: 3351-9.
- Nagata, S. 1999. Fas ligand-induced apoptosis. *Annual Review of Genetics.* 33: 29-55.
- Paulino, N., A. P. Dantas, V. Bankova, D. T. Longhi, A. Scremin, S. L. De Castro and J. B. Calixto. 2003. Bulgarian propolis induces analgesic and anti-inflammatory effects in mice and inhibits in vitro contraction of airway smooth muscle. *J. Pharmaceutical Sciences.* 92: 307-313.

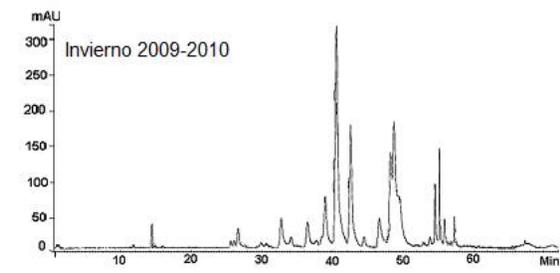
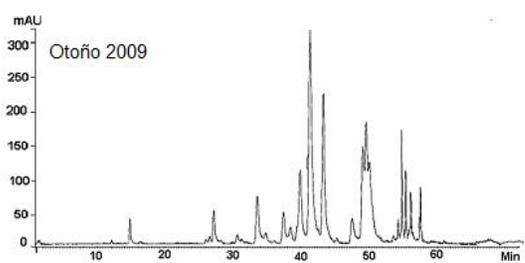
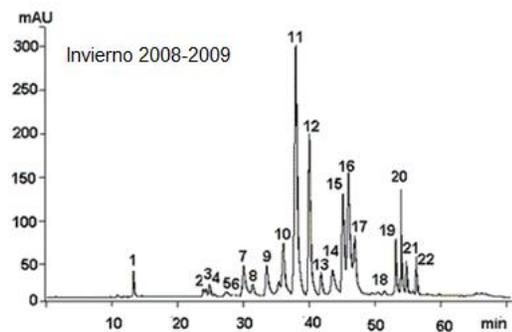
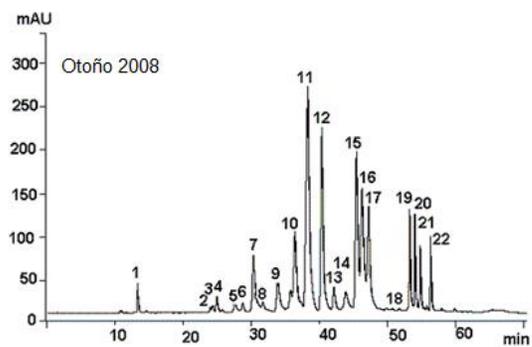
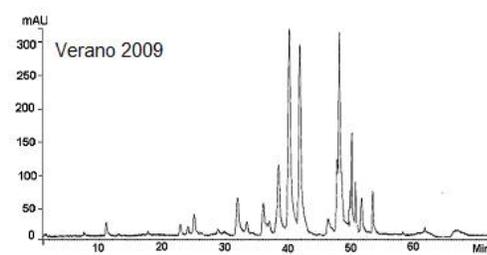
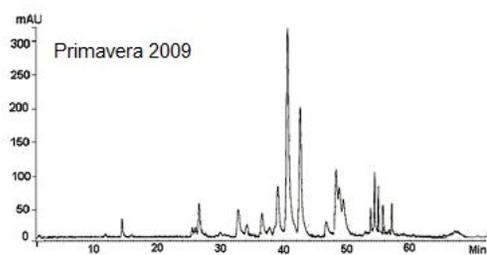
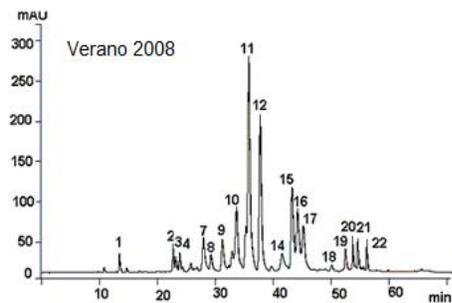
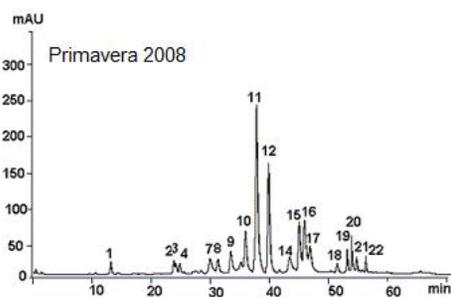
- Piccinelli, A. L., M. C. Fernandez, O. Cuesta-Rubio, I. M. Hernandez, F. De Simone and L. Rastrelli. 2005. Isoflavonoids isolated from Cuban propolis. *J. Agric. Food Chem.* 53: 9010-9016.
- Popova, M., V. Bankova, D. Butovska, V. Petkov, B. Nikolova-Damyanova, A. G. Sabatini, G. L. Marcazzan and S. Bogdanov. 2004. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochem. Analysis.* 15: 235-240.
- Popova, M., S. Silici, O. Kaftanoglu and V. Bankova. 2005. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine.* 12: 221-228.
- Prytyk, E., A.P. Dantas, K. Salomao, A.S. Pereira, V.S. Bankova, S.L. De Castro and F.R. Neto. 2003. Flavonoids and trypanocidal activity of Bulgarian propolis. *J. Ethnopharmacol.* 88: 189–193.
- Robles-Zepeda et al. 2012. Medicinal Plants, *Biodiversity and Drugs*. 18 Botanical Origin and Biological Activity of Propolis . Science Publishers. ISBN 978-1-57808-000-0.
- Salatino, A., E. W. Teixeira, G. Negri and D. Message. 2005. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2: 33-38.
- Senedese, J. M., A. R. Rodrigues, M. A. Furtado, V. D. Faustino, A. A. Berretta, J. M. Marchetti and D. C. Tavares. 2008. Assessment of the mutagenic activity of extracts of Brazilian propolis in topical pharmaceutical formulations on mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*
- Sforcin, J. M., A. Fernandes, C. A. M. Lopes, V. Bankova and S. R. C. Funari. 2000. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.* 73: 243-249.
- Sforcin, J. M., A. Fernandes Junior, C. A. M. Lopes, S. R. C. Funari and V. Bankova. 2001. Seasonal effect of Brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *J. Venomous Animals and Toxins.* 7: 1-7.

