

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Título:

Efecto de una bebida a base de *Tenebrio molitor*, sobre la hepatocarcinogénesis experimental en el ratón

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRO EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS**

PRESENTA:

DULCE MARÍA MORENO GARCÍA

Directores:

Dr. Sergio Soto Simental

Dr. Armando Zepeda Bastida

Asesores:

Dra. Maricela Ayala Martínez

Dr. Jaime Arellanes Robledo

Septiembre 2018





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: **“Efecto de una bebida a base de Tenebrio molitor, sobre la hepatocarcinogénesis experimental en el ratón”**, que desarrolla el estudiante Dulce María Moreno García

Asistentes:

- Dr. Sergio Soto Simental
- Dr. Armando Zepeda Bastida
- Dra. Maricela Ayala Martínez
- Dr. Jaime Arellanes Robledo

A. Revisión de Trabajo de Tesis

Observaciones:

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por la estudiante, comunicando a la estudiante, Dulce María Moreno García, oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo y poder continuar con el proceso de obtención de grado. La 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 20 de septiembre de 2018

- Dr. Sergio Soto Simental
- Dr. Armando Zepeda Bastida
- Dra. Maricela Ayala Martínez
- Dr. Jaime Arellanes Robledo





Agradecimientos

Agradecimientos institucionales

Al Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). Institución donde se realizó gran parte de esta tesis y por permitir desarrollarme en esta área de investigación.

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN). Institución que a través del Dr. Emérito Saúl Villa Treviño, me permitió el uso de animales de experimentación para desarrollar satisfactoriamente este proyecto.

Agradecimientos

Al Dr. Zepeda por darme la confianza de trabajar.

Al Dr. Sergio por sus grandes consejos, y compartirme toda su sabiduría además de ser muy paciente conmigo.

A la Dra. Maricela por ser más que un asesor de tesis, una gran amiga, por sus consejos, enseñanzas y tiempo invertido para apoyarme a terminar de escribir esta tesis.

A mi compañera de maestría Denis, por su gran amistad y consejos.

Al Dr. Jaime Arellanes Robledo por brindarme la oportunidad de trabajar con él, sobre todo por su paciencia, enseñanzas y consejos.

Al Dr. Julio Isael Pérez, por permitirme realizar mi proyecto de tesis en el Laboratorio de Enfermedades Hepáticas a su cargo.

A la QFB. Norma Areli López Hernández, técnico del laboratorio de Enfermedades hepáticas, por su asistencia técnica durante mi estancia en el INMEGEN, además de su gran amistad que me brindo.



A los QFB. Sergio Hernández García, Eunice Romo Medina; a los Técnicos Leobardo Molina García y Alejandro Cruz Hernández, por su gran apoyo y asistencia técnica para la obtención del tejido de los animales de experimentación, realizada en el laboratorio 50 del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV-IPN.

Al Dr. Jorge Fernández, a los MVZ. Rafael Leyva Muñoz, Ricardo Gaxiola Centeno, Benjamín E. Chávez Álvarez, María A. López López y Alberto Rojo García, y a la Srta. María T. Hernández Moreno, por el excelente trato y por su invaluable apoyo en el cuidado de los animales de laboratorio (Bioterio del CINVESTAV-IPN) utilizados en este proyecto de tesis.

Al personal de la Unidad de Histología del INMEGEN conformado por la Dra. Belem N. Gabiño López y el Dr. Ricardo Nava Monroy, por su apoyo y asistencia técnica durante el desarrollo de mis experimentos.

A mis compañeros del Laboratorio de Enfermedades Hepáticas del INMEGEN Alexia, Sergio, Dafne, Javier y Brisa, por sus consejos y su gran amistad.



Dedicatoria

El presente trabajo está dedicado especialmente a mis padres Felipe Moreno y Juana María García, que sin su entrega, apoyo y dedicación por sacarme adelante, esto no sería posible, a mi hermano Daniel Moreno, que siempre ha estado conmigo y me ha apoyado en todo.

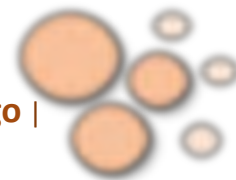


ÍNDICE GENERAL

LISTA DE TABLAS	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
ABREVIATURAS Y UNIDADES	VIII
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	2
2. Cáncer	2
2.1 Causas	2
2.2 Tipos	6
2.2.1 Carcinoma hepatocelular	6
2.2.1.1 Características	7
2.2.1.2 Incidencias en el mundo y en México.	7
2.3 Tratamientos	9
2.3.1 Tratamientos convencionales	9
2.3.2 Tratamientos alternativos	10
2.3.2.1 Plantas	10
2.3.2.2 Hongos	11
2.3.2.3 Insectos	12
2.3.2.3.1 Consumo de insectos	13
2.3.2.3.2 <i>Tenebrio molitor</i>	15
III. JUSTIFICACIÓN	19
IV. OBJETIVOS	20
4.1 Objetivo general	20
4.2 Objetivos específicos	20
V. HIPÓTESIS	21
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	22
6.1 Obtención de material biológico	22
6.2 Elaboración de harina a base de <i>Tenebrio molitor</i>	23
6.3 Análisis químico proximal	23



