



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**Propiedades Biológicas de *Ulomoides dermestoides*
(Gorgojo Chino)**

Tesis para obtener el título de Biólogo (a)

P R E S E N T A

Stephanie Saint Remy Hernandez

Director de Tesis

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy

Los Reyes Iztacala, Edo. De México, 2017





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

A los miembros del jurado:

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy

Dra. Ma. Margarita Canales Martínez

Dr. Óscar de Jesús Nieto Yáñez

M. en C. Ana Bertha Hernández Hernández

M. en C. Judith Salas Oropeza

Este trabajo fue financiado por el Programa de apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) proyecto UNAM-PAPIIT-IN212317 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

ÍNDICE

Contenido

ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
RESUMEN	vi
INTRODUCCIÓN	1
Medicina tradicional; zooterapia, entomoterapia y coleoterapia.	1
<i>Ulomoides dermestoides</i>	3
Taxonomía	3
Morfología	4
Huevo	4
Larvas	4
Pupa	5
Adulto	5
Genitalia	5
Glándulas Secretoras	6
Secreciones volátiles	10
Benzoquinonas	10
Usos del “gorgojo chino”	11
Tratamiento Empírico	11
Inflamación	12
Enfermedades Inflamatorias Intestinales (EII)	12
Colitis Ulcerosa (CU)	13
Cuadro clínico y síntomas de CU	13
Tratamientos y efectos adversos.	14
Microbiota intestinal en las EII	17
Modelos experimentales <i>in vivo</i> para EII (CU)	18
Dextrán Sulfato de Sodio (DSS)	19
ANTECEDENTES	19
JUSTIFICACIÓN	20
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
HIPÓTESIS	21
Objetivo General	21
Objetivos Particulares	21
MATERIALES Y MÉTODOS	22
Condiciones de crecimiento de <i>Ulomoides dermestoides</i>	22
Obtención del extracto etanólico de <i>U. dermestoides</i>	22
Análisis Antibacteriano	22
Evaluación Cualitativa	24
Evaluación Cuantitativa	24
Caracterización química del extracto	24

Fenoles totales	24
Capacidad Antioxidante	24
Carbohidratos Nelson- Somogyi.....	25
Proteínas (Bradford)	25
HPLC y GC-MS	25
Animales experimentales	25
Modelo de Edema Plantar	25
Modelo Murino de Colitis Experimental.	26
Inducción de Colitis	26
Administración del extracto	26
Porcentaje de sobrevida.	26
Índice de Actividad de la Enfermedad (DAI).	26
Obtención y Medición de Intestinos	27
Histología y Tinción	27
Índice de Daño Histológico	27
RESULTADOS	29
Rendimiento del extracto.....	29
Evaluación de la Actividad Antibacteriana	29
Evaluación cualitativa	29
Evaluación cuantitativa	34
CMI y CBM.....	34
Curva de Crecimiento Bacteriano	35
Caracterización química del extracto	38
Fenoles Totales.....	38
Capacidad Antioxidante.....	39
Cuantificación de Carbohidratos por el método de Nelson-Somogyi	40
Determinación del Contenido de Proteínas por el método de Bradford.....	41
Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS).....	42
Esterificación de ácidos grasos	45
Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	48
Actividad Biológica	53
Efecto Antiinflamatorio en un Modelo de Edema Plantar Inducido por Carragenina 1%.	54
.....	55
Efecto Antiinflamatorio en un modelo murino de Colitis experimental inducido por DSS.	56
Porcentaje de sobrevida	56
Índice de Actividad de la Enfermedad (DAI)	57
Longitud de los intestinos	59
.....	60
Índice histopatológico	61
DISCUSIÓN	63
CONCLUSIONES	69
APÉNDICES	70
APÉNDICE I	70

Ubicación e historia de <i>U. dermestoides</i>	70
APÉNDICE II	70
Método de difusión en agar Kirby-Baüer	70
APÉNDICE III	72
Método de dilución en caldo	72
APÉNDICE IV	73
Curva de crecimiento bacteriano.....	73
APÉNDICE V	74
Determinación de la concentración de fenoles totales (CFT). Método modificado de Singleton	74
APÉNDICE VI	75
Método de reducción del radical 2-2Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH)	75
APÉNDICE VII	76
Cuantificación de Carbohidratos Reductores por el método de Nelson-Somogyi	76
APÉNDICE VIII	77
Determinación de Proteínas por la Técnica de Bradford	77
APÉNDICE IX	78
Técnica histológica descrita por Prophet	78
APÉNDICE X	79
Tinción con Hematoxilina- Eosina	79
APÉNDICE XI	81
Esterificación de Ácidos Grasos.....	81
REFERENCIAS	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Vista general de las glándulas secretoras de <i>U. dermestoides</i>	7
Figura 2.- Puntura en extremo distal de las glándulas secretoras	8
Figura 3.- Glándulas secretoras de <i>U. dermestoides</i> y tejidos de unión	8
Figura 4.- Estructuras glandulares internas	10
Figura 5.- Zona de afectación de la CU	13
Figura 6.- Respuesta inflamatoria de la mucosa del colon ante agentes microbianos	18
Figura 7.- Gráfica de las cepas Gram positivas	30
Figura 8.- <i>S. epidermidis</i> (caso clínico)	31
Figura 9.- Gráfica de las cepas Gram negativas	32
Figura 10.- <i>P. agglomerans</i> CDBB-B-959.	32
Figura 11.- Gram +/Gram- vs Cloranfenicol	33
Figura 12.- Curva de crecimiento de <i>S. aureus</i>	35
Figura 13.- Cepa de <i>S. aureus</i> en la curva de crecimiento	36
Figura 14.- Curva de crecimiento <i>V. cholerae</i>	37
Figura 15.- Cepa de <i>V. cholerae</i> en la curva de crecimiento	37
Figura 16.- Gráfica de concentración de fenoles totales	38
Figura 17.- Gráfica de capacidad antioxidante	39

Figura 18.- Curva patrón de carbohidratos _____	40
Figura 19.- Curva patrón de albúmina _____	41
Figura 20.- Cromatograma de la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas _____	44
Figura 21.- Cromatograma de esterificación de ácidos grasos por GC-MS _____	47
Figura 22.- Cromatograma de HPLC _____	52
Figura 23.- Gráfica del efecto antiinflamatorio en el modelo de edema plantar.	54
Figura 24.- Edema plantar _____	55
Figura 25.- Curvas de porcentaje de sobrevivencia _____	56
Figura 26.- Gráfica del índice de actividad de la enfermedad (DAI) _____	57
Figura 28.- Gráfica de la medición de la longitud de los intestinos _____	59
Figura 29.- Intestinos (colon) _____	60
Figura 30.- Índice histopatológico. _____	61
Figura 31.- Cortes histológicos de colon _____	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Tabla de tratamientos para CU y sus efectos adversos. _____	14
Tabla 2.- Tabla de valores del Índice de la Actividad de la Enfermedad (DAI) _____	27
Tabla 3.- Tabla con valores del índice de daño histológico. _____	28
Tabla 4.- Rendimiento del extracto etanólico de <i>U. dermestoides</i> _____	29
Tabla 5.- Actividad antibacteriana en cepas Gram positivas _____	30
Tabla 6.- Actividad antibacteriana en cepas Gram negativas _____	31
Tabla 7.- Concentración mínima inhibitoria y concentración bactericida mínima .	34
Tabla 8.- Compuestos identificados por GC-MS _____	43
Tabla 9.- Compuestos identificados en la esterificación de ácidos grasos por GC- MS. _____	46
Tabla 10.- Compuestos identificados en HPLC. _____	49
Tabla 11.- Actividades biológicas de los compuestos identificados en el por GC-MS, Esterificación de ácidos grasos y HPLC. _____	53
Tabla 12.- Curva patrón para la determinación de fenoles totales. _____	75
Tabla 13.- Curva patrón para cuantificación de carbohidratos. _____	77
Tabla 14.- Tabla de concentración de los reactivos para realizar la técnica de Bradford. _____	78

RESUMEN

En la medicina tradicional los animales han sido utilizados a lo largo del tiempo para el tratamiento de diversas enfermedades. Dentro de los animales encontramos a los insectos, entre los insectos más utilizados con algún fin terapéutico se encuentran los coleópteros, éste es conocido como coleoterapia.

Ulomoides dermestoides, es un coleóptero conocido comúnmente como gorgojo chino, y ha sido utilizado para tratar diversas enfermedades respiratorias, cáncer, enfermedades sistémicas e inflamatorias. Las propiedades que se le atribuyen a *U. dermestoides* son principalmente gracias a las sustancias de defensa que secreta como las benzoquinonas.

Debido a la falta de información científica que avale el uso empírico que se le da a *U. dermestoides*, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar algunas propiedades biológicas del extracto etanólico de *U. dermestoides* como la actividad antibacteriana obteniendo como resultado que el extracto etanólico de *U. dermestoides* presentó actividad contra a las cepas Gram positivas como *Staphylococcus epidermidis* caso clínico y , *Enterococcus faecalis* CDBB-B-1533, así como en cepas Gram negativas como *Pantoea agglomerans* CBB-B-959 y *Enterobacter cloacae*. Además presentó un comportamiento bacteriostático en curvas de crecimiento de las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Vibrio cholerae*.

Se evaluó la actividad antiinflamatoria en un modelo de edema plantar inducido por carragenina 1%, donde se probaron tres concentraciones del extracto: 250 mg/Kg, 500 mg/Kg y 750 mg/Kg. No se presentó actividad antiinflamatoria del extracto, sin embargo en la concentración de 750 mg/Kg se observa una tendencia a desinflamar.

El segundo modelo experimental de colitis ulcerosa inducida por DSS al 4%, donde se realizaron 3 grupos con una n=6. Al primer grupo (sano) se le administró únicamente agua potable estéril, al segundo se administró el extracto a una concentración de 15 µg/Kg, y al tercer grupo agua estéril con DSS 4%. El extracto de *U. dermestoides* prolongó la sobrevida y disminuyó la

severidad de los signos de la enfermedad (DAI por sus siglas en inglés), como fueron la pérdida de peso, consistencia de las heces y sangrado.

Palabras Clave: actividad antibacteriana, antiinflamatorio, Colitis ulcerosa, edema plantar, gorgojo chino.

INTRODUCCIÓN

Medicina tradicional; zooterapia, entomoterapia y coleoterapia.

Desde tiempos ancestrales, una de las necesidades básicas de una sociedad ha sido preservar o recuperar la salud de las personas que la conforman. En todos los grupos humanos se han desarrollado diversos sistemas médicos para cubrir dicha necesidad. Estos sistemas médicos o “ciencias médicas” deben entenderse como el conjunto de conocimientos, saberes, conceptos, creencias y prácticas, basados en recursos materiales y simbólicos usados para el mantenimiento de la salud, lo cual también es conocido como medicina tradicional. Dentro de la medicina tradicional, el hombre ha tomado como base diversos recursos, algunos de ellos extraídos de la naturaleza como plantas y/o animales⁽¹⁾.

Los animales han sido utilizados a lo largo del tiempo para el tratamiento de diversas enfermedades. A este fenómeno se le conoce como zooterapia y representa una fuerte evidencia del uso medicinal de los recursos animales. Uno de los significados del término zooterapia hace referencia al uso de remedios elaborados a partir de partes del cuerpo animal, productos de su metabolismo, secreciones corporales o sus excrementos; incluso la industria farmacéutica y la agroindustria han realizado diversas investigaciones con respecto a esto ^(2, 3).

Dentro de los animales encontramos a los insectos que constituyen uno de los grupos más numerosos y exitosos debido a su capacidad de adaptación y representan tres cuartas partes del total de los organismos que se encuentran en la Tierra⁽⁴⁾. Los humanos, desde la antigüedad han aprovechado a los insectos como un recurso muy valioso, pues forman parte de prácticas culturales y cotidianas a través de diversos grupos y en México constituyen un medio de identidad entre diferentes etnias⁽⁵⁾.

El uso de los insectos como alimento se cree que ocurre desde el Plio-Pleistoceno, pues según estudios paleontológicos realizados acerca del ancestro *Australopithecus robustus* reveló que las termitas formaban parte de su dieta. Las principales regiones donde se llevaba a cabo la acción de ingerir insectos ocasional o habitualmente fueron en Asia, América, África y Australia⁽³⁾.

Los insectos son utilizados en muchas localidades y forman parte de su dieta habitual ya que poseen una gran cantidad de proteínas. De las miles de cientos de especies que hay en el mundo, más de 2,000 son utilizadas como alimento por aproximadamente 3,000 grupos étnicos en más de 120 países^(6, 7). El mayor grupo de insectos comestibles es el de los coleópteros con 468 especies, seguido de los himenópteros con 351 especies, ortópteros 267 especies y por último los lepidópteros con 253 especies⁽⁸⁾.

Para México se han registrado cerca de 504 especies de insectos que son usadas como alimento en diferentes etnias del país. El 83 % de éstas 504 especies son de hábitos terrestres, mientras que el 17% restante pertenecen a ecosistemas acuáticos. De igual forma el 55.8% de las especies registradas para México se consumen en estadios inmaduros como el huevo, larva, pupa, ninfas y el 14.2% en estado adulto, sin embargo hay especies que se consumen en cualquier estado de desarrollo^(8, 9).

El uso que los grupos étnicos le da a los insectos, está basado en experiencias personales, por lo que se considera que estos saberes deben ser documentados pues pueden aportar gran información para investigaciones con valor científico en un futuro⁽¹⁰⁾.

Los insectos han demostrado ser muy importantes como fuente de medicamentos para la medicina moderna, ya que se ha demostrado que

pueden tener efectos analgésicos, antibacterianos, diuréticos, anestésicos, antirreumáticos, entre otros^(2, 11).

El uso terapéutico de insectos y productos derivados de ellos se conoce como entomoterapia. Esta práctica y conocimiento meramente empírico, ha sido transmitido por comunicación oral a través de las generaciones. A pesar de que la entomoterapia es una práctica antigua, académicamente es poco conocida^(12, 13).

Entre los insectos más utilizados con fines terapéuticos está el grupo de los coleópteros conocidos comúnmente como escarabajos. En la medicina tradicional se le conoce como coleoterapia a la acción de ingerir escarabajos⁽¹⁴⁾.

Ulomoides dermestoides

Dentro del grupo de los coleópteros, *Ulomoides dermestoides*, conocido como “gorgojo chino” ha sido empleado por décadas como tratamiento tradicional en muchas partes del mundo para tratar enfermedades respiratorias, enfermedades sistémicas e incluso cáncer⁽¹⁵⁾.

U. dermestoides es considerado como una plaga potencial de granos y harinas; en ambientes naturales se encuentra en lugares secos y por lo general debajo de madera en descomposición. Es originario de China y del Sudoeste Asiático y fue introducido en el continente Americano por colonias japonesas, principalmente en Brasil; pero es en Argentina donde comenzó a darse la popularidad de éste escarabajo por su utilización para tratar enfermedades como el cáncer y la diabetes^(16, 17) **(Apéndice I)**.

Taxonomía

Reino: Animalia

Phylum: Artropoda

Clase: Insecta

Orden: Coleoptera

Familia: Tenebrionidae

Género: *Ulomoides*

Especie: *Ulomoides dermestoides*⁽¹⁸⁾

Morfología

Huevo

Cuando el huevo es recién ovipositado lo recubre una capa mucilaginosa, debido a esto se puede cubrir con restos de heces y/o alimento. La forma del huevo es oblonga, es decir, que es más largo que ancho. Posee una longitud promedio de 0.822 mm considerado para el eje polar y 0.22 mm de ancho para el eje ecuatorial⁽¹⁷⁾.

Larvas

Cuando los huevos eclosionan emergen larvas de gran movilidad de tipo elateriformes (éste tipo de larvas son propias de los tenebrionidos), presentan un cuerpo visiblemente segmentado en el cual a simple vista pueden apreciarse las regiones de cabeza, tórax y abdomen; tienen una coloración blanco-cremosa en todo el cuerpo, pero conforme transcurre el tiempo ésta se va tornando a una coloración "caramelizada". El tamaño de las larvas es variable conforme a su desarrollo, siendo el menor registrado de 1 mm y el máximo de 11 mm. Éste estadio dura aproximadamente 55 días (promedio), con un rango de 52- 57 días^(17, 20).

Pupa

Antes de dar paso al estadio de pupa, hay una fase llamada pre-pupa, en la cual la larva detiene su crecimiento, disminuye su actividad y toma una posición encorvada como “letra C” quedando así un promedio de 2.6 a 4 días. Posteriormente se inicia la fase de pupa, la cual es de tipo exarata, es decir, que tiene los apéndices dentro del capullo por tanto se pueden reconocer fácilmente. Es de color blanco-cremoso o café claro ^(17, 20).

Adulto

Posterior a la pupa, los gorgojos pasan por tres etapas, es decir, inmediato a la pupa el gorgojo es de color blanco, posteriormente de color marrón y por último adquiere una coloración negra. Son de una longitud de 5 mm y 1 mm de ancho. Tienen antenas con 11 artejos bien diferenciados y miden aproximadamente el ancho del cuerpo. La forma del cuerpo es oblonga, aplanada, la cabeza es de tipo prognata, ojos compuestos y mandíbulas fuertes. Los élitros poseen surcos o estrías longitudinales; las patas son caminadoras y el abdomen presenta 10 segmentos bien diferenciados. Tienen una gran capacidad de dispersión. Su longevidad promedio es de 858 días en un rango de 492 a 1386 días ^(17, 20).

Genitalia

Se ha observado que esta especie cuenta con mecanismos de defensa que están relacionados con la secreción de sustancias repelentes y bloqueadoras de quimiorreceptores, las cuales se almacenan en inclusiones cuticulares o glándulas en las terminales abdominales de ambos géneros ⁽²⁰⁾.

En el caso de los machos, hay una estructura esclerotizada sobresaliente del conducto excretor del insecto que funge como genital retráctil llamado edeago y se localiza en la región terminal del abdomen la cual posee una longitud aproximada de 0.90 mm, esta medida cambia cuando el adeago sobresale de la cavidad genital y la región retráctil se expande ⁽²⁰⁾.

Las hembras al igual que el macho poseen un órgano retráctil que está unido al ovipositor y éste se prolonga desde la cavidad genital que está ubicada en el extremo terminal del abdomen. Además, tiene una estructura esclerotizada y alargada que se extiende desde el interior del abdomen llegando a la abertura genital ⁽²⁰⁾.

La cavidad genital de las hembras al igual que en los machos se encuentra rodeada de setas que ornamentan su entrada, al igual que la última parte distal del segmento abdominal. De igual forma en ambos sexos en la parte genital se encuentran unas glándulas secretoras ^(17, 19).

Glándulas Secretoras

Las glándulas son un conjunto de células cuya función es secretar sustancias químicas ya sea hacia el interior de la cavidad corporal o hacia el exterior. *U. dermestoides* presenta un par de glándulas secretoras de forma alargada, corrugadas y la punta distal ovalada que termina en un poro. La longitud de las glándulas secretoras, en ambos sexos, es de 1.05 mm aproximadamente; tienen un diámetro de 350 μm en las hembras y 302 μm en los machos exhibiéndose en ambos sexos una tapa con pliegues corrugados al final de cada una (Figura 1 y 2) ⁽²⁰⁾.

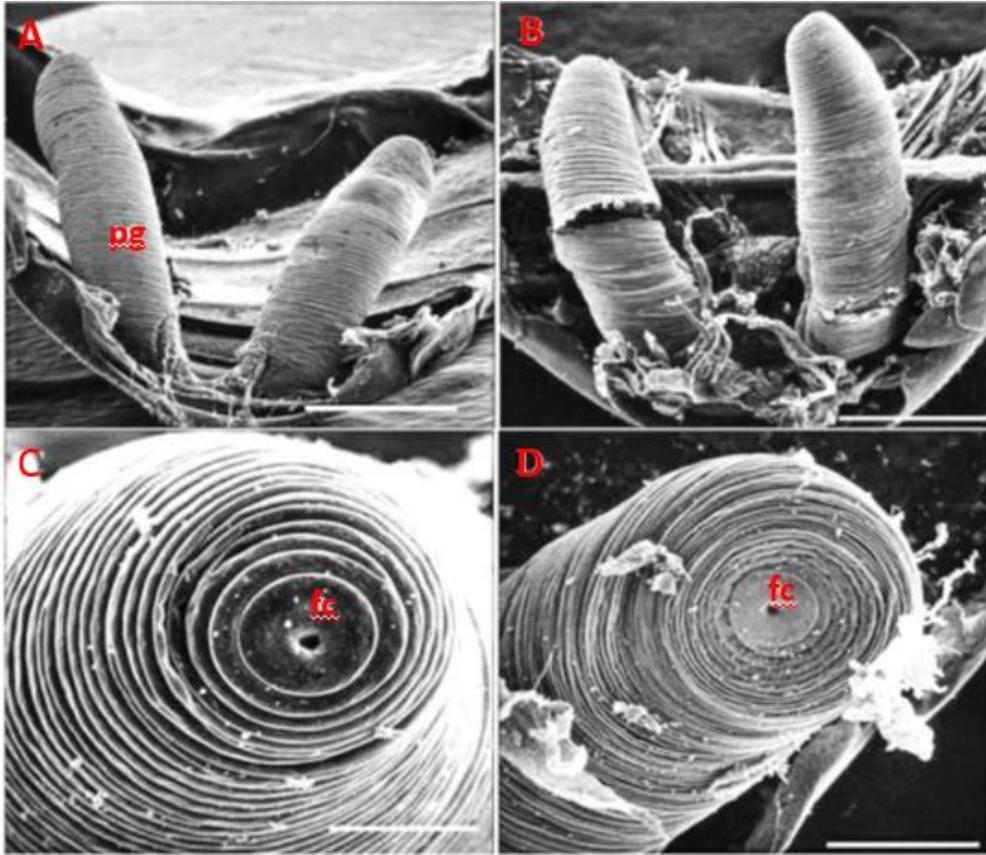


Figura 1.- Vista general de las glándulas secretoras de *U. dermestoides*. A. Longitud aproximada en las hembras, pliegues glandulares (pg) (Barra: 0.43 mm). B Longitud aproximada en los machos, pliegues glandulares (pg) (Barra: 0.38 mm). C, diámetro aproximado en las hembras, final de pliegues corrugados (fc). D, diámetro aproximado en los machos, final de pliegues corrugados (fc) (Barra: 302 μ m) (Modificado de Castro et al., 2009) ⁽²⁰⁾.