- Sforcin, J. M., R. Kaneno and S. R. C. Funari. 2002. Absence of seasonal effect on the immunomodulatory action of Brazilian propolis on natural killer activity. *J Venomous Animals and Toxins*. 8.
- Simoës-Ambrosio, L. M. C., L. E. Gregorio, J. P. B. Sousa, A. S. G. Figueiredo-Rinhel, A. Azzolini, J. K. Bastos and Y. M. Lucisano-Valim. 2010. The role of seasonality on the inhibitory effect of Brazilian green propolis on the oxidative metabolism of neutrophils. *Fitoterapia*. 81: 1102-1108.
- Simone-Finstrom, M. and M. Spivak. 2010. Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie*. 41: 295-311.
- Singleton, V. L. and Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American J. Enology and Viticulture*. 16: 144–158.
- Teixeira, E. W., D. Message, G. Negri, A. Salatino and P. C. Stringheta. 2010. Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian Propolis samples. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 7: 307-315.
- Trusheva, B., M. Popova, V. Bankova, S. Simova, M. C. Marcucci, P. L. Miorin, F. da Rocha Pasin and I. Tsvetkova. 2006. Bioactive constituents of brazilian red propolis. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 3: 249-54.
- Usia, T., A. H. Banskota, Y. Tezuka, K. Midorikawa, K. Matsushige and S. Kadota. 2002. Constituents of chinese propolis and their antiproliferative activities. *J. Nat. Prod.* 65: 673-676.
- Velazquez, C., M. Navarro, A. Acosta, A. Angulo, Z. Dominguez, R. Robles, R. Robles-Zepeda, E. Lugo, F. M. Goycoolea, E. F. Velazquez, H. Astiazaran and J. Hernandez. 2007. Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *J. Appl. Microbiol.* 103: 1747-1756.
- Walgrave, S. E., E. M. Warshaw and L. A. Glesne. 2005. Allergic contact dermatitis from propolis. *Dermatitis* 16: 209-215.
- Woisky, R. G. and Salatino, A. 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J apicultural research*. 37(2): 99–105.

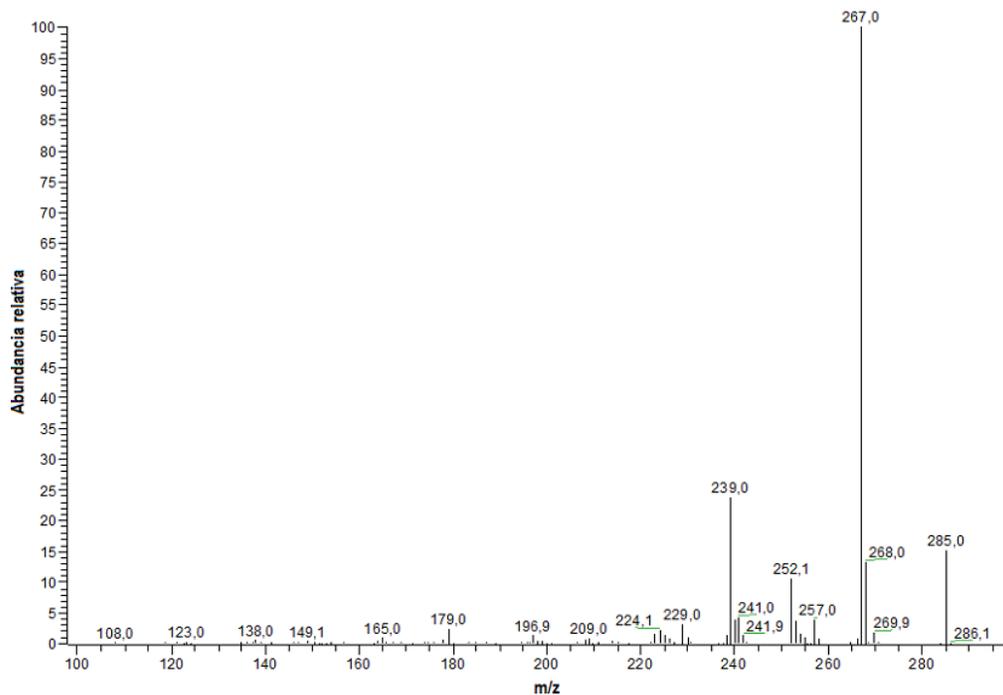
- Woo, K. J., Y. J. Jeong, J. W. Park and T. K. Kwon. 2004. Chrysin-induced apoptosis is mediated through caspase activation and Akt inactivation in U937 leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 325: 1215-22.
- Xiang, D., D. Wang, Y. He, J. Xie, Z. Zhong, Z. Li and J. Xie. 2006. Caffeic acid phenethyl ester induces growth arrest and apoptosis of colon cancer cells via the beta-catenin/T-cell factor signaling. *Anti-Cancer Drugs.* 17: 753-762.
- Xuan, H., R. Zhu, Y. Li and F. Hu. 2011. Inhibitory effect of chinese propolis on phosphatidylcholine-Specific phospholipase C activity in vascular endothelial cells. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 3:1-8.
- Zamzami, N., P. Marchetti, M. Castedo, C. Zanin, J. L. Vayssière, P. X. Petit and G. Kroemer. 1995. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J. Exp. Med.* 181: 1661-72.