6.4 Prueba de solubilidad de proteína	23
6.5 Obtención de la bebida	24
6.6 Modelo de cáncer hepático	25
6.7 Determinación de daño hepático, por Western blot	26
6.8 Determinación de la localización estructural de las proteínas por análisis de inmunohistoquímica	28
6.9 Análisis estadístico	29
VII. RESULTADOS	30
7.1 Análisis químico proximal	30
7.2 Prueba de solubilidad de proteína	30
7.3 Consumo de bebida	31
7.4 Ganancia de peso de los animales	32
7.5 Valoración histológica	34
7.6 Valoración inmunológica.....	37
VIII. DISCUSIÓN.....	45
IX. CONCLUSIONES.....	52
X. PERSPECTIVAS	53
XI. REFERENCIAS	54
XII. ANEXOS.....	67



LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tratamiento con base en el estado patológico del tumor.	10
Tabla 2. Contenido de aminoácidos esenciales y no esenciales de las proteínas de <i>Tenebrio molitor</i>	16
Tabla 3. Composición proximal de la larva de <i>Tenebrio molitor</i> comparada con carne de pescado, pollo, cerdo y res.....	17
Tabla 4. Análisis químico proximal de tres estadios de vida de <i>Tenebrio molitor</i> ..	30



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Capacidades de supervivencia adquiridas por células cancerosas.	5
Figura 2. Variaciones regionales en las tasas de mortalidad de carcinoma hepatocelular. 9	
Figura 3. <i>Tenebrio molitor</i> en sus tres estadios de vida.	15
Figura 4. Alojamiento de <i>Tenebrio molitor</i>	22
Figura 5. Alimentación de <i>Tenebrio molitor</i>	22
Figura 6. Esquema de la inducción de carcinoma hepatocelular y tratamiento.....	26
Figura 7. Solubilidad de la proteína de <i>Tenebrio molitor</i> a diferente pH.	31
Figura 8. Consumo de bebida de ratones con hepatocarcinoma.....	32
Figura 9. Peso semanal de ratones con hepatocarcinoma inducido, que consumieron bebida a base de <i>Tenebrio molitor</i>	33
Figura 10. Peso de hígado con relación al peso vivo de ratones con hepatocarcinoma inducido, que consumieron bebida a base de <i>Tenebrio molitor</i>	33
Figura 11. Determinación de la integridad del tejido hepático mediante la tinción de H&E.	35
Figura 12. Determinación de la presencia de colágena en el parénquima hepático mediante tinción de tricrómica de masson.....	36
Figura 13. Expresión de Cyp2e1 por IHQ, en el tejido hepático de ratones.....	37
Figura 14. Efecto de DEN sobre la expresión de Cyp2e1.	38
Figura 15. Efecto de DEN sobre la expresión de Gstp1.	39
Figura 16. Expresión de Ki67 por IHQ, en el tejido hepático de ratones administrados con diferentes dosis de DEN	40
Figura 17. Efecto de DEN sobre la expresión de Ki67.....	41
Figura 18. Expresión de β -catenina por IHQ, en el tejido hepático de ratones.	42
Figura 19. Efecto de DEN sobre la expresión de β -catenina.	43
Figura 20. Efecto de DEN sobre la expresión de CiclinaD1.....	44



ABREVIATURAS Y UNIDADES

A: Amper

AC: Amortiguador de corrida

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AIP: Amortiguador de Inmunoprecipitación

ANOVA: Análisis de varianza

APS: Persulfato de amonio

AQP: Análisis químico proximal

AT: Amortiguador de transferencia

BCA: Ácido bicinconínico

CHC: Carcinoma hepatocelular

cm: centímetros

DEN: Dietilnitrosamina

Ctrl: Control

D+A: Dietilnitrosamina + Adulto

D+L: Dietilnitrosamina + Larva

D+P: Dietilnitrosamina + Pupa

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

g: gramos

h: horas

HCl: Ácido clorhídrico

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

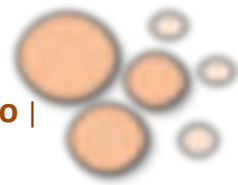
HRP: Peroxidasa de rabano

H&E: Hematoxilina y Eosina

IHQ: Inmunohistoquímica

kDa: kilodaltons

Kg: kilogramos



LDL: Lipoproteínas de baja densidad

L: litros

mg: miligramos

min: minutos

mL: mililitros

mM: milimolar

NaCl: Cloruro de sodio

NaOH: Hidróxido de Sodio

Na₃VO₄: Ortovanato de sodio

nm: nanómetros

OMS: Organización Mundial de la Salud

pH: potencial de Hidrogeno

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PV: peso vivo

PVDF: Polifluoruro de vinilideno

rpm: revoluciones por minuto

s: segundos

SDS: Dodecilsulfato sódico

TBSt: Solución salina tamponada + Tween 20

TEMED: Tetrametiletildiamina

V: Volts

VHB: Virus de la hepatitis B

VHC: Virus de la hepatitis C

WB: Western blot

µg: microgramos

µL: microlitros

° C: grados Celsius



RESUMEN

El cáncer es un padecimiento que se origina por factores físicos, químicos o biológicos que afectan la integridad de la célula, provocando crecimiento irregular, lo cual afecta la funcionalidad del órgano que constituyen. Por tal motivo se han utilizado tratamientos convencionales como la quimioterapia y radioterapia, que afectan al paciente de manera sistémica debido a que no son específicos, por esta razón de manera continua se han buscado alternativas para sustituir estos tratamientos o bien amortiguar los efectos colaterales que éstos ocasionan; tal es el caso de los insectos que pertenecen a la familia Tenebrionidae, los cuales se han propuesto como fuente nutricional viable y factible de ser utilizados en la medicina tradicional. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de una bebida a base de *Tenebrio molitor* sobre la hepatocarcinogénesis experimental en el ratón, para lo cual se preparó una bebida por cada estadio de vida del insecto a una concentración de $62.5 \mu\text{g mL}^{-1}$, y se ofreció a ratones C57BL/6 que fueron inducidos a cáncer con 20 mg kg^{-1} PV de Dietilnitrosamina, los cuales fueron sacrificados y los hígados analizados mediante estudios de biología molecular y celular, para conocer el efecto de la bebida sobre las células afectadas. Los resultados obtenidos mostraron que la bebida a base de *Tenebrio molitor* del estadio de vida de pupa, disminuyó los marcadores de proliferación celular Ki67, CiclinaD1, y el marcador de hepatocarcinogénesis Gstp1, involucrados en el desarrollo de cáncer hepático. Por lo que se puede concluir que el coleóptero *T. molitor*, tiene un posible efecto hepatoprotector durante la inducción de carcinogénesis.



