

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO



**INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
MAESTRÍA EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS**

Evaluación de un alimento funcional a base de extracto proteico de pupa de *Tenebrio molitor*, sobre la hepatocarcinogénesis experimental en el ratón.

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS**

PRESENTA:

M.V.Z. Iliana Alelí Herrera Soto

Director de Tesis:

Dr. Sergio Soto Simental

Co-director:

Dr. Armando Zepeda Bastida

Asesores:

Dr. Juan Ocampo López

Dra. Maricela Ayala Martínez



Tulancingo de Bravo, Hidalgo, Agosto 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias Agropecuarias
School of Forestry and Environmental Studies

COORDINACION DE INVESTIGACION Y POSGRADO DEL ICAp

Actas de la reunión del Comité de Tesis de Maestría en Ciencia de los Alimentos
Apertura:

La reunión ordinaria para evaluar los avances de la tesis intitulada: "Evaluación de un alimento funcional a base de extracto proteico de pupa de *Tenebrio molitor*, sobre la hepatocarcinogenesis experimental en el ratón", que desarrolla la estudiante Iliana Aleli Herrera Soto.

Asistentes:

Dra. Maricela Ayala Martínez
Dr. Armando Zepeda Bastida
Dr. Sergio Soto Simental
Dr. Juan Ocampo López

A. Revisión de Trabajo de Tesis

Observaciones:

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por el estudiante, comunicando a el estudiante, Herrera Soto Iliana Aleli, oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo y poder continuar con el proceso de obtención de grado. El estudiante atendió de forma conveniente las sugerencias del comité.

B. Acuerdos

En esta fecha, se comunica atentamente que el comité conformado por los profesores firmantes, otorgamos nuestra autorización para que la estudiante imprima su trabajo final de tesis, y continúe con los trámites necesarios para la obtención del grado de maestría respectivo.

ATENTAMENTE

"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

Tulancingo de Bravo, Hidalgo a 14 de septiembre de 2020

Dr. Sergio Soto Simental

Dr. Armando Zepeda Bastida

Dra. Maricela Ayala Martínez

Dr. Juan Ocampo López



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Instituto de Fisiología Celular perteneciente a la UNAM, por abrirme sus puertas y ayudar a ampliar mi conocimiento, lugar donde se realizó gran parte del trabajo para esta tesis.

Al bioterio de la UAEH, por brindarme el lugar para llevar a cabo mi trabajo experimental.

Al Cuerpo Académico de Biotecnología Veterinaria por brindarme las herramientas para poder realizar este trabajo.

Al CONACyT por la beca otorgada durante este periodo.

AGRADECIMIENTOS INDIVIDUALES

A la Dra. Natalia Chiquete Félix, por darme las herramientas para poder realizar esta tesis, por su gran compañerismo, amistad, sencillez y demostrarme que las cosas son posibles con empeño y dedicación.

Al Dr. Armando Zepeda Bastida, por ayudar a expandir mis horizontes y confiar en mi capacidad como estudiante.

Al Dr. Juan Ocampo López, por enseñarme nuevas técnicas y ayudar a desarrollarme profesionalmente.

A la Dra. Maricela Ayala Martínez, por brindarme de su paciencia y cariño.

Al Dr. Sergio Soto Simental, por ser un excelente asesor, pero sobre todo una gran persona. Siempre dispuesto a apoyar y hacer que las cosas salgan adelante. Gracias por ser una inspiración para mí y los estudiantes de este posgrado.

Al Dr. Miguel Ángel Servín Trujillo y al M.V.Z Ángel Peña Rojas, por apoyarme con el equipo y material necesario para que este trabajo se lograra concretar.

A mis grandes amigos Getsemani, Dulce, Alba y Leo, por acompañarme en este largo camino, devolverme la vitalidad y apoyarme en todo momento.

A mis compañeros del Instituto de Fisiología Celular del Laboratorio 505 Oriente, Caro, Lili y Ulrick que demostraron un gran espíritu de compañerismo, colaboración y empatía. Llegando a convertirse en buenos amigos.

A Carlos O., por estar en los momentos buenos y malos de esta etapa y a pesar de todo brindarme una hermosa amistad.

A Vidal, por ser parte de este proceso, por su entrega, dedicación y apoyo incondicional.

DEDICATORIA

El presente trabajo está dedicado especialmente a mi madre Guadalupe Herrera a mis abuelos Enriqueta y Jesús y a mi hermosa amiga Lucila, sin su amor, consejos y sabiduría esto no habría sido posible.

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS.....	V
LISTA DE FIGURAS	VI
ABREVIATURAS Y UNIDADES	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	X
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 Cáncer	3
2.1.1 Cáncer hepático.....	3
2.2 Alimentos funcionales y quimioprevención	5
2.3 Insectos comestibles, composición nutricional y actividad terapéutica.....	6
2.4 Péptidos bioactivos con actividad terapéutica.....	10
2.5 <i>Tenebrio molitor</i>	11
2.5.1 Ciclo de vida.....	11
2.5.2 Cultivo de <i>T. molitor</i>	12
2.5.3 Valor nutricional	13
2.6 Utilización del ratón (C57BL/6), como modelo experimental en protocolos para estudiar cáncer.....	13
III. JUSTIFICACIÓN.....	15
IV. OBJETIVOS.....	16
4.1 Objetivo general.....	16

4.2 Objetivos específicos	16
V. HIPÓTESIS	18
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
6.1 Obtención de pupa de <i>Tenebrio molitor</i>	19
6.2 Obtención de extractos proteicos.....	19
6.3 Determinación de proteína soluble	20
6.4 Determinación de perfil de proteínas.....	21
6.5 Aislamiento del péptido	21
6.6 Formulación y elaboración de dietas	22
6.7 Animales.....	24
6.8 Protocolo de evaluación experimental de carcinoma hepatocelular en ratón	25
6.8.1 Aprobación del comité de ética	25
6.8.2 Periodo de adaptación (Semana 1)	25
6.8.3 Periodo de inducción de cáncer, administración de tratamientos y monitoreo de condición física (Semana 2 a 11).....	26
6.8.4 Periodo de finalización (Semana 12).....	26
6.9 Condición física de los animales.....	27
6.10 Histopatología.....	27
6.11 Análisis estadístico	31
VII. RESULTADOS	32
7.1 Determinación de proteína soluble	32
7.2 Determinación de perfil de proteínas.....	32

7.3 Condición física de los animales.....	33
7.4 Histopatología.....	37
7.4.1 Tinción Hematoxilina y Eosina.....	37
7.4.2 Tinción Tricrómico de Gomori.....	40
VIII. DISCUSIÓN.....	42
8.1 Determinación de proteína soluble.....	42
8.2 Determinación de perfil de proteínas.....	43
8.3 Condición física de los animales.....	44
8.4 Histopatología.....	47
8.4.1 Tinción Hematoxilina y Eosina y Tricrómico de Gomori.....	47
IX. CONCLUSIONES.....	50
X. PERSPECTIVAS.....	51
XI. LITERATURA CITADA.....	52
XII. ANEXOS.....	69
12.1 Certificado de salud animal.....	69
12.2 Aprobación CICUAL.....	71
12. 3. Productos adicionales en la formación de la Maestría en Ciencia de los Alimentos.	73
12.3.1 Artículo publicado en Boletín de Ciencias Agropecuarias ICAp. Producción y usos de <i>Tenebrio molitor</i>	73
12.3.2 Artículo publicado en Boletín de Ciencias Agropecuarias ICAp. Péptidos de insectos: una alternativa antibacteriana.....	74
12.3.3 Presentación en la Reunión científica de la asociación mexicana para la producción animal y seguridad alimentaria.....	75

12.3.4 Artículo publicado en Revista mexicana de agrosistemas. Calidad de la canal y de la carne de conejos suplementados con *T. molitor*..... 76

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Contenido nutricional de distintos insectos	7
Tabla 2. Uso terapéutico de diferentes insectos	8
Tabla 3. Acción terapéutica de sustancias aisladas de insectos.....	9
Tabla 4. Actividad terapéutica de péptidos bioactivos de insectos	10
Tabla 5. Valor nutricional de <i>Tenebrio molitor</i>	13
Tabla 6. Formulación y composición nutricional de las dietas ofrecidas a ratones (C57BL/6).....	24
Tabla 7. Procesamiento automatizado del tejido hepático (Modificado de manual AFIP, 1995)	28
Tabla 8. Tinción Hematoxilina y Eosina (Modificado de manual AFIP, 1995)	29
Tabla 9. Tinción tricrómica de Gomori (Modificado de manual AFIP, 1995)	30
Tabla 10. Concentración de proteína soluble, del estadio de pupa de <i>T. molitor</i> , obtenida con diferentes métodos de extracción	32
Tabla 11. Consumo de alimento de ratones (C57BL/6), utilizados en el modelo experimental de carcinoma hepatocelular	34
Tabla 12. Peso de ratones (C57BL/6), utilizados en el modelo experimental de carcinoma hepatocelular.....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estadios del <i>Tenebrio molitor</i>	11
Figura 2. <i>Tenebrio molitor</i> sobre cama de salvado de trigo.....	12
Figura 3. Patrón electroforético de extractos de proteínas del estadio de pupa de <i>T. molitor</i> , obtenidos por diferentes métodos de extracción.	33
Figura 4. Peso semanal de ratones (C57BL/6), utilizados en el modelo experimental de carcinoma hepatocelular	35
Figura 5. Nivel de alopecia en ratones C57BL/6, presentada en la semana 7 de la inducción de carcinoma hepatocelular	37
Figura 6. Hígado de ratón C57BL/6 (H-E). 100x. Recuadros 400x.....	39
Figura 7. Hígado de ratón C57BL/6 (Tricrómica de Gomori). 100X.....	40

ABREVIATURAS Y UNIDADES

DEN: dietilnitrosamina

μL: microlitro

g: gramo

Kg: kilogramo

°C: grados centígrados

cm: centímetros

pH: potencial de hidrogeno

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

mM: milimolar

mL: mililitro

mg: miligramo

H-E: hematoxilina y eosina

%: porcentaje

SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida

HCl: ácido clorhídrico

kDa: kilodalton

NOM: norma oficial mexicana

CHC: carcinoma hepatocelular

min: minutos

NaCl: cloruro de sodio

OMS: organización mundial de la salud

R.P.M.: revoluciones por minuto

RESUMEN

El cáncer hepático es una enfermedad con una alta incidencia y alta mortalidad, el presente, tuvo como objetivo evaluar el efecto de un alimento funcional a base de extracto proteico del estadio de pupa de *Tenebrio molitor* sobre la hepatocarcinogénesis experimental en el ratón. Para lo cual se aislaron péptidos del estadio de pupa de *Tenebrio molitor* con un rango de peso molecular de 65-110 KDa, utilizando tres métodos de extracción (detergente RIPA (Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM; EDTA 1 mM; NaCl 100 mM; NP-40 1 %), amortiguador MET (Manitol, 300mM; EDTA, 5 mM; Tris, 20 mM; pH 7.2) y mecánico con calor), se seleccionó el método con mejor corrida electroforética, para obtener el conjunto de péptidos, que posteriormente se incluyó en la formulación y elaboración del alimento para los ratones. Se utilizaron 20 ratones de la cepa C57BL/6, asignados completamente al azar en 4 grupos, control negativo (sin dietilnitrosamina y sin extracto peptídico), control positivo (con dietilnitrosamina y sin extracto peptídico), tratamiento 1 (con dietilnitrosamina + 60 μg extracto peptídico g^{-1} de alimento), tratamiento 2 (con dietilnitrosamina + 90 μg extracto peptídico g^{-1} de alimento). A los animales de control positivo, tratamiento 1 y tratamiento 2, se les administro dietilnitrosamina intraperitoneal. Al término de 12 semanas, se realizó a todos los animales, hepatectomía total y estudio histopatológico para evaluar el daño al tejido hepático. Los resultados mostraron que al utilizar el método detergente RIPA, se obtuvo mayor ($P>0.05$) concentración de proteína (18.23 mg mL^{-1}), sin embargo, el mejor perfil electroforético fue con el método con amortiguador MET. Los ratones del control negativo y del tratamiento 1, presentaron mayor ($p<0.05$) peso (22.3 y 22.6 g) al final del experimento, sin presentar diferencia entre ellos. Los ratones del control positivo presentaron menor ($p<0.05$) consumo de alimento (21.48 g). El estudio histopatológico realizado con la tinción de Hematoxilina y Eosina revelo una arquitectura tisular normal y sin cambios para el control negativo, lo cual difiere con el control positivo ya que se observan grandes zonas de hepatocitos vacuolados y pleomórficos con disrupción de los cordones de hepatocitos. Los tratamientos 1 y 2, por otro lado, tienen cambios tisulares mínimos, con algunos hepatocitos vacuolados y aumento del diámetro de los capilares

sinusoides. Por lo tanto, se concluye que la fracción proteica de 65-110 kDa aislada del estadio de pupa del *T. molitor*, tiene un efecto positivo sobre los ratones *C57BL/6* con cáncer hepático, ya que ayuda a que los animales no disminuyan el consumo de alimento y con ello mantengan su peso corporal, además de mantener la integridad del tejido.

Palabras clave: Dietilnitrosamina, hepatocarcinogenesis, *Tenebrio molitor*.

ABSTRACT

Liver cancer is a disease with a high incidence and high mortality, the present, aimed to evaluate the effect of a functional food based on protein extract from the pupal stage of *Tenebrio molitor* on experimental hepatocarcinogenesis in mice. For which, peptides from the pupal stage of *Tenebrio molitor* with a molecular weight range of 65-110 KDa were isolated, using three extraction methods (RIPA detergent (Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM; EDTA 1 mM; NaCl 100 mM; NP-40 1%), Buffer MET (Mannitol, 300mM; EDTA, 5 mM; Tris, 20 mM; pH 7.2) and mechanical with heat), the method with the best electrophoretic run was selected, to obtain the set of peptides , which was later included in the formulation and elaboration of the food for the mice. Twenty mice of the C57BL / 6 strain were used, completely randomized into 4 groups, negative control (without diethylnitrosamine and without protein extract), positive control (with diethylnitrosamine and without protein extract), treatment 1 (with diethylnitrosamine + 60 µg extract) protein Kg⁻¹ of food), treatment 2 (with diethylnitrosamine + 90 µg protein extract Kg⁻¹ of food). Positive control animals, treatment 1 and treatment 2, were administered intraperitoneal diethylnitrosamine. At the end of 12 weeks, all animals underwent a total hepatectomy and histopathological study to evaluate liver tissue damage. The results showed that when using the RIPA detergent method, a higher (P> 0.05) protein concentration was obtained (18.23 mg mL⁻¹), however, the best electrophoretic profile was with the MET buffer method. The mice of the negative control and of treatment 1, presented greater (p <0.05) weight (22.3 and 22.6 g) at the end of the experiment, without presenting a difference between them. The positive control mice

presented lower ($p < 0.05$) food consumption (21.48 g). The histopathological study carried out with Hematoxylin and Eosin staining revealed a normal tissue architecture without changes for the negative control, which differs from the positive control since large areas of vacuolated and pleomorphic hepatocytes are observed with disruption of the hepatocyte cords. Treatments 1 and 2, on the other hand, have minimal tissue changes, with some vacuolated hepatocytes and an increase in the diameter of the sinusoid capillaries. Therefore, it is concluded that the 65-110 kDa protein fraction isolated from the pupal stage of *T. molitor* has a positive effect on C57BL / 6 mice with liver cancer, since it helps the animals not reduce the consumption of food and thereby maintain their body weight, in addition to maintaining tissue integrity.

Key words: Diethyl nitrosamine, hepatocarcinogenesis, *Tenebrio molitor*.

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un proceso descontrolado de crecimiento y diseminación de células, las cuales pueden invadir tejido cercano y causar metástasis en puntos distantes (OMS, 1999), este puede desarrollarse en cualquier parte del cuerpo y se puede prevenir evitando los factores de riesgo como el consumo de bebidas alcohólicas y oler humo de tabaco (ABTA, 2014). Se conocen más de 200 tipos de cáncer a nivel mundial, cada uno de ellos posee características particulares, que en algunos casos son completamente diferentes al resto, pudiendo considerarse enfermedades independientes, con sus causas, evolución y tratamiento específico (Puente y De Velasco, 2019). El cáncer de hígado, al igual que el cervicouterino, representan una incidencia mundial del 12 % (Soerjomataram et al., 2008) El carcinoma hepatocelular (CHC), es el tipo de cáncer hepático más encontrado en estudios histológicos, representando el 85 % de los casos (Itriago et al., 2013) con una curva creciente en todo el mundo; en la actualidad constituye la tercera causa de muerte relacionada con el cáncer (Gómez-Senent et al., 2007). La resección quirúrgica, es la primera opción de tratamiento en tumores de hígados no cirróticos, sin embargo, el riesgo de estas resecciones es la insuficiencia hepática postoperatoria. La opción viable de tratamiento en casos de CHC es un trasplante de hígado, pero su aplicabilidad es limitada y el número de candidatos es mayor al de órganos disponibles. La quimioterapia es el único tratamiento que ha demostrado un beneficio de supervivencia, sin embargo, su larga duración y los efectos adversos en el paciente son su principal desventaja (Forner et al., 2016). La caída de cabello, úlceras en la boca, letargo, vómitos e incluso diarrea, son los

principales factores que afectan la calidad de vida del paciente tratado con quimioterapia (Gaviria, 2007). Por ello, se han buscado tratamientos alternativos para el cáncer, como plantas, hongos e insectos, que disminuyan los signos indeseables, causados por este padecimiento y con ello se obtenga un beneficio psicológico en el paciente (Blanco y Giraldo, 2016). El efecto anticancerígeno de los tratamientos alternativos (plantas, hongos e insectos), ha sido atribuido a la presencia de péptidos bioactivos (Shahidi y Zhong, 2008), los cuales pueden ser incluidos en alimentos funcionales, tal es el caso de García (2018), quienes observaron en estudios histológicos e inmunohistoquímicos, propiedades citotóxicas sobre células cancerígenas del hígado de ratones con CHC inducido, al administrar bebidas proteicas que contenían diferentes estadios de *T. molitor*. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de un alimento funcional a base de extracto proteico del estadio de pupa de *T. molitor*, sobre la hepatocarcinogénesis experimental en ratones, mediante estudios histopatológicos, para contribuir a la valoración de su empleo como un tratamiento alternativo.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Cáncer

El cáncer comienza cuando las células del cuerpo se desarrollan descontroladamente formando tumores, causando una pérdida estructural del tejido y por lo tanto, daño en el funcionamiento del órgano (ABTA, 2014). Existen factores genéticos, ambientales, traumáticos y conductuales que pueden aumentar la predisposición a padecer esta enfermedad (Die, 2003). El cáncer se considera un problema de primer orden, debido a su alta incidencia y mortalidad (Martín, 2003), causa más decesos que la tuberculosis y el sida (Itriago et al., 2013). Existen más de 200 tipos de cáncer, cada uno de ellos posee diferente causa, evolución y tratamiento (Puente y De Velasco, 2019). Los principales tipos de cáncer son los presentes en órganos genitales femeninos (incluyendo mama) y masculinos, órganos hematopoyéticos, órganos digestivos (incluyendo hígado) y respiratorios (Gómez-Villanueva et al., 2014).