11. APÉNDICES

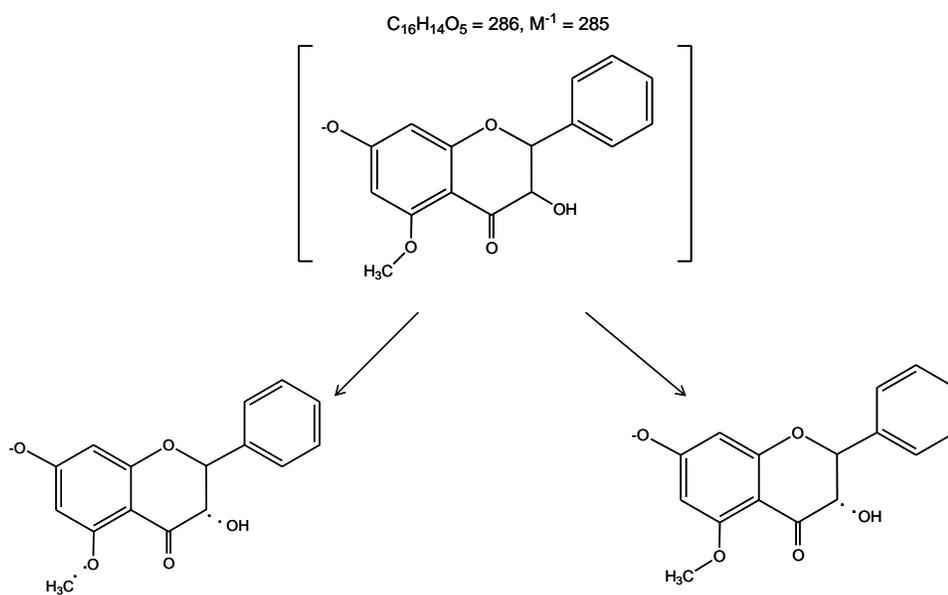
Apéndice A



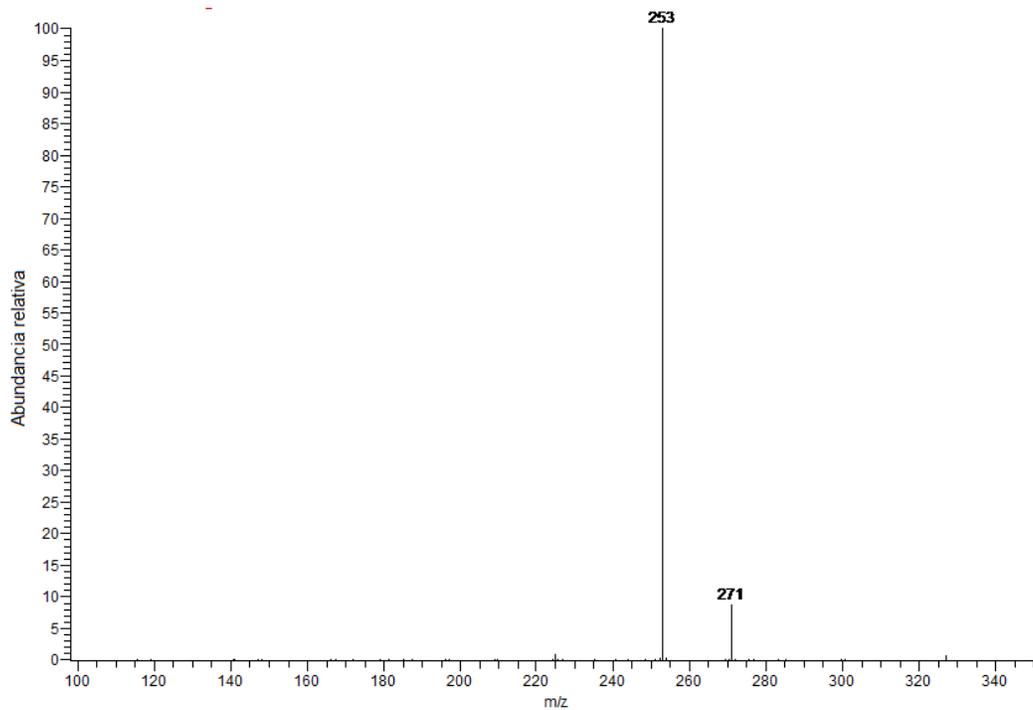
Apéndice B



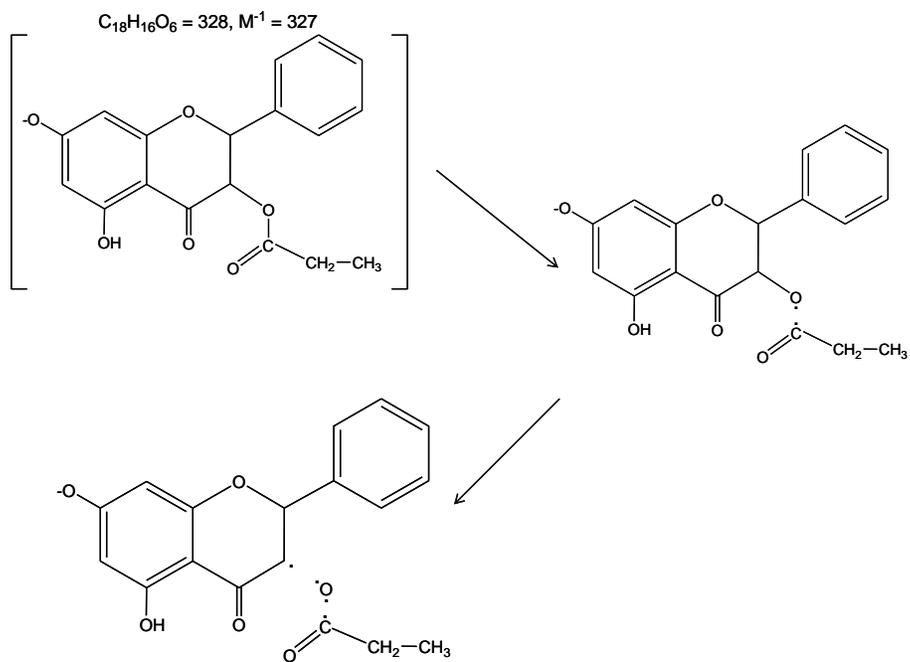
Espectro de masas del compuesto pinocembrina 5-metil-éter.