ABSTRACT

Cancer is a condition caused by physical, chemical or biological factors affecting several cell physiological processes that collectively dictates malignant growth and as a result, provoke the organ malfunctioning. Conventional treatments such as chemotherapy and radiotherapy have been used in order to face this health problem; however, their side effects most of time are more aggressive than the disease itself. This challenge has encouraged researchers to seek for alternatives to replace these treatments. Recently, increasing interest has been paid on natural compounds as a treatment to avoid the side effects of conventional treatments. In this regards, the insects of Tenebrionidae family, have been proposed as a viable nutritional source and feasible in traditional medicine. The aim of this investigation was to determine the effects of a drink prepared with *Tenebrio molitor* on mice experimental hepatocarcinogenesis. Three different drinks were prepared from each life stage of the insect, pupa, larva and adult, at a concentration of 62.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Liver cancer was induced by i.p. injection of Diethylnitrosamine (20 mg kg^{-1}) in C57BL/6 mice and drinks were offered ad libitum thorough the experiment. The drinks effects on the hepatocarcinogenesis, were determined by molecular and cellular analyses. Our results showed that the drink prepared with pupa life stage of *Tenebrio molitor*, decreased the cell proliferation markers Ki67, Cyclin D1, and the hepatocarcinogenesis marker Gstp1, involved in the development of liver cancer. We conclude that *Tenebrio molitor*, might be used as a hepatoprotector during the develop of hepatic alterations such as cancer.



I. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se caracteriza por tener un crecimiento celular incontrolado (Meza-Junco *et al.*, 2006), debido a alteraciones que afectan la estabilidad celular (Lewin, 2004), afectando a millones de personas en el mundo (Lorraine y Mendoza-Espinoza, 2010). Entre los principales tipos de cáncer a nivel mundial, se encuentra el cáncer hepático con 788 000 incidencias de muertes al año (OMS, 2017), mientras que para México, se ha informado que desde el año 2000 la tasa de mortalidad ha incrementado en un 14% (Uribe *et al.*, 2010; González & Sánchez, 2014). Es por esta situación que se han buscado alternativas para combatir esta enfermedad, debido a que los métodos convencionales como las radioterapias y las quimioterapias atacan a todas las células, por ende resultan ser más agresivas que la misma enfermedad (Lorraine y Mendoza-Espinoza, 2010). Las alternativas naturales que se han propuesto son plantas, hongos e incluso insectos de la familia Tenebrionidae de las especies *Ulomoides dermestoides* (Mendoza y Fals, 2013; Deloya-Brito y Deloya, 2014), *Alphitobus diaperinus* (Ushakova *et al.*, 2015), *Palembus ocularis* (Marit-Saskia y Wink, 2006) y *Zophobas morio* (Zhang *et al.*, 2011). Éstos han adquirido mayor importancia debido a que además de contrarrestar enfermedades aportan proteína y grasa (Rumpold y Schlüter, 2013; Yi *et al.*, 2013). Es por ello que el objetivo del presente trabajo fue demostrar el efecto que tiene una bebida a base de *Tenebrio molitor* sobre el hepatocarcinoma experimental.



II. MARCO TEÓRICO

2. Cáncer

El término cáncer comprende un grupo de enfermedades caracterizadas por tener proliferación autónoma de células neoplásicas, las cuales ya tienen varias alteraciones, que incluyen mutaciones e inestabilidad genética; destacando primordialmente los procesos de crecimiento y diseminación celular incontrolados (Meza-Junco *et al.*, 2006); es decir, son mediados por factores de crecimiento autocrinos, paracrinos y endocrinos que activan receptores de superficie celular, por lo cual tienen la capacidad de invadir el tejido circundante provocando metástasis en puntos distantes del organismo (Soto, 2003). El cáncer se debe a varias causas, principalmente a la acumulación y selección sucesiva de alteraciones genéticas y epigenéticas que permiten a las células sobrevivir a partir de errores en los circuitos reguladores que gobiernan el crecimiento, división y proliferación celular normal, así como la homeostasis (Meza-Junco *et al.*, 2006).

2.1 Causas

Existen dos principales tipos de cambio en el genoma, que son la inestabilidad genética (cuando, se producen variaciones en el cariotipo que modifican al azar el número normal de cromosomas, o bien se observan alteraciones estructurales) y la acumulación de mutaciones somáticas (Lewin, 2004). Estos cambios genéticos son también llamados en algunas ocasiones “causantes” de cáncer, ya que contribuyen a originarlo, afectando tres tipos principales de genes:



1. **Los proto-oncogenes** ofrecen un crecimiento y división celular normal. Sin embargo, cuando estos genes son alterados por mutaciones se activan para convertirse en genes causantes de cáncer u oncogenes, haciéndolo excesivamente activo en la promoción del crecimiento.
2. **Los genes supresores de tumores** se encuentran en células normales restringiendo el crecimiento celular, por lo que un daño en éstos permite un crecimiento inapropiado y/o una división celular descontrolada.