2.1.1 Cáncer hepático

El cáncer hepático, representa el 12 % de incidencia a nivel mundial y sólo es igualado por el cáncer cervicouterino. El cáncer de mama, pulmón, próstata, colon, recto, vesícula biliar, esófago y estómago representan el 36 % y otros tipos el 40 % (Soerjomataram et al., 2008). El cáncer hepático tiene mayor incidencia e índice de mortalidad, esto se debe a que normalmente es diagnosticado en fases avanzadas (Varela et al., 2010), en hombres se

encuentra en quinto lugar en frecuencia y segundo en mortalidad; en mujeres en séptimo en frecuencia y sexto en causa de muerte. El principal factor para el padecimiento de esta enfermedad es un hígado cirrótico, por ser una enfermedad crónico-degenerativa, aunque su etiología es multifactorial, las principales causas son el consumo de alcohol, enfermedades hepáticas y exposición a aflatoxinas (INEGI, 2018). El carcinoma hepatocelular (CHC), es el tipo de cáncer hepático más encontrado en estudios histológicos, representando el 85 % de los casos (Itriago et al., 2013). En México se reportan al año 5 mil 393 muertes por cáncer hepático, ocupando el tercer lugar en la lista de enfermedades fatales (Celaya, 2014). El problema más relevante de esta enfermedad es que los signos y síntomas normalmente no aparecen, hasta que el cáncer se encuentra muy avanzado, además de que no son característicos ni específicos de esta enfermedad; entre los cuales se encuentran; pérdida de peso, pérdida de apetito, náuseas o vómitos, dolor abdominal, picazón e ictericia (ACS, 2016).

Entre menor sea la extensión del proceso neoplásico, será mayor la posibilidad de éxito al ser tratada la enfermedad (Kajatt, 2013); para evaluar el pronóstico de CHC se debe considerar además del estadio del tumor, la función hepática y la presencia de síntomas (Forner et al., 2016). El tratamiento de elección para el cáncer hepático es la cirugía, pero esta puede traer consigo problemas de funcionamiento hepático post-operatorio; otra opción es el trasplante de hígado, pero normalmente no se encuentran disponibles suficientes candidatos para llevar a cabo este protocolo. La quimioterapia, es la opción más utilizada para tratar esta enfermedad, sin embargo, su principal desventaja son los efectos

secundarios tales como caída del cabello, calambres, letargo, convulsiones, disnea, vómito, náuseas y problemas psicológicos (Figueras et al., 2001), lo que determina que el paciente oncológico debe tener un cuidado integral (Terol et al., 2000), debido a que el resultado y duración del tratamiento, dependen de la respuesta del paciente (ACS, 2016).

2.2 Alimentos funcionales y quimioprevención

Los alimentos funcionales son conocidos por poseer características benéficas o funciones específicas en el cuerpo, más allá de los efectos nutricionales que permiten tener reducción de riesgo de una enfermedad o bienestar para el consumidor; son clasificados en tres grupos, según su mecanismo de acción (pro bióticos, prebióticos y biogénéticos) (Yamamoto et al., 2003). Estos alimentos son relacionados con el cuidado y la prevención de enfermedades crónicas como el cáncer, ya que cuentan con componentes como el ácido linolénico conjugado, flavonoides, antocianinas, catequinas, terpenos, triterpenos y compuestos organosulfurados (Sedó, 2001), por tal motivo, se pueden considerar quimioprotectores, ya que la quimioprevención, se refiere al uso de compuestos para inhibir, retardar o revertir la carcinogénesis, basándose en la interrupción de eventos biológicos involucrados en esta; un ejemplo de esto son las proteínas de origen animal, las cuales se han utilizado para el aislamiento de péptidos con este fin (Alvídrez-Morales et al., 2002).

2.3 Insectos comestibles, composición nutricional y actividad terapéutica

El término de entomofagia se refiere al consumo de insectos, es una práctica realizada en todo el mundo, derivado de la alta disponibilidad y contenido nutricional (Tabla 1), principalmente su aporte de proteína, el cual es mayor al que se encuentra en los alimentos consumidos normalmente como el frijol, pollo, res, lenteja y huevo (Guzmán-Mendoza et al., 2016), además, de contar con propiedades funcionales quimioprotectoras (Williams et al., 2016). Existen más de 2,000 especies de insectos registradas para consumo humano en el mundo y se estima que no se conoce ni la tercera parte de ellos (Huis, 2015), dentro de los más consumidos se encuentran coleóptera (31%), lepidóptera (18%), himenoptera (14%), orthoptera (13%), y hemiptera (10%) (Soares de Castro et al., 2018). Los insectos pueden ser consumidos asados, dorados, molidos e incluso vivos, así como en sus distintos estadios de vida (larva, pupa y adulto). Por tal motivo, se han cultivado y procesado hasta obtener harinas, factibles de ser incorporadas en productos alimenticios, con el objetivo de aumentar el valor nutricional (Williams et al., 2016), y la eficiencia tecnológica, ya que además los insectos poseen alta capacidad de retención de agua y aceite, alta actividad de emulsión y moderada capacidad de espuma (Zielińska et al., 2018).

Tabla 1. Contenido nutricional de distintos insectos

Insecto	Proteína	Grasa	Minerales	Carbohidratos	Energía
Escarabajos	4-54	4-52	1-3	12-34	126-574
Moscas	18-67	4-31	1-8	8-23	199-460
Saltamontes	33-65	7-54	1-19	7-19	329-622
Abejas, avispas, moscas, hormigas	1-81	1-62	0-6	5-94	234-593
Mariposas y polillas	13-70	7-77	2-8	3-41	126-762
Grillos y langostas	13-77	2-25	2-27	16-30	117-436

(Soares de Castro et al., 2018)

El consumo de insectos no solo aporta beneficios nutricionales, si no también terapéuticos (Tabla 2), los cuales varían dependiendo de la especie (Soares de Castro et al., 2018), los lugares en que más los consumen y estudian son Asia, Latinoamérica y África (Bukkens, 1997). Derivado del estudio de los beneficios terapéuticos de los insectos, se han realizado extracciones para potencializar sus efectos, como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 2. *Uso terapéutico de diferentes insectos*

Insecto	Uso terapéutico	Cita
Piojos		
<i>Pediculus humanus L.</i>	Dolor dental	(Costa-Neto y Oliveira, 2000)
Cucarachas		
<i>Periplaneta americana L.</i> <i>Blatella sp.</i>	Bronquitis asmática, epilepsia, alcoholismo, asma, dolor de oído, cólicos, dolor muscular, furúnculo y cáncer	(Costa y Pacheco, 2005)
Libélulas		
<i>Aeschnidae, Coenagrionidae</i>	Mordedura de serpientes	(Costa-Neto y Oliveira, 2000)
Termitas		
<i>Reticulitermes banyulensis</i>	Asma	
Chapulines		
<i>Gryllus domesticus L.</i>	Asma	
Moscas		
<i>Musca domestica L.</i>	Calvicie	(Costa-Neto y Oliveira, 2000)
Tenebrio		
<i>Ulomoides dermestoides</i>	Impotencia sexual, asma, artritis, tuberculosis, fortificante	
<i>Tenebrio molitor</i>	Cólicos intestinales y uterinos, asma y gripa	
		(Costa et al., 2006).

Tabla 3. Acción terapéutica de sustancias aisladas de insectos

Espece	Sustancia	Acción Terapéutica
Escarabajo rinoceronte <i>Allomyrina dichotomus L.</i>	Dicostatina	Anti-cáncer
Abeja italiana <i>Apis mellifera L.</i>	Propóleo (Mezcla)	Anti-cáncer, anti-VIH
Mariposa pomona <i>Catopsilia crocale (Cramer)</i>	Isoxantopterina	Anti-cáncer
Chinche <i>Euschistus crenator S.</i>	Taninos	Anti-tóxica, anti-tumoral, anti-viral
Mariposa <i>Prioneris thestylis Doubleday</i>	Isoguanina	Anti-cáncer
Chapulín de la milpa <i>Sphenarium purpurescens</i> <i>Ch.</i>	Iridoides, carotenoides	Anti-microbiana, tónica, anti-inflamatoria, actividad de provitamina A

(Costa et al., 2006)

La entomoterapia es conocida por estudiar el uso terapéutico de los insectos y productos derivados de ellos (Cahuich-Campos y Flores, 2014). La utilización de insectos en la medicina es una práctica antigua, pero amplia y hasta cierto punto desconocida actualmente (Costa y Pacheco, 2005) Se conocen coleópteros con actividades terapéuticas obtenidas a partir de péptidos bioactivos, como es el caso de *Pachymerus nucleorum*, utilizado para el tratamiento de la caspa e insectos del género *Megaphanaeus* utilizados en casos de asma y derrame cerebral (Costa et al., 2006).

2.4 Péptidos bioactivos con actividad terapéutica

En Japón, algunas bebidas enriquecidas con péptidos bioactivos se clasifican como alimentos para uso específico de salud (FOSHU), tienen la aprobación del gobierno japonés para hacer declaraciones de propiedades saludables, como alimentos que regulan la presión arterial y los triacilglicerolos (TAG); se utilizan péptidos naturales de hidrolizados enzimáticos y de hongos de carne de sardina, proteína de sésamo, proteína de jalea real y hemoglobina porcina (Sato y Kiyono, 2016).

Por otro lado, los efectos anticancerígeno, antioxidante y antibacteriano, son atribuidos a la presencia de péptidos bioactivos (Vioque y Millán, 2005; Shahidi y Zhong, 2008), de los cuales se conocen al menos 5 000 de origen natural, provenientes de animales, plantas, hongos, insectos y bacterias (Olascoaga-Del Angel et al., 2018). Los péptidos bioactivos presentes en los insectos estimulan células inmunocompetentes, y tienen efecto citomodulador (Borja, 2014), como se muestra en la Tabla 4 (Montaño y Vargas, 2002).

Tabla 4. Actividad terapéutica de péptidos bioactivos de insectos

Péptido	Tipo	Actividad
Cecropinas	Hélice alfa	Contra bacterias Gram (-)
Defensinas	Defensina	Contra bacterias Gram (-)
Apidaecina	Prolina	Contra bacterias Gram (-)
Royalisina	Prolina	Contra bacterias Gram (-)
Drosomicina	Defensina	Fungicida

(Montaño y Vargas, 2002)

2.5 *Tenebrio molitor*

El *T. molitor* es un insecto del orden Coleóptera, muchas de sus especies son plagas de plantas cultivadas, árboles frutales y forestales, pertenece a la familia Tenebrionidae la cual es la más rica en especies, dispersa en zonas cálidas y áridas del planeta (Barrientos, 2004). Este insecto mide en estado adulto de 2.5-3 cm (Feng, 2018), es altamente resistente a cambios de temperatura lo cual lo hace ideal para su producción y reproducción (Menhinick y Crossley, 1968).

2.5.1 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *T. molitor*, se divide en cuatro fases: huevo (1-2 semanas), larva (12-16 semanas), pupa o crisálida (3-4 semanas) y adulto (8-12 semanas) (Figura 1). Las hembras ovopositan por primera vez a los 11.5 d de edad. La vida del insecto es de aproximadamente 280 d, dependiendo de la temperatura, calidad y accesibilidad de alimento (Mendoza, 2017).



Figura 1. Estadios del *Tenebrio molitor* (Herrera, 2019, México)

Autoría propia

2.5.2 Cultivo de *T. molitor*

Los requerimientos básicos para la alimentación del *T. molitor*, son fuentes ricas en glucosa, almidón, sal, vitamina B y agua (Fraenkel et al., 1950), pueden roer cartón y madera (Intriago y Valencia, 2014); se pueden alimentar con salvado de trigo y lechuga (Figura 2) (García, 2018), la cama de salvado debe ser aproximadamente de 3 cm, y se debe cambiar cada 3 d, la lechuga se debe administrar cada dos días cuidando que la cama y el ambiente no este demasiado húmedo, ya que esto puede propiciar el crecimiento de hongos indeseables (Leyuan et al., 2016), sin embargo, se ha demostrado que la inmunidad de *T. molitor*, es adaptativa, ya que tiene la capacidad de responder con una actividad antimicrobiana de larga duración (Moret y Silva-Jothy, 2003). Aunado a lo anterior, se ha demostrado que a mayor densidad de población en el alojamiento se obtendrá menor crecimiento de los insectos (Connat, 1991).



Figura 2. *Tenebrio molitor* sobre cama de salvado de trigo (Herrera, 2019, México)

Autoría propia

2.5.3 Valor nutricional

El valor nutricional de *T. molitor*, puede variar dependiendo de los estadios, tal como se muestra en la Tabla 5. El *T. molitor*, es considerado una excelente fuente de proteína, aunque el estadio que más se consume es la larva, llegando a aportar hasta un 62 % de proteína, tiene un ligero sabor a avellana y al ser cocinada adquiere fácilmente el sabor de los alimentos complementarios; se comercializa frita o deshidratada, posee textura crujiente, lo cual la hace ideal para consumo en forma de *snack* o *topping*. Puede además ser agregada a licuados como fuente de proteína (Bovera et al., 2016).

Tabla 5. Valor nutricional de *Tenebrio molitor*

	Larva	Pupa	Adulto
	g / 100 g		
Hidratos de carbono	5	4	5
Grasa	37	42	46
Fibra	6.5	2	8
Proteína	52	58	64

(Castro-León et al., 2017)

2.6 Utilización del ratón (C57BL/6), como modelo experimental en protocolos para estudiar cáncer

Estudios donde se emplean modelos animales proveen la oportunidad de probar y definir el papel de los factores exógenos y endógenos en la etiología del cáncer (Ojeda, 2007). Las contribuciones de investigaciones basadas en el empleo de ratones de laboratorio han ayudado al desarrollo de las ciencias biológicas, permitiendo prevenir y curar ciertas enfermedades, mejorando la calidad y expectativa de vida. Los ratones *Mus musculus* de la cepa C57BL/6 son utilizados en este tipo de investigaciones ya que se consideran ratones

dóciles, viven en colonias grandes, el tamaño del ratón adulto varía entre 12 a 15 cm de la punta de la nariz a la punta de la cola, con un peso aproximado de 30 g, estos ratones son animales de actividad nocturna, su vista y oído está muy desarrollada, poseen un agudo instinto de defensa de territorio, son de fácil manejo, bajos costos de manutención, y de vida relativamente corta (12-18 meses) lo que las hace ideales para ensayos crónicos de toxicología, microbiología, virología, farmacología y oncología; la cepa C57BL/6 es una de las cepas endocrinas más utilizadas, su genoma está completamente secuenciado y se pueden inducir varios tipos de tumores en ellas, permitiendo estudiar el mecanismo de acción, dosis letales de distintos tratamientos y respuestas del individuo o de grupos frente a esta enfermedad (Montes, 2017).

III. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, el carcinoma hepatocelular, se encuentra en el sexto lugar de incidencia y el tercer lugar de mortalidad. Existen más de 748 000 personas diagnosticadas con cáncer hepático al año en el mundo, de estas se reportan 600 000 muertes. El uso de quimioterapia como tratamiento para ayudar a combatir el cáncer es ampliamente conocido y en la mayoría de los casos efectiva; sin embargo, los medicamentos quimioterapéuticos afectan muchas de las células normales del cuerpo: en la sangre, la boca, el tubo digestivo, la nariz, las uñas, la vagina y el cabello, además de que existen efectos secundarios indeseables como lo son la caída del cabello, úlceras en la boca, cansancio y un incremento significativo en el riesgo de contraer una infección bacteriana, afectando no solo la salud física, sino también la mental del paciente oncológico. Por tal motivo, se han buscado alternativas para aminorar estas afecciones, tal es el caso de los insectos, como *Tenebrio molitor*, que posee propiedades citotóxicas hacia células cancerígenas que se encuentran en el hígado, siendo el estadio de pupa el de mayor actividad. Es por esto, que al elaborar un alimento funcional a base extractos proteicos del estadio de pupa de *T. molitor* representa un avance en la terapéutica experimental y alternativa contra el cáncer hepático.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto de un alimento funcional suplementado con extracto de un grupo de péptidos de 65 a 110 kDa de peso molecular del estadio de pupa de *Tenebrio molitor*, sobre la hepatocarcinogénesis experimental en ratones C57BL/6, mediante su estudio histopatológico, con la finalidad de observar su viabilidad como tratamiento alternativo o complementario de este tipo de cáncer.