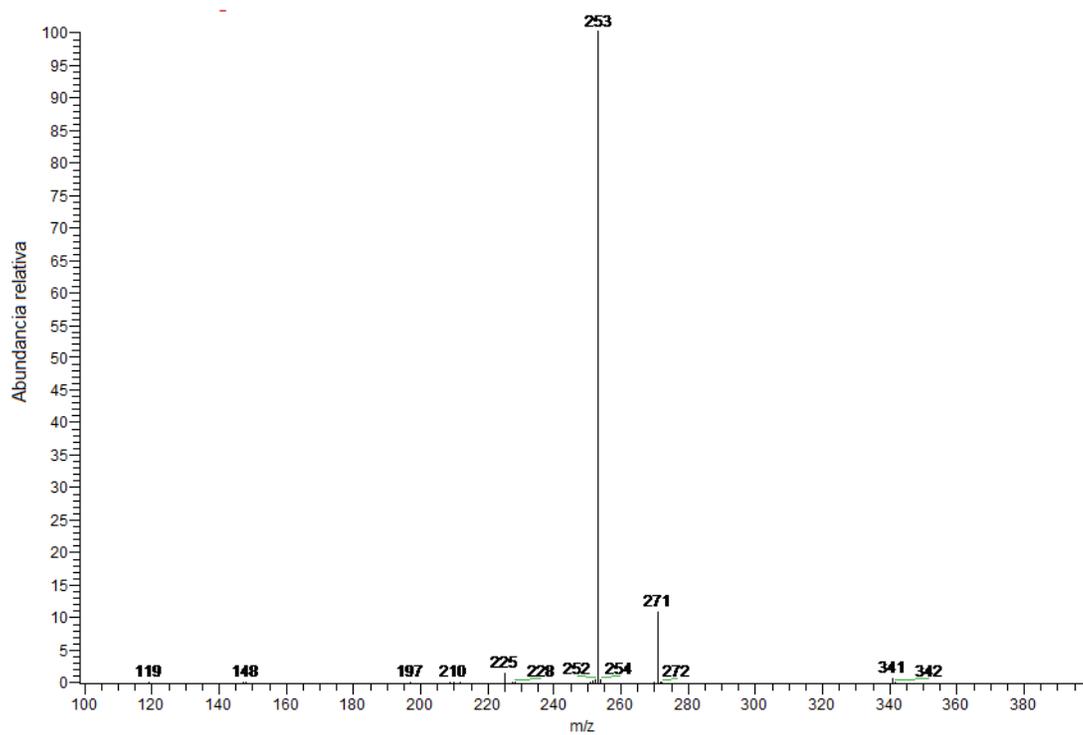
Patrón de fragmentación del compuesto pinocembrina 5-metil-éter.



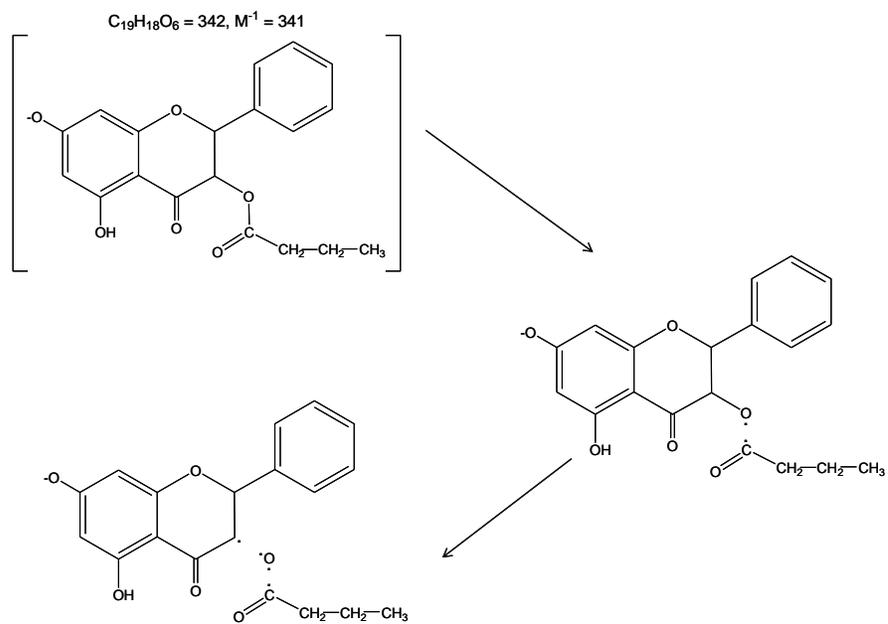
Espectro de masas del compuesto 3-propanoato de pinobanksina.



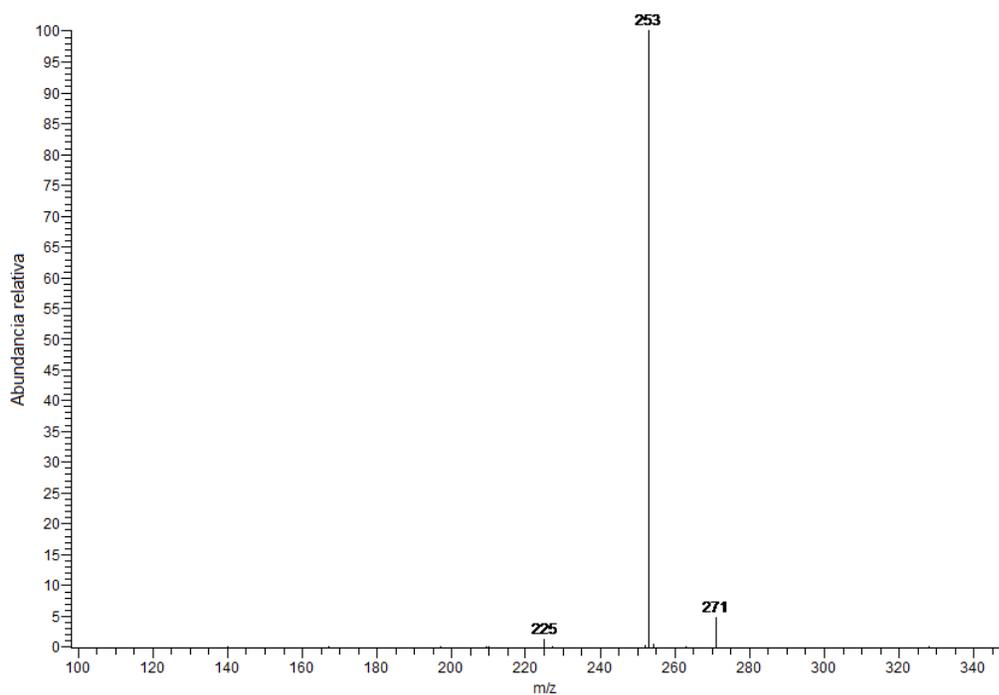
Patrón de fragmentación del compuesto 3-propanoato de pinobanksina.