Estos dos codifican proteínas que ayudan a regular el nacimiento celular o la muerte celular por apoptosis.
3. **Los genes reparadores del ADN** se dedican a arreglar una alteración al ADN. Las células con mutaciones en estos genes tienden a formar mutaciones adicionales en otros (Lodish *et al.*, 1995).

Todas estas alteraciones afectan la estabilidad celular, y con ello las tasas de nacimiento y mortalidad. Cuando las células normales sufren alteraciones genéticas o envejecen, mueren por apoptosis para ser remplazadas por células nuevas, para el caso del cáncer este proceso se sale de control y como consecuencia genera células anormales, que se dividen ininterrumpidamente que en algunas ocasiones se llegan a formar masas de tejido denominadas tumores o metástasis cuando se extiende a otras partes del cuerpo (Lewin, 2004; ACS, 2016; NIH, 2016; OMS, 2017).

Por lo cual se proponen seis alteraciones celulares que colectivamente dictan el crecimiento maligno (Figura 1), las cuales se describen a continuación:



- I. **Evadir la apoptosis:** Las células normales cuando están dañadas entran a una muerte celular programada, para evitar el desarrollo del cáncer; sin embargo, la apoptosis no se puede llevar a cabo en las células de los tumores que llegan a progresar.
- II. **Presentan señales de crecimiento autosuficiente y muy activo:** en un tejido sano, la producción, liberación de señales promotoras del crecimiento y división celular, debe ser controlado para garantizar así la homeostasis celular y las funciones tisulares normales, en cambio una célula cancerosa estas señales no son reguladas y las células dañadas se autorregulan.
- III. **Presentan insensibilidad para la señalización de anti-crecimiento:** las células cancerígenas tienen la habilidad de evadir las señales proliferación negativa, evitando así entrar a un estado de senescencia o muerte celular programada.
- IV. **Angiogénesis sostenida:** los tumores al igual que los tejidos normales requieren de sustento en forma de nutrientes y oxígeno, así como la capacidad de evacuar los desechos metabólicos y el dióxido de carbono, por lo que liberan sustancias al medio para la vascularización de tejidos.
- V. **Crecimiento replicativo ilimitado:** las células sanas tienen un número de ciclos de crecimiento y división celular limitados, por cada división celular cromosomas se acortan y los telómeros crecen, hasta llegar al punto de impedir que la célula se divida, en las células cancerígenas esto no sucede, debido a que tienen la habilidad de producir una enzima que revierte tal efecto.



VI. **Generan una invasión de tejidos y órganos:** a medida que los carcinomas provenientes de los tejidos epiteliales progresan hacia otros grados de malignidad patológica, desarrollan alteraciones de formación y unión a otras células (Manjarrez, 1998; Loraine y Mendoza-Espinoza, 2010; Hanahan y Weinberg, 2011).

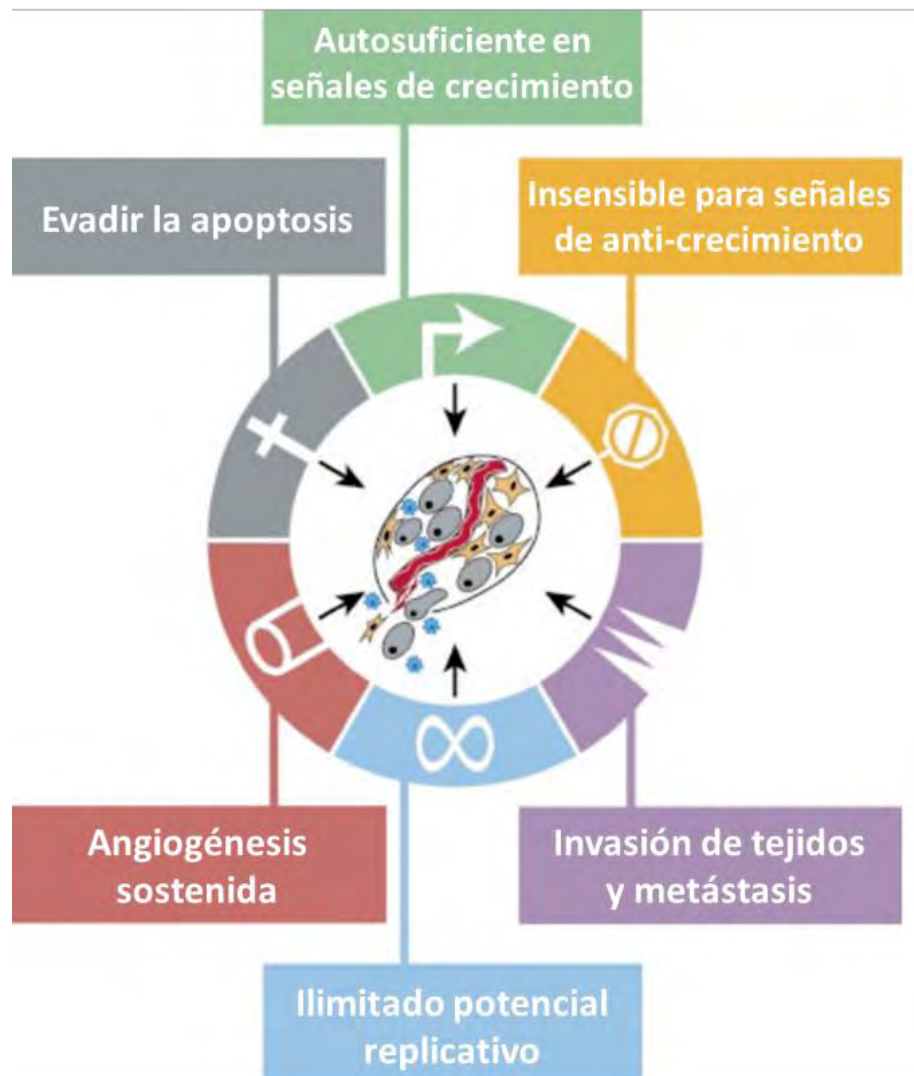


Figura 1. Capacidades de supervivencia adquiridas por células cancerosas (Hanahan y Weinberg, 2011).