4.2 Objetivos específicos

- Evaluar el rendimiento de tres métodos de extracción proteica del estadio de pupa de *Tenebrio molitor*, para elegir el que presente mejor corrida electroforética.
- Identificar el perfil proteico del estadio de pupa de *Tenebrio molitor*, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, para su posterior aislamiento.
- Aislar un grupo de péptidos de 65 a 110 kDa de peso molecular, mediante electroelución y diálisis, para su posterior uso en un alimento funcional para ratones.
- Evaluar el efecto de la inclusión de un grupo de péptidos de 65 a 110 kDa de peso molecular, en el alimento de ratones inducidos con carcinoma hepatocelular, mediante el monitoreo de peso y consumo, para evaluar la condición física de los animales.

- Evaluar el efecto de la inclusión de un grupo de péptidos de 65 a 110 kDa de peso molecular, en el alimento de ratones, inducidos con carcinoma hepatocelular, mediante su estudio histopatológico para conocer el grado de daño tisular en hígado.

V. HIPÓTESIS

La inclusión del extracto de un grupo de péptidos de 65 a 110 kDa de peso molecular, aislados del estadio de pupa de *Tenebrio molitor*, en la alimentación de ratones C57BL/6 inducidos con cáncer hepático, inhibe el progreso de la enfermedad.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Obtención de pupa de *Tenebrio molitor*

Los insectos *T. molitor*, se cultivaron en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Celular del Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Para lo cual se alojaron en contenedores de plástico de 15 x 14 x 9 cm, con una cama de 1 cm de salvado de trigo (con cambio cada 7 d) y una porción de lechuga de 5 cm (con cambio cada 3 d), a una temperatura de 24° C y humedad relativa de 52 %, monitoreadas diariamente con un Termohigrómetro (RadioShack IX60752G). Los insectos fueron separados por estadios de larva, pupa y adulto, con una densidad de población de 1000, 100 y 100, respectivamente. Las pupas obtenidas fueron almacenadas a – 20°C, para su posterior utilización (García, 2018).

6.2 Obtención de extractos proteicos

Para la obtención de extractos proteicos, se utilizaron los siguientes métodos:

1. Método RIPA: Se utilizaron 5 mL de detergente RIPA (Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM; EDTA 1 mM; NaCl 100 mM; NP-40 1 %), y se mezclaron con 1 g de pupa de *T. molitor*, posteriormente se sonicaron (UP250 Portatil Sonicator 250W, West tune) con 3 pulsos al 70%, durante 30 s y se agitaron durante 30 min a 4°C, se centrifugaron a 10 000 r.p.m durante 30 min a 37 °C y el sobrenadante fue conservado a -20 °C (Winyard y Willoughby, 2003).

2. Método mecánico por calor: Se mezclaron 5 mL de agua destilada y 1 g de pupa de *T. molitor*, posteriormente se ajustó el pH a 10, con NaOH 1N y se sonico (UP250 Portátil Sonicator 250W, West tune) con 3 pulsos al 70%, durante 30 s, con agitación durante una hora a 45°C, para posteriormente ser centrifugado a 10 000 r.p.m por 30 min a 37 °C, el sobrenadante se conservó a -20 °C (Azagoh et al., 2016).
3. Método MET: Se mezcló 1 g del estadio de pupa de *T. molitor* con 5 mL de amortiguador MET (Manitol, 300mM; EDTA, 5 mM; Tris, 20 mM; pH 7.2), posteriormente se sonicó (UP250 Portatil Sonicator 250W, West Tune) con 3 pulsos al 70%, durante 30 s, se agitó por 10 min a 4 °C, posteriormente se centrifugó a 10 000 r.p.m por 30 min a 37 °C y el sobrenadante fue conservado a -20 °C (Dammak et al., 2010).

6.3 Determinación de proteína soluble

Una vez obtenidos los extractos proteicos del estadio de pupa de *T. molitor*, por los métodos de RIPA, mecánico con calor y MET, se realizó la determinación de proteína soluble (mg mL^{-1}), mediante un *kit* comercial (Quick Start Bradford Protein Assay de Bio-Rad), utilizando la proteína gamma globulina bovina (BGG), como estándar de la curva patrón (Bradford, 1976).

6.4 Determinación de perfil de proteínas

Se realizó el perfil de proteínas, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), de los extractos proteicos del estadio de pupa de *T. molitor*, obtenidos por los métodos de RIPA, mecánico con calor y MET, ajustando la concentración de proteína de 9.27 mg mL⁻¹. Se realizaron por triplicado el gel de poliacrilamida (separador a una concentración de 10 % y concentrador al 5%). Se sometieron a ebullición durante 5 min, la mezcla de una parte de amortiguador de muestra (0.36 mL de Tris-HCl, 1 M, pH 6.8; 3 mL de glicerol 50 %; 1.2 mL duodecil sulfato de Na al 10 %; 0.3 mL de 2-mercaptoetanol; 0.06 % de azul de bromofenol; 5.14 mL de agua destilada) y dos partes de extracto proteico ajustado. Posteriormente se colocaron 20 µL de mezcla de amortiguador de muestra: extracto proteico en cada pozo. La corrida electroforética se realizó en una cámara vertical a 70 V por 20 min, aumentando la intensidad a 120 V, durante 6 h, dentro de una cámara fría con una temperatura de 3°C. Cada gel fue teñido con azul de Coomassie G-250 (Kapp y Vinogradov, 1978).

6.5 Aislamiento del péptido

Al identificar el extracto peptídico obtenido por el método MET, con mejor corrida electroforética, se realizaron 45 geles de 30 x 25 cm, para aislar el grupo de péptidos con un rango de peso molecular de 65 a 110 kDa por medio de electroelución y diálisis, para lo cual el gel se cortó con ayuda de un bisturí

(Burgess, 2009); la porción cortada de gel se colocó en una cámara vertical de electroforesis con 6 aditamentos para extracción de proteínas y se llevó a cabo la corrida por tres horas a 90 V, transcurrido este tiempo se recuperó el péptido con ayuda de una pipeta y se colocó en membranas semipermeables (Spectrum, Spectra/Por, 2 RC Dialysis Membrane Tubing 12 000 to 14 000 Dalton MWCO; Molecularporous), con un diámetro de 16 mm y una longitud de 15 m, las cuales fueron preparadas para su uso metiéndolas en agua hirviendo por 5 min. Para la diálisis, se sumergieron las membranas en 4 L de Tris 0.5 mM y se mantuvieron en una cámara fría a 3° C, en agitación constante durante cuatro días (Kapp y Vinogradov, 1978). El grupo de péptidos de 65 a 110 kDa aislado, se almaceno a -20 °C, para su posterior incorporación en el alimento funcional.

6.6 Formulación y elaboración de dietas

Considerando los resultados obtenidos por García (2018), quien demostró la presencia de un efecto citotóxico hacia células cancerígenas del hígado, al administrar 218.75 $\mu\text{g d}^{-1}$ de proteína soluble vía oral, obtenida de pupa de *T. molitor*, a cada ratón C57BL/6. En esta investigación se decidió administrar 270 y 405 $\mu\text{g d}^{-1}$, de proteína soluble a cada ratón, ya que la cantidad obtenida en el extracto de péptidos de estadio de pupa de *T. molitor* fue de 60 mg mL^{-1} , y se proyectó un consumo de alimento diario de 4.5 g por animal (NOM-062-ZOO-1999), buscando administrar la misma dosis que en la investigación de García (2018) y un 50 % más, por lo que se formularon tres dietas (sin extracto, 60 y 90 μg de extracto peptídico g^{-1} alimento) (Tabla 6), para lo cual se consideraron los

requerimientos nutricionales de ratones (*Mus musculus*) (NRC, 1995, NOM-062-ZOO-1999) y la composición nutricional de los ingredientes (FEDNA, 2019). Los ingredientes fueron mezclados y peletizados en una máquina modelo SKJ120 (Shandong, China), las dietas elaboradas fueron almacenadas en recipientes herméticos a 4°C.

Tabla 6. Formulación y composición nutricional de las dietas ofrecidas a ratones (C57BL/6)

	Base húmeda kg		
	Sin extracto	60 µg g ⁻¹	90 µg g ⁻¹
Ingrediente			
Sorgo	5	5	5
DDGS Cebada	25	25	25
Melaza de caña	30	30	30
Semilla de girasol	590	590	590
Linaza	270	270	270
Aceite de soya	60	60	60
Premezcla de microingredientes	10	10	10
Carbonato de calcio	10	10	10
Agua destilada (mL)	30	30	30
Extracto peptídico de pupa de <i>T. molitor</i> (mL)*	0	1	1.5
Nutriente			
Proteína cruda (%)		17	
Fibra cruda (%)		13	
Energía metabolizable (Mcal kg ⁻¹ MS)		4.7	

DDGS: Granos secos de destilería

Composición nutricional calculada utilizando valores de FEDNA (2019)

*Concentración de 60 mg mL⁻¹, de proteína soluble (rango de peso molecular de 65 a 110 kDa)

6.7 Animales

Se utilizaron 20 ratones (*Mus musculus*) machos de la cepa C57BL/6, de 20.4 g peso vivo promedio y 6 semanas de edad, los cuales se obtuvieron de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) CINVESTAV-IPN, Ciudad de México, México, con Certificado de Salud Animal (30644/30646/39930) (Anexo 1). Los cuales fueron asignados completamente al azar en 4 grupos, control negativo (sin dietilnitrosamina y sin extracto peptídico), control positivo (con dietilnitrosamina y sin extracto peptídico), tratamiento 1 (con

dietilnitrosamina + 60 μg extracto peptídico g^{-1} de alimento), tratamiento 2 (con dietilnitrosamina + 90 μg extracto peptídico g^{-1} de alimento), fueron alojados en jaulas para ratón de acrílico de 6mm, con dimensiones de 25 x 40 x 15 cm, con cama aserrín esterilizado (cambiada semanalmente), con bebederos de polipropileno de 250 mL, en ambiente controlado con una temperatura de 20 a 26° C, humedad relativa de 49 a 53 %, medidos con un termohigrómetro (RadioShack IX60752G), con ciclos de 12/12 h luz/oscuridad. El experimento duro 12 semanas, durante el cual los animales tuvieron acceso a agua y alimento *ad libitum*.

6.8 Protocolo de evaluación experimental de carcinoma hepatocelular en ratón

6.8.1 Aprobación del comité de ética

Esta investigación se desarrolló con la aprobación núm. CICUAL/014/2019 (Anexo 2) del Comité de Ética de Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

6.8.2 Periodo de adaptación (Semana 1)

Durante este periodo los animales fueron pesados, para obtener el peso inicial, se les ofreció agua y alimento *ad libitum*, sin ningún manejo adicional.

6.8.3 Periodo de inducción de cáncer, administración de tratamientos y monitoreo de condición física (Semana 2 a 11)

Durante este periodo a cada ratón de los grupos control positivo, tratamiento 1 y tratamiento 2, se le administró dietilnitrosamina (DEN) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a una dosis de 20 mg.Kg⁻¹ PV, vía intraperitoneal, dos veces por semana. Se ofreció diariamente a las 8:30 a.m., el alimento correspondiente a cada grupo, previamente pesado. Los animales fueron pesados cada semana a las 8:00 a.m. En la semana 7 se realizó una inspección física externa, para verificar la existencia o ausencia de alopecia.

6.8.4 Periodo de finalización (Semana 12)

Durante este periodo los ratones permanecieron sin la aplicación de DEN. Al término del experimento se realizó una hepatectomía total, para lo cual, los ratones fueron inducidos y mantenidos en anestesia general con sevoflurano al 4.5 % para inducción y 1-2 % para mantenimiento (SEVORANE 100 % líquido para inhalación del vapor, Vademecum), dentro del quirófano del Centro Clínico Veterinario Tulancingo, la cirugía duro aproximadamente 4 min por ratón, seguido del sacrificio de acuerdo a la NOM-033-SAG/ZOO-2014, con una sobredosis intracardiaca de pentobarbital sódico a razón de 120 mg Kg⁻¹ (Penta-Hypnol; Agrovvet Market). El tejido hepático se conservó en formaldehido (JT Baker) *bufferado* con fosfatos al 4 % en solución *acuosa* (Schiffer et al., 2005) por al menos 24 h.

6.9 Condición física de los animales

Para evaluar la condición física de los animales, se realizó la medición de consumo (pesando diariamente el alimento ofrecido y el rechazado) de cada grupo; y el peso de los ratones (semanalmente), en una balanza analítica (0.0001, AR2140 OHAUS, China). Así como la presencia o ausencia de alopecia (en la séptima semana) en cada uno de los individuos, ubicados en los diferentes tratamientos.

6.10 Histopatología

Las muestras de tejido hepático fueron procesadas por el método de inclusión en parafina (Prophet et al., 1995), mediante un procesador automatizado de tejidos (Microm, modelo TP120) (Tabla 7) y cortadas a 4 μm en un microtomo de rotación manual (Leica, modelo RM125RT). Posteriormente se tiñeron con el método de hematoxilina y eosina (H-E) (Tabla 8) o con el método de tricrómica de Gomori (Prophet et al., 1995) (Tabla 9).

Posterior a cada tinción, las laminillas fueron cubiertas con una gota de resina sintética y un cubreobjetos (Prophet et al., 1995), para su posterior observación en un microscopio compuesto de campo claro (Olympus; modelo BX41), donde se analizaron los cambios tisulares observados y se capturaron las imágenes correspondientes mediante una cámara Evolution VF (Microsystems) y procesadas con el *software* ImagePro v. 6.0 (Microsystems), en una PC Vaio con

procesador Pentium y 4 GB de RAM. Para el análisis histológico se realizó un análisis cualitativo (morfológico) del tejido hepático.

Tabla 7. *Procesamiento automatizado del tejido hepático (Modificado de manual AFIP, 1995)*

	Paso	Reactivo	Tiempo de procesamiento (h)
Lavado	1	Agua destilada	1
	2	Alcohol isopropílico 60 %	1
	3	Alcohol isopropílico 70 %	1
	4	Alcohol isopropílico 80 %	1
Deshidratación	5	Alcohol isopropílico 96 %	1
	6	Alcohol isopropílico 96 %	2
	7	Alcohol isopropílico 100 %	1
	8	Alcohol isopropílico 100 %	2
Aclaración	9	Xileno	1
	10	Xileno	2
Infiltración	11	Parafina	1
	12	Parafina	2

Modificado de Prophet et al., 1995.

Tabla 8. Tinción Hematoxilina y Eosina (Modificado de Prophet et al., 1995)

	Tinción H-E	Tiempo (min)
Inicio	Xileno	2
	Xileno	2
	Alcohol isopropílico 100 %	2
	Alcohol isopropílico 100 %	2
	Alcohol isopropílico 95 %	2
	Alcohol isopropílico 95 %	2
	Alcohol isopropílico 80 %	2
	Alcohol isopropílico 70 %	2
	Agua destilada	0.1
	Hematoxilina de Harris	10
	Agua corriente	2-5
	Alcohol ácido	0.1
	Agua amoniacal	Cambie a azul
	Agua corriente	10
	Alcohol isopropílico 70 %	2
	Eosina-Floxina	5
	Alcohol isopropílico 80 %	2
	Alcohol isopropílico 95 %	2
	Alcohol isopropílico 95 %	2
	Alcohol isopropílico 100 %	2
Alcohol isopropílico 100 %	2	
Xileno	2	
Xileno	2	
Montar	Resina	
Resultados: epitelio rosa intenso a violeta, conectivo rosa claro, muscular rosa intenso y nervioso rosa claro		

Tabla 9. Tinción tricrómica de Gomori (Modificado de manual AFIP, 1995)

	Tinción tricrómica de Gomori	Tiempo (min)
Inicio	Xileno	2
	Xileno	2
	Alcohol isopropílico 100 %	2
	Alcohol isopropílico 100 %	2
	Alcohol isopropílico 95 %	2
	Alcohol isopropílico 95 %	2
	Alcohol isopropílico 80 %	2
	Alcohol isopropílico 70 %	2
	Agua destilada	0.1
	Fijador de Bouin, en el horno a 60 °C	1 hora
	Lavados de agua destilada hasta que las secciones se aclaren	
	Hematoxilina de hierro de Weigert	10
	Enjuagar con agua corriente	
	Solución tricrómica de Gomori	15-20
	Enjuagar ácido acético 1 %	
	Enjuagar con agua destilada	
	Etanol 95 %	2
	Etanol 95 %	2
	Etanol 100 %	2
	Etanol 100 %	2
	Xileno	2
	Xileno	2
Montar	Resina	
Resultados: colágeno verde oscuro-celeste, fibras musculares rojo, citoplasma rosado, núcleos de azul a negro		

6.11 Análisis estadístico

La concentración proteica de los extractos de pupa de *Tenebrio molitor*, peso y consumo de los animales, se analizaron bajo un diseño completamente al azar mediante un análisis de varianza, cuando existieron diferencias estadísticas, se hizo una prueba de Tukey ($p < 0.05$). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software SPSS ver 20 (IBM, Chicago, IL, USA).