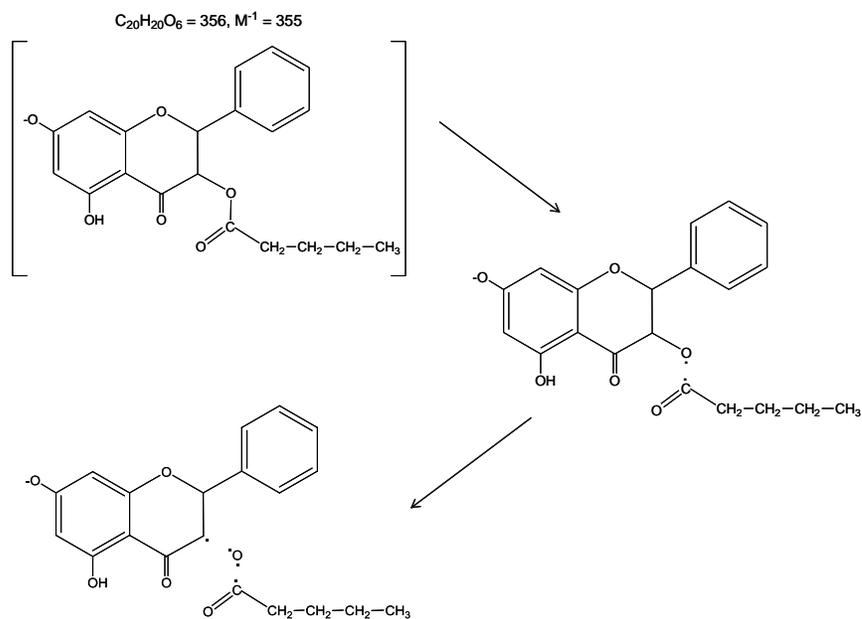
Espectro de masas del compuesto 3-butirato de pinobanksina.



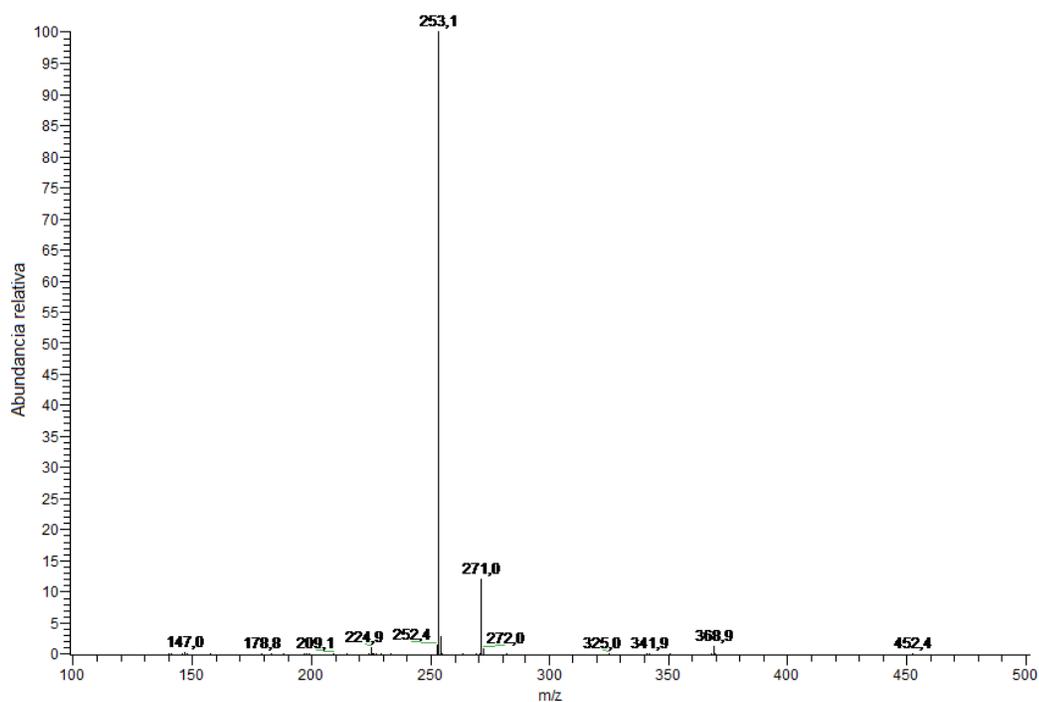
Patrón de fragmentación del compuesto 3-butirato de pinobanksina.



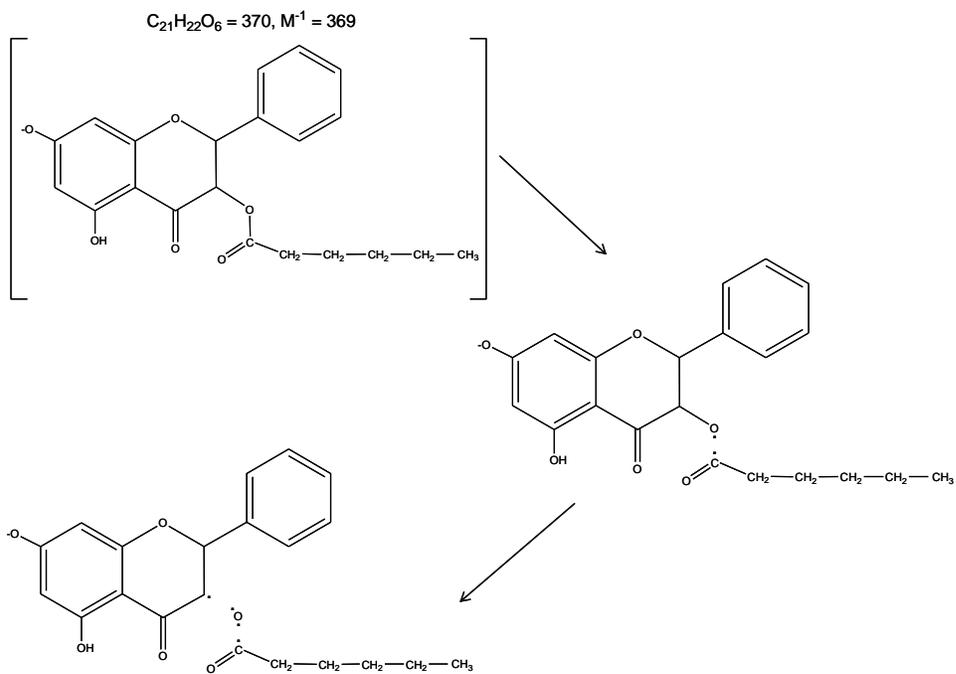
Espectro de masas del compuesto 3-pentanoato de pinobanksina.