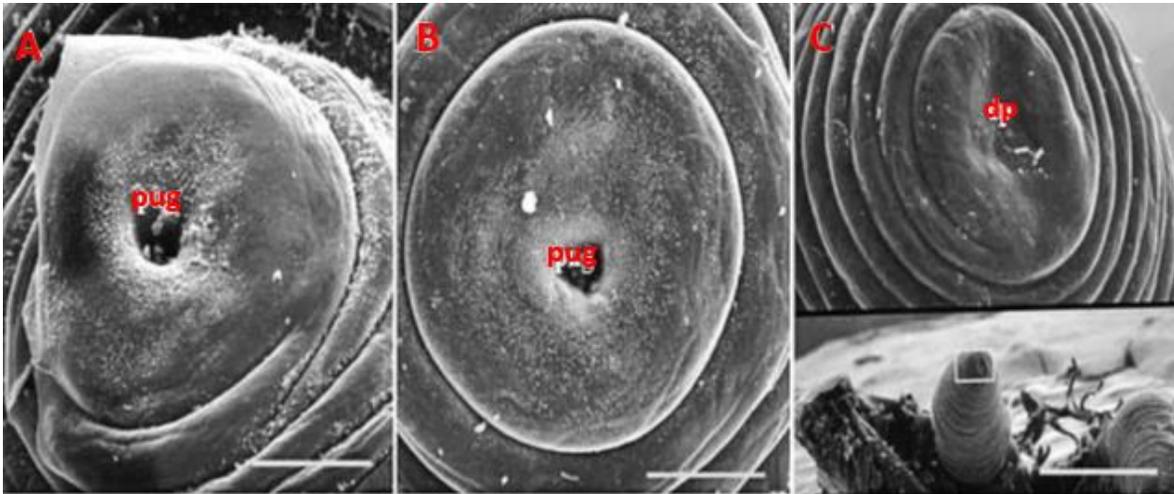


Figura 2.- Puntura en extremo distal de las glándulas secretoras. A. Puntura en glándula de hembra (pug) (Barra: 25 μ m). B. Puntura en glándula del macho (pug) (Barra: 25 μ m). C. Detalle de depresión (dp) y posible ausencia de puntura (Barra: inferior 0.43 mm; superior 0.43 μ m) (Modificado de Castro *et al.*, 2009) ⁽²⁰⁾.

Estas glándulas se ubican anatómicamente en la región ventral del abdomen y se encuentran unidas fuertemente a por un tejido musculoso formando una interface entre la pared interna del último segmento de la parte abdominal y la estructura glandular (Figura 3) ⁽²⁰⁾.

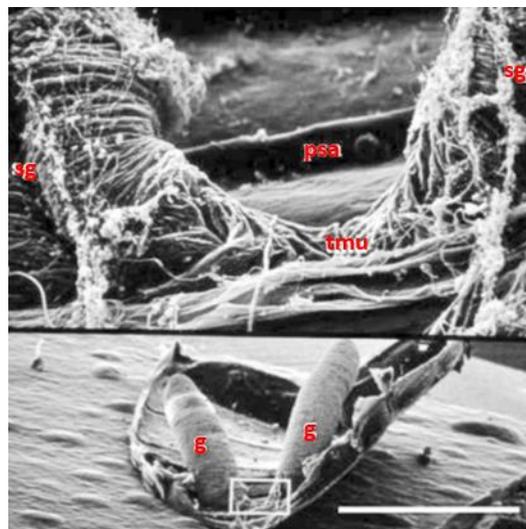


Figura 3.- Glándulas secretoras de *U. dermestoides* y tejidos de unión. Glándulas (g), tejido musculoso de unión glandular externa (tmu), suturas de la base de las glándulas

en la región de la unión (sg), pared interna del segmento abdominal (psa) (Barra: inferior 1.00 mm; superior 0.1 mm) (Modificado de Castro *et al.*, 2009) ⁽²⁰⁾.

La importancia de las glándulas secretoras en los tenebrionidos es que juegan un papel importante en la bioquímica de su mecanismo de defensa. Estas glándulas reaccionan ante estímulos táctiles que desencadenan respuestas hormonales y la producción de proteínas (enzimas) específicas que promueven la salida de las secreciones de defensa ⁽²⁰⁾.

Como ya se mencionó anteriormente, estas glándulas se encuentran en ambos sexos y a las secreciones de estas se le atribuyen el papel de alomonas o simioquímicos de interacción con varias especies. Como estos escarabajos no poseen un mecanismo de propulsión violenta para la expulsión de dichas sustancias se observó que tienen un mecanismo de efecto al contacto, lo cual se lleva a cabo mediante la movilización de las extremidades del pterotórax y el roce de éstas con la cavidad genital ⁽²⁰⁾.

Estas glándulas tienen una estructura basal que las mantienen unidas a la pared del abdomen, compuesta por un tejido que al parecer es la intercepción de los canales que conducen a las secreciones de forma directa hacia los genitales, es decir, se comunica con el ovipositor en el caso de las hembras y con el adeago en el caso de los machos. Estos canales se juntan en una especie de tabique que divide la estructura basal en dos lóbulos llamados pseudo lóbulos ⁽²⁰⁾.

El tabique tiene una importante relación anatómica con los conductos excretores ya que se define como la sutura glandular y es ahí donde convergen dichos conductos y son protegidos por el tejido muscular que es muy común en estructuras glandulares que podrían ser comprimidas por movimientos del abdomen ⁽²⁰⁾.

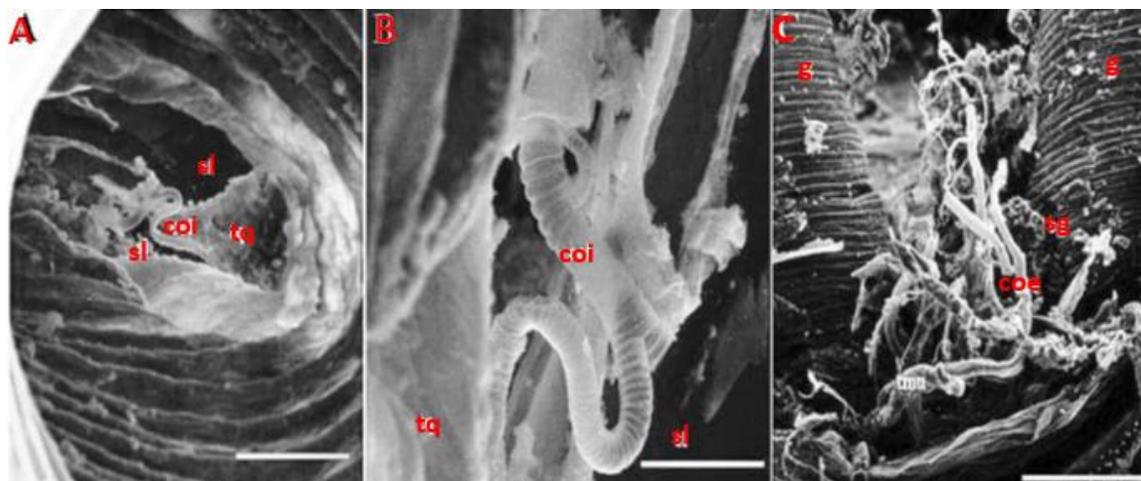


Figura 4.- Estructuras glandulares internas. A. Conductos intra glandulares en macho (coi), pseudo lóbulo glandular (sl), tejido en forma de tabique (tq) (Barra: 0.38 μ m). B. Detalle de la apariencia y ramificación de conductos intra glandulares en macho (coi), seudo glóbulo glandular (sl), tejido en forma de tabique (tq) (Barra: 10 μ m). C. Posibles conductos inter glandulares en la región de unión externa en hembra (coe), sutura glandular (sg), glándula (g) (Barra: 231 μ m) (Modificado de Castro et al., 2009) ⁽²⁰⁾.

Secreciones volátiles

Estudios recientes han demostrado que los principios activos de *U. dermestoides* son benzoquinonas, que son compuestos químicos secretados por glándulas del tórax y abdomen del coleóptero ⁽¹⁵⁾. Los escarabajos tenebriónidos utilizan sus glándulas secretoras para producir éstas sustancias que poseen repelentes e irritantes contra depredadores ⁽²⁰⁾.

Benzoquinonas

Las benzoquinonas pertenecen al grupo de las quinonas, las cuales son parte de productos naturales o bioquímicos endógenos como las hidroquinonas y/o catecoles. Las quinonas son denominadas dependiendo del sistema aromático que se deriven, como en el caso de las benzoquinonas que son derivadas del grupo benceno. Las quinonas por si solas representan una clase de intermediarios toxicológicos y pueden crear una variedad de efectos peligrosos *in vivo* como toxicidad aguda,

inmunotoxicidad y carcinogénesis. Estas sustancias ocasionan daño celular ya que aniquilan a proteínas celulares importantes y al ADN. ⁽¹⁵⁾.

Usos del “gorgojo chino”

Uno de los principales usos que se le da al gorgojo chino es como un coadyuvante de tratamientos para curar o disminuir diversas afecciones como el asma, diabetes, Parkinson, artritis, psoriasis, algunos tipos de cáncer y algunas enfermedades inflamatorias ⁽¹⁵⁾.

Tratamiento Empírico

El tratamiento tradicional que la gente realiza consiste en tragar un coleóptero el primer día e ir aumentando la ingesta progresivamente hasta llegar a 70. Posteriormente ir reduciendo la cantidad hasta llegar nuevamente a uno ⁽¹⁵⁾.

El primer registro para México de la práctica de la coleoterapia como medicina alternativa, se refiere a una mujer de 48 años diagnosticada con fibromialgia y osteoartritis cuatro años antes, quien a los 47 años y medio inició la ingesta del “gorgojo chino” aunado al tratamiento prescrito por su médico, dijo haber notado una mejoría importante en su salud desde dicha ingesta, independiente de la proporcionada por la medicina alopática que llevaba consumiendo desde su diagnóstico. Aunque esta observación no tiene bases científicas, documenta por primera vez el uso de este escarabajo como medicina tradicional en México ⁽²¹⁾.

Es importante mencionar que hasta hace poco tiempo, no existían bases científicas que justificaran el uso de *U. dermestoides* y su eficacia en las enfermedades antes mencionadas; sin embargo, en la actualidad se han realizado investigaciones que demuestran el efecto antiinflamatorio de las sustancias secretadas por el coleóptero.

Inflamación

La inflamación es la respuesta del organismo al daño a los tejidos que comprende reacciones vasculares, humorales y celulares en el sitio de la lesión y puede darse en todas las partes del cuerpo, ya que es considerada una respuesta de “protección”. Desencadena una serie compleja de acontecimientos, que en lo posible cura y reconstruye el tejido dañado; sin embargo, en exceso provoca una reacción dañina en el organismo ⁽²²⁾.

Enfermedades Inflamatorias Intestinales (EII).

Las EII, corresponden a una serie de patologías inflamatorias que afectan principalmente el tracto intestinal. Sin embargo, la etiología y la patogenia de las EII aún no se comprenden en su totalidad. Se han descrito factores genéticos y ambientales, los cuales conducen a un desequilibrio en el sistema inmune gastrointestinal. Dentro de las EII destacan la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU) ⁽²³⁾.

La frecuencia de las enfermedades inflamatorias ha aumentado en las últimas décadas sin predominio en el género o edad de las personas, por tanto, son consideradas de suma importancia en la clínica contemporánea debido al deterioro severo de la calidad de vida de quienes las padecen y al riesgo de desarrollar cáncer colorectal ⁽²³⁾. La mayor incidencia y prevalencia de las EII se ha señalado en el norte de Europa, Reino Unido y Estados Unidos de América. Sin embargo, en los últimos años se ha informado que la incidencia de estas enfermedades está aumentando en otras regiones geográficas como son Europa central, Europa del Sur, Asia, África y Latinoamérica ⁽²⁴⁾. En América Latina existen pocos informes sobre la epidemiología de las EII, aunque se ha sugerido una menor incidencia a comparación de otros países ^(25, 26).

Colitis Ulcerosa (CU)

La CU se caracteriza por afectar la mucosa y submucosa difusa del colon (Figura 5). La inflamación habitualmente comienza en el recto, se extiende de forma proximal hacia el ciego y se detiene de forma brusca en la válvula ileocecal. Por lo general, las lesiones son más intensas en el recto y se extienden a lo largo del colon, es decir, se limita únicamente a la capa mucosa del colon y el recto. Se piensa que la patogénesis de esta enfermedad puede estar estrechamente relacionada por la estimulación antigénica por bacterias, hongos o virus en individuos genéticamente susceptibles que conducen a un estado inflamatorio crónico desregulado (27).

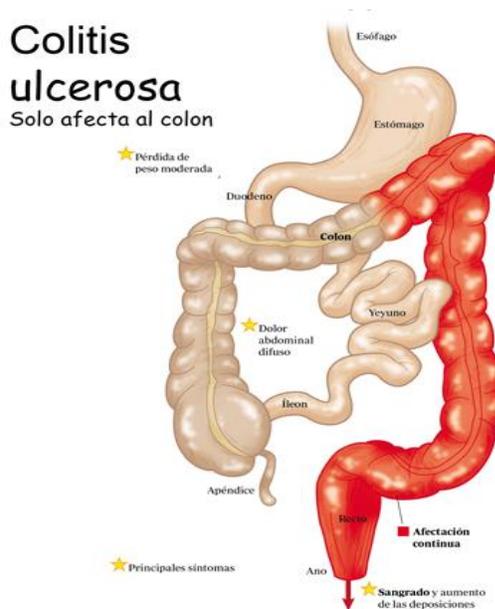


Figura 5.-Zona de afectación de la CU (modificado de CUN).

Cuadro clínico y síntomas de CU

En la CU, las manifestaciones clínicas tienen una correlación con la intensidad de la inflamación, es decir, que es directamente proporcional a la gravedad clínica de la enfermedad. La CU comienza por ser localizada o

presentarse únicamente en la parte proximal del colon, sin embargo, al aumentar la severidad puede extenderse a lo largo de todo el intestino

⁽²⁸⁾. Los síntomas típicos que se presentan en la CU son, rectorragias, diarreas, tenesmo, urgencia por defecar, dolor en el hipogastrio y fosa iliaca izquierda, fiebre, malestar general y pérdida de peso ⁽²⁹⁾.

Tratamientos y efectos adversos.

El tratamiento de la CU comprende el uso de fármacos antiinflamatorios como aminosilicatos, corticoides, e inmunomoduladores (Tabla 1). Todos estos producen una supresión inespecífica de los procesos inflamatorios, presentan una eficacia limitada y no se encuentran exentos de efectos secundarios, además se administran según la severidad de la enfermedad ⁽²⁹⁾.

Tabla 1.-Tabla de tratamientos para CU y sus efectos adversos.

Fármaco	Reacciones adversas
AMINOSILICATOS	
Mesalazina	Antiinflamatorio específico para el tracto gastrointestinal. Inhibe la quimiotaxis de los leucocitos, disminuye la producción de citocinas y leucotrienos, elimina los radicales libres. Provoca insuficiencia hepática, insuficiencia renal, náuseas, vómito, flatulencia, urticaria, fiebre e hipertensión ⁽³⁰⁾ .
Sulfasalazina	Anorexia, náuseas, vómito, dolor epigástrico y dolor de cabeza ocurren frecuentemente, especialmente con dosis altas y niveles plasmáticos altos de sulfapiridina. La oligospermia reversible ocurre frecuentemente en hombres. Erupciones cutáneas ocurren de forma ocasional. La anemia hemolítica y leucopenia ocurren rara vez. Se ha reportado daño de absorción de folatos

	<p>en la dieta y de igual forma, un pequeño número de daños hepáticos tanto en niños como en adultos ⁽³⁰⁾.</p>
INMUNOSUPRESORES	
<p>Azatriopina y Mercaptopurina</p>	<p>Molestias gastrointestinales, náuseas, vómito y cansancio. Los pacientes que hacen uso de estos inmunosupresores, deben hacerse análisis de sangre. Es un fármaco que habitualmente se maneja en hospitales durante el tratamiento para vigilar la posible aparición de efectos como:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Disminución de glóbulos blancos (hasta 2%) • Inflamación del hígado (hasta 5%) • Pancreatitis (hasta 3-10%) ⁽³¹⁾
<p>Ciclosporina</p>	<p>Se administra en hospital y se requiere controles especiales para ajustar dosis ⁽³¹⁾.</p>
CORTICOIDES	
<p>Prednisona y Prednisolona</p>	<p>Son medicamentos con efecto antiinflamatorio, que se utilizan en la fase de brote o empeoramiento de la enfermedad. Se administran vía oral, intravenosa o rectal. Sus efectos secundarios deben conocerse por el paciente antes de su administración, como son: molestias a nivel de estómago. En un tratamiento corto, los síntomas son más estéticos, es decir, hay un aumento de peso, retención de líquidos, acné, vello y estrías ⁽³²⁾.</p> <p>De igual forma puede haber leves alteraciones del comportamiento como euforia excesiva, aumento de</p>

	<p>apetito, insomnio y ocasionalmente depresión. También favorecen un incremento en los niveles de transaminasas, colesterol, tensión arterial y de la glucosa ⁽³²⁾.</p>
<p>ANTIBIÓTICOS</p>	
<p>Los antibióticos son utilizados cuando hay brotes graves con fiebre, complicaciones como fístulas o casos en los que puede haber infección.</p>	
<p>Metronidazol</p>	<p>Puede producir molestias en la región del estómago. En tratamientos de larga duración provoca sensación de hormigueo en los pies y puede llegar a ocasionar presencia de hongos en la boca. En ocasiones la orina puede presentar un color rojizo ⁽³²⁾.</p>
<p>Ciprofloxacino</p>	<p>Puede haber presencia de náuseas, molestias abdominales y elevación transitoria de transaminasas. Ocasionalmente es asociado con rotura de tendones y colitis por antibióticos ⁽³²⁾.</p>
<p>FÁRMACOS BIOLÓGICOS</p>	
<p>Infliximab</p>	<p>Es un producto que bloquea el TNF-α. Es suministrado cuando los pacientes no responden a los medicamentos anteriores. Debido a que se administra por vía intravenosa, puede producirse dolor de cabeza o reacción con dificultad para respirar, erupciones en la piel, etc. En casos raros se ha asociado a disminución de glóbulos blancos, psoriasis, empeoramiento de una insuficiencia cardiaca de base ⁽³³⁾.</p>
<p>Adalimumab, Golimumab, Certolizumab</p>	<p>Bloquean el TNF-α. Es administrado subcutáneamente. Sus efectos secundarios son similares a los que se producen con la administración del Infliximab ⁽³³⁾.</p>
<p>Vedolizumab</p>	<p>Es un anticuerpo antiintegrina. Se administra por vía intravenosa. Es un fármaco recientemente</p>

	comercializado y sus efectos adversos descritos más frecuentes son vómito, náuseas, dolor de articulaciones o abdominal ⁽³⁰⁾ .
--	---

Microbiota intestinal en las EII

La microbiota intestinal es descrita como un complejo ecosistema compuesto de cientos de microorganismos y su composición varía con cada individuo. La microbiota de un colon humano es como un órgano de intensa actividad metabólica por la acción de enzimas bacterianas en la luz intestinal y sus funciones son: ⁽³⁴⁾

- Descomposición de los residuos de la dieta.
- Recuperación de energía por medio de ácidos grasos de cadena corta.
- Protección contra la colonización e invasión de patógenos (efecto barrera).
- Desarrollo, estimulación y modulación del sistema inmune.

Sin embargo, algunos estudios han propuesto que uno de los factores que favorecen la aparición de las EII es el aumento del número de bacterias en el intestino, ya que se produce una pérdida de la tolerancia inmunológica a la microbiota endógena propia aunque esto es relativamente desconocido (Figura 6) ⁽³¹⁾.

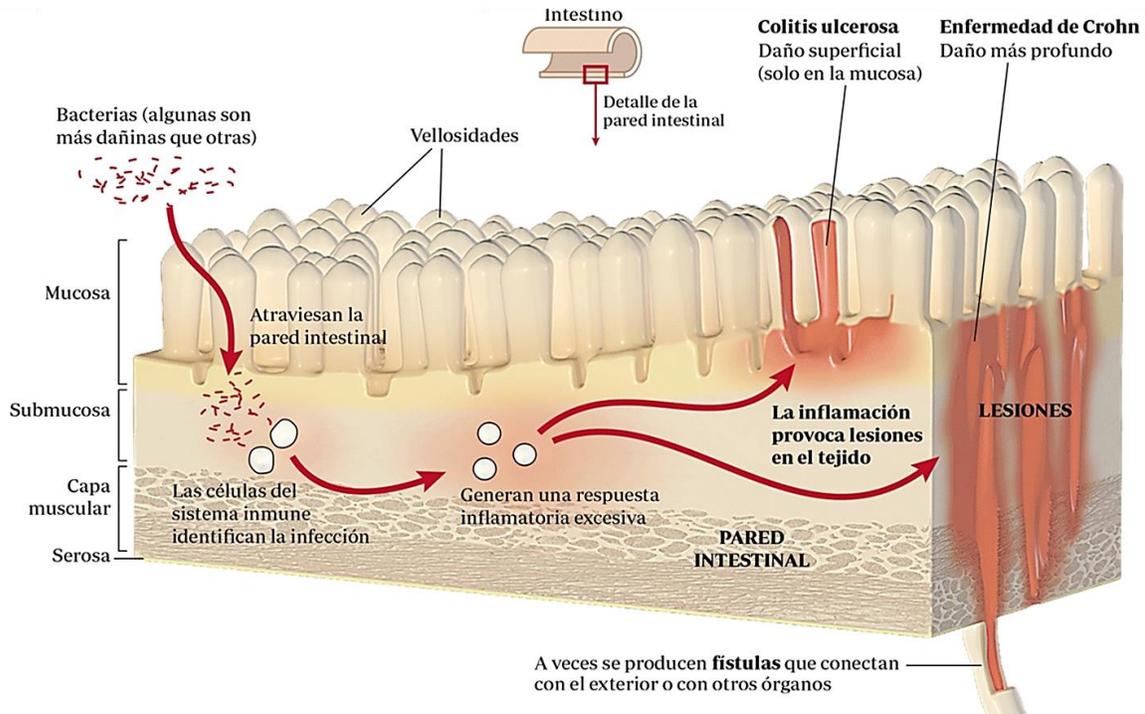


Figura 6.- Respuesta inflamatoria de la mucosa del colon ante agentes microbianos (modificado de CUN).

Modelos experimentales *in vivo* para EII (CU)

Los modelos animales para el estudio de las EII se pueden clasificar en dos categorías: modelos inducidos por agentes endógenos y modelos inducidos por agentes exógenos.

Los modelos endógenos son portadores de distintas alteraciones genéticas que predisponen al animal a padecer un proceso inflamatorio intestinal y no se conoce con exactitud la mutación o mutaciones relacionadas con la aparición de la CU. Mientras que los modelos *in vivo* inducidos por agentes exógenos pueden inducirse mediante la administración de enemas de diferentes sustancias químicas (haptenos y ácidos grasos), vía oral (polisacáridos sulfatados e inmunocomplejos), inyección transmural (polisacáridos microbianos) y por vía subcutánea (compuestos farmacéuticos). En general son modelos influenciados por la microbiota bacteriana intestinal y por diversos componentes dietéticos. En el caso de la colitis inducida por polímeros microbianos o polisacáridos

sulfatados se produce una fase aguda que se prolonga durante varias semanas, mientras que la reacción aguda inducida por enemas se limita a una semana posterior a su inducción ⁽³⁵⁾.