Para las variables perfil proteico, alopecia y evaluación histopatológica del hígado, se realizó un análisis descriptivo, considerando los tratamientos a los cuales fueron asignadas las muestras.

VII. RESULTADOS

7.1 Determinación de proteína soluble

Al utilizar el método mecánico con detergente RIPA, se obtuvo una mayor ($p < 0.05$) concentración de proteína soluble del estadio de pupa de *T. molitor*, que con los métodos mecánico con calor y mecánico con amortiguador MET (Tabla 10).

Tabla 10. Concentración de proteína soluble, del estadio de pupa de *T. molitor*, obtenida con diferentes métodos de extracción

Método de extracción	mg mL ⁻¹
Mecánico con detergente RIPA	18.23 ^a
Mecánico con calor	15.74 ^b
Mecánico con amortiguador MET	9.27 ^c

Literales diferentes ^{a,b,c} indican diferencia significativa ($p < 0.05$), mediante la prueba Tukey.
 RIPA :Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM; EDTA 1 mM; NaCl 100 mM; NP-40 1 %
 MET:Manitol, 300mM; EDTA, 5 mM; Tris, 20 mM; pH 7.2

7.2 Determinación de perfil de proteínas

Al utilizar el método mecánico con amortiguador MET, se obtuvo un extracto de proteínas del estadio de pupa de *T. molitor*, que presentó una corrida electroforética con mejor patrón de bandeo, y resolución, además de ser repetible. A diferencia de los extractos de proteínas del estadio de pupa de *T. molitor* obtenidos por los métodos con calor y con detergente RIPA, los cuales presentaron bandas sin definición - con mala resolución y bandas bien definidas con resolución media, respectivamente (Figura 3).

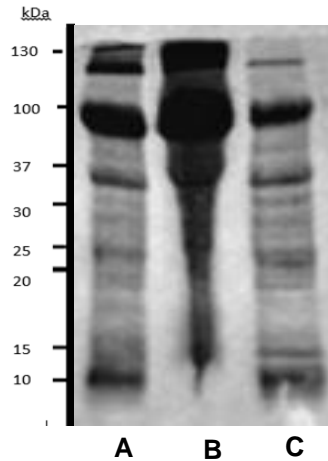


Figura 3. Patrón electroforético de extractos de proteínas del estadio de pupa de *T. molitor*, obtenidos por diferentes métodos de extracción.

La letra A, muestra la columna que corresponde al extracto de proteínas del estadio de pupa de *T. molitor* obtenido por el método mecánico con detergente RIPA (Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM; EDTA 1 mM; NaCl 100 mM; NP-40 1 %); la letra B, el obtenido con calor y la letra C con amortiguador MET (Manitol, 300mM; EDTA, 5 mM; Tris, 20 mM; pH 7.2)

7.3 Condición física de los animales

En la Tabla 11, se muestra el consumo promedio de alimento de cada grupo de ratones *C57BL/6*, sometidos a diferentes tratamientos. En la cual se observa que los animales del grupo de control positivo (con dietilnitrosamina y sin extracto peptídico), consumieron menor cantidad de alimento que aquellos que se encontraban en el grupo control negativo (sin dietilnitrosamina y sin extracto peptídico), tratamiento 1 (con dietilnitrosamina + 60 μg extracto peptídico g^{-1} de alimento) y tratamiento 2 (con dietilnitrosamina + 90 μg extracto peptídico g^{-1} de alimento). Cabe señalar que el grupo control positivo, presentó una mortalidad del 100 %, en la semana 8 del experimento.

Tabla 11. Consumo de alimento de ratones (C57BL/6), utilizados en el modelo experimental de carcinoma hepatocelular

Grupo	g d ⁻¹
Control negativo*	50.03 ^a ± 2.89
Control positivo**	21.48 ^b ± 4.23
Tratamiento 1*	42.99 ^a ± 2.89
Tratamiento 2*	46.08 ^a ± 2.89

Control positivo: Con dietilnitrosamina y sin extracto peptídico

Control negativo: Sin dietilnitrosamina y sin extracto peptídico

Tratamiento 1: Con dietilnitrosamina + 60 µg extracto peptídico g⁻¹ de alimento

Tratamiento 2: Con dietilnitrosamina + 90 µg extracto peptídico g⁻¹ de alimento

Media ± Error estándar

Literales diferentes ^{a, b} indican diferencia significativa (p<0.05), mediante la prueba de Tukey

* Grupo con 5 individuos durante las 12 semanas de experimento

** Grupo con 5 individuos hasta la semana 7 de experimento

En la Figura 4, se muestra el peso de los ratones a través de las 12 semanas de experimento, en la cual se puede observar que los animales del grupo de control positivo (con dietilnitrosamina y sin extracto peptídico), tuvieron una disminución drástica de peso a partir de la tercera semana, lo cual se logró estabilizar de la quinta a la séptima semana, sin embargo, en la octava semana se presentó una mortalidad del 100 % de los animales; de manera similar el tratamiento 2 (con dietilnitrosamina + 90 µg extracto peptídico g⁻¹ de alimento), presentó una disminución de peso hasta la semana siete, sin embargo, se logró estabilizar hasta la semana 8 e incremento ligeramente hasta la décima semana, que alcanzó la estabilidad; en cambio, en el grupo de control negativo (sin dietilnitrosamina y sin extracto peptídico) y el tratamiento 1 (con dietilnitrosamina + 60 µg extracto peptídico g⁻¹ de alimento), se mantuvo un incremento constante de peso, durante todo el experimento, excepto en la quinta semana, en la cual, se registró una ligera disminución de peso; sin embargo presentaron un claro incremento de peso entre la semana 7 y la 12.

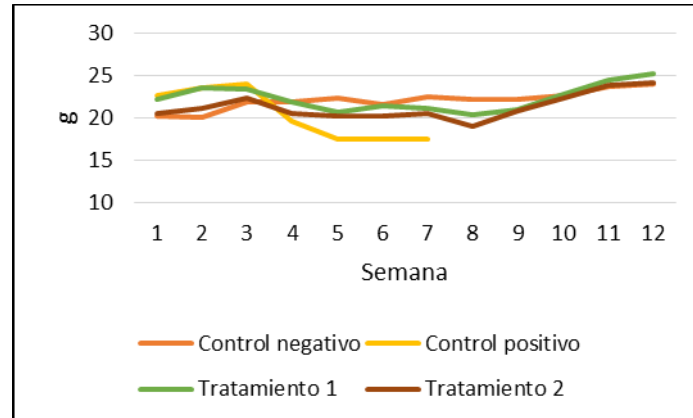


Figura 4. *Peso semanal de ratones (C57BL/6), utilizados en el modelo experimental de carcinoma hepatocelular*

Control positivo: Con dietilnitrosamina y sin extracto peptídico

Control negativo: Sin dietilnitrosamina y sin extracto peptídico

Tratamiento 1: Con dietilnitrosamina + 60 µg extracto peptídico g⁻¹ de alimento

Tratamiento 2: Con dietilnitrosamina + 90 µg extracto peptídico g⁻¹ de alimento

Al analizar el peso promedio global de las 12 semanas del experimento, se encontró que el peso de los animales del grupo control positivo (con dietilnitrosamina y sin extracto peptídico) y el tratamiento 2 (con dietilnitrosamina + 90 µg extracto peptídico g⁻¹ de alimento), fue menor ($P < 0.05$), que el presentado en el grupo del control negativo (sin dietilnitrosamina y sin extracto peptídico) y el tratamiento 1 (con dietilnitrosamina + 60 µg extracto peptídico g⁻¹ de alimento) (Tabla 11).

Tabla 12. *Peso de ratones (C57BL/6), utilizados en el modelo experimental de carcinoma hepatocelular*

Grupo	Control negativo
Control negativo	22.30 ^a ± 0.28
Control positivo	21.10 ^b ± 0.41
Tratamiento 1	22.66 ^a ± 0.30
Tratamiento 2	21.58 ^b ± 0.29

Control positivo: Con dietilnitrosamina y sin extracto peptídico

Control negativo: Sin dietilnitrosamina y sin extracto peptídico

Tratamiento 1: Con dietilnitrosamina + 60 µg extracto peptídico g⁻¹ de alimento

Tratamiento 2: Con dietilnitrosamina + 90 µg extracto peptídico g⁻¹ de alimento

Media ± Error estándar

Literales diferentes ^{a, b} indican diferencia significativa (p<0.05), mediante la prueba de Tukey

En la Figura 5, se puede observar la ausencia de alopecia en el ratón del grupo de control negativo (sin dietilnitrosamina y sin extracto peptídico); de manera contraria a lo que se percibe en el animal del grupo de control positivo (con dietilnitrosamina y sin extracto peptídico), tratamiento 2 (con dietilnitrosamina + 90 µg extracto peptídico g⁻¹ de alimento) y tratamiento 1 (con dietilnitrosamina + 60 µg extracto peptídico g⁻¹ de alimento), los cuales muestran un nivel de alopecia máxima, media y mínima, respectivamente.

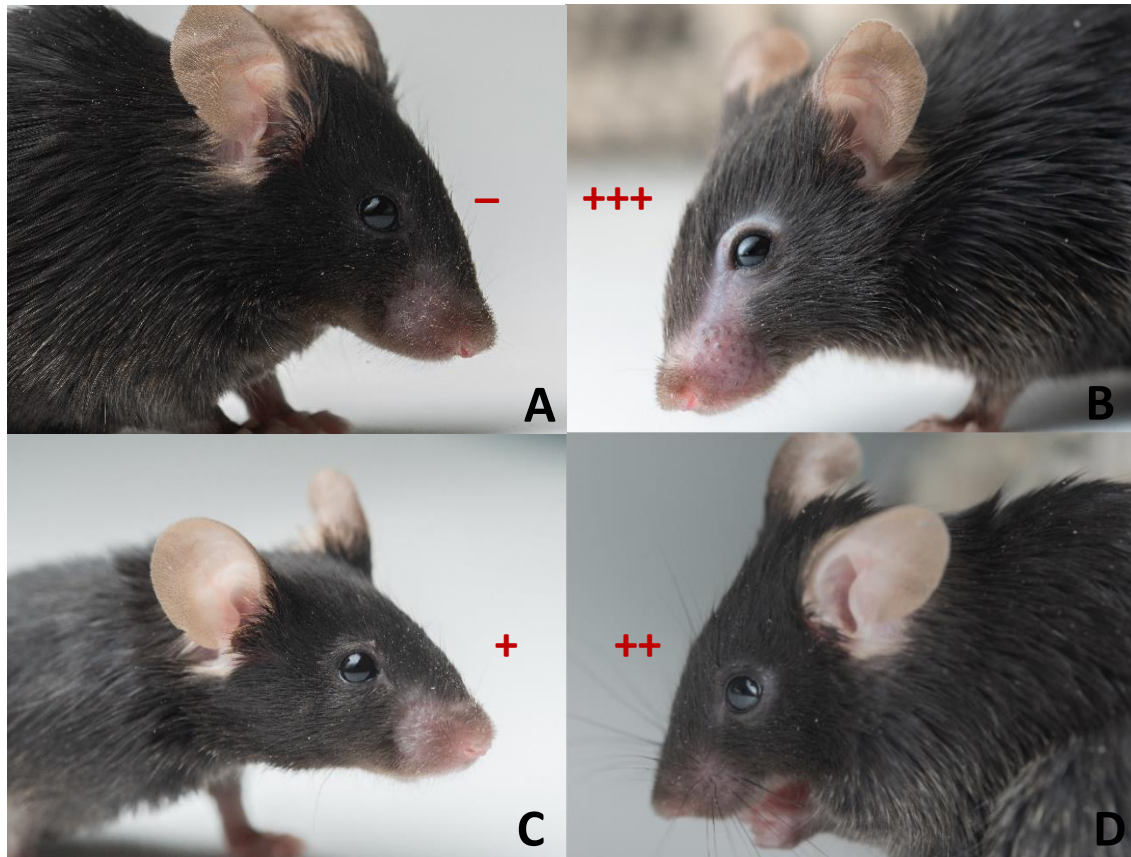


Figura 5. Nivel de alopecia en ratones C57BL/6, presentada en la semana 7 de la inducción de carcinoma hepatocelular

- A. Animal del grupo control negativo (sin dietilnitrosamina y sin extracto peptídico)
 - B. Animal del grupo control positivo (con dietilnitrosamina y sin extracto peptídico)
 - C. Animal del grupo del tratamiento 1 (con dietilnitrosamina + 60 μg extracto peptídico g^{-1} de D. alimento)
 - D. Animal del grupo del Tratamiento 2 (con dietilnitrosamina + 90 μg extracto peptídico g^{-1} de alimento)
- Nivel de alopecia: - nulo, + mínimo, ++ medio, +++ máximo

7.4 Histopatología

7.4.1 Tinción Hematoxilina y Eosina

En la Figura 6 se muestran hígados de animales de los 4 distintos tratamientos a un aumento de 100 x. El control negativo (sin dietilnitrosamina y sin extracto

peptídico) -Fig. 6A- presentó arquitectura tisular normal, con sus hepatocitos con citoplasma homogéneo, con pequeñas vacuolas y partículas acidófilas y núcleo(s) con cromatina dispersa y nucléolo(s) aparentes. En algunos animales se observó hiperemia moderada. El control positivo (con dietilnitrosamina y sin extracto peptídico) -Fig. 6B- presentó pérdida estructural de los cordones de hepatocitos y forma de los lobulillos hepáticos en zonas amplias del órgano. Se observa necrosis hepática, con picnosis, cariólisis, cariorexis y anisocariosis. Los hepatocitos presentan un citoplasma acidófilo con vacuolas dispersas; muchos de ellos están fusionados entre sí. También se observan fragmentos citoplásmicos aislados, así como pérdida de la forma celular, muchas de ellas se observan redondeadas o bien, pleomórficas. Se observa hiperemia severa en el tejido y moderada infiltración de neutrófilos. El tratamiento 1 (con dietilnitrosamina + 60 μg extracto peptídico g^{-1} de alimento) -Fig. 6C- presentó pérdida ligera de la arquitectura tisular, con sus hepatocitos con vacuolización y presencia de hiperemia en venas centrales. El tratamiento 2 (con dietilnitrosamina + 90 μg extracto peptídico g^{-1} de alimento) -Fig. 6D- conserva mayoritariamente la arquitectura tisular del órgano, aunque hay algunas zonas con hepatocitos redondeados, con vacuolas en su citoplasma y anisocariosis, también se observa hiperemia severa. Cabe mencionar que un animal de este grupo (20 %) presentó mayor daño tisular, con cambios similares a los del control positivo.

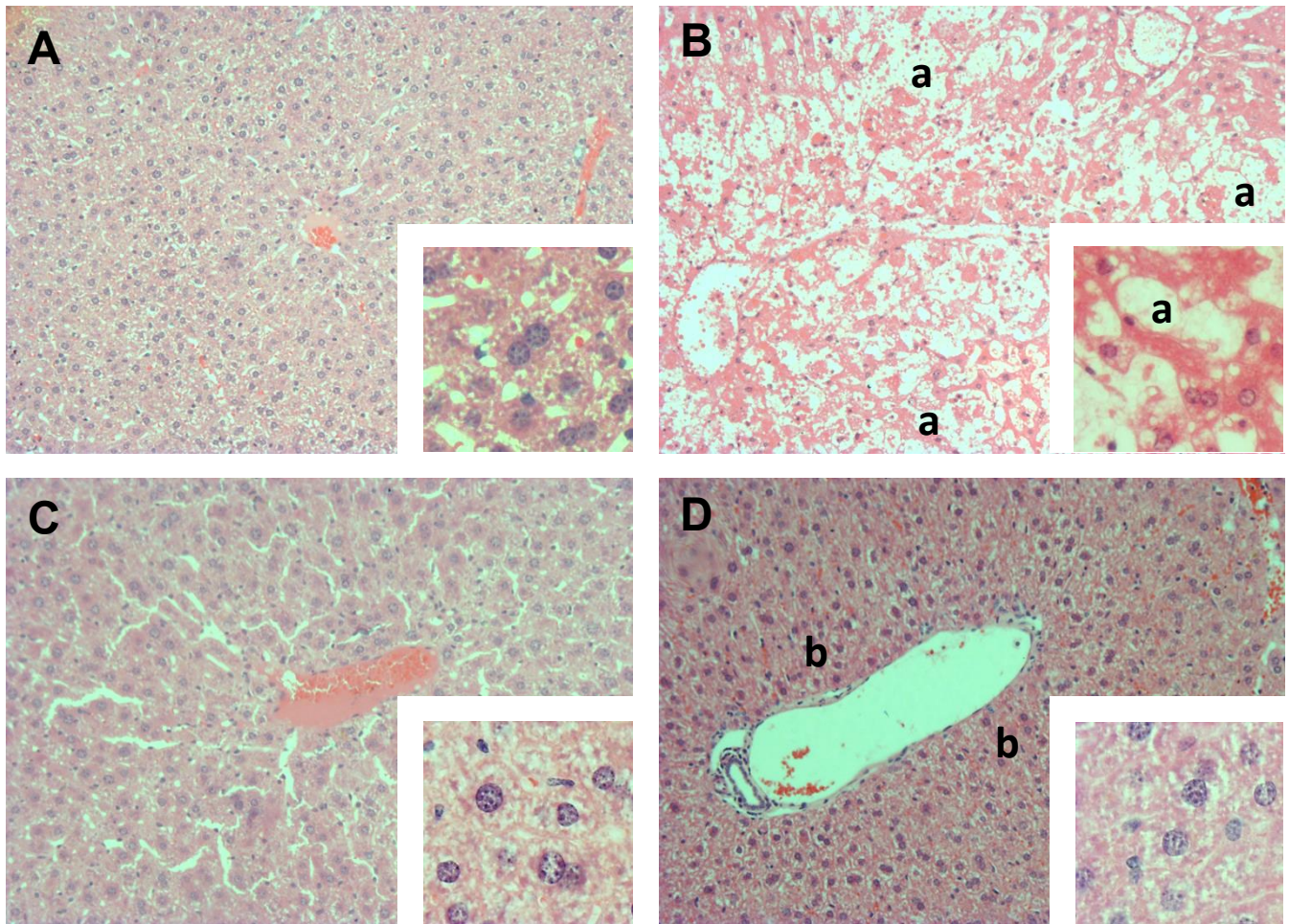


Figura 5. Hígado de ratón C57BL/6 (H-E). 100x. Recuadros 400x

A. Control negativo. Arquitectura tisular normal, sin cambios. **B. Control positivo.** Se observan grandes zonas de hepatocitos vacuolados y pleomórficos (a) con disrupción de los cordones de hepatocitos. **C. Tratamiento 1.** Los cambios tisulares son mínimos, con algunos hepatocitos vacuolados y aumento del diámetro de los capilares sinusoides. **D. Tratamiento 2.** Tejido hepático de aspecto normal, salvo por algunas zonas con hepatocitos vacuolados (b).