2.2 Tipos

Existen más de 100 tipos de cáncer (Hanahan y Weinberg, 2011), donde cada uno recibe el nombre del órgano o tejido en que se forma (NIH, 2016).

A nivel mundial en el año 2012, la Organización Mundial de la Salud (OMS) registro 14.1 millones de nuevos casos de cáncer. Para el 2015 reportó 8.8 millones de defunciones a causa del cáncer, por lo que una de cada seis muertes se debe a esta enfermedad (Loraine y Mendoza-Espinoza, 2010). En 2016, los cinco principales tipos de cáncer reportados en orden de incidencia fueron en primer lugar, pulmonar con 1.69 millones, seguido del hepático con 788 000, colorectal con 774 000, gástrico con 754 000 y de mama con 571 000 de muertes (CDC, 2017; OMS, 2017).

2.2.1 Carcinoma hepatocelular

El carcinoma hepatocelular (CHC), es la forma predominante de cáncer de hígado, y la principal causa de muerte en pacientes cirróticos, siendo más frecuente en hombres que en mujeres con una relación 2-3:1. El CHC tiene varios factores de riesgo conocidos, incluyendo las infecciones crónicas del virus de la hepatitis B (VHB) y el virus de la hepatitis C (VHC), el abuso del alcohol, la hepatitis autoinmune, la diabetes mellitus, la obesidad, el tabaquismo, reservas de hierro aumentadas y varios factores metabólicos (Tovar *et al.*, 2007; Dhanasekaran *et al.*, 2016; Pascual *et al.*, 2016).



2.2.1.1 Características

La lesión hepática inducida por estos factores de riesgo, produce un ambiente inflamatorio progresivo que da como resultado un ciclo de necrosis y regeneración que conlleva a la inestabilidad cromosómica. Las alteraciones genéticas y epigenéticas que se acumulan progresivamente en un microambiente de incremento de los niveles de las especies de oxígeno reactivo, citoquinas inflamatorias y fibrosis, muy probablemente conduzcan a la iniciación del CHC (Ally *et al.*, 2017). Los pacientes con CHC presentan una o varias manifestaciones clínicas que incluyen dolor en el cuadrante superior derecho del abdomen, pérdida de peso, y descompensación de la función hepática evidenciada por alteración en enzimas hepáticas con cirrosis. También presentan manifestaciones poco comunes como tener el abdomen agudo secundario a ruptura del tumor con hemorragia intraabdominal y manifestaciones extra hepáticas. Más de la mitad de los pacientes con CHC presenta anemia. En 10% a 20% de los casos es posible auscultar un soplo hepático (Uribe *et al.*, 2010).

2.2.1.2 Incidencias en el mundo y en México.

El cáncer primario de hígado representa aproximadamente el 4% de todos los nuevos cánceres diagnosticados a nivel mundial. De todas las neoplasias que se originan en el hígado, aproximadamente el 85-90% corresponden a CHC, que a su vez representa globalmente la quinta neoplasia más frecuente y la segunda causa más común de muerte por cáncer en todo el mundo, con más de 700,000 muertes anuales registradas a nivel global en los últimos años (Tovar *et al.*, 2007; González



& Sánchez, 2014; Ally *et al.*, 2017). En el año 2012 más del 80% de los 782,000 nuevos casos de CHC ocurrieron en regiones menos desarrolladas del mundo (Dhanasekaran *et al.*, 2016). Es decir, las incidencias de cáncer no están registradas de manera uniforme en todo el mundo (Figura 2), ya que más del 80% de los casos de CHC, ocurren en África subsahariana o en Asia oriental, China representa más del 50% de los casos del mundo, Europa representa un 20%, América del norte constituye un 13%, seguido de Senegal, Gambia y Corea del Sur (El-Serag y Rudolph, 2007; Uribe *et al.*, 2010; Joong-Wong *et al.*, 2015).

Estados Unidos de América se encuentra en el grupo que representa el mayor incremento en las últimas dos décadas, en el sexo femenino con el 63% y en el sexo masculino el 31%, y se espera que este número aumente durante los próximos 20 años y sobrepase la incidencia del cáncer de mama y el colorrectal para convertirse así, en la tercera causa de muerte por cáncer en los Estados Unidos para el 2030 (Singal y El-Serag, 2015).

En México, la incidencia de esta patología se ha duplicado en un lapso de 25 años (1965-1990), desde el año 2000 hasta el 2006 se ha informado un incremento nacional de 14% en la mortalidad por CHC (4.16 defunciones por 100,000 habitantes en el año 2000 contra 4.74 en el 2005), en donde se percibe una mayor incidencia para el sexo femenino sobre el masculino con un incremento del 15% y 12.5 % respectivamente. La información disponible refiere que los grupos de edad más afectados son los mayores de 55 años, mientras que la tasa de mortalidad es igual en hombres que en mujeres (Uribe *et al.*, 2010; González & Sánchez, 2014).