De estos modelos de inducción de CU, el modelo de vía oral por un polisacárido sulfatado como el Dextrán Sulfato de Sodio (DSS) es un modelo reproducible que se asemeja morfológica y sintomáticamente a la colitis ulcerosa en humanos y por ello es ampliamente utilizado. El uso del modelo de colitis inducido por DSS es muy habitual en la investigación sobre las EII debido a su facilidad de reproducción, sencillez, rapidez y capacidad de control ya sea para modelos agudos o crónicos mediante la modificación de la concentración de DSS y el tiempo de administración ⁽³⁶⁾.

Dextrán Sulfato de Sodio (DSS)

El DSS es un polisacárido sulfatado con carga negativa soluble en agua y peso molecular variable que va desde los 5-1500 kDa. La colitis más grave inducida en ratones es la que más se asemeja a la CU humana. Para que el DSS tenga un efecto inflamatorio en el intestino del modelo murino necesita tener un peso molecular de 40-50kDa y ser disuelto en agua potable. El mecanismo por el cual el DSS induce inflamación intestinal es probablemente el resultado de daños en la monocapa epitelial que recubre el intestino grueso permitiendo así la difusión de los contenidos intestinales proinflamatorios, por ejemplo, las bacterias ⁽³⁶⁾.

ANTECEDENTES

Hay pocos estudios científicos que sustenten la veracidad acerca del uso tradicional que se le da a *U. dermestoides*, entre ellos se encuentra el realizado por Crespo R. *et al.* ⁽³⁷⁾, donde evaluaron la citotoxicidad y daño en el DNA de los componentes de defensa (metil-1,4-benzoquinona, etil-1,4-benzoquinona y 1-pentadeceno) de *U. dermestoides* extraídos con

diclorometano en una línea de células de carcinoma epitelial de pulmón humano (A549), obteniendo como resultado que el daño al ADN es proporcional a la concentración del extracto de escarabajo, la mezcla sintética de los componentes o el uso de 1,4-benzoquinona (0.15 equivalente/mL) reduce la viabilidad de las células y produce daño significativo en el DNA, mientras que los pentadecenos no mostraron ningún efecto inhibitorio ni citotóxico.

Se ha evaluado la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso de *U. dermestoides* (8 mg/Kg y 16 mg/Kg), el cual administraron vía intraperitoneal en un modelo de pleuresía inducida con carragenina en ratas; se determinó la fuga de volumen de exudado; migración de leucocitos y exudación plasmática, además para determinar un posible efecto de inmunomodulación determinaron la toxicidad y la acción inmunomoduladora del extracto en la proliferación de linfocitos T humanos. En el modelo de pleuresia, se obtuvo que en los grupos tratado con el extracto acuoso se redujo significativamente el número de leucocitos polimorfonucleares $13.7 \pm 2.1 \times 10^6$ células por cavidad pleural (8 mg/kg) y $12.6 \pm 1.6 \times 10^6$ células por cavidad pleural; consecuentemente hubo una disminución del número total de leucocitos ($18.7 \pm 2.6 \times 10^6$ células por cavidad pleural para la concentración de 8 mg/kg y $17.5 \pm 2.2 \times 10^6$ células por cavidad pleural con la concentración de 16 mg/Kg); en el exudado se redujo significativamente la viabilidad celular a concentraciones entre 400 mg/dL a 25 mg/dL ⁽³⁸⁾.

JUSTIFICACIÓN

Por la falta de conocimiento científico suficiente que avale las propiedades que se atribuyen a *U. dermestoides* y a los efectos adversos que tienen los tratamientos utilizados en la CU es importante proponer nuevas alternativas para la mejora de la calidad de vida de las personas que padecen dicha enfermedad.

Debido a esto, se ha recurrido al uso e investigación de productos naturales que no conlleven a dichos efectos secundarios. La Organización Mundial de la Salud (OMS) promueve el desarrollo del uso racional de la medicina tradicional para tratar y controlar enfermedades. Se describe como producto natural a cualquier compuesto orgánico producido por organismos vivos ⁽³⁹⁾.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Tomando en cuenta las investigaciones acerca de las propiedades de *U. dermestoides*, nos planteamos las siguientes preguntas:

¿El extracto etanólico de *U. dermestoides* tendrá un efecto antibacteriano? ¿Tendrá un efecto antiinflamatorio en un modelo de edema plantar inducido por carragenina 1%? ¿Disminuirá la severidad de la colitis ulcerosa en un modelo murino?.

HIPÓTESIS

Debido a las diferentes atribuciones que se le dan a *U. dermestoides*, es posible que el extracto etanólico disminuya la inflamación o tendrá algún efecto benéfico en alguno de los modelos a probar.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar las propiedades biológicas de *U. dermestoides*.

Objetivos Particulares

- 1) Obtener del extracto etanólico de *U. dermestoides*.
- 2) Evaluar de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *U.*

dermestoides.

3) Caracterizar químicamente del extracto etanólico de *U. dermestoides*.

4) Evaluar el efecto antiinflamatorio en un modelo de Edema plantar inducido por Carragenina.

5) Evaluar el efecto antiinflamatorio en un modelo murino de colitis inducido por DSS al 4%.

MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones de crecimiento de *Ulomoides dermestoides*.

El cultivo de gorgojos se mantuvo en un recipiente de plástico, a temperatura ambiente, con ciclo de luz 12/12 h. y fueron alimentados con avena, pan integral, salvado de trigo, hojas de lechuga fresca, rodajas de manzana y cáscaras de plátano.

Obtención del extracto etanólico de *U. dermestoides*.

El extracto etanólico de *U. dermestoides* se obtuvo por el método de maceración. El material congelado se pesó y trituró en un mortero; el resultante se colocó en un matraz con etanol (EtOH) al 96%. Posteriormente se filtró y evaporó el exceso de solvente ⁽⁴⁰⁾.

Análisis Antibacteriano

Para la evaluación de la actividad antibacteriana se utilizaron las siguientes cepas:

- Gram positivas

Streptococcus mutans ATCC 35668

Streptococcus mutans CDBB-B-1455

Staphylococcus aureus ATCC 12398

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Staphylococcus aureus ATCC 33592

Staphylococcus aureus 85 S

Staphylococcus epidermidis (Caso clínico)

Staphylococcus epidermidis ATCC 122228

Enterococcus faecalis CDBB-B-1533

Enterococcus faecalis ATCC 29212

Actinomyces viscosus WFCC 449

- Gram negativas

Pseudomonas aeruginosa CDBB-B-999

Pantoea agglomerans CBB-B-959

Enterobacter aerogenes CDBB-B-958

Enterobacter aerogenes CDBB-B-968

Enterobacter cloacae

Enterobacter aerogenes

Escherichia coli (caso clínico 1)

Escherichia coli (caso clínico 2)

Escherichia coli 28-MR

Shigella flexneri

Proteus mirabilis (caso clínico)

Vibrio cholerae (caso clínico)

Vibrio cholerae CDC V 12

Salmonella typhimurum

Vibrio cholerae CDBB-1159

Salmonella typhimurum CDBB-B-1111

Evaluación Cualitativa.- Se realizó un antibiograma de discos por la técnica de difusión en agar Kirby-Baüer. Los discos fueron impregnados con 2 mg del extracto obtenido, los discos del grupo control positivo se impregnaron con 25 µg de Cloranfenicol y los del control negativo con 10 µL de etanol al 96% ⁽⁴¹⁾ **(Apéndice II)**.

Evaluación Cuantitativa.- Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) se realizó la técnica de microdilución en caldo, con las siguientes concentraciones: 12, 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 y 0.125 mg/mL ⁽⁴¹⁾. Ésta técnica se realizó únicamente en las cepas que presentaron mayor sensibilidad en la prueba cualitativa. **(Apéndice III)**.

Posteriormente se evaluaron el efecto del extracto activo sobre la curva de crecimiento bacteriano con las concentraciones de la CMI, ½ CMI y CBM ⁽⁴¹⁾ **(Apéndice IV)**.

Caracterización química del extracto

Fenoles totales

Se realizó la caracterización química del extracto etanólico de *U. dermestoides*. El contenido de fenoles totales (CFT) por el método modificado de Singleton ⁽⁴²⁾, donde se utilizó el reactivo de Folin Ciocalteu y se midió por espectrofotometría **(Apéndice V)**.

Capacidad Antioxidante

Se determinó la capacidad antioxidante mediante el método basado en la reducción del radical 2,2-Difenil-1 Picrilhidracil (DPPH) ⁽⁴³⁾ **(Apéndice VI)**.

Carbohidratos Nelson- Somogyi

Se cuantificó el contenido de carbohidratos por el método de Nelson-Somogyi utilizando un patrón de glucosa. ⁽⁴⁴⁾ **(Apéndice VII).**

Proteínas (Bradford)

Se determinó el contenido de proteínas por el método de Bradford utilizando un patrón de albúmina ⁽⁴⁵⁾ **(Apéndice VIII).**

HPLC y GC-MS

Se llevó a cabo un análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución y Cromatografía de Gases Acoplado a Espectrometría Masas (HPLC y GC-MS por sus siglas en inglés).

Animales experimentales

Se utilizaron 18 ratones hembras (*Mus musculus*) BALB/c de 6-7 semanas de edad y 15 ratas (machos) Wistar de 200-250 g (*Rattus norvegicus*), los cuales se mantuvieron en el bioterio de la FES Iztacala, UNAM, en un ambiente libre de patógenos según las normas nacionales e institucionales, NOM-062-ZOO-1999, Norma Oficial Mexicana para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio ⁽⁴⁶⁾.

Modelo de Edema Plantar

Se hizo la prueba del edema plantar inducido por carragenina en 15 ratas Wistar de 200-250 g, determinando 5 grupos aleatorios con una n=3, para probar 3 concentraciones (750 mg/Kg, 500 mg/Kg y 250 mg/Kg) del extracto de *U. dermestoides* y a los grupos control se le administró sólo Diclofenaco 2mg/Kg y carragenina al 1% respectivamente. La inflamación se cuantificó midiendo el volumen de las patas por medio de un medidor de espesores electrónico a las 0, 1, 2, 3, 4, y 5 horas después de la inyección de carragenina ⁽⁴⁷⁾.

Modelo Murino de Colitis Experimental.

Inducción de Colitis

La colitis se indujo en 12 ratones BALB/c de los 18 utilizados con (DSS) al 4% con un peso molecular de 40-50 KDa, el cual se agregó en los bebederos con agua estéril durante 10 a 12 días.

Administración del extracto

El extracto etanólico de *U. dermestoides* fue disuelto en etanol al 10% y administrado por medio de una cánula hogastrica. En ese lapso de tiempo se observó la supervivencia de los ratones y el índice de actividad de la enfermedad (DAI, por sus siglas en inglés) que consiste en la observación de la pérdida de peso, consistencia de las heces y sangrado ⁽⁴⁸⁾.

Los grupos experimentales se determinaron aleatoriamente en tres grupos con una n=6; al grupo control se le administró únicamente agua potable estéril, al control negativo agua potable estéril y DSS al 4%, mientras que al grupo experimental, DSS al 4% y el extracto etanólico de *U. dermestoides* a una concentración de 15 µg/Kg, la cual se determinó tomando en cuenta el consumo promedio de gorgojos por un humano en tratamiento.

Porcentaje de sobrevida.

Se monitorearon los ratones a los que se les administraron los tratamientos establecidos y se registró el deceso de los animales de cada grupo.

Índice de Actividad de la Enfermedad (DAI).

Se utilizó el índice de la actividad de la enfermedad modificado por Rodríguez-Canales (Tabla 2) ⁽²⁷⁾.

Tabla 2.-Tabla de valores del Índice de la Actividad de la Enfermedad (DAI)

Pérdida de peso	Diarrea	Sangrado
0 -No hay pérdida	0 -Sin diarrea	0 -Sin sangre
1 -Del 1-5%	2 -Pérdida de consistencia pero no de forma	2 -Ligero
2 -Del 6-10%	4 -Sin forma	4 -Abundante
3 -Del 10-15%		
4 -Mayor al 15%		

Obtención y Medición de Intestinos

Los ratones fueron sacrificados en una cámara de CO₂, se obtuvieron los intestinos, se midió su longitud con un Vernier digital Mitutoyo modelo CD-12.

Histología y Tinción

Los intestinos fueron procesados para la histología, descrita por Prophet⁽⁴⁹⁾, y teñidos con la tinción de Hematoxilina y Eosina⁽⁵⁰⁾ (**Apéndices IX y X**).

Índice de Daño Histológico

Para evaluar el daño de la CU en los tejidos del intestino se utilizó el método modificado por Rodríguez- Canales ⁽²⁷⁾ y se asignaron valores en dos categorías: infiltrado inflamatorio y ulceración. El primero fue evaluado en cada capa del colon, es decir, en el epitelio superficial, criptas, estroma, submucosa y la capa transmural, siguiendo la siguiente escala de valores, arrojando valores como máximos y mínimos entre 0 y 9. (Tabla 3)

Tabla 3.- Tabla con valores del índice de daño histológico.

Infiltrado inflamatorio	Extensión del daño	Daño en la cripta
0-No hay	0-No hay	0-No hay
1-Leve	1-En la capa mucosa	1-Primer tercio basal del daño
2-Moderado	2-En la capa submucosa	2-Dos tercios dañados
3-Severo	3-En la capa transmural	3-Pérdida total de la cripta

RESULTADOS

Rendimiento del extracto

En la Tabla 4, se observa el porcentaje de rendimiento que se obtuvo del extracto etanólico de *U. dermestoides*, el cual fue del 16.34% (Tabla 4).

Tabla 4.- Rendimiento del extracto etanólico de *U. dermestoides*. El rendimiento fue calculado a partir de 515.02g de gorgojos vivos.

Especie	Rendimiento en gramos (g)	Rendimiento en porcentaje (%)
<i>U. dermestoides</i>	84.172 g	16.34 %

Evaluación de la Actividad Antibacteriana

Evaluación cualitativa

De las 27 cepas utilizadas, en las Gram positivas el extracto tuvo un mayores halos de inhibición en *S. epidermidis* (Caso clínico), seguido de *E. faecalis* CDBB-B-1533, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. epidermidis* ATCC 122228, *S. mutans* CDBB-B-1455 y *S. aureus* ATCC 12398 (Tabla 5) (Figuras 7 y 8).

Tabla 5.- Actividad antibacteriana del extracto etanólico de *U. dermestoides* en cepas Gram positivas (+). Halos de inhibición en milímetros. NI: No hubo inhibición.

Cepa Bacteriana	Halos de inhibición (mm)
Gram positivas	
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (caso clínico)	16.66 ± 2.04
<i>Enterococcus faecalis</i> CDBB-B-1533	14.19 ± 0.35
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	14.00 ± 1.48
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	13.66 ± 1.92
<i>Streptococcus mutans</i> CDBB-B-1455	12.57±0.46
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12398	6.68 ± 0
<i>Actinomyces viscosus</i> WFCC 449	NI
<i>Staphylococcus aureus</i> 85 S	NI
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33592	NI
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	NI
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 35668	NI

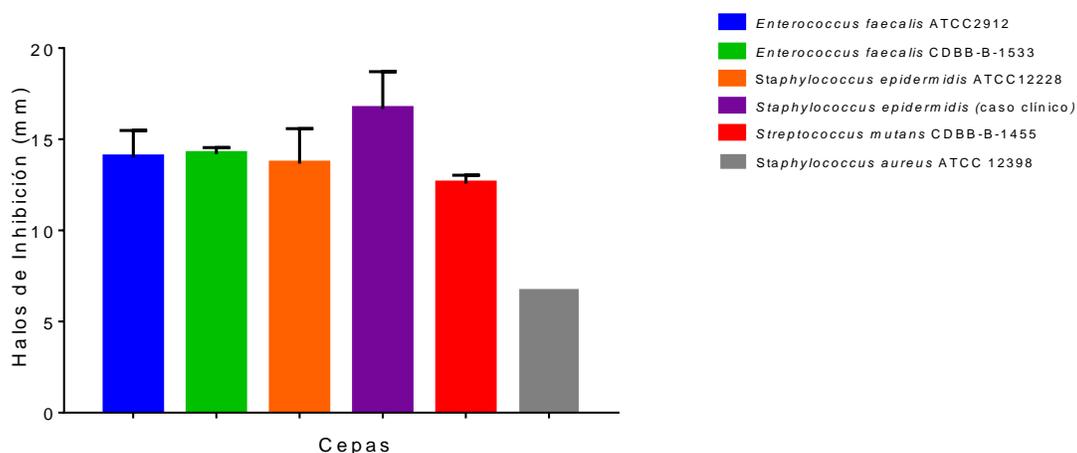


Figura 7.- Gráfica de las cepas Gram positivas con actividad antibacteriana frente al extracto etanólico de *U. dermestoides*. * Todas las cepas presentaron sensibilidad al Cloranfenicol.



Figura 8.- La cepa con mayor halo de inhibición fue *S. epidermidis* (caso clínico).

Mientras que en las Gram negativas las cepas que tuvieron inhibición fueron, *P. agglomerans* CBB-B-959, *E. cloacae*, *V. cholerae* (caso clínico), *V. cholerae* CDBB-1159, *E. coli* (caso clínico), *E. aerogenes* CDBB-B-958 y *S. typhimurum* (Tabla 6) (Figuras 9 y 10).

Tabla 6.- Actividad antibacteriana del extracto etanólico de *U. dermestoides* en cepas Gram negativas (-). Halos de inhibición en milímetros. NI: No hubo inhibición. (*) Cepas en las que el extracto únicamente atenuó el crecimiento de la bacteria.

Cepa Bacteriana	Halos de inhibición (mm)
<i>Pantoea agglomerans</i> CBB-B-959	14.43 ± 0.80
<i>Enterobacter cloacae</i>	10.90± 0.42
<i>Vibrio cholerae</i> (caso clínico)	10.76±0.74
<i>Vibrio cholerae</i> CDBB-1159	10.75 ±0.38
<i>Escherichia coli</i> (caso clínico 2)	8.26 ± 0.58
<i>Enterobacter aerogenes</i> CDBB-B-958	6.68±0
<i>Salmonella typhimurum</i>	6.68±0
<i>Enterobacter aerogenes</i> CDBB-B-968	NI
<i>Enterobacter aerogenes</i>	NI
<i>Escherichia coli</i> 28-MR	NI
<i>Pseudomonas aeruginosas</i> CDBB-B-999	NI
<i>Proteus mirabilis</i> (caso clínico)	NI
<i>Salmonella typhimurum</i> CDBB-B-1111	NI
<i>Vibrio cholerae</i> CDC V 12	NI
<i>Shigella flexneri</i> *	17.16 ± 1.53
<i>Escherichia coli</i> (caso clínico 1)*	12.44 ±1.07

Propiedades Biológicas de *U. dermestoides*

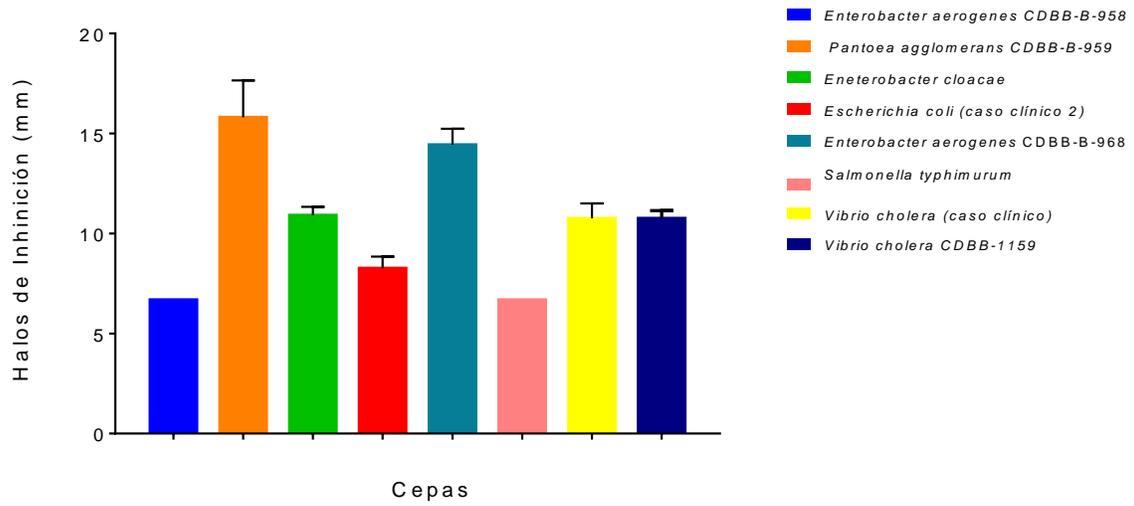


Figura 9.- Gráfica de las cepas Gram negativas con actividad antibacteriana frente al extracto etanólico de *U. dermestoides*. * Todas las cepas presentaron sensibilidad al Cloranfenicol.



Figura 10.- La cepa con mayor inhibición fue *P. agglomerans* CDBB-B-959.

Entre las cepas Gram + y las cepas Gram -, las primeras presentaron mayores halos de inhibición. Como control positivo, se utilizaron discos de impregnados de Cloranfenicol 25 μ g, al cual todas cepas presentaron sensibilidad (Figura 11).