Control positivo: Con dietilnitrosamina y sin extracto peptídico

Control negativo: Sin dietilnitrosamina y sin extracto peptídico

Tratamiento 1: Con dietilnitrosamina + 60 μg extracto peptídico g^{-1} de alimento

Tratamiento 2: Con dietilnitrosamina + 90 μg extracto peptídico g^{-1} de alimento

7.4.2 Tinción Tricrómica de Gomori

Como se puede observar en la Figura 7, los hígados de animales del control negativo (sin dietilnitrosamina y sin extracto peptídico), tratamiento 1 (con dietilnitrosamina + 60 μg extracto peptídico g^{-1} de alimento) -Fig. 7A- y tratamiento 2 (con dietilnitrosamina + 90 μg extracto peptídico g^{-1} de alimento) - Fig. 7B- presentaron una arquitectura tisular normal, con sus hepatocitos con citoplasma rojizo-violeta, con vacuolas pequeñas, gránulos rojizos y núcleos en tonalidad violácea, con partículas cromatínicas y nucléolo(s) visibles. Sólo se observa colágena en pequeñas cantidades, asociada al subendotelio de los vasos sanguíneos. Hiperemia moderada asociada a algunas venas centrales.

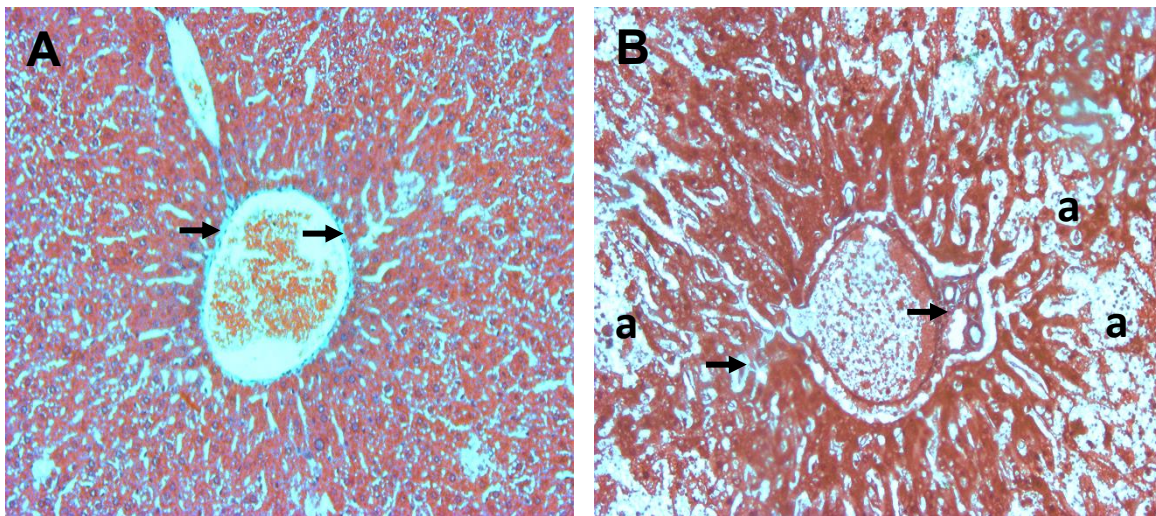


Figura 6. Hígado de ratón C57BL/6 (Tricrómica de Gomori). 100X.

A. Control negativo: La arquitectura tisular es normal, la presencia de colágena (azul) está restringida a los espacios subendoteliales de los vasos sanguíneos (flechas). **B. Control positivo:** Aunque la arquitectura tisular está visiblemente alterada, con grandes zonas de hepatocitos vacuolados (a), la fibrosis es muy escasa, estando la colágena visible de nuevo en asociación con los vasos sanguíneos (flechas).

Control positivo: Con dietilnitrosamina y sin extracto peptídico
 Control negativo: Sin dietilnitrosamina y sin extracto peptídico

Aunado a lo descrito previamente, en el grupo control positivo (con dietilnitrosamina y sin extracto peptídico), se observan pequeñas zonas con proliferación de colágena, asociadas a los canales portales.

VIII. DISCUSIÓN

8.1 Determinación de proteína soluble

Debido a que los péptidos bioactivos son secuencias de aminoácidos inactivos dentro de la proteína, al ser liberados por la desnaturalización, confieren diferentes actividades biológicas, por ende, al cuantificar la proteína soluble contenida en los extractos proteicos obtenidos por diferentes métodos, se conoce de manera indirecta el rendimiento que ofrecen estos (Martínez et al., 2019). Al utilizar los métodos mecánicos con detergente RIPA (Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM; EDTA 1 mM; NaCl 100 mM; NP-40 1 %), con calor y con amortiguador MET (Manitol, 300mM; EDTA, 5 mM; Tris, 20 mM; pH 7.2), se obtuvo 9.1, 7.8 y 4.6 g por cada 100 g de insecto, respectivamente; valores menores a los obtenidos por Yi et al., (2013 y 2017), 19.6 y 11.6 g por cada 100 g de insecto, en extracto proteico de larva. Y mayores a lo obtenido por Avelino et al., (2000) quienes obtuvieron de 4.7 a 8 g por cada 100 g de pupa de *Catolacsus grandis burks*, insecto himenóptero. Considerando que la solubilidad de la proteína, está directamente relacionada con el pH, la temperatura y el tiempo de extracción al obtener mayor ($P < 0.05$) concentración (Tabla 10) de proteína soluble del extracto proteico de estadio de pupa de *T. molitor*, al utilizar el método RIPA (Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM; EDTA 1 mM; NaCl 100 mM; NP-40 1 %), coincide con lo reportado Yi et al., (2017), quienes al obtener un extracto proteico de larva de *T. molitor*, demostraron que al utilizar pH entre 6 y 11 se obtenía mayor solubilidad de la proteína, la cual se favorece por la formación de aminoácidos cargados con mayor punto isoeléctrico provocado repulsión electrostática.

Aunque el amortiguador de MET se manejó a un pH de 7.2, al tener menor concentración de Tris y EDTA, la concentración de proteína soluble fue menor ($P < 0.05$). En cambio, al utilizar una temperatura de 45 °C en el método mecánico con calor, se obtuvo una concentración intermedia de proteína soluble, al compararlo con los métodos, en los que no se incrementó la temperatura, debido a que para lograr una mejor solubilidad proteica se necesita entre 30 y 60 °C (Urribarrí et al., 2004).

8.2 Determinación de perfil de proteínas

Aunque con el método mecánico de extracción proteica del estadio de pupa de *T. molitor* con detergente RIPA (Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM; EDTA 1 mM; NaCl 100 mM; NP-40 1 %), se obtuvo una mayor concentración de extracto proteico, al realizar su corrida electroforética, el patrón de bandeo se mostró con menor resolución, debido a que contiene Tris el cual al ser un *buffer zwitteriónico* empleado comúnmente para la separación de péptidos y proteínas por ser de baja conductividad permite reducir el calentamiento por efecto joule, sin embargo al combinarlo con cloruros y fosfatos se afecta la conformación de las proteínas e impacta sobre su separación (Castagnino, 2000). En cambio, al utilizar para la extracción proteica del estadio de pupa de *T. molitor* el amortiguador con MET (Manitol, 300mM; EDTA, 5 mM; Tris, 20 mM; pH 7.2), prevalece el beneficio de utilizar Tris por su baja conductividad, permitiendo la separación de las proteínas en bandas bien definidas, ya que no incluye cloruros ni sulfatos (Figura 3). Por tal motivo este método de extracción fue el seleccionado para realizar el

aislamiento del extracto peptídico de pupa de *T. molitor*, con un rango de 65-110 kDa. Considerando lo obtenido por Yi et al., (2013), quienes evaluaron el perfil proteico del estadio de larva de *T. molitor*, encontrando un patrón de bandeo de <14, 14-32, 32-95 y >95 kDa, relacionando que de 8.5 a 13 kDa son proteínas internas incluida la hemolinfa, de 14 a 32 kDa de cutícula y de 32 a 95 kDa posiblemente sean proteínas ligadas a enzimas y otras proteínas (43 kDa- proteína inhibidora de la melanización, 59 kDa- β -glicosidasa, 85 kDa- proteínas que participan en la melanización). Al observar (Figura 3) el patrón de bandeo del extracto proteico de la pupa de *T. molitor* obtenido con el método con amortiguador MET (pH 7.2) se aprecia que existe una mayor expresión de bandas en el rango de 65 a 110 kDa, lo cual coincide con lo reportado por Yi et al., (2017) quienes con un pH entre 7-8, muestran mayor expresión de bandas en el rango de 45-120 kDa.

8.3 Condición física de los animales

Durante la evaluación experimental de carcinoma hepatocelular, los animales del grupo de control positivo (con dietilnitrosamina y sin extracto peptídico) consumieron menor ($P < 0.05$) cantidad de alimento (Tabla 11) lo cual provoco una disminución de peso (Figura 4) a partir de la semana tres y el 100 % de mortalidad en la semana ocho en ratón, lo cual se explica por la fisiopatología de la caquexia neoplásica descrita por Argíles et al., (2006), quienes explican que existe una relación entre la etapa del cáncer y la falta de apetito, a medida que avanza el cáncer, se incrementa la probabilidad de padecer anemia, causando

fatiga crónica, náuseas, vómitos e ictericia, debido a que mecanismos como la producción de bilis, glucogénesis y regulación de niveles de aminoácidos en sangre, se ven afectados durante el proceso tumoral. Ya que la regulación del apetito está controlada por factores gastrointestinales, metabólicos, nutricionales y neuronales, que al ser alterados por el cáncer los pacientes oncológicos presentan una sensación de saciedad precoz y con ello la disminución del apetito. Aunado a la pérdida de apetito causada, por el mal funcionamiento del hígado, con presencia de dolor lo cual puede presentar un deterioro cerebral, ya que el hígado no elimina las sustancias tóxicas que al acumularse en la sangre, causa encefalopatía hepática (Pereira y Zubizarreta, 2006). La malnutrición debida a una menor ingesta de alimentos agrava el estado caquéctico, propiciando la muerte del paciente (Argilés et al., 2006).

De manera contraria los animales de los grupos, tratamiento 1 (con dietilnitrosamina + 60 μg extracto peptídico g^{-1} de alimento) y tratamiento 2 (con dietilnitrosamina + 90 μg extracto peptídico g^{-1} de alimento), durante la evaluación experimental de carcinoma hepatocelular, consumieron mayor ($P < 0.05$) cantidad de alimento (Tabla 11), lo que permitió que incrementaran su peso (Figura 4) de la semana 7 a la 12, amortiguando las caídas ligeras de peso de la semana 5 a la 7, en comparación con los animales del grupo control positivo (con dietilnitrosamina y sin extracto peptídico); sin presentar diferencia con el control negativo (sin dietilnitrosamina y sin extracto peptídico). Lo cual se puede explicar debido a que al consumir vía oral péptidos bioactivos (contenidos en el extracto peptídico de pupa de *T. molitor*) pueden actuar de manera local en el aparato digestivo o sobrepasarlo hasta llegar a tejidos periféricos a través del

sistema cardiovascular y ejercer sus propiedades fisiológicas en otros aparatos o sistemas, como el propio sistema cardiovascular (incluyendo órganos y estructuras linfoides), el aparato digestivo y el sistema nervioso (Martínez et al., 2019), lo cual puede ejercer un efecto terapéutico evitando que se desarrolle la caquexia neoplásica. Se conocen terapias alternativas y complementarias que ayudan a disminuir hasta tres cuartas partes los signos indeseables que trae consigo el cáncer y la quimioterapia, un ejemplo de esto es la Dieta de Gerson, la cual se basa en proporcionar los nutrientes adecuados para el mantenimiento de energía, salud y bienestar, la desintoxicación del cuerpo a través de los alimentos igual está implícita dentro de este régimen, disminuyendo menor necesidad a tratamientos analgésicos (Gómez-Navarro, 2000).

Al realizar la exploración física de los animales del grupo control positivo, tratamiento 2 y tratamiento 1, en la semana 7 de la inducción de hepatocarcinoma celular, mostraron un nivel de alopecia máximo, medio y mínimo, respectivamente (Figura 5); al ser la alopecia un signo de padecimiento oncológico que se desarrolla como resultado de la caquexia cancerosa, que se caracteriza por debilidad, pérdida marcada y progresiva de peso corporal, grasa y masa muscular, anorexia, saciedad precoz; afectación rápida del estado general, lo que lleva a la alopecia por las alteraciones metabólicas como son la anemia, edemas, déficit vitaminas, alteración hidroelectrolíticas y déficit inmunológico (García-Luna, 2006), por tal motivo cuando los animales consumieron el extracto peptídico de pupa de *T. molitor* se disminuyeron las alteraciones metabólicas y se fortaleció su sistema inmunológico, sin embargo fue más efectiva la inclusión de 60 μg que 90 μg extracto peptídico g^{-1} de

alimento, posiblemente a un proceso de hormesis, que se refiere a una dosis-respuesta bifásica a un agente ambiental caracterizada por un efecto benéfico con dosis baja y uno inhibitorio o tóxico con dosis alta (Mattson, 2008).

8.4 Histopatología

8.4.1 Tinción Hematoxilina y Eosina y Tricrómico de Gomori

Al teñir con H-E los hígados de animales del grupo control positivo (con dietilnitrosamina y sin extracto peptídico) (Figura 6B) de la evaluación experimental de carcinoma hepatocelular, se observó pérdida estructural de los cordones de hepatocitos y forma de los lobulillos hepáticos en zonas amplias del órgano, necrosis hepática, con picnosis, cariólisis, cariorexis y anisocariosis, hepatocitos con citoplasma acidófilo, vacuolas dispersas; fusionados entre sí, así como fragmentos citoplásmicos aislados, pérdida de la forma celular, pleomórficas, con hiperemia severa en el tejido y moderada infiltración de neutrófilos; similar a lo encontrado en los hígados de animales del tratamiento 2 (con dietilnitrosamina + 90 μg extracto peptídico g^{-1} de alimento) (Figura 6D), en lo referente a la presencia de hiperemia severa, zonas con hepatocitos redondeados, con vacuolas en su citoplasma y anisocariosis, aunque, se conserva mayoritariamente la arquitectura tisular del órgano; lo cual se puede explicar debido a que la dietilnitrosamina (DEN) administrada durante el protocolo de inducción a carcinoma hepatocelular, a una dosis de 20 mg kg^{-1} de peso vivo, promueve especies reactivas de oxígeno y producción de 4-hidroxinenal, infiltrado inflamatorio de proliferación celular y fibrosis, que induce

cáncer de hígado (Fuentes-Hernández et al., 2019), la fibrosis hepática se considera una respuesta para la cicatrización, tiene el propósito de limitar el daño tisular producido por lesiones hepáticas, pero cuando es persistente, como la inducción de carcinoma hepatocelular con DEN, puede producir alteración de la arquitectura hepática por la aparición de cirrosis, la cual se caracteriza por bandas de fibrosis, nódulos parenquimatosos de regeneración y distorsión vascular (Páramo et al., 2010). Aunado a ello el dolor causado por el cáncer depende de la etapa y extensión de este, sin embargo, esto varía dependiendo del individuo, la DEN causa un daño estructural importante desde la primera administración (Martínez de Morentín y Hernández, 1970), por otro lado el estrés oxidativo generado por el metabolismo de DEN tiende a aumentar gradualmente, causando necrosis hepática (Delgado y Mas, 2013). Por tal motivo, se puede llegar a una mortalidad del 45 %, como lo menciona Martínez de Morentín y Hernández (1970) en ratas inducidas con DEN en la semana 20, sin embargo, en esta investigación, fue en la semana 8, cuando los animales del grupo control positivo, presentaron mortalidad del 100 %.