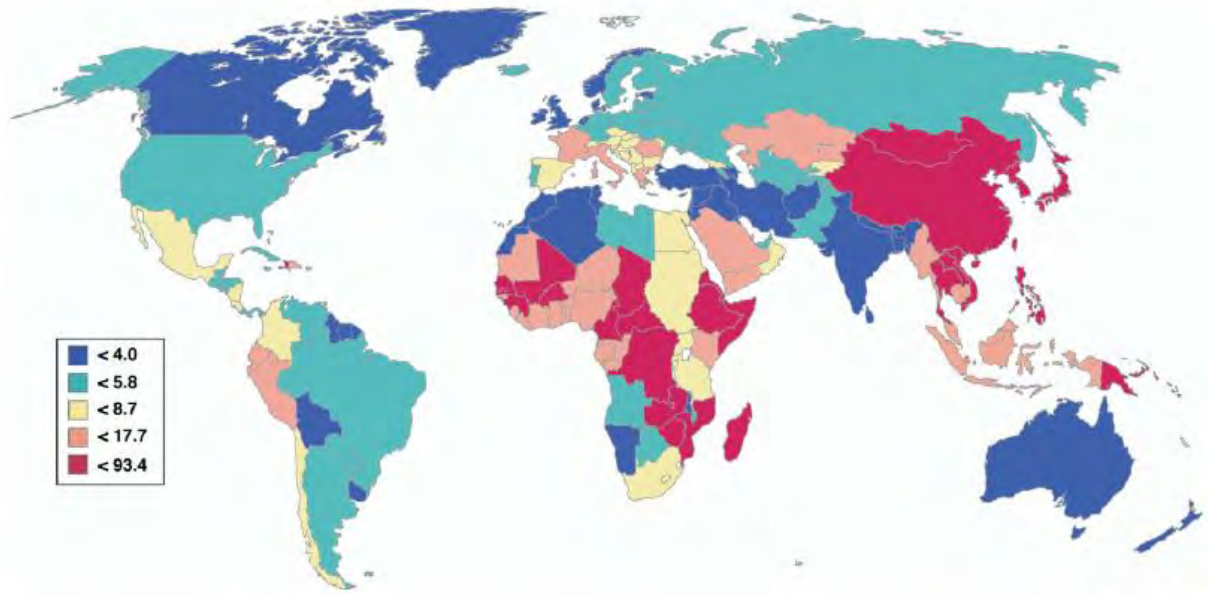


Figura 2. Variaciones regionales en las tasas de mortalidad de carcinoma hepatocelular. Las tasas se informan por cada 100.000 personas (El-Serag y Rudolph, 2007).

2.3 Tratamientos

Derivado del aumento en la incidencia de cáncer, se han desarrollado diferentes tratamientos, para su control o erradicación. Los pacientes con cáncer invasor, requieren de pruebas adicionales para establecer la etapa de la enfermedad y con ello el tratamiento a elegir, debido a que este dependerá primariamente de la extensión de la lesión, de factores como la edad y presencia de otras condiciones médica (Loraine y Mendoza-Espinoza, 2010; NIH, 2016).

2.3.1 Tratamientos convencionales

Actualmente existen diferentes tratamientos para el cáncer (Tabla 1), dependiendo del grado de afectación en que se encuentre el tumor (Loraine y Mendoza-Espinoza, 2010; NIH, 2016).



Tabla 1. Tratamiento con base en el estado patológico del tumor (Loraine y Mendoza-Espinoza, 2010).

Grado clínico patológico	Tratamiento principal
Grado 1 (tumor localizado)	Cirugía, radioterapia
Grado 2 (el tumor no existe en los tejidos vecinos)	Cirugía, radioterapia y quimioterapia
Grado 3 (tumor regional con compromiso extenso de los tejidos vecinos e invasión de los ganglios regionales)	Quimioterapia
Grado 4 (tumor con metástasis y leucemias)	Quimioterapia

2.3.2 Tratamientos alternativos

Los tratamientos que han sido utilizados generalmente presentan efectos secundarios, que pueden llegar a ser más graves que la misma enfermedad, dado que no son específicos (Loraine y Mendoza-Espinoza, 2010); por tal motivo, se están buscando alternativas para combatir esta enfermedad, como las plantas, hongos e insectos.

2.3.2.1 Plantas

Dentro de las plantas que se han utilizado en el tratamiento de cáncer se encuentra la *Morinda citrifolia* (noni), la cual contiene xeronina, un alcaloide que se ha reportado que tiene efecto preventivo contra el cáncer en la etapa inicial de la carcinogénesis (Wang y Su, 2001), *Canabis sativa* que contiene cannabinoides los



cuales presentan efecto antitumoral (Ligresti *et al.*, 2006); diferentes especies del género *Taxus*, de las cuales se extrae principalmente un metabolito para realizar un fármaco empleado en la quimioterapia de diversos tipos de cáncer y para el tratamiento de la artritis reumatoide, de manera comercial se conoce como taxol (Barrales-Cureño y de la Rosa, 2014) y algunas especies de la familia Leguminosae cuyos extractos metanólicos de *Neptunia pubescens* (fruto), *Zygia latifolia* (tallo) y *Albizia adinocephala* (corteza) presenta un efecto antiproliferativo en el cáncer de mama, y *Pithecelobium dulce* (hojas), *Acosmium panamense* (tallo), *Macroptilium lathyroides* (rama), y *Aeschynomene sp.*, (raíz) en el cáncer de próstata (Olmedo *et al.*, 2016).