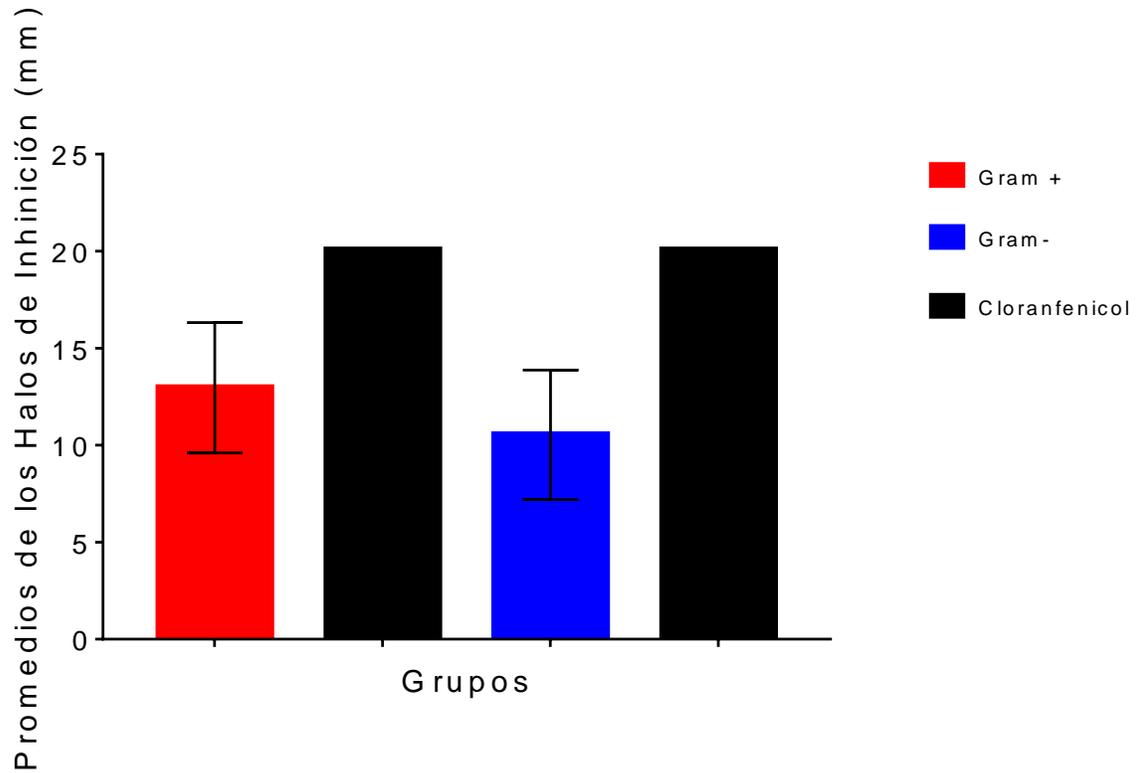


Figura 11.- Las cepas que presentaron mayor halo de inhibición fueron las Gram +.

Evaluación cuantitativa

CMI y CBM

Se evaluó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) del extracto etanólico de *U. dermestoides* en algunas de las cepas con las que se realizó la prueba cualitativa utilizando las siguientes concentraciones: 12, 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 y 0.125 mg/ mL. Las cepas con mayor susceptibilidad al extracto activo fueron *S. epidermidis* (caso clínico) con una CMI de 0.25 mg/mL y una CBM de 0.5 mg/mL, *S. epidermidis* ATCC1228 con una CMI de 0.25 mg/mL y una CBM de 1 mg/mL, *S. aureus* ATCC12398 con una CMI de 0.125 mg/mL y una CBM de 4 mg/mL, *E. faecalis* ATCC 29212 con una CMI de 0.5 mg/mL y una CBM de 1 mg/mL y *E. faecalis* CDBB-B-1533 con una CMI de 0.25 mg/mL y una CBM de 1mg/mL. El resto de las cepas en las que se probó el extracto activo presentaron mayor resistencia con una CMI de 4 mg/mL y una CBM mayor a los 4 mg/mL (Tabla 7).

Tabla 7.- Concentración mínima inhibitoria y concentración bactericida mínima del extracto etanólico de *U. dermestoides*. (>) Concentración mayor a los 4mg/ mL.

Cepa Bacteriana	CMI (mg/mL)	CBM (mg/mL)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (caso clínico)	0.25	0.5
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC1228	0.25	1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12398	0.125	4
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	0.5	1
<i>Enterococcus faecalis</i> CDBB-B-1533	0.25	1
<i>Escherichia coli</i> (caso clínico 2)	4	>4
<i>Enterobacter aerogenes</i> CDBB-B-968	4	>4
<i>Enterobacter cloacae</i>	4	>4
<i>Pantoea agglomerans</i> CDBB-B-959	4	>4
<i>Salmonella typhimurum</i>	4	>4
<i>Vibrio cholerae</i> CDBB-1159	4	>4
<i>Vibrio cholerae</i> (caso clínico)	4	>4

Curva de Crecimiento Bacteriano

Para realizar la curva de crecimiento bacteriano se seleccionaron dos bacterias, una Gram positiva (*S. aureus*) y una Gram negativa (*V. cholerae*), para evaluar el efecto del extracto etanólico de *U. dermestoides* activo durante 24 h. Estas cepas, además de ser seleccionadas por su inhibición que presentaron en la prueba de difusión en agar y microdilución en caldo (CMI y CBM), fueron tomadas en cuenta por su importancia médica. Para la cepa de *S. aureus* se utilizaron las siguientes concentraciones: CBM= 6 mg/mL, CMI= 4 mg/mL y ½ MIC= 2 mg/mL. Para la cepa de *V. cholerae*, las concentraciones utilizadas fueron: CBM= 4 mg/mL, CMI= 2 mg/mL y ½ MIC= 1mg/mL.

En *S. aureus*, las tres concentraciones que se probaron tuvieron el mismo comportamiento durante las 24 horas que se dejó actuar el extracto. Con esto podemos decir que hubo un ligero efecto bacteriostático del extracto sobre esta bacteria, es decir, que hubo una disminución de la población bacteriana (Figura 12).

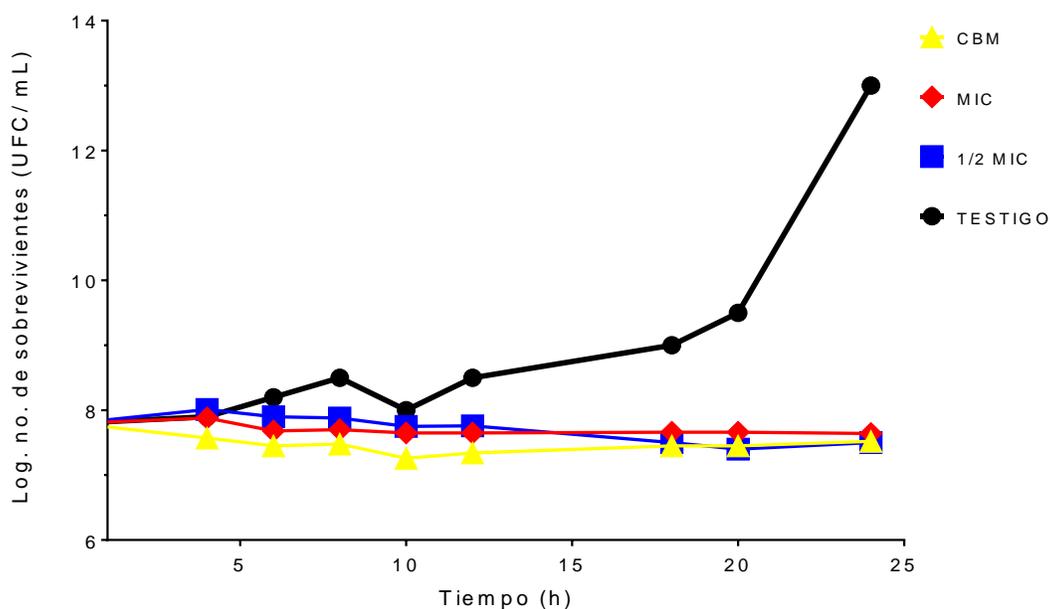


Figura 12.- Curva de crecimiento de *S. aureus* durante 24 h frente al extracto etanólico de *U. dermestoides* a las concentraciones de CBM= 6 mg/mL, CMI= 4 mg/mL y ½ CMI= 2 mg/mL.

Además del efecto bacteriostático que presentó el extracto de *U. dermestoides* sobre *S. aureus*, se observó una disminución en el tamaño de las colonias de las bacterias con respecto al testigo (Figura 13).

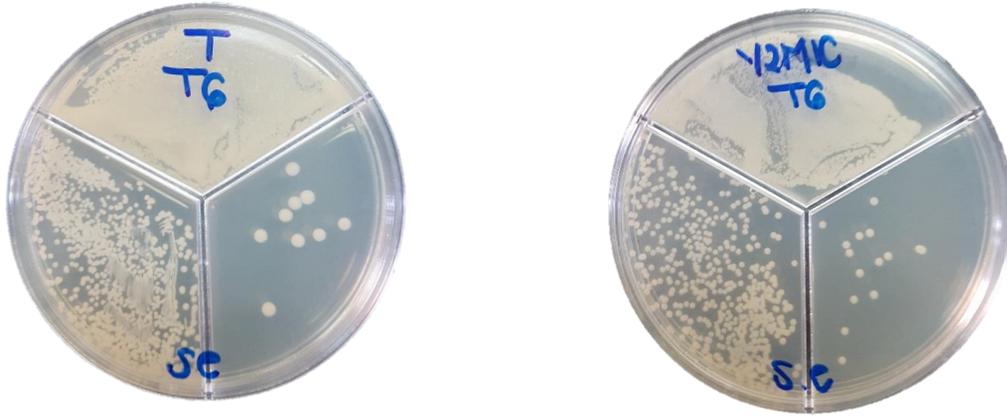


Figura 13.- Cepa de *S. aureus* en la curva de crecimiento frente al extracto etanólico de *U. dermestoides*. (Lado izquierdo, testigo y lado derecho, concentración $\frac{1}{2}$ CMI= 2mg/mL.

En el caso de *V. cholerae*, se observó que en la concentración de $\frac{1}{2}$ MIC= 1 mg/mL, hubo ligeramente más efecto bacteriostático de extracto etanólico de *U. dermestoides* a comparación de la otras concentraciones. En las tres concentraciones probadas, se observa que a la décima hora hay una disminución de la población bacteriana con las tres concentraciones, sin embargo, a la onceava hora vuelve a haber un crecimiento en las concentraciones de CBM= 4 mg/ mL y CMI= 2 mg/mL (Figura 14).

Propiedades Biológicas de *U. dermestoides*

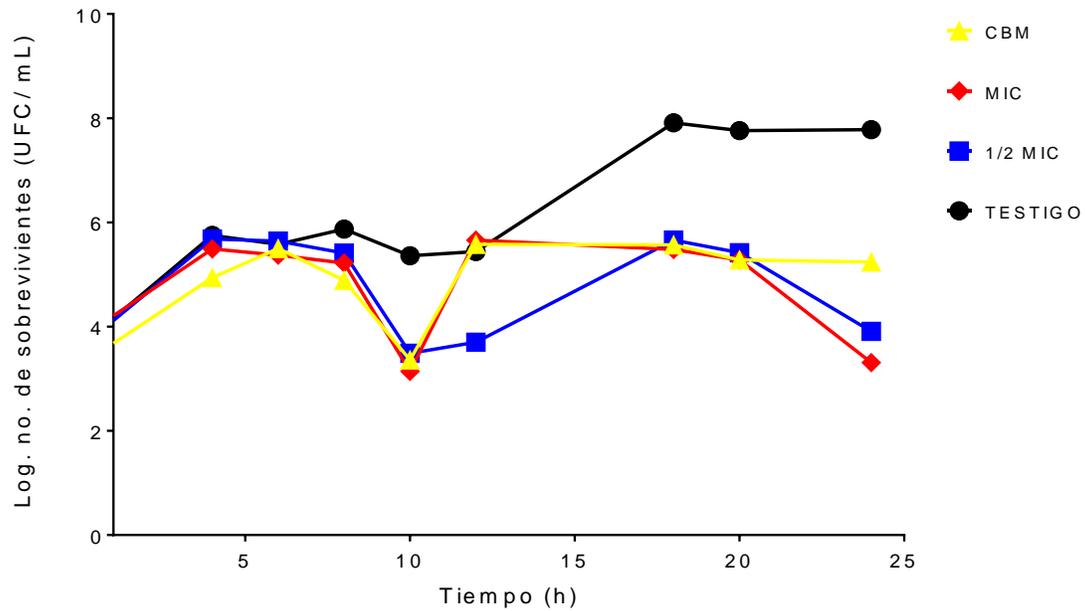


Figura 14.- Curva de crecimiento *V. cholerae* durante 24 horas frente al extracto etanólico de *U. dermestoides* a las concentraciones de CBM= 4 mg/mL, CMI= 2 mg/mL y $\frac{1}{2}$ MIC= 1mg/mL.

Se observó que al igual que *S. aureus*, hubo una disminución en el tamaño de las colonias con respecto al grupo testigo (Figura 15).



Figura 15.- Cepa de *V. cholerae* en la curva de crecimiento frente al extracto etanólico de *U. dermestoides* (Lado izquierdo, testigo y lado derecho, concentración $\frac{1}{2}$ CMI = 1 mg/mL).

Caracterización química del extracto

Fenoles Totales

Se determinó la concentración de fenoles totales del extracto etanólico de *U. dermestoides*. Los fenoles son compuestos que van ligados a la capacidad antioxidante y el extracto tuvo poca cantidad de éstos, ya que se obtuvo una cantidad de 70 mg eAG/g (Figura 16).

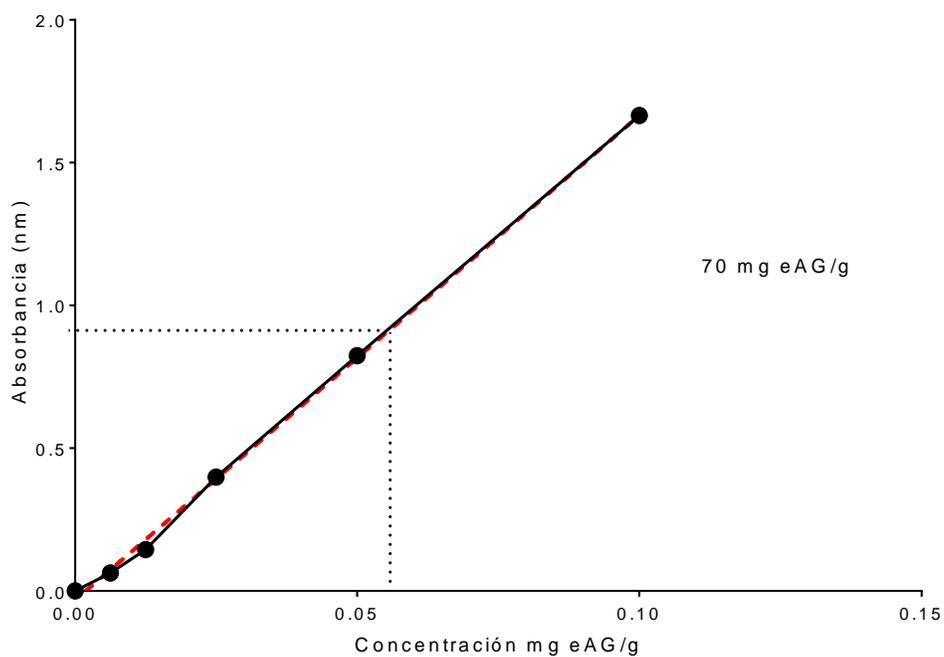


Figura 16.- Gráfica de concentración de fenoles totales del extracto etanólico de *U. dermestoides*.

Capacidad Antioxidante

Es de importancia saber la capacidad antioxidante que posee un extracto, ya que los radicales libres pueden ser una reacción de defensa de un individuo contra microorganismos pero estos radicales a su vez pueden afectar a otras células. Por ello, resultó importante medir la capacidad antioxidante del extracto etanólico de *U. dermestoides*.

Se encontró que la capacidad antioxidante media del extracto etanólico de *U. dermestoides* fue de $CA_{50} = 650 \text{ ppm } (\mu\text{g/mL})$ (Figura 17).

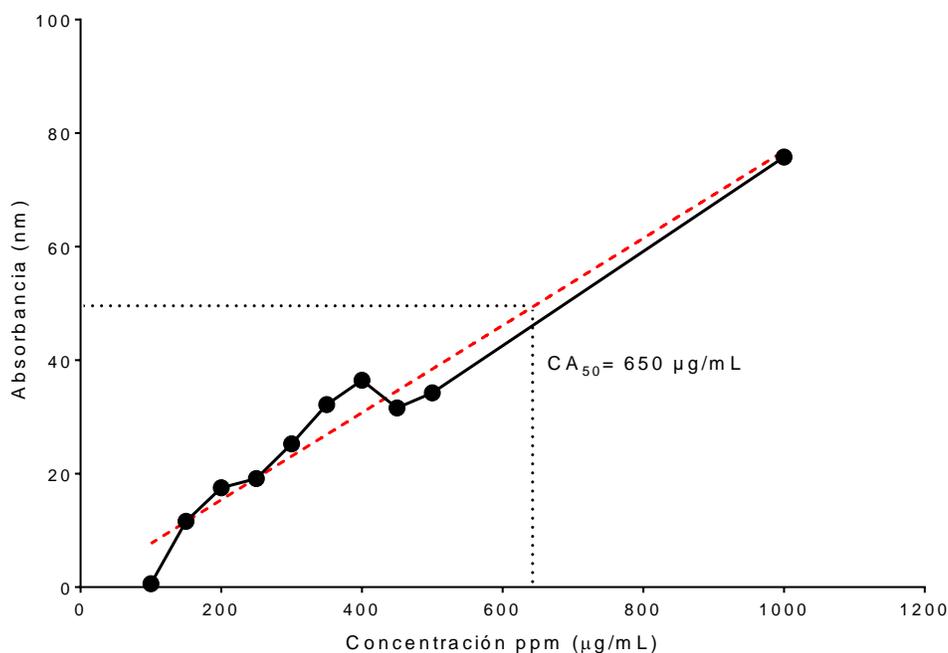


Figura 17.- Gráfica de capacidad antioxidante del extracto etanólico de *U. dermestoides*.

El extracto etanólico de *U. dermestoides*, no tiene capacidad antioxidante de acuerdo con el criterio de Al- Fatimi (2007), que nos indica que para calificar a un extracto con una buena capacidad antioxidante debe tener una concentración de $CA_{50} = 1 \text{ a } 96.4 \text{ ppm } (\mu\text{g/mL})$.⁽⁵¹⁾

Cuantificación de Carbohidratos por el método de Nelson-Somogyi

En la cuantificación de Carbohidratos por el método de Nelson- Somogyi se obtuvo que por cada gramo de gorgojos hay 1.802 μg de $(\text{CH}_2\text{O})_n$ (Figura 18).

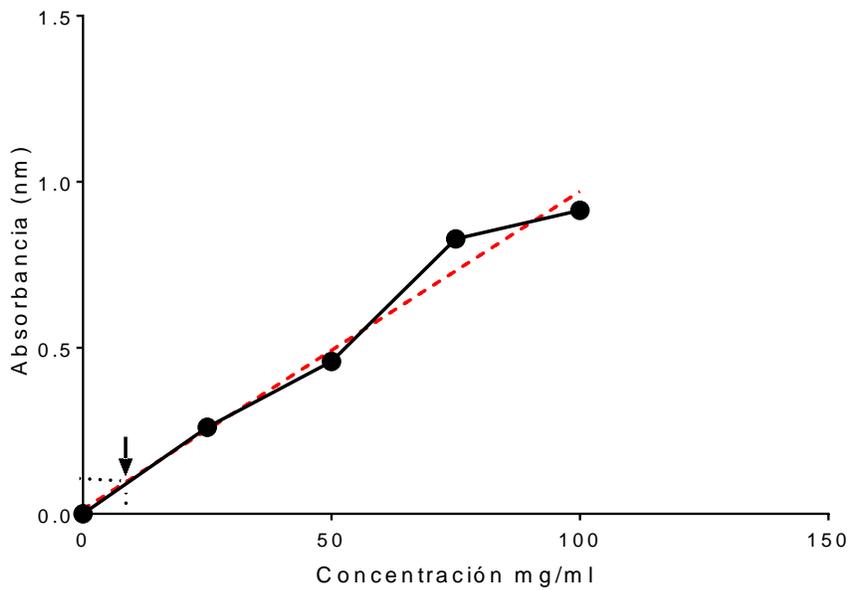


Figura 18.- Curva patrón de carbohidratos (glucosa) : interpolación de $(\text{CH}_2\text{O})_n$ de *U. dermestoides*.

Determinación del Contenido de Proteínas por el método de Bradford

La concentración total de proteínas en el extracto de *U. dermestoides* a una concentración de 5 mg/mL fue de 115.740 mg/mL (Figura 19).

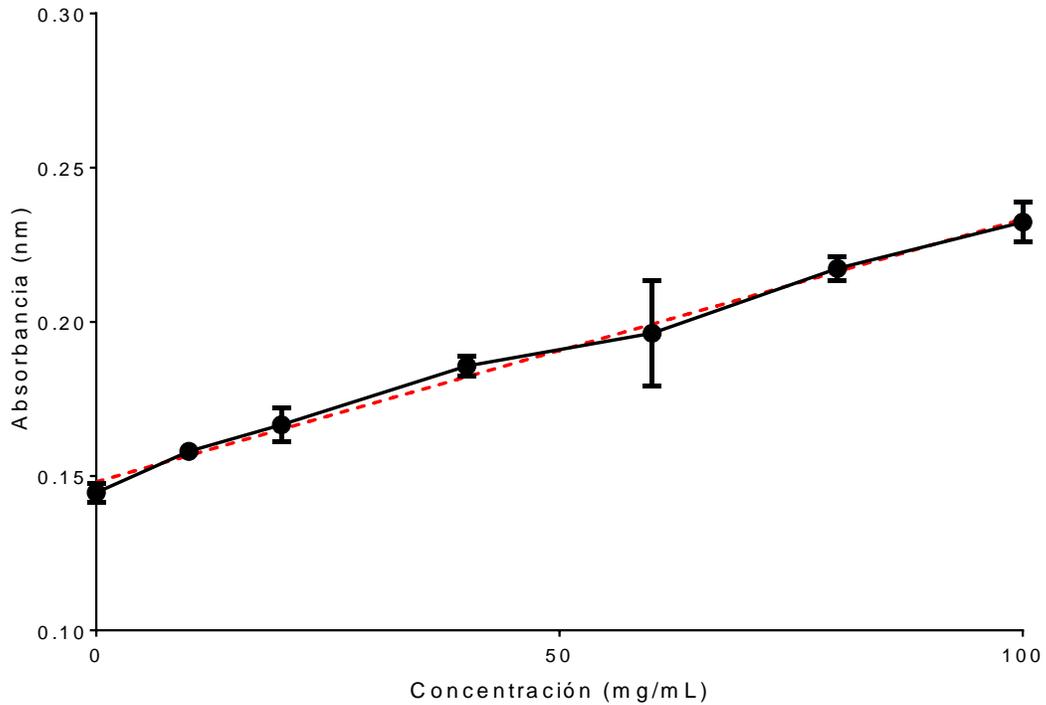


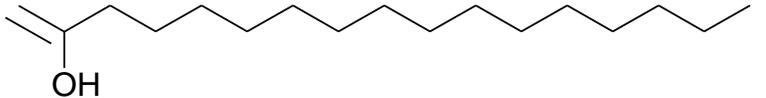
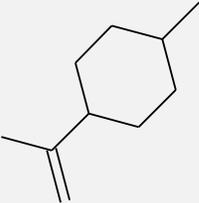
Figura 19.- Curva patrón de albúmina con interpolación de la concentración de proteínas contenidas en el extracto etanólico de *U. dermestoides*.

Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS)

Se tomaron 3 mg del extracto etanólico de *U. dermestoides* y se disolvieron en 200 μ L de metanol HPLC. Para el análisis e identificación de los compuestos mayoritarios del extracto etanólico de *U. dermestoides*, se utilizó la técnica de cromatografía de gases con las siguientes condiciones de análisis: temperatura inicial del horno a 150°C y se mantuvo durante 2 minutos; se realizó una primera rampa de calentamiento de 5°C/min hasta llegar a una temperatura de 200°C; una segunda rampa de 3°C hasta alcanzar la temperatura de 215°C y una tercera rampa 10 °C hasta llegar a 260 °C, se mantuvo durante 2 minutos; la temperatura del inyector fue de 250°C; el gas acarreador fue Helio a una velocidad constante de 38 cm/seg; el modo de inyección fue Splitless, el volumen de inyección fue de 1 μ L. Las condiciones del espectrómetro de masas fueron las siguientes: temperatura de la fuente de ionización a 230°C y de cuadrupolo a 150 °C; temperatura de la línea de transferencia a 290°C; tipo de ionización barrido completo con impacto electrónico (EI) con una energía de ionización de 70 eV y un rango de 35 a 400 de relación de masa carga (m/z); polaridad de los iones positivos. Se utilizó una columna DB-5MS 30 m x 0.250 mm, tamaño de partícula 0.50 μ m (J&W Scientific INC.). Los espectros de fragmentación de masas obtenidos del extracto de *U. dermestoides* separados se compararon con la biblioteca NIST8. El análisis de la muestra duró 23.50 minutos y se obtuvo el siguiente cromatograma que se muestra en la figura 20.

Los componentes de mayor abundancia presentes en el extracto que se obtuvieron fueron alcohol cetílico o palmítico (1-Hexadecanol), ácido palmítico (n-Ácido Hexadecanoico) y Limoneno (Tabla 8).

Tabla 8.- Compuestos de mayor abundancia identificados por GC-MS en el extracto etanólico de *U. dermestoides*.

Compuesto	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	Nombre	Estructura Química
1	11.407	53.87	Alcohol Cetílico o Alcohol Palmítico (1-Hexadecanol)	
2	15.006	5.56	Ácido Palmítico (n-Ácido Hexadecanoico)	
3	6.731	2.54	Limoneno	

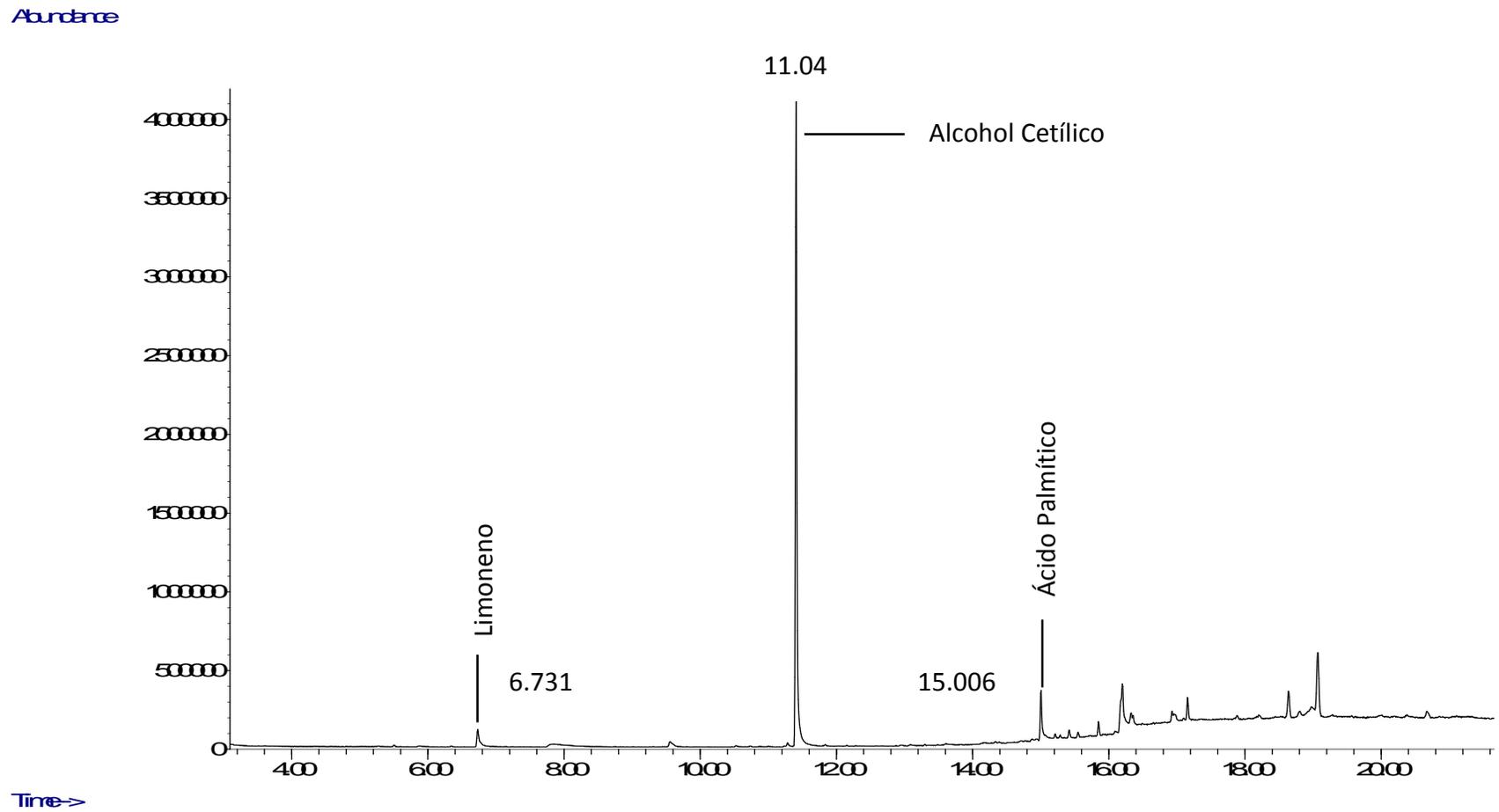


Figura 20.- Cromatograma obtenido de la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas del extracto etanólico de *U. dermestoides*.

Esterificación de ácidos grasos

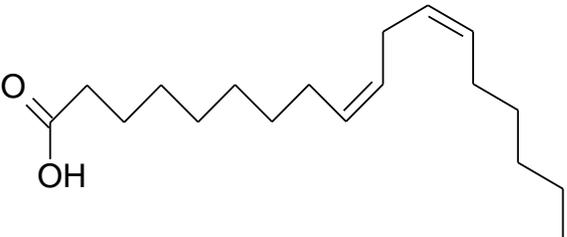
La esterificación de ácidos grasos se llevó a cabo debido a que en el cromatograma de la Cromatografía de Gases acoplada a espectrometría de masas no pudieron identificarse específicamente algunos ácidos grasos, y por medio de este método dichos ácidos ya que al adicionarles un éster se pueden volatilizar con mayor facilidad. **(Apéndice XI)**

Las condiciones cromatográficas para llevar a cabo éste proceso fueron las mismas anteriormente utilizadas en el GC-MS.

Para ello se colocó 1 g de gorgojos en 50 mL de hexano° HPLC, se realizó una extracción exhaustiva y se procedió a hacer la esterificación (Apéndice XI). Se tomaron 2µL de la muestra esterificada, se inyectaron en el GC-MS y se analizó durante 30 minutos.

Los compuestos de mayor abundancia que se identificaron con la esterificación fueron el 1- Trideceno, isómero del 1-Trideceno, 1-12 Tridecadieno, ácido linoléico (9,12- Octadecadienoico (Z,Z)- (Tabla 9)(Figura 21).

Tabla 9.- Compuestos de mayor abundancia identificados en la esterificación de ácidos grasos por GC-MS.

Compuesto	Tiempo de Retención	Abundancia (%)	Nombre	Estructura Química
1	4.464	53.86	1-Trideceno	
2	7.508	20.62	9-Octdeceno,(E)-	
3	22.003	15.85	1,12- Tridecadieno	
4	20.037	1.13	Ácido linoléico (9,12-Ácido Octadiecadienoico)	

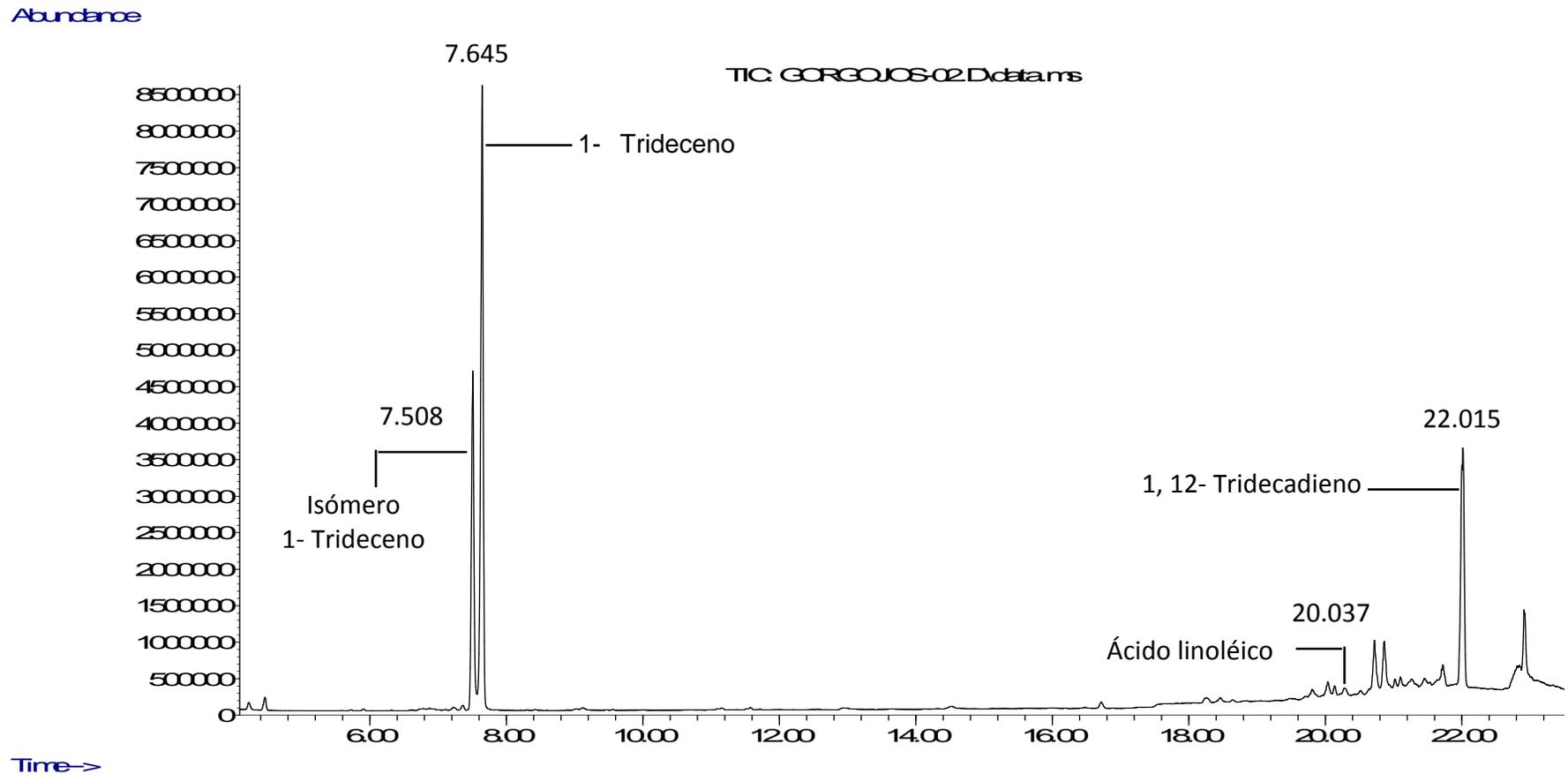


Figura 21.- Cromatograma de los compuestos identificados en la esterificación de ácidos grasos por GC-MS del extracto etanólico de *U. dermestoides*.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Para realizar el análisis por HPLC se pesaron 3mg del extracto etanólico de *U. dermestoides* y se disolvieron en 200 μ L de hexano^oHPLC.

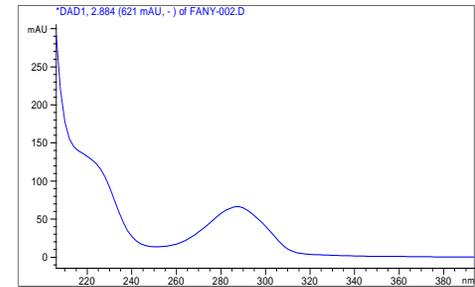
La caracterización preliminar por HPLC, se realizó con una columna Allsphere ODS-1 de 250 mm x 4.6 mm con un tamaño de partícula 5 μ m (GRACE). Análisi en fase reversa isocrática con mezcla de (H₂O:MeOH:ACN) 0.1% H₃PO₄ (50:25:25), flujo de 1 mL/min. Detector de arreglo de diodos a una longitud de onda de 280 nm con barrido completo de 200 a 400 nm. LA muestra se dejó correr durante 25 minutos para obtener el cormatograma de los posibles compuestos presentes en el extracto. Los compuestos identificados fueron Catecol, derivados de éste los cuales no se pudieron identificar específicamente y Catequina, además de otros 7 compuestos que no pudieron ser identificados (Tabla 10) (Figura 22).

Tabla 10.- Compuestos del extracto etanólico de *U. dermestoides* identificados en el HPLC.

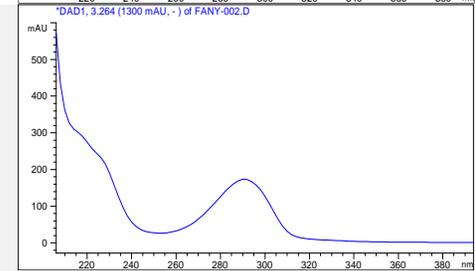
Compuesto	TR (min)	UV máx (nm)	Nombre	Estructura Química	Espectro UV
1	2.7	204, 206, 276	Catecol		
2	3.2	210, 290	Derivados del Catecol		
3	4.3	220, 280	Catequina		

Propiedades Biológicas de *U. dermestoides*

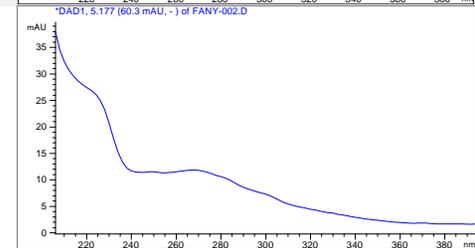
4 2.6 228, 288 CN ---



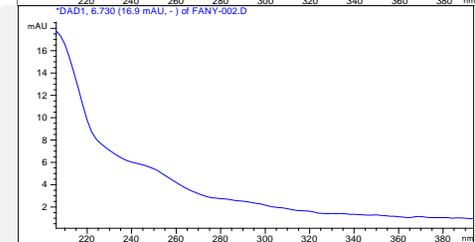
5 3.2 232, 292 CN ---



6 5.1 230, 272 CN ---

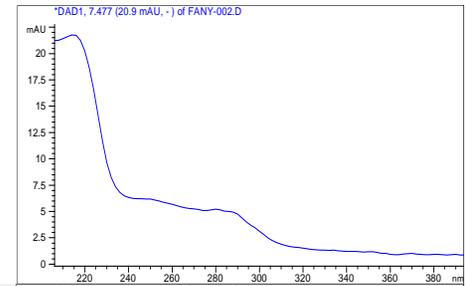


7 6.7 228, 250 CN ---

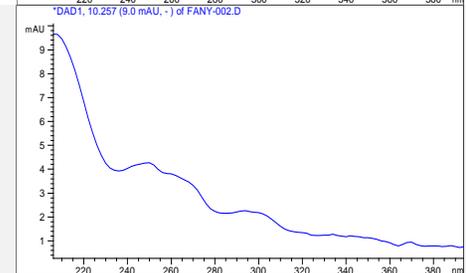


Propiedades Biológicas de *U. dermestoides*

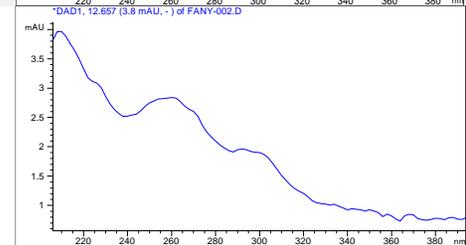
8 7.4 214, 288 CN ---



9 10.2 210, 250 CN ---



10 12.6 210, 228 CN ---



*CN: Compuestos No Identificados.

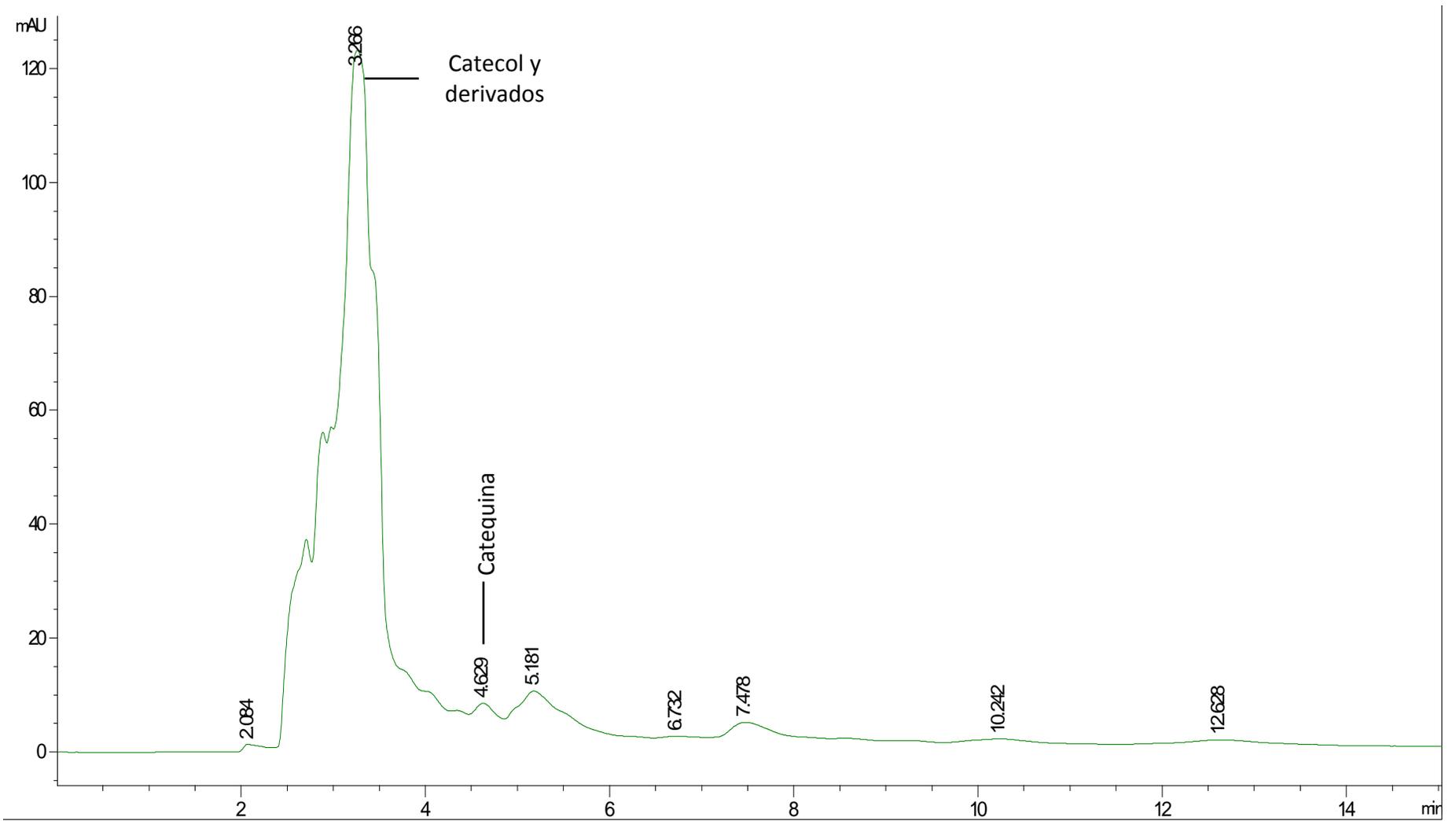


Figura 22.-Cromatograma de los compuestos identificados por HPLC.

Actividad Biológica

De los compuestos identificados en el GC-MS, Esterificación de ácidos grasos y HPLC, los cuales se muestran en la tabla 11, poseen actividades biológicas, pero que en conjunto le dan pie a las distintas propiedades que se le atribuyen a *U. dermestoides*.

Tabla 11.- Actividades biológicas de los compuestos identificados en el extracto etanólico de *U. dermestoides* por GC-MS, Esterificación de ácidos grasos y HPLC.

	COMPUESTO	ACTIVIDAD BIOLÓGICA
GC-MS	Alcohol cetílico o Alcohol Palmítico (1-Hexadecanol)	Tiene acción emoliente por impedir la desecación de la epidermis en su capa córnea ⁽⁵²⁾
	Ácido palmítico (n- Ácido Hexadecanoico)	Antioxidante ⁽⁵³⁾
	Limoneno	Antioxidante, antiinflamatoria y anticancerígena ^(54, 55)
ESTERIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS	1-Trideceno	Molécula vehículo de benzoquinonas ⁽⁵⁶⁾
	Ácido Linoléico 9,12-Ácido Octadecadienoico (Z,Z)-	Diversos efectos sobre el sistema inmune ⁽⁵³⁾
HPLC	Catecol	Antioxidante, antibacteriana ⁽⁵⁷⁾
	Catequina	Antioxidante, antimicrobiana ⁽⁵⁸⁾
	Derivados del Catecol	Antimicrobiana ⁽⁵⁹⁾

Efecto Antiinflamatorio en un Modelo de Edema Plantar Inducido por Carragenina 1%.

Para verificar el efecto antiinflamatorio del extracto etanólico de *U. dermestoides* en el modelo de edema plantar inducido por carragenina 1%, se tuvieron 5 grupos experimentales con una n=3. Se probaron tres concentraciones del extracto: 250, 500 y 750 mg/Kg, además de que un grupo fue tratado con el antiinflamatorio Diclofenaco 2 mg/Kg.

Se observó el efecto de las tres concentraciones y del fármaco Diclofenaco y se concluyó que el extracto etanólico de *U. dermestoides* no presentó actividad antiinflamatoria, aunque en la concentración de 750 mg/Kg se observa una ligera tendencia a bajar la inflamación, sin embargo, esta diferencia no es significativa en comparación con los otros dos grupos tratados con extracto ni con el grupo de Carragenina (Figuras 23 y 24).