Contrario a lo observado en los hígados de animales del control positivo, en el grupo del tratamiento 1 (con dietilnitrosamina + 60 µg extracto peptídico g⁻¹ de alimento) (Figura 6C), los cuales presentaron solo pérdida ligera de la arquitectura tisular, con vacuolización de hepatocitos y presencia de hiperemia en venas centrales, lo cual puede explicarse gracias al posible efecto terapéutico del extracto peptídico del estadio de pupa de *T. molitor* incluido en el alimento consumido durante 11 semanas de la evaluación experimental de carcinoma hepatocelular, ya que como mencionan Martínez et al., (2019) los péptidos

bioactivos debido a su especificidad, amplio espectro, diversidad estructural, bajos niveles de toxicidad y acumulación en tejidos tienen la capacidad de proveer de efectos benéficos en el sistema cardiovascular, el aparato digestivo, el sistema nervioso y los diversos órganos y estructuras linfoides responsables de la respuesta inmunológica, como puede ser el caso de péptidos obtenidos de insectos, de los cuales se ha reportado que ofrecen beneficios para contrarrestar la anemia, así como un efecto anticancerígeno (Seabrooks y Longqin, 2017), por tal motivo ha tenido relevancia la coleóptero-terapia, que es el consumo de coleópteros que han mostrado tener un efecto citotóxico frente a células cancerígenas, un ejemplo de esto es el consumo de *Ulomoides dermestoides* y coleópteros de la familia *Cantharidae* usados en el tratamiento del cáncer de pulmón e hígado (Deloya-Brito y Deloya, 2014). Por tal motivo, el extracto proteico de *T. molitor*, puede ser una opción de terapia complementaria, ya que ayudó a mantener la integridad del tejido, lo cual permitió evitar la mortalidad de los animales a los cuales se les indujo el carcinoma hepatocelular, al evitar la progresión rápida de la enfermedad, como lo mencionan Kosola et al. (2001).

IX. CONCLUSIONES

El método mecánico con amortiguador MET (Manitol, 300mM; EDTA, 5 mM; Tris, 20 mM; pH 7.2), permite aislar un extracto peptídico del estadio de pupa de *T. molitor* en un rango de 65-110 kDa, factible de ser utilizado en alimentos funcionales para el tratamiento complementario de carcinoma hepatocelular.

La utilización de un alimento funcional que contenga un extracto peptídico obtenido del estadio de pupa de *T. molitor*, es una alternativa viable de tratamiento complementario de carcinoma hepatocelular, ya que evita la presencia de alopecia, contribuye a estabilizar el consumo de alimento y el peso corporal, además de mantener la arquitectura tisular del hígado.

X. PERSPECTIVAS

Para posteriores investigaciones, se recomienda hacer más evaluaciones experimentales de la dosis del extracto peptídico de estadio de pupa de *T. molitor* (65 a 110 kDa) y su respuesta al carcinoma hepatocelular, debido a su posible mecanismo de hormesis.

Así como evaluar extractos peptídicos de pupa de *T. molitor* con diferentes rangos de peso molecular, y sus efectos sobre el carcinoma hepatocelular, para ofrecer mayores opciones de alimentos funcionales o farmacéuticos.

XI. LITERATURA CITADA

- ABTA. (5 de Mayo de 2014). *American brain tumor association* Recuperado el 10 de septiembre de 2019 de <https://www.abta.org/about-brain-tumors/brain-tumor-diagnosis/brain-tumor-types/>
- ACS. (24 de Mayo de 2016). *Asociación americana de cáncer*. Recuperado el 14 de Agosto de 2019 de <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-higado/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/senales-sintomas.html>
- Alvídrez-Morales, A., González-Martínez, BE, y Jiménez-Salas, Z. (2002). Tendencias en la producción de alimentos: Alimentos funcionales. *Revista Salud pública y nutrición*, 3 (3).
<https://www.medigraphic.com/pdfs/revsalpubnut/spn-2002/spn023g.pdf>
- Argilés, JM, Busquets, S., López-Soriano, FJ, y Figueras M. (2006). Fisiopatología de la caquexia neoplásica. *Nutrición Hospitalaria*, 21 (3), 4-9. <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/3727.pdf>
- Avelino, ALH, Alvarez, GA, y Aranda, HE. (2000). Contenido de los nutrientes básicos en *Catolaccus grandis burks* criados sobre larvas del picudo del algodón. *Pesq. Agropec. Bras*, 35 (9). <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2000000900001>
- Azagoh, C., Ducept, F., Garcia, R., Rakotozafy, L., Cuvelier, ME, Keller, S., Lewandowski, S., Mezdour, S. (2016). Extraction and physicochemical

characterización of *Tenebrio molitor* proteins. *Food Research International*.
88, 24-31. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.06.010>

Barrientos, JA. (2004). Curso práctico de entomología. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, 1(36), 373. <http://sea-entomologia.org/PDF/GeneralInsectorum/GE-0053.pdf>

Blanco, MDA, y Giraldo, CDF. (2016). *Desarrollo de una barra tipo granola a base de harina de grillo Acheta domesticus como principal fuente proteica*. Universidad de La Salle, Facultad de Ingeniería, Programa de Ingeniería de Alimentos. Tesis Ingeniero (a) de Alimentos. Bogotá D.C., Colombia, 93p.

https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1064&context=in_g_alimentos

Bovera, F., Loponte, R., Marono, S., Piccolo, G., Parisi, G., Laconisi, V., Gasco, L., Nizza, A. (2016). Use of *Tenebrio molitor* larvae meal as protein source in broiler diet: effect on growth performance, nutrient digestibility, and carcass and meat traits. *Journal of Animal Science*, 94(2), 639-647. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9201>

Borja, LJE. (2014). *Obtención de péptidos bioactivos de Lupinus mutabilis ("tarwi") mediante proteasas de Bacillus sp.* Universidad Nacional Mayor De San Marcos Facultad De Farmacia y Bioquímica E.A.P. De Farmacia y Bioquímica, 106 p.

http://201.159.223.26/pdfs/Contenido_1/Tesis_Jackeline_Elena.pdf

- Bradford, MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2), 248-254.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bukkens, SGF. (1997). The nutritional value of edible insects. *Ecology of Food and Nutrition*, 36 (2-4), 287-319.
<https://doi.org/10.1080/03670244.1997.9991521>
- Burgess, RR. (2009). Elution of proteins from gels. In: Guide to protein purification. *Methods in Enzymology*. 463, 565-572.
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63032-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63032-9)
- Cahuich-Campos, D., y Flores, GF. (2014). Entomoterapia: curaciones entre los antiguos pueblos mayas de la península de Yucatán, México. *Ressources du vivant, ELOHI, Peuples indigenes et environnement*, (5-6), 39-54.
<https://doi.org/10.4000/elohi.712>
- Castagnino, JM. (2000). Electroforesis capilar. *Bioquímica*, 25 (1), 13-32. [fecha de Consulta 12 de Septiembre de 2020]. ISSN: 0185-5751. Disponible en:
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=576/57611797003>
- Castro-León, CA, Cervantes-Mayagoitia, JF, Schettino-Bermúdez, BS, Noguera-Hernández, N. (2017). Comparación de cinco dietas alimenticias en la cría de *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) *Entomología Mexicana*, 4, 616-620.
http://www.entomologia.socmexent.org/revista/2017/EV/EM0772017_616-620.pdf

Celaya, EX, (02 de octubre de 2014). C Cáncer de hígado: Un mal prevenible.

La Jornada.

<https://www.jornada.com.mx/2014/10/02/Iscontra.html#:~:text=C%C3%A1ncer%20de%20h%C3%ADgado%3A%20un%20mal%20prevenible&text=En%20M%C3%A9xico%20se%20reportan%20al,ciento%20del%20total%20de%20decesos.>

Connat, JL, Delbecq, JP., Glitho, I., Delachambre, J. (1991). The onset of metamorphosis in *Tenebrio molitor* larvae (*Insecta, Coleoptera*) under grouped, isolated and starved conditions. *Journal of Insect Physiology*, (37), 653-662. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(91\)90042-X](https://doi.org/10.1016/0022-1910(91)90042-X)

Costa-Neto, E. M. (2005). Entomotherapy, or the medicinal use of insects. *Journal of Ethnobiology*, 25(1), 93-114. [https://doi.org/10.2993/0278-0771\(2005\)25\[93:EOTMUO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2993/0278-0771(2005)25[93:EOTMUO]2.0.CO;2)

Costa-Neto, EM., y Oliveira, MVM. (2000). Cockroach is Good for Asthma: Zootherapeutic Practices in Northeastern Brazil. *Research in Human Ecology*, 7(2), 41-51. DOI: 10.2307/24706947

<http://www.humanecologyreview.org/pastissues/her72/72costanetooliveira.pdf>

Costa NEM., Ramos-Elorduy, J., y Pino, JM. (2006). Los insectos medicinales de Brasil: primeros resultados. *Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa*, 1(38), 395-414.

<http://sea-entomologia.org/PDF/GeneralInsectorum/GE-0062.pdf>

- Costa, NEM., y Pacheco, JM. (2005). Utilização medicinal de insetos no povoado de Pedra Branca, Santa Teresina, Bahia, Brasil. *Biotemas*. 18 (1), 113-133.
https://www.researchgate.net/publication/237666418_Utilizacao_medicinal_de_insetos_no_povoado_de_Pedra_Branca_Santa_Terezinha_Bahia_Brasil
- Dammak, M., Tounsi, S., Rouis, S., y Jaoua, S. (2010). Comparative study of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ia and Cry1Aa delta-endotoxins: Activation process and toxicity against *Prays oleae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 104, 39-43. doi.10.1016/j.jip.2010.01.006
- Delgado, CBA, y Mas, OJ. (2017). Avances en el Estudio Experimental de la Bioquímica hepática. *Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México*. 189 p.
http://www.ifc.unam.mx/docencia/pdf/bioquimica_hepatica.pdf
- Deloya-Brito, GG, y Deloya, C. (2014). Sustancias producidas por el coleóptero *Ulomoides dermestoides* (Chevrolat, 1878) (Insecta: Coleoptera: Tenebrionidae): efecto anti-inflamatorio y citotóxico. *Acta Zoológica Mexicana*, 30 (3), 655-661.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0065-17372014000300014
- Die, TM. (2003). Influencia de la cultura en la experiencia del cáncer. *Psicooncología*, 0(1), 39-48.

http://www.seom.org/seomcms/images/stories/recursos/sociosyprofs/documentacion/psicooncologia/numero1_vol0/articulo3.pdf

FEDNA. (07 de Mayo de 2019). Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Recuperado el 10 de agosto de 2020 de <http://www.fundacionfedna.org/tablas-fedna-composicion-alimentos-valor-nutritivo>

Feng, S. (2018). *Tenebrio molitor*, entomophagy and processing into ready to use therapeutic ingredients. *Journal of nutritional health y food engineering*, 8 (3), 280-285.

<http://medcraveonline.com/JNHFE/JNHFE-08-00283.pdf>

Figueras, J., Torras, J., Valls, C., Ramos, E., Lama, C., Busquets, J., Lladó, L., Rafecas, A., Fabregat, J., Serrano, T., López, S., Martí-Rague, J., y Jaurrieta, E. (2001). Resección de metástasis hepáticas de carcinoma colorrectal. Índice de reseccabilidad y supervivencia a largo plazo. *Cirugía Española*, 70 (1), 27-33. [https://doi.org/10.1016/S0009-739X\(01\)71836-2](https://doi.org/10.1016/S0009-739X(01)71836-2)

Forner, A., Reig, M., Varela, M., Burrel, M., Feliu, J., Briceño, J., Sastre, J., Martí-Bonmati, L., Llovet, JM, Bilbao, JI, Sangro, B., Pardo, B., Ayuso, C., Bru, C., Tabernero, J., y Bruix, J. (2016). [Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. Update consensus document from the AEEH, SEOM, SERAM, SERVEI and SETH]. *Med. Clin. (Barc)*, 146(11), 511-522. DOI: 10.1016/j.medcli.2016.01.028

Fraenkel, G., Blewett, M., y Coles, M. (1950). The Nutrition of the Mealworm, *Tenebrio molitor* L. (Tenebrionidae, Coleoptera). *Physiological Zoology*, 23 (2), 92-102.

<https://www.journals.uchicago.edu/doi/10.1086/physzool.23.2.30152067>

Fuentes-Hernández, S., Alarcón-Sánchez, B., Guerrero-Escalera, D., Montes-Aparicio, A., Castro-Gil, M., Idelfonso-García, O., Rosas-Madrigal, S., Aparicio- Bautista, DI, Pérez-Hernández, JL, Reyes-Gordillo, K., Raj-Lakshman, M., Vásquez-Garzón, VR., Baltiérrez-Hoyos, R., López-González, ML., Sierra-Santoyo, A., Villa-Treviño, S., Pérez-Carreón, J., Arellanes-Robledo, J. (2019). Chronic administration of diethylnitrosamine to induce hepatocarcinogenesis and to evaluate its synergistic effect with other hepatotoxins in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 378. <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2019.114611>

García, MD. (2018). *Efecto de una bebida a base de Tenebrio molitor, sobre la hepatocarcinogénesis experimental en el ratón*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Tesis de Maestría en Ciencia de los Alimentos. 67 p. <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/handle/231104/2404>

García-Luna, PP, Parejo, CJ, y Pereira, CJL. (2006). Causas e impacto clínico de la desnutrición y caquexia en el paciente oncológico. *Nutrición Hospitalaria*, 21(3), 10-16.

http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112006000600003

- Gaviria, AM, Vinaccia, S., Riveros, M., y Quiceno, JM. (2007). Calidad de vida relacionada con la salud, afrontamiento del estrés y emociones negativas en pacientes con cáncer en tratamiento quimioterapéutico. *Psicología desde el Caribe*, (20), 50-75.
<https://www.redalyc.org/pdf/213/21302004.pdf>
- Gómez-Navarro, AG. (2000). Oncología y terapia Gerson. La desintoxicación nutricional como base del tratamiento del cáncer. *Natura medicatrix*, 60, 21-30. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4989588>
- Gómez-Senenta, S., Gómez RC, y Segura CJM. (2007). Guía para el diagnóstico, estadificación y tratamiento del hepatocarcinoma. *Medicina clínica*, 128 (19), 741-748. <https://doi.org/10.1157/13106134>
- Gómez-Villanueva, A., Chacón, SJ, Santillán, AL, Sánchez, GY, Romero-Figueroa, MS. (2014). Incidencia de cáncer en una Unidad de Atención Oncológica del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), en Toluca, Estado de México. *Gaceta médica de México*, 150, 297-303.
<https://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2014/gm144d.pdf>
- Guzmán-Mendoza, R., Calzontzi-Marín, J., Salas-Araiza, MD, y Martínez-Yañez, R. (2016). La riqueza biológica de los insectos: análisis de su importancia multidimensional. *Acta zoológica mexicana*, 32 (3), 370-379.
<http://www.scielo.org.mx/pdf/azm/v32n3/0065-1737-azm-32-03-00370.pdf>
- Huis, VA. (2015). Edible insects contributing to food security?. *Agric & Food Secur*, 4 (20), 1-9.

<https://agricultureandfoodsecurity.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s40066-015-0041-5>

INEGI. (2018). Estadísticas a propósito del...día mundial contra el cáncer (4 de febrero), datos nacionales. Comunicado de prensa, *Comunicación social*, 61(18) 1-13.

https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_nal.pdf

Intriago, S. C., y Valencia, B. (2014). Determinación de antocianinas y valor nutricional de los tenebrios alimentados con dietas enriquecidas con maíz morado. *Bioteología de los recursos naturales*. 4-15.
<http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/7261>

Kajatt, EA. (2013). Cáncer de pulmón, una revisión sobre el conocimiento actual, métodos diagnósticos y perspectivas terapéuticas. *Revista Peruana de medicina experimental y salud pública*. 30 (1), 85-92.
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342013000100017

Kapp, OH, y Vinogradov, SN. (1978). Removal of sodium dodecyl sulfate from proteins. *Analytical Biochemistry*. 91(1), 230-235.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90835-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90835-7)

Kosola, S., Lauronen, J., Sairanen, H., Heikinheimo, M., Jalanko, H., y Pakarinen, M. (2001). High survival rates after liver transplantation for

hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma. *Pediatric transplant*. 14 (5) 646-650. doi.10.1111/j.1399-3046.2010.01312.x

Leyuan, L., Beizhen, X., Chen, D., Minjuan, W., y Hong, L. (2016). Can closed artificial ecosystem have an impact on insect microbial community? A case study of yellow mealworm (*Tenebrio molitor* L.). *Ecological engineering Journal*, 86, 183-189. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.09.015>

Martín, MJ. (2003). El código Europeo contra el cáncer. Tercera revisión (2003): Insistiendo y avanzando en la prevención del cáncer. *Rev. Esp. Salud pública*. 77, 673-974.
<https://www.scielosp.org/article/resp/2003.v77n6/673-679/>

Martínez de Morentín, J., y Hernández, F. (1970). Efecto de la hepatectomía parcial sobre la carcinogénesis hepática producida por la dietilnitrosamina en ratas. *Revista Médica de la Universidad de Navarra*. 14 (2), 103-116. <https://revistas.unav.edu/index.php/revista-de-medicina/article/view/6550>

Martínez-Medina, GA., Prado-Barragan, A., Martínez-Hernandez, JL., Ruíz, HA., Rodríguez, RM., Contreras-Esquivel, JC., y Aguilar, CN. (2019). Péptidos Bio-funcionales: bioactividad, producción y aplicaciones. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 13 (22), 1-7. <http://www.biochemtech.uadec.mx/Articulos/No.22/PeptidosBiofuncionales.pdf>

Mattson, P. (2008). Review Hormesis defined. *Ageing Research Reviews*, 7, 1-7. doi:10.1016/j.arr.2007.08.007