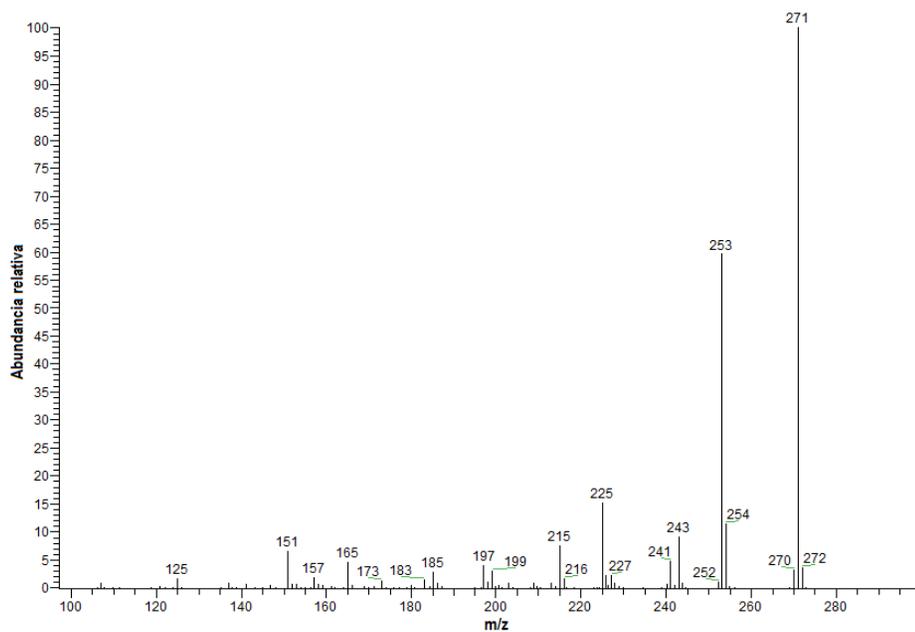
Patrón de fragmentación del compuesto 3-pentanoato de pinobanksina.



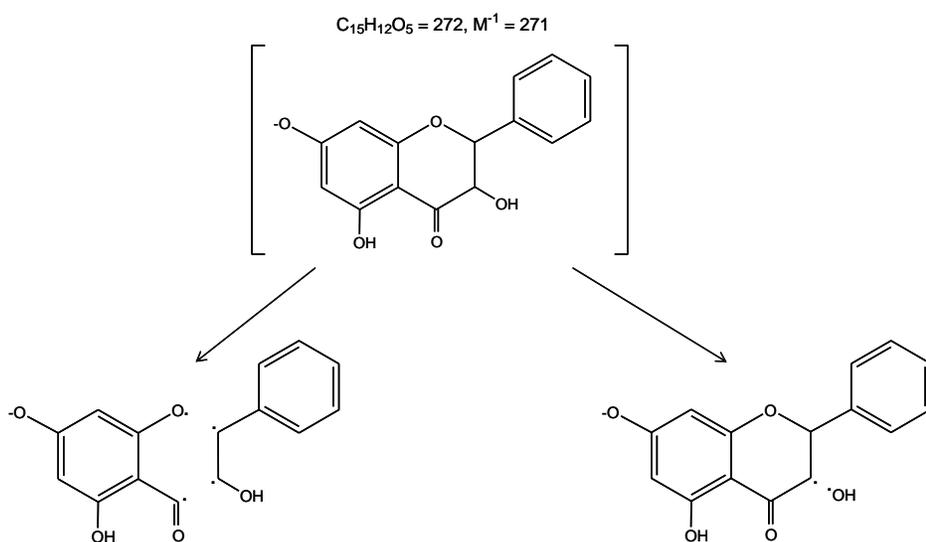
Espectro de masas del compuesto 3-hexanoato de pinobanksina.



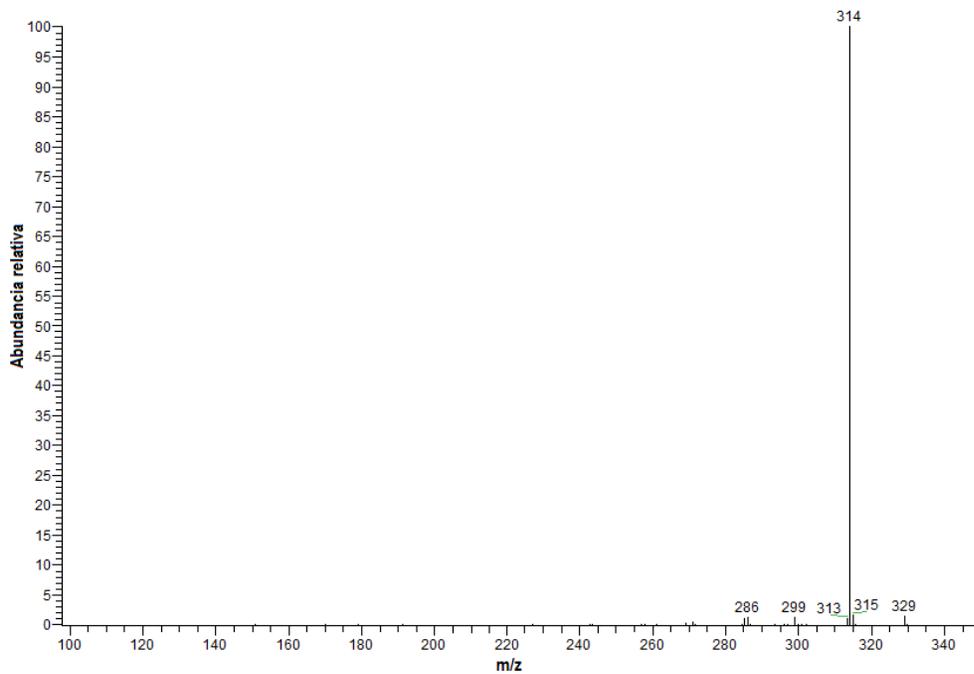
Patrón de fragmentación del compuesto 3-hexanoato de pinobanksina.