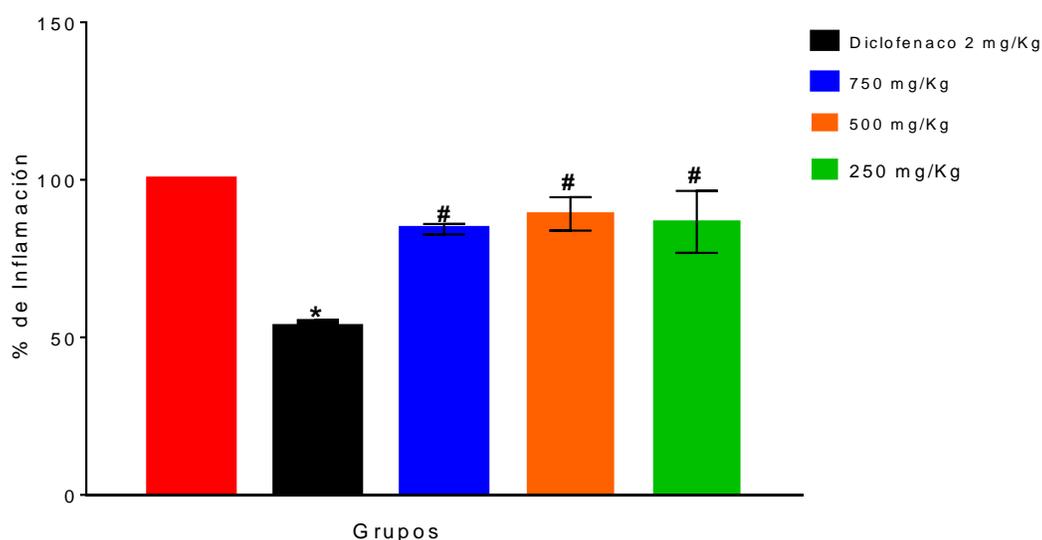


Figura 23.- Gráfica del efecto antiinflamatorio del extracto etanólico de *U. dermestoides* en el modelo de edema plantar ($P < 0.05$). *: Diferencia significativa con la carragenina 1%. #: Diferencias significativas con el Diclofenaco 2mg/Kg.

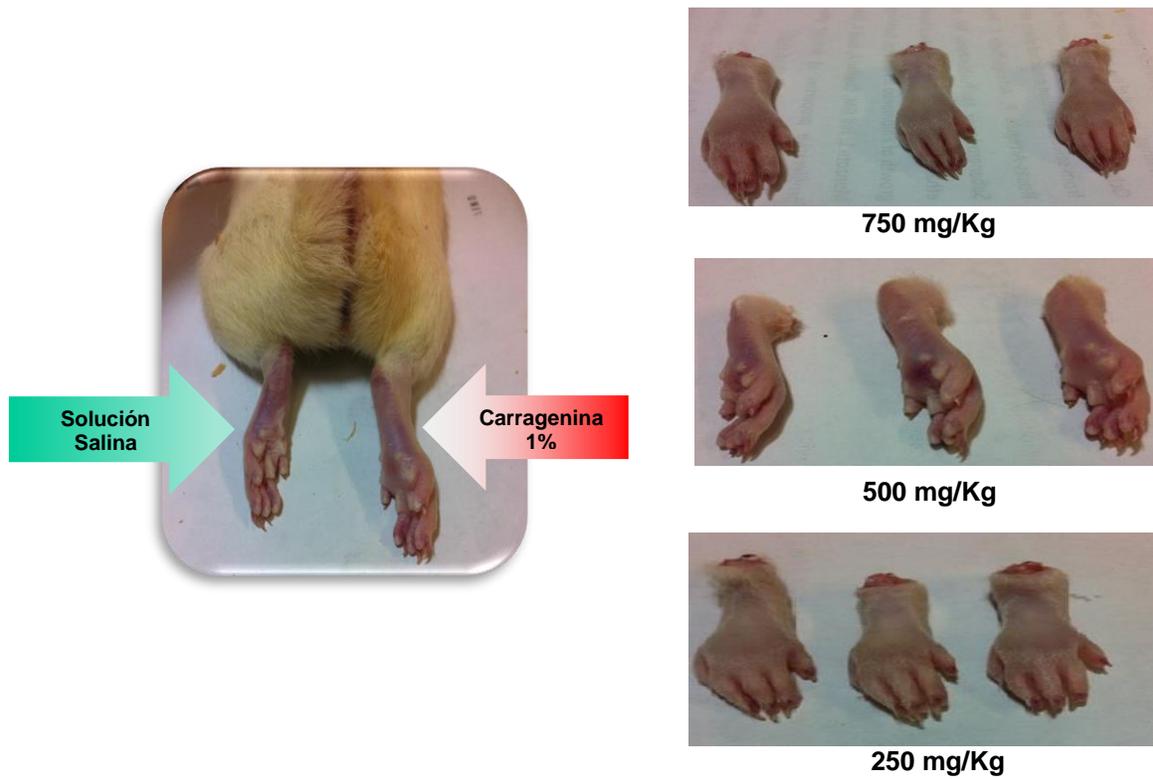


Figura 24.- De lado izquierdo se muestra la diferencia en ambas patas, la izquierda tratada con solución salina y la derecha con carragenina 1%. De lado derecho, las patas derechas de las ratas utilizadas en cada grupo de tratamiento.

Efecto Antiinflamatorio en un modelo murino de Colitis experimental inducido por DSS.

Para realizar éste modelo, se tuvieron tres grupos con una n=6; al grupo control se mantuvo únicamente con agua estéril y alimento. Al siguiente grupo se le administró agua potable estéril y DSS al 4%, mientras que al grupo experimental, DSS 4% y el extracto etanólico de *U. dermestoides* a una concentración de 15 µg/Kg.

Porcentaje de sobrevida

Se monitoreó la sobrevida de los animales durante el tratamiento. La mortalidad comenzó a partir del día 12, el grupo de DSS 4% para el día 16 ya había alcanzado el 100% de mortalidad. Los ratones tratados con el extracto etanólico de *U. dermestoides*, al día 21 únicamente habían alcanzado el 38% de mortalidad (Figura 25).

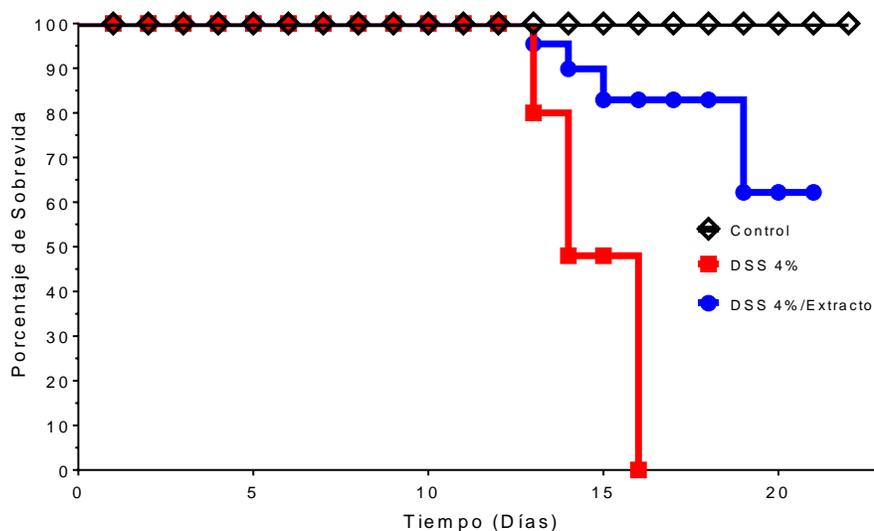


Figura 25.- Curvas de porcentaje de sobrevida.

Índice de Actividad de la Enfermedad (DAI)

Durante los 10 días de tratamiento se registró la pérdida de peso, la presencia o ausencia de sangre en las heces fecales y presencia o ausencia de diarrea, con base a la tabla de valores de DAI (tabla2), siendo 12 el valor máximo de la enfermedad. A partir del segundo día el grupo de DSS + Extr. comenzó a presentar los signos de la enfermedad, sin embargo a lo largo de todo el tratamiento su valor máximo no pasó de los 5 puntos. El grupo de DSS, al día 10 de tratamiento ya había alcanzado el valor máximo de la enfermedad. Los valores medios presentados a lo largo del tratamiento se muestran en la figura 26.

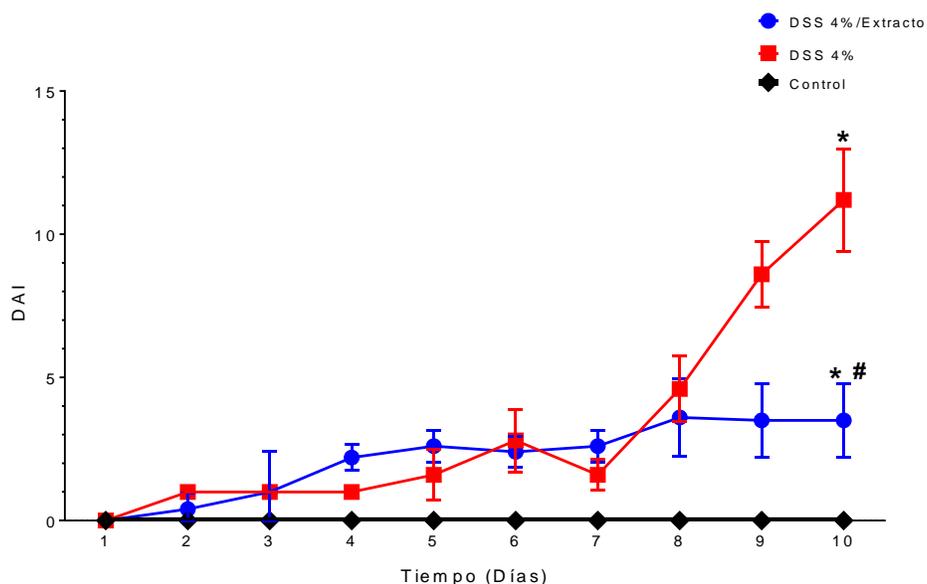


Figura 26.- Gráfica del índice de actividad de la enfermedad de los grupos utilizados para el modelo murino de colitis experimental. Grupo control (tratado con agua potable), DSS (4% peso/volumen), DSS + Ext. (DSS 4% peso/volumen y 100 mL de extracto etanólico de *U. dermestoides* a una concentración de 15 μ L/kg). *: Diferencias significativas con respecto al grupo control. #: Diferencias significativas con respecto al grupo de DSS ($P < 0.05$).

El extracto etanólico de *U. dermestoides*, disminuyó notablemente la severidad de la enfermedad en sus principales síntomas, por ejemplo, en la aparición de sangrado rectal (Figura 27).

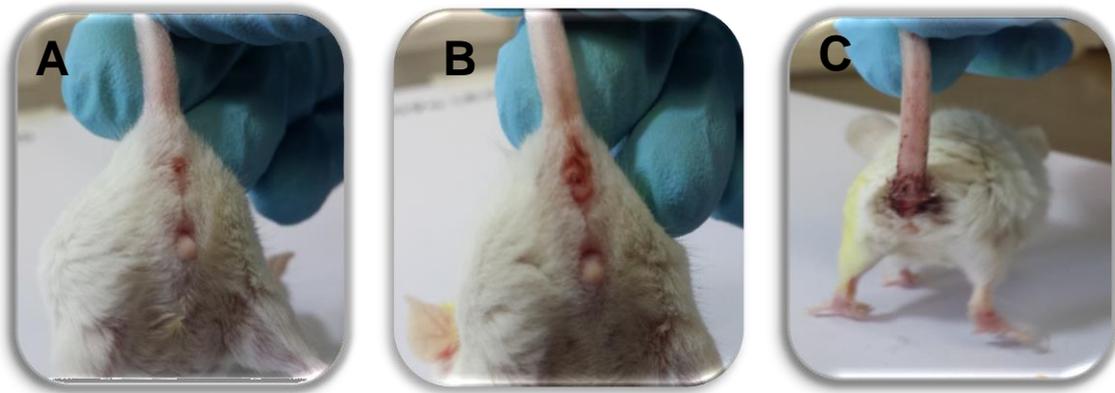


Figura 27.- A: Ratón del grupo sano. **B:** Ratón del grupo tratado con DSS 4% + Ext [15 µg].
C: Ratón del grupo DSS 4%. Fotografías tomadas al día 9 de tratamiento.

Longitud de los intestinos

Se tomó la longitud de los intestinos ya que éste parámetro es una característica de la colitis ulcerativa inducida por DSS. Como se muestra en la figura 28 y 29, el extracto etanólico de *U. dermestoides* no protegió contra el acortamiento de los intestinos.

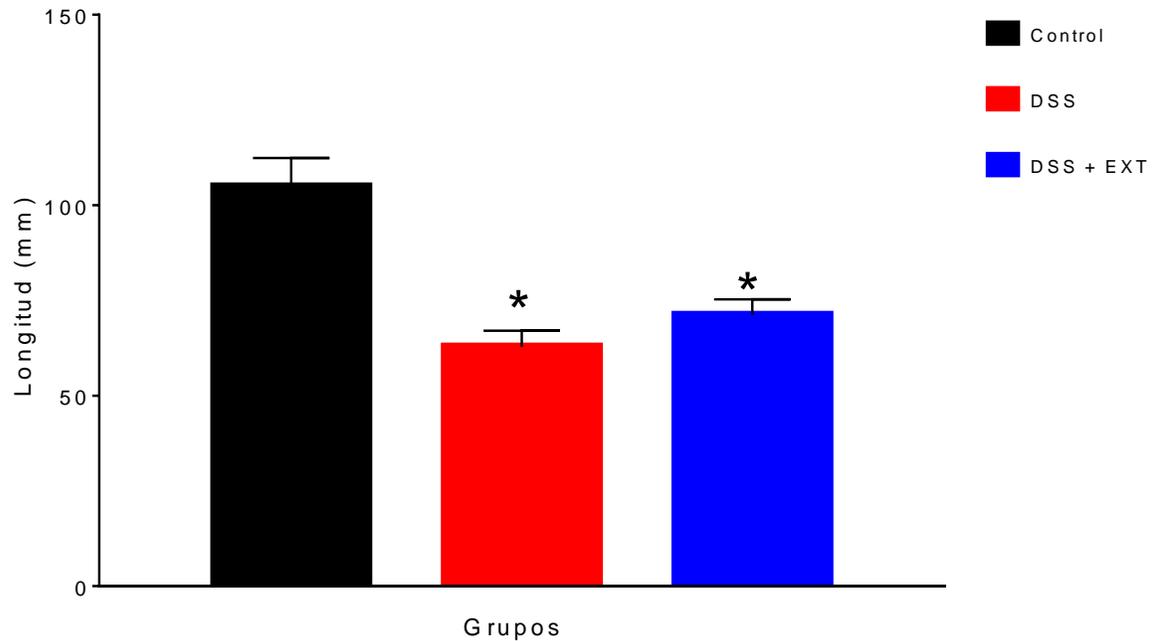


Figura 28.- Gráfica de la medición de la longitud (mm) de los intestinos. Control: tratados únicamente con agua potable. DSS: Tratados únicamente con DSS y agua potable. DSS+Ext.: tratados con extracto etanólico de *U. dermestoides* a una concentración de 15 µg/Kg. *: Diferencias significativas con respecto al grupo control.

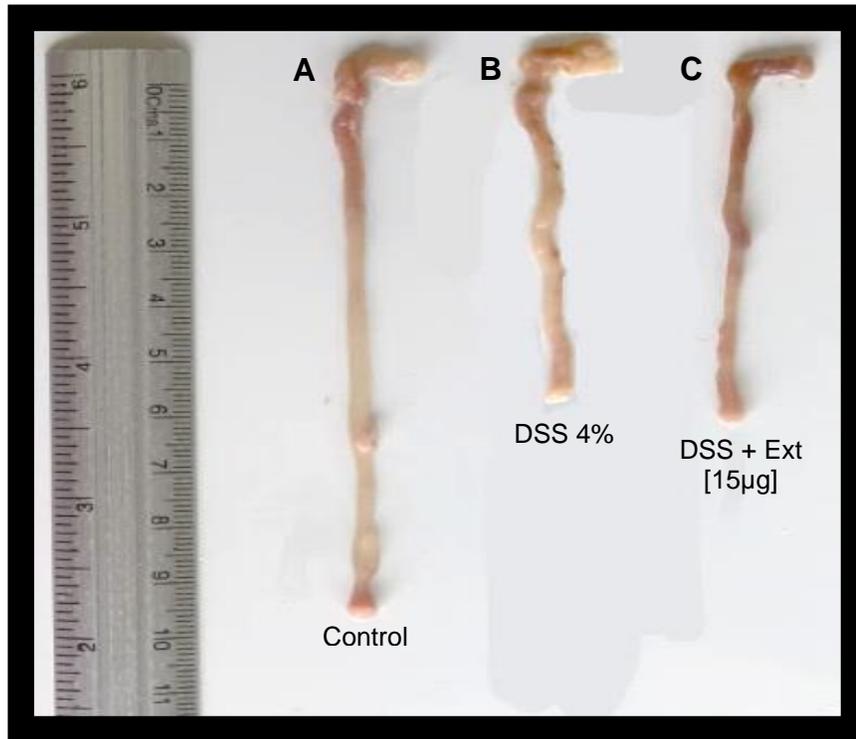


Figura 29.- A: intestino sano. B: Intestino del grupo DSS 4%. C: Intestino del grupo DSS + Ext [15 µg]. Intestinos extraídos al día 10 de tratamiento.

Índice histopatológico

El daño en las criptas es una característica de la colitis ulcerosa debido a que la inflamación que se presenta es exacerbada y por tanto llega a dañar en demasía el tejido del colon. En el índice de daño histológico fue tomado en cuenta el daño a la integridad y arquitectura de las criptas así como el infiltrado inflamatorio en las capas del intestino (tabla 3). El extracto etanólico de *U. dermestoides* presentó actividad antiinflamatoria en el modelo de CU experimental, ya que hay una reducción del infiltrado inflamatorio y daño en la integridad de las criptas. El grupo tratado con el extracto posee diferencias significativas con respecto al grupo control y al grupo de DSS 4%. (Figuras 30 y 31)

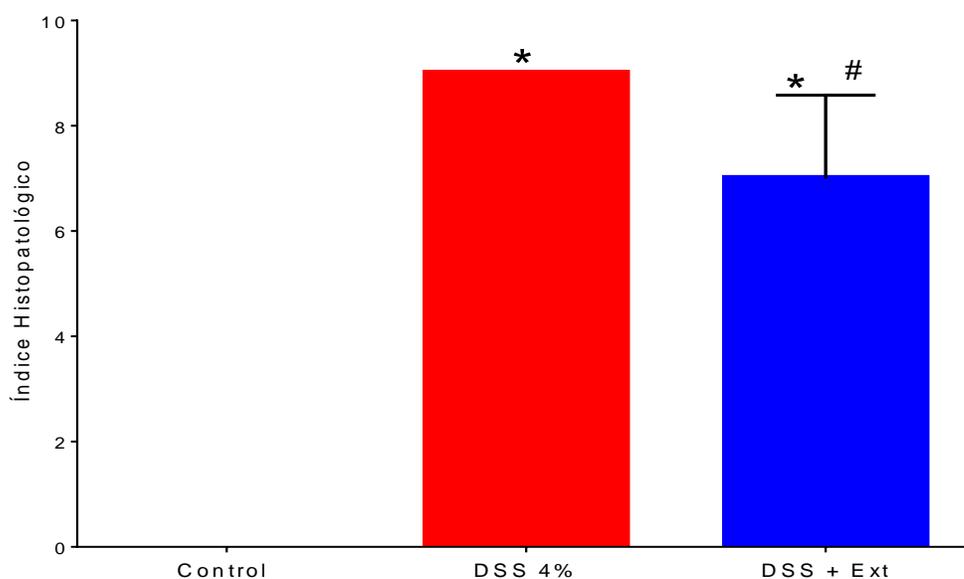


Figura 30.- Índice histopatológico. El grupo tratado con el extracto etanólico de *U. dermestoides* presentó diferencias significativas con respecto a los grupos Control y DSS 4%. *: Diferencias significativas con respecto al grupo control. #: Diferencias significativas con respecto al grupo DSS 4%. ($P < 0.05$).

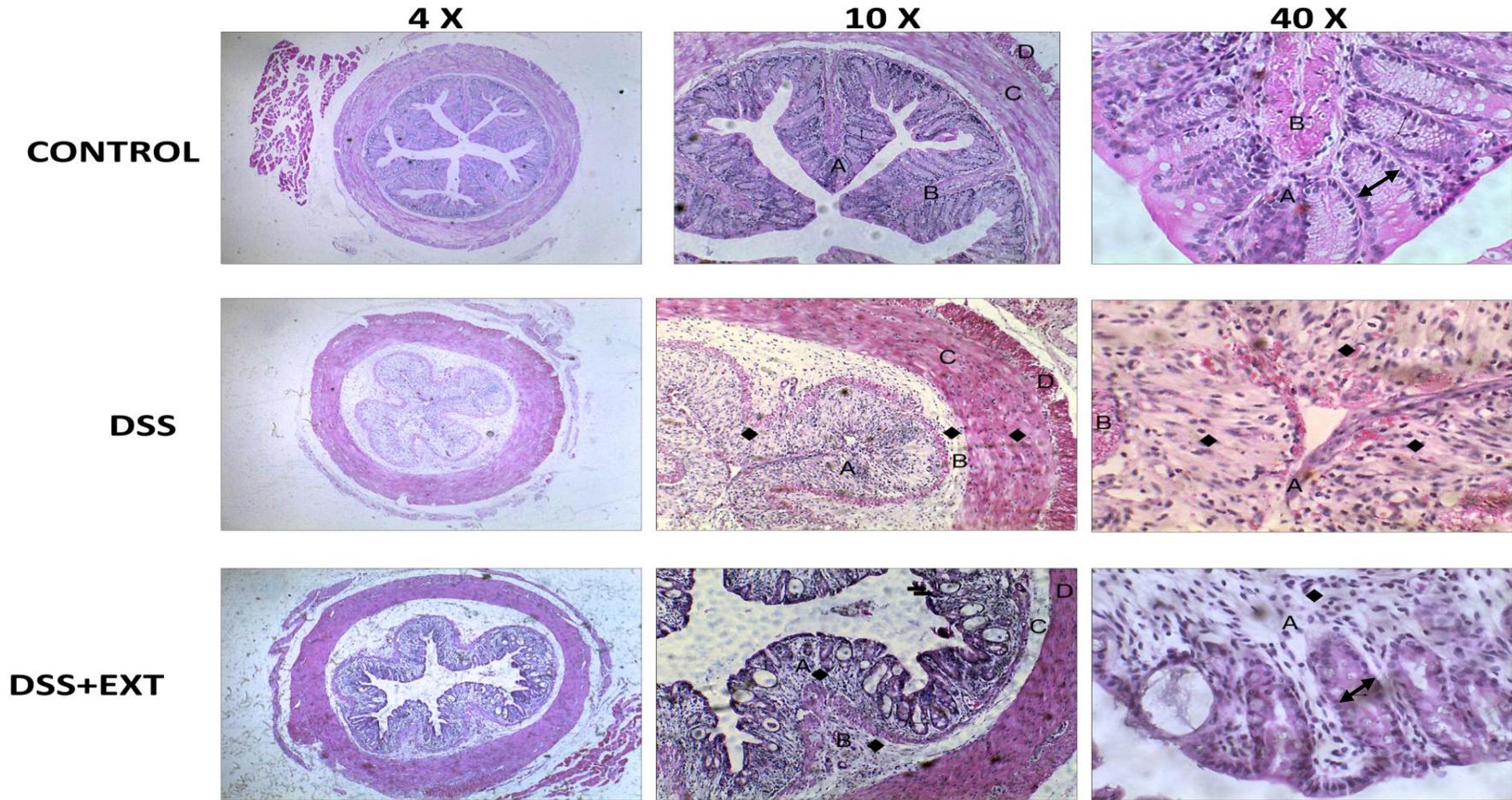


Figura 31.- Cortes histológicos de colon; se muestran las imágenes en 3 aumentos (4X, 10X y 40 X). Tinción H&E. Control: Se observa que la arquitectura de las crestas y criptas está intacta, es decir, están sanas; no hay presencia de infiltrado inflamatorio. DSS: Se ha perdido por completo la arquitectura de las crestas y criptas, además hay presencia de infiltrado inflamatorio en la mucosa, submucosa, y capa muscular. DSS+Ext.: Se observa que se ha perdido parcialmente la arquitectura de las crestas y criptas, erosión del epitelio de la capa mucosa, además de presentar infiltrado inflamatorio en las capas mucosa, submucosa y capa muscular. **A:** mucosa. **B:** submucosa. **C:** músculo. **D:** serosa. \updownarrow : cripta. \uparrow : erosión del epitelio. \blacklozenge : presencia de infiltrado infamatorio.