- Mendoza, LE. (2017). Influencia de diferentes dietas en la composición nutricional del insecto comestible *Tenebrio molitor* y estudio de su pardeamiento. *Universidad Pública de Navarra Nafarroako Unibertsitate Publikoa Escuela Tecnica Superior Nekazaritzako Ingeniarrien, De Ingenieros Agronomos Goi Mailako Eskola Teknikoa* Tesis. Innovación En Procesos y Productos Alimentarios. 2017. 43 p
- Menhinick, EF, y Crossley, DA. (1968). A Comparison of Radiation Profiles of *Acheta domesticus* and *Tenebrio molitor*. *Annals of the Entomological Society of America*, 61(6), 1359–1365.
<https://doi.org/10.1093/aesa/61.6.1359>
- Montaño, PK, y Vargas, AF. (2002). Péptidos antimicrobianos: un mecanismo de defensa ancestral con mucho futuro. *Interciencia*, 27 (1), 21-27.
http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S037818442002000100004&script=sci_abstract
- Montes GES. (2017). Diseño de protocolo para el manejo de ratones cepa C57BL/6. *Instituto Tecnológico de Colima*. Informe técnico de residencia profesional, 42 p.
<https://dspace.itcolima.edu.mx/bitstream/handle/123456789/809/EVELYN%20SARAH%20MONTES%20GARC%3A.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Moret, Y., y Silva-Jothy, MT. (2003). Adaptive innate immunity? Responsive-mode prophylaxis in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Proceedings*

of the Royal Society of London. Series B, 270, 2475-2480.
doi.10.1098/rspb.2003.2511

NOM-033-SAG/ZOO-2014 (2015). NORMA Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014, Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres. Publicada el 26 de agosto de 2015. Diario oficial de la federación, México.

https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5405210&fecha=26/08/2015#:~:text=Que%20con%20fecha%2018%20de,naturales%20los%20interesados%20presenten%20sus

NOM-062-ZOO-1999. (2001). NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Publicada 22 de agosto de 2001. Diario Oficial de la Federación, México. <http://publico.senasica.gob.mx/?doc=743>

NRC. (1995). *Nutrient Requirements of Laboratory Animals*, Fourth Revised Edition, National Research Council. National Academy Press, Washington, D.C. 153 p. <https://www.nap.edu/catalog/4758/nutrient-requirements-of-laboratory-animals-fourth-revised-edition-1995>

Ojeda, CA. (2007). Efecto protector de la *Moringa oleifera* sobre un modelo de cáncer-inflamación en ratones ICR. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. *Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de química. Programa de posgrado en alimentos del centro de la república (PROAC)* 114p. <http://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/972>

- Olascoaga-Del Angel, K., Sánchez-Evangelista, G., Carmona-Navarrete, I., Galicia-Sánchez, MC, Gómez-Luna, AJ, Islas-Arrollo, SJ, y Castañeda-Sánchez, JI. (2018). Péptidos antimicrobianos, una alternativa prometedora para el tratamiento de enfermedades infecciosas. *Gaceta médica de México*, 154, 681-687. DOI: 10.24875/GMM.18003445
https://www.anmm.org.mx/GMM/2018/n6/GMM_6_18_681-688.pdf
- OMS. (1999). Epidemiología del Cáncer: Principios y métodos. Agencia internacional de investigación sobre el cáncer. *Obtenido de Organización Mundial de la Salud*. ISBN 92 832 0407 7
- Páramo, HDB, Otero, RW, y Pineda, OLF. (2010). Fibrogenesis Hepática. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 25 (2), 187-197.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99572010000200011
- Pereira, DMG, y Zubizarreta, P. (2007). Tumor hepático y anemia. *Medicina infantil, Ateneos hospitalarios*, 14 (2), 177-189.
https://www.medicinainfantil.org.ar/images/stories/volumen/2007/xiv_2_177.pdf
- Prophet, E., Mills, B., Arrington, J., y Sobin, L. (1995). Métodos histotecnológicos. En Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP) Washington, D.C.: *Registro de Patología de los Estados Unidos de América (ARP)*. 55-57.

- Puente, J. y De Velasco, G. (2019). Sociedad Española de Oncología Médica. Recuperado el 17 de agosto de 2020 de <https://seom.org/informacion-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer-y-como-se-desarrolla>
- Sato, K., y Kiyono, T. (Shahidi, F., Alasalvar, G.) (2016). Peptide-Enriched Functional Beverages. En *Handbook of Functional Beverages and Human Health*. (págs. 853-859). Nutraceutical Science and Technology.
- Schiffer, E., Housset, C., Cacheux, W., Cacheux, W., Wendum, D., Desbois-Mouthon, C., Rey, C., Clergue, F., Poupon, R., Bardu, V. y Rosmorduc, O. (2005). Gefitinib, an EGFR inhibitor, prevents hepatocellular carcinoma development in the rat liver with cirrhosis. *Hepatology*. 41(2), 307-314. <https://doi.org/10.1002/hep.20538>
- Seabrooks, L., y Longqin, H. (2017). Insects: an underrepresented resource for the discovery of biologically active natural products. *Acta pharmaceutica sinica B*. 7(4), 409-426. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.05.001>
- Sedó, MP. (2001). Alimentos funcionales: análisis general acerca de las características químico-nutricionales, desarrollo industrial y legislación alimentaria. *Revista Costarricense de Salud Pública*, 10 (18-19), 34-39. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-14292001000100005
- Shahidi, F., y Zhong, Y. (2008). Bioactive Peptides. *Journal of AOAC International*. 91(4), 914-931. <https://academic.oup.com/jaoac/article/91/4/914/5656149>

- Soares de Castro, RJ, Ohara, A., Gonçalves dos Santos, A., Fontenele, DMA. (2018). Nutritional, functional and biological properties of insect proteins: Processes for obtaining, consumption and future challenges. *Trends in Food Science & Technology Journal*, 76, 82-89.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224417306702> doi.10.1016/j.tifs.2018.04.006
- Soerjomataram, I., Lortet-Tieulent, J., Parkin, DM, Ferlay, J., Mathers, C., Forman, D., Bray, F. (2008). Global burden of cancer in 2008: a systematic analysis of disability-adjusted life-years in 12 world regions. *Lancet*, (380), 1840-1850. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60919-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60919-2)
- Terol, MC, López, RS, Rodríguez, MJ, Pastor, M., Angeles, M., Mora, M. (2000). Diferencias en la calidad de vida: un estudio longitudinal de pacientes de cáncer recibiendo tratamiento de quimioterapia. *Anales de psicología*, 16(2), 111-122. <https://www.redalyc.org/pdf/167/16716201.pdf>
- Urribarrí, CL, Ferrer, OA, y Colina A. (2004). Extracción y precipitación de las proteínas solubles del pasto elefante enano (*Pennisetum purpureum Schum cv. Mott*). *Revista de la Facultad de Agronomía*. 21 (3) http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S037878182004000300006&script=sci_arttext
- Varela, M., Reig, M., De la Mata, M., Matilla, A., Bustamante, J., Pascual, S., Turnes, J., Aracil, C., Del Val, A., Pascasio, JM, Rodríguez, M., Bruix, J. (2009). Tratamiento del carcinoma hepatocelular en España. Análisis de 705 casos en 62 centros. *España: Med Clin (Barc)*, 134(13), 569-576.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025775309015590>

[doi.10.1016/j.medcli.2009.10.042](https://doi.org/10.1016/j.medcli.2009.10.042)

Vioque, J., y Millán, F. (2005). Los péptidos bioactivos en alimentación: nuevos agentes promotores de salud. *Ciencia y Tecnología de Alimentos. Consejo superior de investigaciones científicas. Instituto de la grasa (Sevilla), Agrocsic.* 26, 103-107. <http://hdl.handle.net/10261/5751>

Williams, JP, Williams, JR, Kirabo, A., Chester, D., y Peterson, M. (Dossey, TA, Morales-Ramos, JA, and Rojas, MG). (2016). Nutrient Content and Health Benefits of Insects. En *Insects as Sustainable Food Ingredients*. (págs. 61-84). Academic Press. DOI:10.1016/B978-0-12-802856-8.00003-X

Winyard, PG, y Willoughby, DA. (2003). Inflammation protocols, Methods in Molecular Biology. Springer Science y Business Media. *Humana press Totowa New Jersey, USA.* (225) 89-112. ISBN 0-89603-970-6

Yamamoto, N., Ejiri, M., y Mizuno, S. (2003). Biogenic Peptides and Their Potential Use. *Current Pharmaceutical Design.* 9; 1345-1355. [doi.10.2174/1381612033454801](https://doi.org/10.2174/1381612033454801)

Yi, L., Lakemond, CMM, Sagis, LMC, Eisner-Schadler, V., Huis, AV., y Boekel, MAJSV.(2013). Extraction and characterisation of protein fractions from five insect species, *Food Chemistry*, 141, 3341-3348

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.115>

Yi, L., Van Boekel, MAJS, y Lakemond, CMM. (2017). Extracting *Tenebrio molitor* protein while preventing browning: effect of pH and NaCl on protein yield. *Journal of insects as food and feed*. 3(1), 21-31

<https://doi.org/10.3920/JIFF2016.0015>

Zielińska, E., Karaś, M., y Baraniak, B. (2018). Comparison of functional properties of edible insects and protein preparations thereof. *Food Science and Technology journal*, 91, 168-174.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002364381830080X>

[doi.10.1016/j.lwt.2018.01.058](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.058)

XII. ANEXOS

12.1 Certificado de salud animal



UPEAL
UNIDAD DE PRODUCCIÓN Y EXPERIMENTACIÓN
DE ANIMALES DE LABORATORIO



Cinvestav

CERTIFICADO DE SALUD ANIMAL

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional
 Av. Instituto Politécnico Nacional # 2508,
 Col. San Pedro Zacatenco, C.P. 07360, CDMX, México.
 SENASICA AUT-B-C-0419-051

Fecha de expedición:	Septiembre 06, 2019	Especie:	RATÓN	Línea o Cepa:	C57BL/6	
Cantidad total:	20	Sexo:	MACHOS_20_	HEMBRAS_	Peso o edad:	5 a 6 semanas
Ref. de Monitoreo:	30644/30646/39930	Fecha de Diagnóstico:	DICIEMBRE 2018	Válido Hasta:	DICIEMBRE 2019	

MONITOREO AMBIENTAL MICROAISLADOR

Agente etiológico	Muestra	Método	Resultado
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Ambiente	PCR	Negativo
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ambiente	PCR	Negativo
<i>Citrobacter rodentium</i>	Ambiente	PCR	Negativo
<i>Clostridium piliforme</i>	Ambiente	PCR	Negativo
Mouse rotavirus (EDIM)	Ambiente	PCR	Negativo
<i>Helicobacter spp.</i>	Ambiente	PCR	Negativo
<i>Helicobacter bilis</i>	Ambiente	PCR	Negativo
<i>Helicobacter ganmani</i>	Ambiente	PCR	Negativo
<i>Helicobacter hepaticus</i>	Ambiente	PCR	Negativo
<i>Helicobacter mastomyris</i>	Ambiente	PCR	Negativo
<i>Helicobacter rodentium</i>	Ambiente	PCR	Negativo
<i>Helicobacter typhlonius</i>	Ambiente	PCR	Negativo
Mouse adenovirus (MAV1)	Ambiente	PCR	Negativo
Mouse adenovirus (MAV2)	Ambiente	PCR	Negativo
Mouse hepatitis virus (MHV)	Ambiente	PCR	Negativo
Murine norovirus (MNV)	Ambiente	PCR	Negativo
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	Ambiente	PCR	Negativo
Minute virus of mice (MVM)	Ambiente	PCR	Negativo
Mouse parvovirus (MPV)	Ambiente	PCR	Negativo
<i>Pasteurella pneumotropica</i> biotype Jawetz	Ambiente	PCR	Negativo
<i>Pasteurella pneumotropica</i> biotype Heyl	Ambiente	PCR	Negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ambiente	PCR	Negativo
<i>Salmonella spp.</i>	Ambiente	PCR	Negativo

SEROLOGIA

Agente etiológico	Muestra	Método	Resultado
Ectromelia virus	Suero	MIF	Negativo
Mouse rotavirus (EDIM)	Suero	MIF	Negativo
Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)	Suero	MIF	Negativo
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	Suero	MIF	Negativo
Mouse adenovirus (MAV1)	Suero	MIF	Negativo
Mouse adenovirus (MAV2)	Suero	MIF	Negativo
Mouse hepatitis virus (MHV)	Suero	MIF	Negativo
Murine norovirus (MNV)	Suero	MIF	Negativo
Mouse parvovirus (MPV)	Suero	MIF	Negativo
Minute virus of mice (MVM)	Suero	MIF	Negativo
Polyoma virus	Suero	MIF	Negativo
Pneumonia virus of mice PVM	Suero	MIF	Negativo
Reovirus 3 (REO3)	Suero	MIF	Negativo
Theller's murine encephalomyelitis virus (TMEV)	Suero	MIF	Negativo
Sendai virus	Suero	MIF	Negativo

Los animales de laboratorio resultado de este diagnóstico nacieron en esta unidad y han sido mantenidos en la condición de "centinelas", bajo las prácticas de manejo establecidas para tal efecto.



Médico Veterinario Certificado
 María Antonieta López López
 Cédula Profesional: 2759847

Este documento es válido con firma digitaliz

MONITOREO AMBIENTAL MICROAISLADOR cont...

Agente etiológico	Muestra	Método	Resultado
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ambiente	PCR	Negativo
<i>Streptococcus sp. beta hemolytic Group A</i>	Ambiente	PCR	Negativo
<i>Streptococcus sp. beta hemolytic Group B</i>	Ambiente	PCR	Negativo
<i>Streptococcus sp. beta hemolytic Group C</i>	Ambiente	PCR	Negativo
<i>Streptococcus sp. beta hemolytic Group G</i>	Ambiente	PCR	Negativo
TMEV	Ambiente	PCR	Negativo
<i>Entamoeba muris</i>	Ambiente	PCR	Negativo
<i>Spironucleus muris</i>	Ambiente	PCR	Negativo
<i>Tritrichomonas muris</i>	Ambiente	PCR	Negativo
<i>Aspiculuris tetraptera</i>	Ambiente	PCR	Negativo
<i>Syphacia muris</i>	Ambiente	PCR	Negativo
<i>Syphacia obvelata</i>	Ambiente	PCR	Negativo
<i>Myocoptes musculinus</i>	Ambiente	PCR	Negativo
<i>Redfordia spp / Myobia spp.</i>	Ambiente	PCR	Negativo

BACTERIOLOGIA

Agente etiológico	Muestra	Método	Resultado
<i>Haemophilus spp</i>	Pulmón	Cultivo	Negativo
<i>Pasteurella spp/ Bordetella spp</i>	Pulmón	Cultivo	Negativo
<i>Mycoplasma spp</i>	Pulmón	Cultivo	Negativo
<i>Klebsiella spp</i>	Pulmón	Cultivo	Negativo
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	Pulmón	Cultivo	Negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	Pulmón	Cultivo	Negativo
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Pulmón	Cultivo	Negativo
<i>Candida spp</i>	Pulmón	Cultivo	Negativo
<i>Staphylococcus intermedius</i>	Pulmón	Cultivo	Negativo
Cultivo aerobio	Intestino	Cultivo	Negativo
<i>Helicobacter spp</i>	Intestino	Cultivo	Negativo
<i>Clostridium spp</i>	Intestino	Cultivo	Negativo

REFERENCIAS

Monitoreo Ambiental Microaislador: Técnica de colector de polvo en microfiltro a nivel de microaislador.

PCR: real-time Polymerase Chain Reaction, IDEXX, MO, USA.

Serología MFI: Multiplex Fluorecent Immunoassay Technology, IDEXX, MO, USA.

Microbiología: Laboratorios DIVET SA de CV, Estado de México, México.

Microscopía: Microscopía de raspado cutáneo, DIVET SA de CV, Estado de México, México.

Coproparasitológico: Observación directa y Técnica de flotación de Faust, DIVET SA de CV, Estado de México, México.