2.3.2.2 Hongos

En lo que se refiere a los hongos se reportan ejemplos como: el hongo *Grifola frondosa* (Maitake) el cual presenta actividad inhibidora de crecimiento tumoral, estimulando la actividad de las células competentes del sistema inmunitario, que potencian la capacidad de eliminar células en mal estado, por lo cual es efectivo para diferentes tipos de cáncer (Namba, 1996); *Taiwanofungus camphoratus* presentando actividad anticancerígena en el micelio, con una actividad relacionada con la detención del ciclo celular, inducción de apoptosis, inhibición de angiogénesis y respuesta inmune (Illana-Esteban, 2014); *Cordyceps militaris* que ha sido utilizado durante años en la medicina tradicional china como un tratamiento contra el cáncer, cuyo efecto es atribuido a una proteína (Park *et al.*, 2009).



2.3.2.3 Insectos

Se ha observado que los insectos además de su gran aporte proteico, grasas, vitaminas y minerales (Belluco *et al.*, 2013), se pueden utilizar en la medicina tradicional (entomoterapia), como es el caso del alacrán para la insolación en niños, las avispas para la hinchazón de rodillas y articulaciones, los grillos para problemas de orina, las hormigas para algunos tipos de degeneraciones oculares, las libélulas para tratar la hemoptisis, entre otros (Cahuich-Campos y Flores, 2014). Se ha reportado el uso de insectos como una alternativa para combatir algunos tipos de cáncer, entre los que podemos mencionar: *Mylabris phalerata* Pallas, un coleóptero del cual se aísla la cantaridina, un potente inhibidor de células de carcinoma hepatocelular, causando lesiones agudas a las células, debido a que interfiere con el metabolismo de proteínas y ácidos nucleicos en las células cancerosas (Chin-Chiung *et al.*, 2000). El veneno de *Apis mellífera* una mezcla muy compleja de péptidos activos se le atribuye un efecto anticancerígeno a la melitina, un polipéptido básico que produce alrededor del 50% del veneno seco, que ocasiona susceptibilidad en la membrana celular, haciéndola más permeable (Gajski y Garaj-Vrhovac, 2013). El veneno del escorpión chino *Buthus martensii* Karsch, encontrando un péptido con actividad antitumoral y analgésica (Yan-Feng *et al.*, 2003); de igual manera, se han estudiado las cecropinas, un grupo de péptidos extraídos de la hemolinfa de la polilla de seda gigante, *Hyalophora cecropia*, los cuales presentan actividad contra linfomas y leucemias *in vitro*, su mecanismo de acción implica la formación de poros en la membrana citoplasmática (Moore *et al.*,

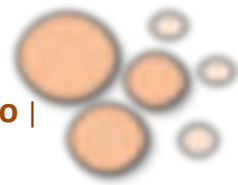


1994); así mismo, se ha reportado que los compuestos bioactivos de la larva de *Protaetia brevitarsis* muestran citotoxicidad contra células cancerosas, mediante actividad inductora de apoptosis (Yung-Choon *et al.*, 2007); también se ha reportado el uso de *Ulomoides dermestoides*, un coleóptero utilizado como remedio casero en la medicina tradicional China, para el tratamiento de diversas patologías como la diabetes, Parkinson, artritis, asma, e incluso algunos tipos de cáncer (Deloya-Brito y Deloya, 2014).

2.3.2.3.1 Consumo de insectos

Por siglos, los insectos se han utilizado como una fuente de alimento debido su alto contenido proteico, su disponibilidad y facilidad de reproducción, además que su crianza genera un menor impacto para el ambiente y su mantenimiento es menos oneroso. Se consumen todas las etapas de vida de los insectos, van desde huevos, larvas, pupas hasta adultos. Los principales ordenes de consumo de la Clase insecta son: escarabajos (Coleoptera), orugas, mariposas y palomillas (Lepidoptera), hormigas, abejas y avispas (Hymenoptera), chapulilnes y langostas (Orthoptera), insectos verdaderos, áfidos y chinches (Hemiptera), termitas (Isoptera) y moscas (Diptera) (Rumpold y Schlüter, 2013; Yi *et al.*, 2013).

A nivel mundial se han utilizado como alimento, consumiéndose cerca de unas 1700 especies aproximadamente, el consumo de estos se da principalmente en los pueblos indígenas y países pobres (cerca de 113 países y 300 grupos étnicos los consumen), donde hay escasez de alimentos nutritivos. Para Europa se reporta el 2% de estos para consumo, para África el 30% y en América hasta el 39% total de



consumo (Ravzanaadii *et al.*, 2012; Siemanowska *et al.*, 2013). En México, se reporta el consumo aproximado de 104 especies de insectos, cuyo orden más representado es el Hymenoptera, seguido de Hemiptera y posteriormente Coleoptera (Ramos-Elorduy y Viejo-Montesino, 2007)

Los insectos comestibles se han transformado en una alternativa viable de proteínas para la alimentación humana y su uso está progresando constantemente debido a las ventajas que representan, tales como son su elevado contenido de proteína y/o grasa en comparación con el ganado convencional, su corto ciclo biológico que facilita su crianza, su gran capacidad reproductora y su amplia distribución en diferentes hábitats (Siemanowska *et al.*, 2013; Yi *et al.*, 2013; Smetana *et al.*, 2017). El principal aporte nutricional de los insectos en peso seco es la proteína, conteniendo en promedio de 40-60% y su segundo aporte nutricional es la grasa con un 25% aproximadamente (Lizhang *et al.*, 2008), sin embargo a pesar de tener un gran contenido graso, cabe destacar que menos del 9% son ácidos grasos de tipo saturado y el resto son mono o poli-insaturados (Ramos-Elorduy y Viejo-Montesino, 2007).