DISCUSIÓN

El uso de los escarabajos es una práctica que se lleva a cabo en un gran porcentaje de la población. A pesar de esto, las evidencias científicas que se tienen acerca de las propiedades que se le atribuyen a *U. dermestoides* dentro de la coleoterapia son escasas. Debido a esto, en este trabajo se decidió evaluar las propiedades antiinflamatorias y por primera vez la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *U. dermestoides*.

Se decidió demostrar si el extracto etanólico de *U. dermestoides* tenía capacidad antibacteriana ya que en los últimos años se ha observado que ha habido un incremento de enfermedades producidas por bacterias y éstas a su vez se han vuelto resistentes a los medicamentos convencionales que son utilizados para combatirlos, por ello, se han hecho investigaciones acerca de productos de origen natural que tengan efectos antibacterianos.

El extracto etanólico de *U. dermestoides* demostró tener actividad antibacteriana de forma cualitativa en algunas de las cepas Gram positivas como *S. epidermidis* caso clínico, *E. faecalis* CDBB-B-1533, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. epidermidis* ATCC 122228, *S. mutans* CDBB-B-1455 y *S. aureus* ATCC 12398. De igual forma en cepas Gram negativas como *P. agglomerans* CBB-B-959, *E. cloacae*, *V. cholerae* (caso clínico), *V. cholerae* CDBB-1159, *E. coli* (caso clínico 2), *E. aerogenes* CDBB-B-958, *S. typhimurum*; todas éstas cepas son de importancia médica ya que son agentes causales de diversas enfermedades. Debido a estos resultados, es importante seguir la investigación acerca de la actividad antibacteriana.

S. aureus es una bacteria que puede producir una amplia gama de enfermedades, que van desde infecciones cutáneas y de las mucosas relativamente benignas, tales como foliculitis, forunculosis o conjuntivitis, hasta enfermedades de riesgo vital, como celulitis, abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsis,

endocarditis o neumonía. Además, también puede afectar al aparato gastrointestinal, ya sea por presencia física de *S. aureus* o por la ingesta de la enterotoxina estafilocócica secretada por la bacteria ⁽⁶⁰⁾.

V. cholerae, una bacteria Gram negativa que ha presentado resistencia a antibióticos durante los últimos años y es causante de la enfermedad del cólera que provoca diarreas acuosas, vómito, acidosis metabólica, agotamiento de Potasio y en conjunto con todos éstos síntomas puede llegar a provocar la muerte ⁽⁶¹⁾.

Se ha demostrado que los insectos o productos que derivan de ellos como las sustancias de defensa que secretan, poseen actividad antibacteriana, por ejemplo, Fratini ⁽⁶²⁾, reportó actividad antibacteriana de los venenos de algunos insectos del orden Hymenoptera como son las avispas, abejas y hormigas; de dos arácnidos como las arañas y escorpiones, así como de ciempiés (*Scolopendra*). El veneno de abeja, tuvo actividad antibacteriana en las cepas de *S. aureus*, *S. aureus* MRSA y *S. epidermidis* con una CMI de 0.78 a 30 µL/mL, 1.56 a 3.12 µg/mL y 0.78 a 40 µg/ml respectivamente.

En esta investigación, el extracto etanólico de *U. dermestoides* fue probado sobre una curvas de crecimiento de las cepa de *S. aureus* ATCC12398 con una CMI de 0.125 mg/ mL y una CBM de 4 mg/ mL, y en *V.cholerae* con una CMI de 2 mg/mL y una CBM de 4 mg/mL. El comportamiento del extracto frente a las bacterias mencionadas, durante las 24 h presentó un comportamiento bacteriostático y no bactericida, ya que un medicamento o extracto es considerado como bacteriostático cuando únicamente inhibe la multiplicación bacteriana, la cual se reanuda una vez que se suspende el tratamiento, mientras que es considerado como bactericida cuando el medicamento o el extracto posee la capacidad de destruir la bacteria, es decir, que su acción es terapéutica e irreversible. Esto resulta ser de importancia, ya que cuando un tratamiento es de acción bacteriostática, al disminuir únicamente el número de organismos, da pie a que el sistema inmune se encargue de eliminar por sí sólo los patógenos en cuestión y en parte evitar una resistencia bacteriana ⁽⁶³⁾.

De igual forma, se han realizado estudios con coleóperos de otras especies para demostrar su actividad antibacteriana, como Nenadié ⁽⁶⁴⁾, realizó pruebas antibacterianas de las secreciones de las glándulas del pigidio de tres especies *Carabus ullrichii*, *C. corlaceus*, *Abax parallelepipedus*. *C. ullrichii* tuvo efecto en todas las bacterias probadas pero mayor efecto contra *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *S. typhimurium* con una CMI de 51.986 mg/mL y una CBM de 103.975 mg/mL, mientras que *C. corlaceus* y *A. parallelepipedus* únicamente mostraron efecto contra *P. aeruginosa* con una CMI de 25.5 mg/mL y una CBM de 50.1 mg/mL.

Cabe mencionar que es la primera vez que se prueba el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *U. dermestoides*.

La inflamación es un proceso natural del sistema inmune ya que es una respuesta de defensa a algún daño histórico o contra patógenos y cuando llega a ser exacerbada provoca daños al organismo como en el caso de la CU ⁽⁶⁵⁾.

En el modelo inflamatorio de edema plantar, el extracto etanólico de *U. dermestoides* tuvo efecto antiinflamatorio en la concentración de 750 mg/ Kg, sin embargo, estadísticamente no se muestra una diferencia significativa con respecto al control positivo. A comparación con Santos *et al.*⁽³⁸⁾, que probó el efecto antiinflamatorio induciendo pleuresía con carragenina en ratas y administró un extracto acuoso de *U. dermestoides* a una concentración de 8mg/ Kg y 16 mg/ Kg siendo ésta última la concentración más efectiva ⁽³⁸⁾.

En el modelo de colitis por DSS se observó que los animales experimentales tratados con el extracto etanólico de *U. dermestoides* alargaron su sobrevivencia en comparación del grupo tratado únicamente con DSS, ya que al día 21 había el 66% de sobrevivencia. Aunque no se tiene claro el mecanismo de acción que pudo tener el extracto, al tener éste

En la medición del DAI, el peso se mantuvo relativamente constante en los animales tratados con DSS y el extracto etanólico de *U. dermestoides*, aunque en éste grupo la aparición de los síntomas se comenzaron a presentar a partir del segundo día hubo una disminución significativa de éstos con respecto al grupo de DSS. Esto es de gran importancia, ya que la pérdida de peso, junto con la diarrea y el sangrado, son los síntomas más comunes que presentan los

pacientes con colitis, los cuales incrementan dependiendo de la severidad de la enfermedad. Es por esto que la administración del extracto etanólico de *U. dermestoides*, puede estar implicada en una disminución en la severidad de la enfermedad.

En cuanto a la medida de la longitud de los intestinos se observó que el extracto etanólico de *U. dermestoides* no previene el acortamiento del colon en comparación con los del control positivo (sanos). Esta medición es de suma importancia ya que el acortamiento del colon ha sido descrito como un indicador de la severidad de la enfermedad en los modelos experimentales.

En la histología no se observa que la administración del extracto etanólico de *U. dermestoides* tenga un efecto protector sobre la arquitectura de las crestas y criptas de la parte distal del intestino que se reporta como sano ⁽⁶⁶⁾.

Los resultados obtenidos del modelo de colitis experimental inducida por DSS parecieran ser contradictorios. Una posible explicación a esto es que la colitis es una enfermedad multifactorial, de la cual se desconoce su etiología. Sin embargo, se ha descrito que la inflamación, el estrés oxidativo y, aunque en menor medida y aún en controversia, la ruptura a la tolerancia de la microbiota intestinal, juegan un papel muy importante en el establecimiento de la enfermedad ⁽⁶⁷⁾.

Tomando en cuenta que tanto a nivel macroscópico como microscópico el extracto etanólico de *U. dermestoides* no parece tener un efecto protector para prevenir el desarrollo de la colitis, es posible que éstas pequeñas diferencias estén más relacionada con la actividad antibacteriana del extracto sobre bacterias Gram negativas, ya que se ha reportado que la invasión de éstas al tejido, dan curso desencadenante de la enfermedad. ⁽⁶⁸⁾.

Cuando la microbiota intestinal pasa a través de la capa mucosa del intestino y llega a otras capas, como la submucosa, muscular y serosa, son reconocidas por células del sistema inmune como patógenos, con lo cual se comienza una respuesta inflamatoria y al ya haber inflamación producida por la colitis, ésta se exagera y daña en demasía los tejidos ^(67, 69).

Para describir y explicar de mejor manera los efectos del extracto etanólico de *U. dermestoides*, sería necesario evaluar algunos otros aspectos de la respuesta

inflamatoria en el modelo de colitis inducida por DSS, pues se ha reportado que algunas citocinas proinflamatorias como TNF α e IL-6, están involucradas con la producción de especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno⁽⁷⁰⁾. Sin embargo para corroborar esto es necesario realizar más análisis, como la medición de citocinas proinflamatorias en el tejido del colon, medición de marcadores del estrés oxidativo y evaluar el efecto del extracto sobre bacterias que sean propias de la microbiota.

Es importante mencionar que es la primera vez que se prueba el efecto antiinflamatorio del extracto de *U. dermestoides* en un modelo *in vivo* de una enfermedad inflamatoria intestinal como la colitis ulcerosa, además que en éste experimento hubo que hacer arreglos referentes a la dosis que se aplicó, ya que la forma de administración de los gorgojos es diferente a la manera y la cantidad que toman las personas (incremento y disminución del número de coleópteros ingeridos).

Los beneficios empíricos que se le atribuyen a *U. dermestoides* pueden ser debido a la presencia de diversos compuestos como limoneno, ácido palmítico, ácido linoléico, catecol y pinocembrina, por lo cual, en esta investigación se realizó una caracterización química del extracto para identificar los compuestos presentes en el mismo.

Uno de los compuestos identificados en el GC-MS fue el limoneno, el cual es un monoterpeno que presenta diversas actividades biológicas, entre ellas capacidad antioxidante, actividad anticancerígena y se ha demostrado que posee actividad antiinflamatoria. Esta actividad antiinflamatoria se le ha relacionado con efectos antiasmáticos y puede ser que la actividad antiinflamatoria de éste compuesto la responsable de la actividad parcial del extracto etanólico de *U. dermestoides* en los modelos de inflamación. Se han realizado estudios que demuestran que la inhalación de vapores de limoneno puede calmar las reacciones alérgicas en el caso del asma⁽⁵⁴⁾. De igual forma se ha demostrado, que el limoneno, posee la capacidad de prevenir tumores de mama y reducir su tamaño en caso de que

haya presencia de éstos, lo cual puede estar relacionado con otras actividades que se le han reportado de manera empírica a *U. dermestoides* ⁽⁵⁵⁾.

Otro compuesto que de igual manera es relevante es el ácido linoléico, que pertenece al grupo de los ácidos grasos Omega 6, el cual es muy importante en la dieta humana y se le atribuyen efectos significativos sobre el sistema inmune⁽⁵³⁾. Este compuesto puede estar relacionado en la regulación de la respuesta inflamatoria del modelo de CU.

Otro mecanismo por el cual se pudo haber disminuido la severidad de la enfermedad, podría ser por los efectos antibacterianos, específicamente de compuestos presentes en el extracto etanólico de *U. dermestoides* como lo son los derivados de los catecoles, ya que éstos funcionan como agentes biológicos quelantes en bacterias y estos a su vez conjugados con antibióticos, mejoran la penetración en células bacterianas, aumentando así la eficacia antibacteriana en las células ⁽⁷¹⁾.

Los catecoles poseen diversas actividades como la antimicrobiana por tanto es posible que debido a la presencia de estos compuestos, el extracto haya presentado actividad antibacteriana ⁽⁵⁷⁾.

Las benzoquinonas son compuestos derivados de los catecoles, y éstas se encuentran en algunos insectos ya que son utilizadas como sustancias de defensa no únicamente contra depredadores, sino, contra patógenos. Es por esto, que dichos compuestos puedan ser los responsables de la actividad antibacteriana que presentó el extracto etanólico de *U. dermestoides*, y a su vez como ya se mencionó anteriormente, tener alguna relación con respecto a los resultados obtenidos en el modelo de colitis experimental, ya que pudo controlar la microbiota intestinal y así evitar una mayor inflamación.

Se tiene registro de que los compuestos fenólicos son captadores de radicales libres y por tanto están relacionados con la capacidad antioxidante que pueda tener un extracto ^(72, 73). En trabajos previos, se ha demostrado que el extracto de *U. dermestoides* posee una gran capacidad antioxidante, teniendo una CA₅₀ de

23 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^(29, 72); estos resultados no concuerdan con los obtenidos en nuestra investigación, ya que principalmente el extracto utilizado reportó una baja cantidad de fenoles, con un valor de 70mg eAG/g y se obtuvo una CA_{50} de 650 ppm ($\mu\text{g}/\text{mL}$). Estas diferencias pueden ser debido a que el extracto se obtuvo con un solvente diferente lo que puede estar interviniendo en la disponibilidad de algunos compuestos de polaridad media o baja, los cuales posiblemente sean los responsables de la capacidad antioxidante presente en los diferentes extractos estudiados por otros autores.

CONCLUSIONES

El extracto etanólico de *U. dermestoides*:

- A. Tuvo actividad antibacteriana en cepas Gram positivas y en cepas Gram negativas.
- B. Tuvo efecto bacteriostático en las curvas de crecimiento de *S. aureus* y *V. cholerae*.
- C. En el modelo de edema plantar, no tuvo una buena actividad antiinflamatoria, aunque se observa una tendencia a desinflamar con la concentración de 750 mg/kg.
- D. El modelo de colitis ulcerosa no resultó ser un buen modelo para probar las propiedades que se le atribuyen a *U. dermestoides*, ya que el modo de suministrar el tratamiento a comparación de como comúnmente la gente lo toma fue muy diferente.

APÉNDICES

APÉNDICE I

Ubicación e historia de *U. dermestoides* ⁽⁷⁴⁾

Tenebrionidos es la sexta familia más grande de los coleópteros con un aproximado de 20,000 especies descritas y se encuentran distribuidas en zonas tropicales y subtropicales del planeta.

A pesar de la heterogeneidad morfológica que se da en esta familia, se conocen las siguientes características más comunes: talla desde 1 mm hasta un poco más de 80 mm, alados o ápteros, ojos frecuentemente separados en dos porciones por un canto epistomal. Antenas insertadas bajo expansiones laterales de la frente generalmente con 11 segmentos, rara vez con 9 o 10 antenómeros, éstos normalmente con

U. dermestoides fue introducido al continente Americano por medio de embarcaciones Japonesas que traían consigo cargamentos de granos y semillas.

APÉNDICE II

Método de difusión en agar Kirby-Baüer ⁽⁴¹⁾.

Bacterias (Gram+/Gram-)

Medio: se utilizó como medio el agar Müller-Hinton (Bioxon 110-1), este promueve el crecimiento de la mayoría de los aislamientos bacterianos clínicamente importantes. El agar debe tener un espesor aproximado de unos 4 mm, ya que de lo contrario el antibiótico tiende a difundir más en dirección lateral y aumenta el tamaño de las zonas de inhibición; en caso contrario, se promueve una mayor difusión del antibiótico hacia abajo y ahora se tiende a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

Inóculo: Con un asa de siembra estéril se recogieron algunas colonias de los microorganismos a utilizar. Se sumergió el asa en 10 mL de caldo Müller- Hinton (Bixon 260), se agitó suavemente para descargar lo tomado anteriormente y se retiró. Se mantuvo en cultivo a 37 °C durante 24 horas hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar N° 0.5 de McFarland, equivalente al estándar 1.5×10^8 bacterias/mL.

Posteriormente se sumergió un hisopo estéril en el caldo, se retiró el exceso de éste rotándolo contra la pared interna del tubo. Una vez humedecido el hisopo se procedió a inocular una placa con agar Müller-Hinton (anteriormente esterilizada y templada). La siembra en la placa se llevó a cabo por estría cerrada en tres direcciones girándola en ángulos de 60°.

*El estándar de McFarland se preparó añadiendo 0.5 mL de cloruro de Bario a 99.5 mL de H₂SO₄ 0.36N. Al comparar la turbidez entre el estándar y el caldo con los organismos de estudio contra una cartulina blanca o con un espectrofotómetro a 600 nm, si la suspensión de los organismos llega a verse más turbia que el estándar se agrega solución salina al 0.9% hasta igualarlas.

Realizados los pasos anteriores se procedió a aplicar los discos impregnados con los controles (positivo y negativo) y con el extracto a probar.

Extracto: Se utilizaron sensidiscos de 5 mm de diámetro de papel Whatman No. 5, se esterilizaron e impregnaron con 10 µL del extracto diluido en etanol a una concentración de 2 mg por sensidisco; una vez preparados se colocaron en las placas de agar (5 sensidiscos por placa) con ayuda de unas pinzas estériles.

Control positivo: se evaluó la susceptibilidad de las cepas con sensidiscos impregnados con el antibiótico sintético cloranfenicol 25 µg/disco.

Control negativo: Se utilizaron sensidiscos con 10 μ L de EtOH 50% (solvente con el que fue obtenido el extracto).

Incubación para prueba de susceptibilidad: Una vez que las cajas fueron impregnadas con el inóculo y colocados los sensidiscos, se pusieron en una incubadora a 35°C durante 24 horas, sin mayor tensión de CO₂. Es importante evitar la presión de CO₂ ya que de no ser así, puede formarse ácido carbónico en la superficie humedecida del agar provocando un descenso de pH. El control de pH es importante debido a que el desarrollo de algunos microorganismos puede inhibirse con un pH ácido, lo cual tiende a estrechar falsamente la zona de inhibición. De igual forma, la actividad de diversos antibióticos puede aumentar o disminuir con la caída del pH produciendo una diferencia en las velocidades de difusión y alteraciones de las zonas de inhibición.

APÉNDICE III

Método de dilución en caldo ⁽⁴¹⁾.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración bactericida mínima (CBM).

Stock: Se obtuvo el extracto en fresco, se evaporó el etanol con el que se obtuvo, se pesaron 100 μ L para determinar su densidad y saber cuántos solutos del extracto iban disueltos.

A diferencia del método de microdilución en agar, para la determinación de la CMI y la CBM se realizó en fase líquida en una serie de microtúbulos moldeados en una placa de cultivo de noventa y seis pozos.

En la caja de cultivo se colocarán 50 μ L de caldo Müller-Hinton más 50 μ L del stock del extracto (12, 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 mg), el testigo (bacteria en caldo) y control negativo (EtOH 50%).

Se separó la suspensión bacteriana de acuerdo al método descrito en el apéndice IX hasta alcanzar el estándar No. 0.5 de McFarland. De esta suspensión se tomaron 10 μL y se colocaron en 9.9 mL de caldo Müller-Hinton, obteniendo una concentración de 1×10^5 bacterias/mL. De esta concentración bacteriana se colocaron 50 μL en cada pozo. Una vez lista la placa se tapó e incubó a 37°C por 24 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación se añadió a cada pozo 50 μL de cloruro de tetrazolio (TTC) al 0.08% y se incubó durante 30 minutos a 37°C . En los pozos donde se desarrollan los microorganismos éste compuesto se reduce a formazán, produciendo una coloración rojiza-violácea, en los pozos donde no se presente la coloración será porque no hay crecimiento bacteriano y por lo tanto la solución permanece en color claro.

Una CMI es representada cuando hay una disminución drástica del crecimiento de los microorganismos mientras que una CBM se presenta cuando hay una inhibición completa del desarrollo de microorganismos.

APÉNDICE IV

Curva de crecimiento bacteriano⁽⁴¹⁾.

Stock: Se tomaron en cuenta los resultados del apéndice anterior para la determinación de las concentraciones a utilizar (CMI, $\frac{1}{2}$ CMI y CBM).

Se prepararon placas septadas con agar Müller-Hinton. En un tubo con 10 mL de caldo Müller-Hinton se preparó un inóculo de 1×10^8 bacterias/mL. De éste inóculo se tomaron 10 μL y se pasaron a los tubos respectivos de CMI, $\frac{1}{2}$ CMI, CBM y testigo (sólo inóculo de bacteria), quedando una concentración de 1×10^5 bacterias/mL en cada tubo. Se incubaron a 37°C .

Se tomó una muestra de cada tubo en las primeras 4 horas, después cada 2 horas hasta las 12 horas y finalmente a las 24 horas y se inocularon en

las cajas septadas; en el primer septo se colocaron 50 μ L de alguno de los tubos y se esparcieron con un asa de vidrio estéril, se tomaron nuevamente 50 μ L del tubo elegido y se colocaron en 5 mL de solución salina de la cual se tomaron 50 μ L que se colocaron en el segundo septo de la caja y de igual forma fueron esparcidos, se repitió el segundo paso para el tercer septo.