PARASITOLOGIA

Agente etiológico	Muestra	Método	Resultado
<i>Myobia musculi</i>	Piel y pelo	Microscopía	Negativo
<i>Mycopites musculinus</i>	Piel y pelo	Microscopía	Negativo
<i>Polyplax serrata</i>	Piel y pelo	Microscopía	Negativo
<i>Demodex spp</i>	Piel y pelo	Microscopía	Negativo
<i>Aspiculuris tetraptera</i>	Intestino /Ciego	Copro	Negativo
<i>Entamoeba muris</i>	Intestino /Ciego	Copro	Negativo
<i>Elmeria spp</i>	Intestino /Ciego	Copro	Negativo
<i>Giardia muris</i>	Intestino /Ciego	Copro	Negativo
<i>Hymenolepis spp</i>	Intestino	Copro	Negativo
<i>Syphacia spp</i>	Intestino	Copro	Negativo
<i>Tritrichomona spp</i>	Intestino /Ciego	Copro	Negativo
<i>Enterobius spp</i>	Intestino /Ciego	Copro	Negativo

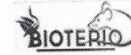
POSTMORTEM

Muestra	Método	Resultado
Inspección externa	Anatomopatológico	Sin cambios patológicos aparentes
incisión Primaria	Anatomopatológico	Sin cambios patológicos aparentes
Incisión Secundaria	Anatomopatológico	Sin cambios patológicos aparentes
Aparato Respiratorio	Anatomopatológico	Sin cambios patológicos aparentes
Aparato Digestivo	Anatomopatológico	Sin cambios patológicos aparentes
Aparato Urinario	Anatomopatológico	Sin cambios patológicos aparentes
Aparato Reproductor	Anatomopatológico	Sin cambios patológicos aparentes
Sistema Circulatorio	Anatomopatológico	Sin cambios patológicos aparentes
Sistema Linfático	Anatomopatológico	Sin cambios patológicos aparentes
Sistema Nervioso	Anatomopatológico	Sin cambios patológicos aparentes
Pulmón	Histopatológico	Sin cambios patológicos aparentes
Higado	Histopatológico	Sin cambios patológicos aparentes
Bazo	Histopatológico	Sin cambios patológicos aparentes
Intestino	Histopatológico	Sin cambios patológicos aparentes
Encéfalo	Histopatológico	Sin cambios patológicos aparentes
Riñón	Histopatológico	Sin cambios patológicos aparentes

12.2 Aprobación CICUAL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
COORDINACIÓN ACADÉMICA
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ACADÉMICOS
DIRECCIÓN DEL BIOTERIO
COMITÉ INTERNO DE ÉTICA



DICTAMEN

21 de septiembre del 2019

DR. ARMANDO ZEPEDA BASTIDA.
PROFESOR INVESTIGADOR DE TIEMPO COMPLETO
ÁREA ACADÉMICA DE MEDICINA VETERINARIA
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS, UAEH

Por medio de la presente, le informo que después de haber sido evaluado el protocolo intitulado "*Evaluación del efecto de un alimento funcional a base del estadio de pupa de Tenebrio molitor sobre la hepatocarcinogenesis experimental en el ratón*", donde participan el Dr. Sergio Soto Simental, la Dra. Maricela Ayala Martínez y la M.V.Z. Iliana Aleli Herrera Soto, los miembros el CICUAL han decidido aprobarlo y queda registrado con el **Número de Aprobación CICUAL/014/2019**.

Sin más otro particular, aprovechamos la ocasión deseándole el mejor de los éxitos en su proyecto.

ATENTAMENTE

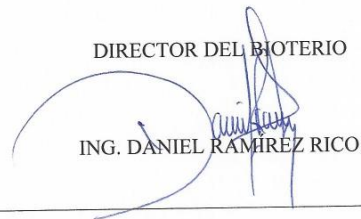
"AMOR, ORDEN y PROGRESO"

PRESIDENTE DEL CIECUAL



DR. LUIS DELGADO OLIVARES.

DIRECTOR DEL BIOTERIO



ING. DANIEL RAMÍREZ RICO.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
COORDINACIÓN ACADÉMICA
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ACADÉMICOS
DIRECCIÓN DEL BIOTERIO
COMITÉ INTERNO DE



DICTAMEN DE EVALUACIÓN

INSTITUCIÓN (Subdirección, Departamento o Área de trabajo): Instituto de Ciencias de la Salud. Área Académica de Medicina Veterinaria, ICAP, UAEH.		FOLIO: CICUAL/014/2019		
		FECHA DE APOBACIÓN: 24 de Septiembre de 2019		
PROYECTO: Evaluación del efecto de un alimento funcional a base del estadio de pupa de Tenebrio molitor sobre la hepatocarcinogenesis experimental en el ratón.		RESPONSABLE DEL PROYECTO: Dr. Armando Zepeda Bastida azepeda@uaeh.edu.mx Tel: 751245633		
INVESTIGADORES QUE COLABORAN EN EL PROYECTO: Dr. Sergio Soto Simental, Ext. 2449, sotos@uaeh.edu.mx , Cel 7751337155 Dra. Maricela Ayala Martínez Cel 7751565336 M.V.Z. Iliana Aleli Herrera Soto				
ALUMNOS O PASANTES QUE PARTICIPAN EN EL PROYECTO: No hay alumnos registrados				
ASPECTOS A EVALUAR:	RESULTADO			
	ACEPTABLE	NO ACEPTABLE	SUGERENCIAS	
JUSTIFICACIÓN DEL USO DE ANIMALES DE LABORATORIOS	X			
BIENESTAR Y ESTRÉS ANIMAL	X			
PROCEDIMIENTOS Y CUIDADOS APLICADOS EN EL ANIMAL	X			
ASPECTOS ÉTICOS DEL PROTOCOLO	X			
PUNTO FINAL Y EUTANASIA	X			
OBSERVACIONES GENERALES 1) Para que se autorice la entrada de animales externos al bioterio de la UAEH, el investigador deberá presentar el certificado de salud correspondiente de los animales de laboratorio, el cual deberá ser otorgado por el MVZ responsable de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV.				
FECHA DE REVISIÓN	RESULTADO	SI	NO	OBSERVACIONES
	APROBADO	X		
2 de septiembre del 2019	NEGADO			
	PROPUESTAS O CAMBIO			
Fecha de inicio: septiembre de 2019		Fecha de término: 31 de enero de 2020		
CARACTERÍSTICAS DE LOS ANIMALES QUE SE PROPORCIONARÁN: Ratón (<i>Mus musculus</i>) de la cepa C57BL/6, los cuales serán adquiridos en el CINVESTAV				
INVESTIGADOR PRINCIPAL  Dr. Armando Zepeda Bastida.	PRESIDENTE DEL CIECUAL  Dr. Luis Delgado Olivares.		DIRECTOR DEL BIOTERIO  Ing. Daniel Ramirez Rico.	

12. 3. Productos adicionales en la formación de la Maestría en Ciencia de los Alimentos.

12.3.1 Artículo publicado en Boletín de Ciencias Agropecuarias ICAP. Producción y usos de *Tenebrio molitor*.



<https://repository.uaeh.edu.mx/revistas/index.php/icap/issue/archive>
Boletín de Ciencias Agropecuarias del ICAP
 Publicación semestral, Vol. 6, No. 12 (2020) 1-4

ICAP
 ISSN: 2448-5357

Producción y usos de *Tenebrio molitor*

Production and uses of *Tenebrio molitor*

Iliana A. Herrera-Soto^a, Sergio Soto-Simental^a, Juan Ocampo-López^a, Maricela Ayala-Martínez^a, Armando Zepeda-Bastida^{a}*

Abstract:

The aim of work is to propose the insect *Tenebrio molitor* as a nutritional alternative and report on their production methods, because not only have nutritional characteristics needed for a good diet for its nutritional high, but also have a variety of qualities beneficial to the health of consumers. It is well known that Mexico is a country with nutritional problems, due to lack of knowledge about nutritional deficiencies and options that people have in their diet; so that an alternative to this problem is to expand knowledge and food choices. *Tenebrio molitor* is known as a nutritional option for the large number of proteins containing, which provide a nutritional option, in addition to the health benefits that may be due to the presence of bioactive peptides. Not much is known about the management that these insects must have to avoid pests or infections during their production, in addition to the specific care necessary for rapid and sustainable production.

Keywords:

Insect consumption, nutritional alternative, protein, coleopter

Resumen:

El objetivo del trabajo es proponer el insecto *Tenebrio molitor* como alternativa nutricional e informar sobre los métodos de producción de este, ya que no solo tienen las características nutricionales necesarias para una buena dieta por su alto contenido nutricional, sino que también tienen una variedad de cualidades benéficas para la salud de los consumidores. Es bien sabido que México es un país con problemas nutricionales, debido principalmente a la falta de conocimientos sobre opciones nutricionales y a las deficiencias que las personas tienen en su dieta; por lo que una alternativa a esta problemática es ampliar el conocimiento y opciones alimenticias. El *Tenebrio molitor* es conocido como una opción nutricional por la gran cantidad de proteínas que contiene, lo que proporcionan una opción nutricional, además de los beneficios para la salud que pueden tener gracias a la presencia de péptidos bioactivos. No se sabe mucho sobre el manejo que estos insectos deben tener para evitar plagas o infecciones durante su producción, además de los cuidados específicos necesarios para una producción rápida y sostenible.

Palabras Clave:

Consumo de insectos, alternativas nutricionales, proteína, coleóptero

Introduction

Insects are part of the diet in some regions, they are used as a source of protein. Human consumption of insect is associated with countries located in Asia, Latin America

and Africa due to its high consumption reported in these places [6]. In tropical countries, most insects are collected from nature, in an inventory carried out, more than 2000 species of edible insects were recognized worldwide;

^a Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Agropecuarias. Ave. Universidad s/n. ExHacienda de Aquetzalpa, Tulancingo, Hidalgo. MÉXICO. Iliana A. Herrera-Soto, aleli_herrera@hotmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-6923-0928> Sergio Soto Simental, sotos@uaeh.edu.mx, <https://orcid.org/0000-0002-6923-0926>; Juan Ocampo López, jocampo@uaeh.edu.mx, <https://orcid.org/0000-0002-9208-7216>; Maricela Ayala Martínez, ayalam@uaeh.edu.mx, <https://orcid.org/0000-0001-5554-218X>; Armando Zepeda Bastida, azepeda@uaeh.edu.mx, <https://orcid.org/0000-0003-0572-5206>.

*Autor de Correspondencia, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, <https://orcid.org/0000-0003-0572-5206>, Email: azepeda@uaeh.edu.mx.

Fecha de recepción: 30/04/2020, Fecha de aceptación: 04/05/2020, Fecha de publicación: 05/07/2020



12.3.2 Artículo publicado en Boletín de Ciencias Agropecuarias ICAP. Péptidos de insectos: una alternativa antibacteriana.



<https://repository.uaeh.edu.mx/revistas/index.php/icap/issue/archive>

Boletín de Ciencias Agropecuarias del ICAP

Publicación semestral, Vol. 6, No. 12 (2020) 5-8

ICAP
ISSN: 2448-5357

Péptidos de insectos: una alternativa antibacteriana

Insect peptides: an antibacterial alternative

Carolina Costeira-Huerta ^a, Iliana A. Herrera-Soto ^a, Maricela Ayala-Martínez ^a, Sergio Soto-Simental ^a, Juan Ocampo-López ^a, Armando Zepeda-Bastida ^{a*}

Abstract:

Microorganisms causing diseases in humans and animals are constantly evolving, that is why it has become vital to find new alternatives to their treatment and prevention, since the antimicrobial resistance, defined by the WHO as the ability of microorganisms of preventing antimicrobials from acting against them, is a growing issue in our society. In 2016, the World Health Organization published a report that had an estimated of 700 000 deaths caused by antimicrobial resistance in the world and established that these numbers could increase over the next 35 years if appropriate measurements are not taken. By 2017, the WHO published a report where around 51 new antimicrobials are mentioned as an alternative to the treatment of some specific diseases, however, only 8 of those molecules are considered to have a therapeutic potential. The use of insects in medicine is not considered to be a recent technique since there are references to it that go back to the first human civilizations and has been proved to have beneficial aspects not only in nutritional issues, but in the health areas. For instance, antimicrobial peptides have been described in several species of organisms, such as fungi, plants, humans and insects, the latter being the ones where the most effective antimicrobial peptides have been described.

Keywords:

Insects, Antibacterial alternative, Peptide

Resumen:

Los microorganismos causantes de enfermedades en el humano y animales están en constante evolución, por lo que es de vital importancia encontrar alternativas para su tratamiento y prevención. La resistencia antimicrobiana, definida por la OMS como la capacidad que tienen los microorganismos de impedir que los antimicrobianos actúen contra ellos, es un problema creciente en nuestra sociedad. En el año 2016, la Organización Mundial de la Salud publicó un informe en el que se estimó que para ese año se atribuían 700 000 muertes a la resistencia a antimicrobianos en el mundo, y que la cifra puede ascender hasta 10 millones de muertes en los próximos 35 años si no se toman medidas adecuadas. Para el siguiente año, la OMS publicó un reporte donde se mencionan 51 nuevos antimicrobianos que pueden ser una alternativa al tratamiento de algunas enfermedades, sin embargo, solo 8 de estas moléculas se consideran con potencial terapéutico. El uso de insectos en la medicina no es considerado una práctica reciente, ya que hay referencias de ella desde las primeras civilizaciones y ha sido demostrado que tiene aspectos benéficos no solo para la nutrición, sino para ámbitos de salud. Por ejemplo, los péptidos antimicrobianos se han descrito en muchas especies de organismos: hongos, plantas, humanos e insectos, siendo estos últimos en los que más se han descrito péptidos antimicrobianos eficaces.

Palabras Clave:

Insectos, Alternativa antibacteriana, Péptidos

^a Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Agropecuarias. Ave. Universidad s/n. Ex Hacienda de Aquetzalpa, Tulancingo, Hidalgo, MEXICO. Carolina Costeira-Huerta, carocosteira@gmail.com; Iliana A. Herrera-Soto, aleli_herrera@hotmail.com; Maricela Ayala Martínez, ayalam@uaeh.edu.mx, <https://orcid.org/0000-0001-5554-218X>; Sergio Soto Simental, sotos@uaeh.edu.mx, <https://orcid.org/0000-0002-6923-0926>; Juan Ocampo López, jocampo@uaeh.edu.mx, <https://orcid.org/0000-0002-9208-7216>; Armando Zepeda Bastida, azepeda@uaeh.edu.mx, <https://orcid.org/0000-0003-0572-5206>.

*Autor de Correspondencia, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, <https://orcid.org/0000-0003-0572-5206>, Email: azepeda@uaeh.edu.mx.

Fecha de recepción: 30/04/2020, Fecha de aceptación: 04/05/2020, Fecha de publicación: 05/07/2020



12.3.3 Presentación en la Reunión científica de la asociación mexicana para la producción animal y seguridad alimentaria.



La Asociación Mexicana para la Producción Animal y Seguridad Alimentaria A.C.
 La Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
 La Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca
 otorgan la presente

Constancia a:

Herrera-Soto I.A., Apaez- Barrios J., Ocampo-López J.,
 Ayala-Martínez M., Zepeda-Bastida A., Soto-Simental S.

Como ponente del cartel titulado "Calidad de la canal y de la
 carne de conejos suplementados con Tenebrio molitor", en la
 XLVI Reunión Científica de la Asociación Mexicana para la
 Producción Animal y Seguridad Alimentaria, A.C.

Sustentabilidad y soberanía alimentaria, un reto para la producción
 animal en México

16-18 de Octubre del 2019, Oaxaca de Juárez, Oaxaca

M. en C. PATRICIA KARINA VICENTE CASTILLO Directora, FMVZ, UABJO	DR. JUAN CARLOS MARTÍNEZ GONZALEZ Presidente AMPA, A.C.	DR. JORGE HERNÁNDEZ BAUTISTA Presidente del Comité Organizador



12.3.4 Artículo publicado en Revista mexicana de agrosistemas. Calidad de la canal y de la carne de conejos suplementados con *T. molitor*.



Revista Mexicana de Agroecosistemas
 Vol. 6 (Suplemento 2), 2019 16-18 de octubre ISSN:2007-9559
 Memoria de artículos en extenso y resúmenes
 “XLVI Reunión Científica de la Asociación Mexicana para la Producción Animal y Seguridad Alimentaria, A. C.”

CALIDAD DE LA CANAL Y DE LA CARNE DE CONEJOS SUPLEMENTADOS CON *Tenebrio molitor*

[CARCASS AND MEAT QUALITY OF RABBITS FED WITH *Tenebrio molitor*]

Iliana Aleli Herrera-Soto¹, Jairo Apaez- Barrios, Juan Ocampo-López, Maricela Ayala-Martínez, Armando Zepeda-Bastida, Sergio Soto-Simental

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo / Instituto de Ciencias Agropecuarias. Av. Universidad s/n km 1. Ex Hacienda de Aquetzalpa. Tulancingo, Hidalgo. México. CP. 43600. ¹Autor para correspondencia: (soto@uaeh.edu.mx).

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto de la inclusión de larva de *Tenebrio molitor* en la alimentación de conejos, sobre la calidad de la carne y de la canal. Se utilizaron 20 conejos de 35 d de edad, distribuidos completamente al azar en dos tratamientos (sin tenebrio, con tenebrio), con 5 repeticiones cada uno, en 28 d de engorda, en los cuales se evaluó la calidad de la canal y de la carne. Los resultados fueron analizados con ayuda de programa estadístico SPSS. Los datos obtenidos demostraron que no tiene efecto ($p > 0.05$) sobre la calidad de la canal y de la carne de conejos. Por lo cual se concluye que *T. molitor* insecto del orden Coleóptera, tiene potencial para ser incluido como fuente de proteína en la dieta de conejos sin presentar alteraciones en la calidad de la canal ni de la carne.

Palabras clave: Capacidad de retención de agua, coleóptero, insecto, pH.

ABSTRACT

The present work was the objective to determinate the effect of *Tenebrio molitor* inclusion, in the feeding process of fattening rabbits on the quality of the carcass and meat. Were used 20 rabbits weaned at 35 d and were subjected to a fattening of 28 days. This work have two treatments were used (Without *Tenebrio*, with *Tenebrio*) with 5 repetitions. The results were evaluated with the help of the SPSS program. The results obtained with the two diets offered have similarities, so it is concluded that *T. molitor*, insect of the order Coleoptera, has potential to be included as a source of protein in the diet of rabbits without presenting alterations in the quality of the carcass or meat.

Index words: Coleoptero, insect, pH, water retention capacity.

INTRODUCCIÓN

La carne de conejo es 20% más barata que la carne de res (SAGARPA, 2015), es de fácil digestión, posee bajo contenido de colesterol, alto nivel de aminoácidos y un 21.5% de proteína (Camps, 1996). A pesar de estas cualidades, no es consumida frecuentemente; por ejemplo en México, el consumo per cápita es menor a 100 g (Marín, 2017). Lo anterior probablemente se debe a que el