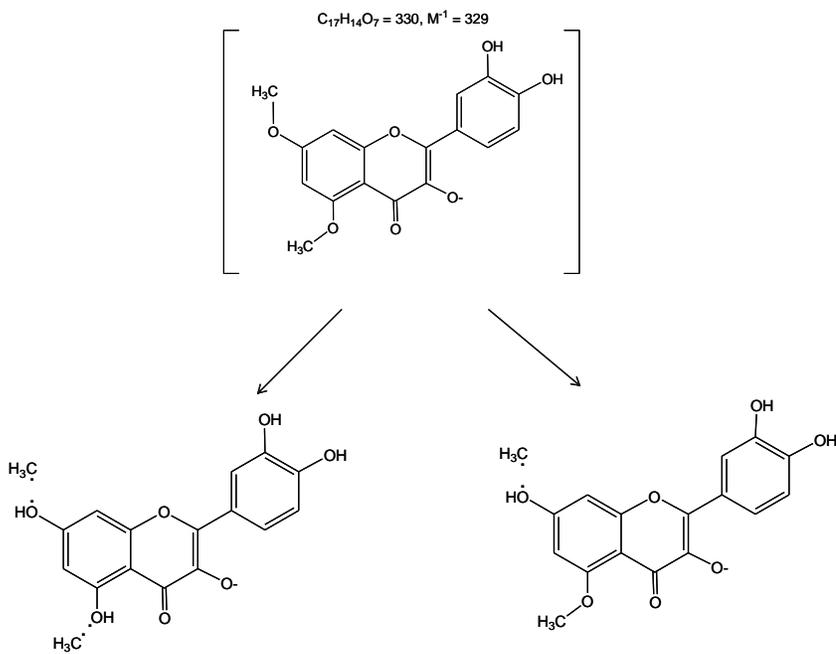
Espectro de masas del compuesto pinobanksina.



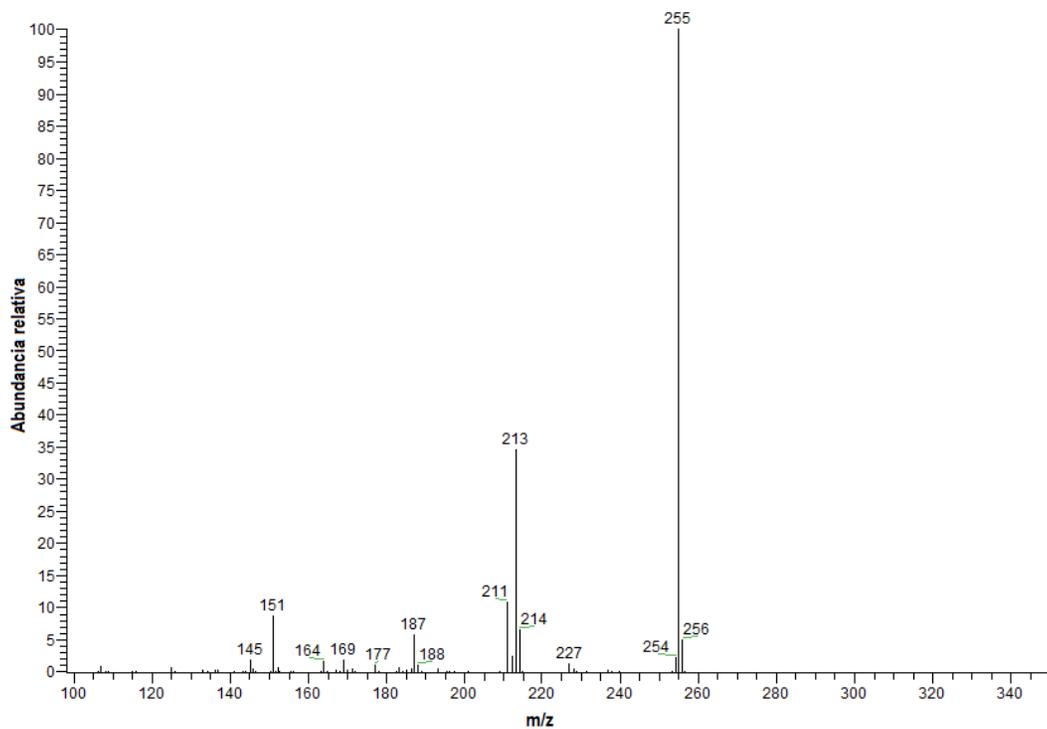
Patrón de fragmentación del compuesto pinobanksina



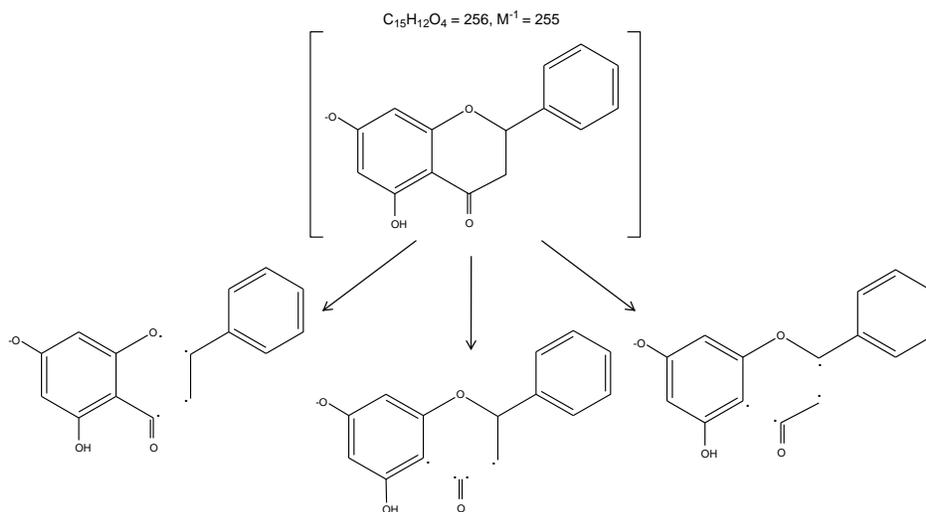
Espectro de masas del compuesto 5,7-dimetil-éter.