APÉNDICE V

Determinación de la concentración de fenoles totales (CFT). Método modificado de Singleton ⁽⁴²⁾.

La concentración de fenoles totales se determinó por espectrofotometría con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción. Este método se basa principalmente en la reacción de los fenoles presentes en la solución problema con agentes oxidantes.

El agente oxidante que se utilizó fue el reactivo Folin- Ciocalteu; se trata de una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato, en la cual el molibdeno y el tungsteno se encuentran en estado de oxidación 6^+ y reaccionan con cualquier tipo de fenol formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico y son reducidos a óxidos por la transferencia de electrones a un pH básico. Cuando son reducidos, toman una coloración azul intensa, siendo este color el resultado proporcional al número de grupos hidroxilo de la molécula.

Se preparó una curva de calibración con ácido gálico ya que ésta molécula presenta una estructura fenólica, es decir, presenta un grupo benceno unido a un grupo OH. El ácido gálico se utilizó como solución estándar a 0.2 mg/mL.

Tabla 12.- Curva patrón para la determinación de fenoles totales.

Tubo (blanco)	[Ácido gálico] mg/mL	μL patrón	μL agua destilada	mL agua destilada
1	0.00625	31	968.5	7
2	0.0125	62.5	937.5	7
3	0.025	125	875	7
4	0.05	250	750	7
5	0.1	500	500	7
6	0.2	1000	0	7
problema	-	250	750	7

Finalmente se graficó la concentración contra la absorbancia, se analizó por medio de una regresión lineal y se interpoló la absorbancia de la muestra a evaluar. Los resultados fueron expresados como equivalentes de ácido gálico (eAG).

APÉNDICE VI

Método de reducción del radical 2-2Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH) ⁽⁴³⁾.

La actividad antioxidante del extracto se evaluó mediante la decoloración de una solución metanólica de 2-2Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH) por la adición del compuesto activo a diferentes concentraciones (2-100 ppm), por medio de espectrofotometría visible (VIS). El DPPH es un radical libre, con un electrón desapareado que le da una coloración violácea. Cuando el DPPH llega a estar en contacto con un compuesto o sustancia que pueda donarle un átomo de hidrógeno, éste se reduce produciendo un cambio de color de violeta a amarillo y esto se da gracias al grupo picril.

En la placa de ELISA se adicionaron 50 μL de la solución problema (extracto) a diferentes concentraciones de 2 a 1000 ppm (por triplicado); es decir, se pesaron 3mg del extracto y se disolvieron en 3 mL de MetOH grado HPLC. Una vez colocadas las concentraciones se colocaron 100 μL

de DPPH en cada pozo. Se cubrió la placa de la luz y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se determinó la absorbancia a 517 nm en un lector de ELISA.

Blanco: pozos con 200 µL de MetOH grado HPLC.

Control positivo: catequina a la concentración de 2 a 100 ppm.

Resultados: Se reportaron obteniendo el porcentaje de reducción, el cual se calculará con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reducción} = (C-E/C) * 100$$

Donde: C= Abs. Del DPPH+ MetOH.

E= Abs. Del experimental (DPPH + muestra problema)

APÉNDICE VII

Cuantificación de Carbohidratos Reductores por el método de Nelson-Somogyi ⁽⁴⁴⁾.

Al hacer reaccionar un azúcar reductor (como glucosa), se forma óxido cuproso de color rojo. La base es la donación de electrones del reductante al oxidante; ion Cu^{++} que se transforma en ion Cu^{+} .

En este método, el factor limitante es el agente reductor (glucosa) estando los reactivos en exceso, por lo que puede usarse para medir la cantidad de Cu_2O que es proporcional a la cantidad de glucosa originalmente presente.

Se dispuso una serie de tubos, de la manera siguiente (Tabla 5):

Tabla 13.- Curva patrón para cuantificación de carbohidratos.

	1	2	3	4	5	6
Patrón de glucosa	-	0.25	0.50	0.75	1	-
Problema (mL)	-	-	-	-	-	1
Agua destilada (mL)	1	0.75	0.50	0.25	-	-
Reactivo de cobre (mL)	1	1	1	1	1	1

Una vez preparados los tubos se taparon con una canica y se colocaron a baño María durante 20 min. Posteriormente se enfriaron con agua corriente, se agregó a cada tubo 1 mL de reactivo de Arsenomolibdato y 7.5 mL de agua destilada. Se mezcló por inmersión cada tubo y se leyó en el espectrofotómetro a 540 nm.

APÉNDICE VIII

Determinación de Proteínas por la Técnica de Bradford ⁽⁴⁵⁾.

Se pesó 0.01 mg de albúmina y aforar a 1 mL con agua bidestilada. De esta solución se tomó 100 µL y agregó 900 µL (solución patrón). Se hizo la curva patrón en una placa de ELISA de 96 pozos.

Tabla 14.- Tabla de concentración de los reactivos para realizar la técnica de Bradford.

Albúmina (µg)	Albúmina (µL)	Reactivo de Bradford	PBS 1X µL
10	100	40	60
8	80	40	80
6	60	40	100
4	40	40	120
2	20	40	140
1	10	40	150
0	0	40	160

Muestra problema: 10 µL+40 µL de Bradford+ 150 µL de PBS 1X. Volúmen de la muestra final fue de 200 µL. Leyó a 595 nm.

APÉNDICE IX

Técnica histológica descrita por Prophet ⁽⁴⁹⁾.

Obtención de la muestra de tejido. Colocar en formol al 4% durante 24 h.

A) Deshidratación

	Tiempo	
	Min.	Máx.
Sumergir en alcohol: Etílico 70%	2h	2-5 días
Etílico 80%	2h	2-3 días
Etílico 90%	2h	2-3 días
Etílico 100%	1h	2 horas

B) Impregnación en solvente (aclaración)

Sumergir en butanol 2h. *Quitar el exceso de butanol antes de pasar a la parafina.

C) Infiltración

Colocar las muestras en:

Parafina I (Impura) 24h

Parafina II (Pura) 24h

D) Formación de bloques de parafina

El molde se llena con parafina de inclusión, con una pinza se toma cuidadosamente el tejido y se introduce.

E) Microtomía

Se coloca el bloque en el congelador durante algún tiempo antes de ser cortado.

Una vez en el micrótopo se rebaja hasta alcanzar la zona del tejido a cortar. El grosor del corte debe ser de 5 μm .

APÉNDICE X

Tinción con Hematoxilina- Eosina⁽⁵⁰⁾.

Desparafinar las muestras en la estufa durante 3 h aproximadamente.

Se procede a hacer el tren de tinción:

Xilol I- 5 min

Xilol II-10 min

Alcohol 100%- 10 lavados

Alcohol 90%- 10 lavados

Alcohol 80%- 10 lavados

Alcohol 70%- 10 lavados

Agua corriente- 10 lavados

Propiedades Biológicas de *U. dermestoides*

Hematoxilina- 5 min

Agua corriente- 10 lavados

Alcohol ácido- 1 lavado

Agua corriente- 10 lavados

Carbonato de Litio- Sumergir los cortes hasta que viren

Agua corriente- 1 lavado

Alcohol 100%- 10 lavados

Eosina- 7 min

Alcohol 70%- 10 lavados

Alcohol 80%- 10 lavados

Alcohol 90%- 10 lavados

Alcohol 100%- 10 lavados

Xilol I- 10 lavados

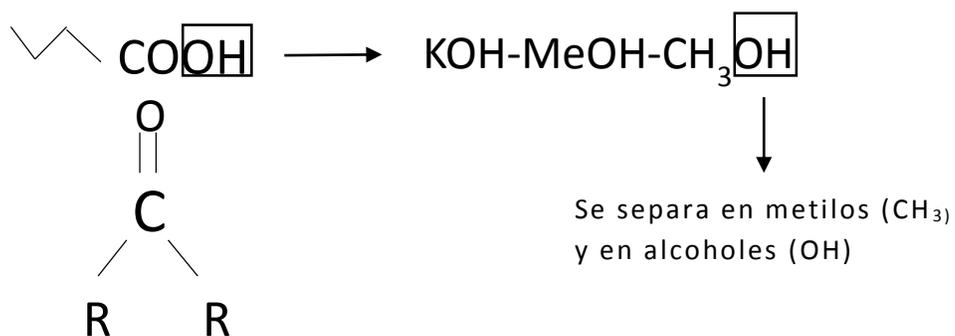
Xilol II- Dejar ahí la muestra hasta que sea montada.

APÉNDICE XI

Esterificación de Ácidos Grasos.

Para volatilizar un ácido Graso se requiere esterificarlo, es decir, añadirle un grupo éster. El éster se obtiene a partir del MetOH, y el catalizador será el hidróxido de potasio (KOH), el catalizador puede variar dependiendo del ácido graso que se quiera esterificar, en éste caso se utilizó el KOH para ácidos grasos de cadena larga.

Para llevar a cabo esto, se necesita un ácido carboxílico (COOH) y un grupo alcohol (OH). EL OH se va a obtener de la reacción que se lleve a cabo al agregar el KOH y el MetOH.



REFERENCIAS

1. Cahuich-Campos D, Granados FF. Entomoterapia: curaciones entre los antiguos pueblos mayas de la península de Yucatán, México ELOHI Peoples indigènes et environnement.2014;5-6:39-54.
2. Costa-Neto EM. Animal-based medicines: biological prospection and the sustainable use of zootherapeutic resources. Anais da Academia Brasileira de Ciências.2005;77:33-43.
3. Costa-Neto EM. La zooterapia popular en el Estado de Bahía: registro de nuevas especies animales utilizadas como recursos medicinales Ciencia y Salud Pública 2011;16:1639-1650.
4. Lokeshwari RK, Shantibala T. A review on the fascinating World of Insect resources: reason for thoughts. Psyche: A Journal of Entomology.2010.
5. Ramos-Elorduy J, Viejo-Montesino J. Los insectos como alimento humano: Breve ensayo sobre la entomofagia, con especial referencia a México. Boletín Real Sociedad Española de Historia Natural.2007:1-4.
6. Ramos-Elorduy J, J. M. Pino, E. E. Prado, M. A. Perez, L.Otero J, Guevara OL. Nutritional value of edible insects from the state of Oaxaca. Mexico Journal of Food Composition and Analysis.1997: 142-157.
7. DeFoliart GR. The human of insects as a food resource. A bibliographic progress.2004.
8. Ramos-Elorduy J. Consumption of insects as ecological food source. Sometido a Human Ecology.2005.
9. Costa-Neto EM. Manual of ethnoentomology. Sociedad Entomológica Aragonesa. 2002.
10. Maya EMA, Villamar AA. Colecciones Etnoentomológicas Comunitarias: Una Propuesta Conceptual y Metodológica. Etnobiología.2013;11: 1-15.
11. Yamakawa M. Insect antibacterial proteins: regulatory mechanisms of their synthesis and a possibility as new antibiotics. J Seric Sci Japan 1998:163–182.
12. Costa-Neto EM. The use of insects in folk medicine in the state of Bahia, northeastern Brazil, with notes on insects reported elsewhere in Brazilian folk medicine. Human Ecology.2002;30:245-263.
13. Costa-Neto EMC, Ramos-Elorduy J, Pino JM. Los insectos medicinales de Brasil: primeiros resultados. . Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa.2006;1:395-414
14. Natt BS, Champion JM, Knox KS. Acute eosinophilic pneumonia associated with ingestion of *Ulomoides dermestoides* larvae ("Chinese beetles"). Annals of the American Thoracic Society.2014;11:1667-1668.
15. Deloya-Brito GG, Deloya C. Sustancias producidas por el coleóptero *Ulomoides dermestoides* (Chevrolat, 1878)(Insecta: Coleoptera: Tenebrionidae): efecto anti-inflamatorio y citotóxico. Acta zoológica mexicana.2014;30:655-661.

16. Teixeira GJS, Corseuil E. Desenvolvimento de formas imaturas do besouro-do-amendoim sob três temperaturas In: VII Salão de Iniciação Científica PUCRS Porto Alegre (CD).2006.
17. Rodríguez-Palma E, Pérez-Torres, B. C., Aragón-García, A., Cuate-Mozo. CICLO DE VIDA DE *Ulomoides dermestoides* (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE) EN CONDICIONES CONTROLADAS DE TEMPERATURA Y HUMEDAD. *Entomología Mexicana*.2014;1:431-435.
18. Marinoni RC, Ribeiro-Costa CS. Influence of temperature and diet on the development of *Ulomoides dermestoides* (Fairmaire, 1893)(Coleoptera, Tenebrionidae, Diaperinae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*.2001;44:129-134.
19. Castro REC, Velásquez VV, González IM. Descripción anatómica de los órganos genitales y glándulas secretoras abdominales del escarabajo *Ulomoides dermestoides* (fairmare 1893)(Coleoptera Tenebrionidae). *Tecnología en Marcha*.2009;22:45-65.
20. Villaverde ML, Girotti JR, Mijailovsky SJ, Pedrini N, Juarez MP. Volatile secretions and epicuticular hydrocarbons of the beetle *Ulomoides dermestoides*. *Comparative biochemistry and physiology Part B, Biochemistry & molecular biology*.2009;154:381-386.
21. Magaña FGC. Sobre el uso de *Ulomoides dermestoides* (Chevrolat, 1878),(Coleoptera, Tenebrionidae, Diaperini) en la coleopteroterapia: informe de un caso en Ixtapa, Jalisco, México. *Boletín de la Asociación Española de Entomología*.2010;34:419-422.
22. Montero G. T, Hurtado de Mendoza A. J, Cabrera Rosell P. Daño múltiple de órganos: morfología de la respuesta inflamatoria sistémica. *Revista Cubana de Medicina Militar*.2010:77-88.
23. Sepúlveda SE, et al. Enfermedad inflamatoria intestinal: Una mirada inmunológica. *Rev Med Chile* 2008:367-375.
24. Gomollón F, García-López S, Sicilia B, Gisbert JP, Hinojosa J. The GETECCU clinical guideline for the treatment of ulcerative colitis: A guideline created using GRADE methodology. *Gastroenterología y hepatología*.2013;36:483-e481.
25. Bosques-Padilla FJ, Sandoval-Garcia ER, Martinez-Vázquez MA, Garza-González E, Maldonado-Garza HJ. Epidemiología y características clínicas de la colitis ulcerosa crónica idiopática en el noreste de México. *Rev Gastroenterol Mex*.2011:34-38.
26. Fakhoury M, Negruj R, Mooranian A, Al-Salami H. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and treatments. *Journal of inflammation research*.2014;7:113-120.
27. Rodriguez-Canales M, et al. Protective Effect of *Amphipterygium adstringens* Extract on Dextran Sulphate Sodium-Induced Ulcerative Colitis in Mice. *Mediators of inflammation*.2016;2016:8543561.
28. Ortigosa L. Concepto actual y aspectos clínicos de la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. *Colombia Médica*.(2005). ;36:16-24.
29. Mendoza Hernández JL, Lana Soto R, Díaz-Rubio M. Definiciones y manifestaciones clínicas generales. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*.2007;3:21-28.
30. van der Woude CJ, et al. The second European evidenced-based consensus on reproduction and pregnancy in inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's & colitis*.2015;9:107-124.
31. Annese V, et al. European Evidence-based Consensus: Inflammatory Bowel Disease and Malnancies. *Journal of Crohn's & colitis*.2015;9:945-965.

32. Rahier JF, et al. Second European evidence-based consensus on the prevention, diagnosis and management of opportunistic infections in inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's & colitis*.2014;8:443-468.
33. Annese V, et al. European evidence based consensus for endoscopy in inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's & colitis*.2013;7:982-1018.
34. Guarner F. El colon como órgano: hábitat de la flora bacteriana. *Nutrición Hospitalaria*.2002;17:7-10.
35. Randhawa PK, Singh K, Singh N, Jaggi AS. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*.2014;18:279-288.
36. Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, Vijay-Kumar M. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Current protocols in immunology*.2014;104:Unit 15 25.
37. Crespo R, Villaverde ML, Girotti JR, Guerci A, Juarez MP, de Bravo MG. Cytotoxic and genotoxic effects of defence secretion of *Ulomoides dermestoides* on A549 cells. *Journal of ethnopharmacology*.2011;136:204-209.
38. Santos RC, et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Ulomoides dermestoides* on induced pleurisy in rats and lymphoproliferation in vitro. *Inflammation*.2010;33:173-179.
39. Tamayo C. PLO7 Fitoterapia basada en la evidencia. *Revista de fitoterapia*.2006;6:55-60.
40. Domínguez A. Métodos de la Investigación Fitoquímica Ed Limusa, México.1979:45-47.
41. Cos P, Vlietinck AJ, Vanden Berghe D, Maes L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of ethnopharmacology*.2006;106:290-302.
42. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*.1999;299:152-178.
43. Franco EM. Actividad antioxidante in vitro de las bebidas de frutas. *Bebidas-Alfa Editores Técnicos, Junio/Julio*.2006:20-27.
44. Blair GHG, Domínguez ÓFC. Alternatives for modifying the Somogyi-Nelson method for determining reducing sugars by using their thermal possibilities. *Ingeniería e Investigación*.2003;23:5-17.
45. Bradford M. Método rápido y sensible para la cuantificación de cantidades de microgramos de proteína utilizando el principio de la proteína de unión a colorante.1976.
46. De Aluja AS. Animales de laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). *Gac Med Mex*.2002;138:295-298.
47. Majid M, et al. Studies on phytochemical, antioxidant, anti-inflammatory and analgesic activities of *Euphorbia dracunculoides*. *BMC complementary and alternative medicine*.2015;15:349.
48. Azuma Y-T, et al. PPAR α contributes to colonic protection in mice with DSS-induced colitis. *International immunopharmacology*.2010;10:1261-1267.

49. Prophet E, Mills B, Arrington J, Sobin L. Laboratory Methods in Histotechnology. Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology. Laboratory Methods in Histotechnology Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology.1992.
50. Montuenga L, Esteban F, Calvo A. Técnicas en histología y biología celular. Elsevier Masson, Barcelona.2009.
51. Al-Fatimi M, Wurster M, Schröder G, Lindequist U. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. Journal of ethnopharmacology.2007;111:657-666.
52. Simpson EL, Berry TM, Brown PA, Hanifin JM. A pilot study of emollient therapy for the primary prevention of atopic dermatitis. Journal of the American Academy of Dermatology.2010;63:587-593.
53. RONDÓN RA, Usubillaga A, MEDINA YAL. Estudio preliminar de los niveles de ácidos grasos de la harina de lombriz (*Eisenia foetida*) mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Revista de la Facultad de Farmacia.2003;45:2.
54. Hirota R, et al. Limonene inhalation reduces allergic airway inflammation in *Dermatophagoides farinae*-treated mice. Inhalation toxicology.2012;24:373-381.
55. Elegbede J, Elson C, Qureshi A, Tanner M, Gould M. Inhibition of DMBA-induced mammary cancer by the monoterpene d-limonene. Carcinogenesis.1984;5:661-664.
56. Chacon Castro RE, Villalba Velasquez V, Moreira Gonzalez I. Anatomical description of genital organs and abdominal secreting glands of the beetle *Ulomoides dermestoides* (Fairmare 1893)(Coleoptera: Tenebrionidae). Tecnologia en Marcha.2009;22:45-65.
57. Pawar R, Das T, Mishra S, Pancholi B, Gupta SK, Bhat SV. Synthesis, anti-HIV activity, integrase enzyme inhibition and molecular modeling of catechol, hydroquinone and quinol labdane analogs. Bioorganic & medicinal chemistry letters.2014;24:302-307.
58. Teixeira EW, Negri G, Salatino A, Stringheta PC. Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian propolis samples. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.2010;7:307-315.
59. Promsan S, et al. Pinocembrin attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. Canadian journal of physiology and pharmacology.2016;94:808-818.
60. Cervantes-García E, García-González R, Salazar-Schettino PM. Características generales del *Staphylococcus aureus*. Revista latinoamericana de patología clínica y medicina de laboratorio.2014;61:28-40.
61. Ayala JC, Silva AJ, Benitez JA. H-NS: an overarching regulator of the *Vibrio cholerae* life cycle. Research in Microbiology.2016.
62. Fratini F, Cilia G, Turchi B, Felicioli A. Insects, arachnids and centipedes venom: a powerful weapon against bacteria. A literature review. Toxicon.2017.
63. Fernández Riverón F, López Hernández J, Ponce Martínez LM, Machado Betarte C. Resistencia bacteriana. Revista Cubana de Medicina Militar.2003;32:0-0.
64. Nenadić M, et al. Antimicrobial activity of the pygidial gland secretion of three ground beetle species (Insecta: Coleoptera: Carabidae). The Science of Nature.2016;103:1-9.

65. Montero González T, Hurtado de Mendoza Amat J, Cabrera Rosell P. Daño múltiple de órganos: morfología de la respuesta inflamatoria sistémica. *Revista Cubana de Medicina Militar*.2001;30:77-88.
66. Bauer C, et al. Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. *Gut*.2010;59:1192-1199.
67. Nagao-Kitamoto H, Kitamoto S, Kuffa P, Kamada N. Pathogenic role of the gut microbiota in gastrointestinal diseases. *Intestinal research*.2016;14:127-138.
68. Singh V, et al. Microbiota-inducible Innate Immune, Siderophore Binding Protein Lipocalin 2 is Critical for Intestinal Homeostasis. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*.2016;2:482-498 e486.
69. Tomasello G, et al. Nutrition, oxidative stress and intestinal dysbiosis: Influence of diet on gut microbiota in inflammatory bowel diseases. *Biomedical Papers*.2016;160:461-466.
70. Jung BC, Lee MH, Sethupathi P, Lee IS, Lee D, Rhee KJ. Omentum Cells Promote Healing of Colonic Tissues in Dextran Sulfate Sodium (DSS) Induced Model of Colitis in Mice. *Journal of lifestyle medicine*.2013;3:48-53.
71. Coelho D, Sampaio A, Silva CJ, Felgueiras HP, Amorim MTP, Zille A. Antibacterial Electrospun PVA/Enzymatic Synthesized Poly (catechol) Nanofibrous Mid-Layer Membrane for Ultrafiltration. *ACS Applied Materials & Interfaces*.2017.
72. Meza DLM. Evaluación del contenido de fenoles totales y actividad captadora de radicales libres de extractos hidrometanólicos del escarabajo *Ulomoides dermestoides* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*.2015;1.
73. Ramamoorthy PK, Bono A. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. *Journal of Engineering Science and Technology*.2007;2:70-80.
74. Villegas-Fudino D, Tantaleán-Vidaurre M. Experimental evaluation of *Ulomoides dermestoides* (tenebrionidae) as an intermediate host of *Hymenolepis diminuta*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*.2015;32:515-518.