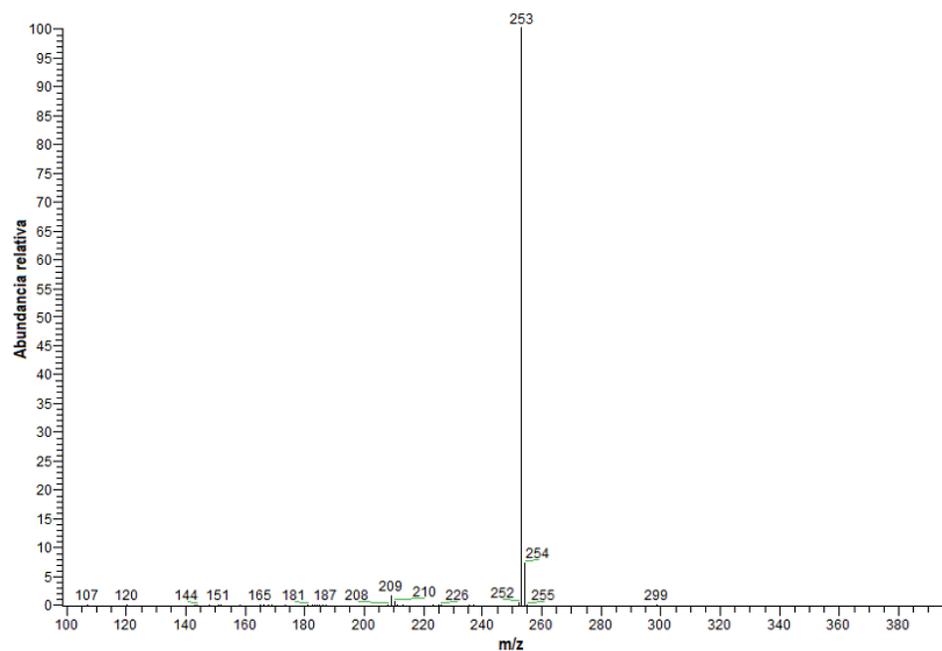
Patrón de fragmentación del compuesto 5,7-dimetil-éter.



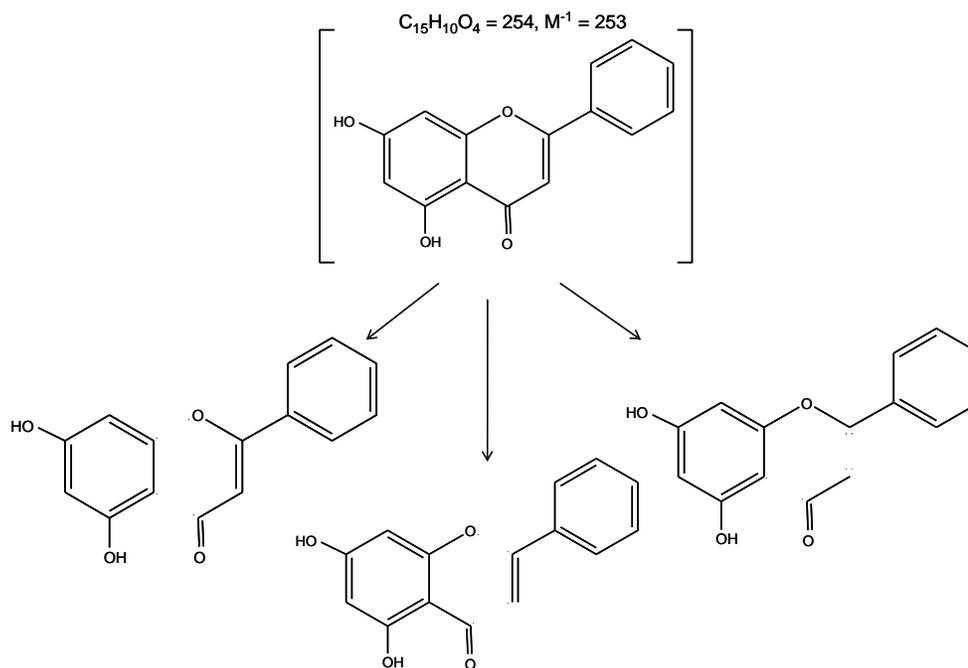
Espectro de masas del compuesto pinocembrina.



Patrón de fragmentación del compuesto pinocembrina.



Espectro de masas del compuesto crisina.



Patrón de fragmentación del compuesto crisina.

12. ANEXOS

Productos obtenidos del programa de doctorado en Ciencias de Materiales

Dora Valencia, Efrain Alday, Ramon Robles-Zepeda, Adriana Garibay-Escobar, Juan C. Galvez-Ruiz, Magali Salas-Reyes, Manuel Jiménez-Estrada, Enrique Velazquez-Contreras, Javier Hernandez, Carlos Velazquez. 2012. Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chemistry*. 131:645-651.

Ramón Enrique Robles-Zepeda, Javier Hernández Martínez, Adriana Garibay Escobar, Dora Edith Valencia Rivera and Carlos Arturo Velázquez Contreras. 2012. Medicinal Plants, *Biodiversity and Drugs*. 18 Botanical Origin and Biological Activity of Propolis. Science Publishers. ISBN 978-1-57808-000-0.