Debido a su gran aporte nutricional la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés), está sugiriendo el consumo de insectos para cubrir la demandas de ingesta de proteína animal que se requieren en la dieta diaria de la alimentación humana (Belluco *et al.*, 2013; Dreassi *et al.*, 2017).



2.3.2.3.2 *Tenebrio molitor*

Es un insecto perteneciente al Phylum Arthropoda, Clase Insecta, Orden Coleóptera, Familia Tenebrionidae (CONABIO, 2017), comúnmente denominado como gusano de la harina o gorgojo amarillo de la harina, es de color castaño oscuro, mide aproximadamente 18 mm de largo y 4 mm de ancho, cuyas larvas son cilíndricas, duras, con pequeñas patas torácicas, vive en harinas y subproductos de granos, también consumen cuero y restos de carne seca. Es uno de los insectos más copulentos que ataca granos almacenados. Presenta 4 fases o estadios de vida los cuales son huevo, larva, pupa y adulto (Bin *et al.*, 2014). En la (Figura 3) se muestran 3 de los 4 estadios de vida del insecto.



Figura 3. *Tenebrio molitor* en sus tres estadios de vida, de izquierda a derecha podemos observar la larva, pupa y adulto.



Aunque *Tenebrio molitor* es un insecto considerado como plaga nociva para el grano almacenado, sus larvas, se utilizan como alimento para mascotas en muchos países, debido a sus propiedades nutritivas como son las grasas que son ricas en ácido oleico, el cual tiene la capacidad de disminuir las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y aumentar los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en la sangre (Bin *et al.*, 2014; Dreassi *et al.*, 2017); en cuanto a sus proteínas son ricas en aminoácidos, esenciales y no esenciales (Tabla 2), cuyos valores son mayores en comparación con la carne tradicional (Tabla 3) (Siemanowska *et al.*, 2013). Diversos autores han mencionado una variedad de formas en que se pueden utilizar las larvas de este insecto: como suplemento alimenticio para mascotas (Argueta y Ramos, 2013)

Tabla 2. Contenido de aminoácidos esenciales y no esenciales de las proteínas de *Tenebrio molitor*, expresadas en g /100 g de proteína (Ravzanaadii *et al.*, 2012).

Aminoácidos	Larva	Adulto	Exuvia	Excreta
Cisteína	0.517	0.587	0.316	0.186
Metionina	0.672	0.547	0.11	0.065
Ácido aspártico	3.591	3.95	1.886	0.486
Treonina	1.807	2.153	1.124	0.276
Serina	2.091	2.204	2.055	0.29
Ácido glutámico	5.676	5.236	3.129	0.559
Glicina	2.41	5.443	3.901	0.53
Alanina	3.685	4.786	2.815	0.302



Valina	2.439	3.368	2.423	0.253
Isoleucina	3.556	3.918	1.9	0.33
Leucina	3.405	5.165	1.981	0.368
Tirosina	3.46	1.635	2.036	0.168
Fenilalanina	1.759	1.538	0.98	0.198
Lisina	2.906	2.227	1.009	0.193
Histidina	1.527	1.71	1.236	0.438
Arginina	2.434	2.632	1.05	0.255
Prolina	3.019	3.433	2.659	0.396

Tabla 3. Composición proximal de la larva de *Tenebrio molitor* comparada con carne de pescado, pollo, cerdo y res (Siemianowska *et al.*, 2013).

Tipo de alimento	Agua %	Proteína %	Grasa %	Ceniza %
<i>Larva de T. molitor</i>				
Fresco	56.27 ± 0.127	17.92 ± 0.731	21.93 ± 0.577	1.55 ± 0.114
Polvo	2.43 ± 0.157	44.72 ± 0.433	42.48 ± 0.808	3.69 ± 0.481
<i>Carnes</i>				
Pollo	75.2	17.8	6.0	1.0
Res	75.4	20.1	0	1.0
Cerdo	74.2	22.0	1.6	1.0
Pescado	70.6	18.6	0.7	1.2

Aunado a lo anterior la proteína de *T. molitor* tiene alta digestibilidad, Yi *et al.*, (2016) reportaron un estudio de digestión gastroduodenal *in vitro* de la solubilidad proteica que confiere la larva de *T. molitor*, obtuvieron cerca de un 80% de la proteína soluble



en agua es digestible, en cambio la proteína sobrenadante la digestibilidad baja hasta un 50%. Por ello es factible utilizar *T. molitor* para desarrollar una bebida proteica, considerando que este tipo de bebida trata de cubrir niveles altos de proteína (6.5 g por porción o 16%). Las bebidas proteicas que hasta ahora se han reportado en su mayoría son a base de granos y legumbres (Rivera *et al.*, 2008; Pilco e Hidalgo, 2015).



III. JUSTIFICACIÓN

Debido al incremento de incidencias de cáncer que existen en el mundo y a los efectos colaterales que presentan los tratamientos convencionales, es necesario buscar nuevas alternativas, la bebida a base de *Tenebrio molitor* puede ser una opción viable debido a que presenta una cercanía taxonómica con otros coleópteros que ya han sido estudiados, además de contar con nutrientes esenciales para amortiguar el deterioro de los pacientes.



IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto de una bebida proteica a base de *Tenebrio molitor* sobre la hepatocarcinogénesis experimental en el ratón, para plantearse como posible tratamiento de cáncer hepático.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar la composición proteica de los estadios larva, pupa y adulto de *T. molitor* mediante un análisis químico proximal para comparar los niveles de nutrientes presentes en cada uno.
- Identificar la mayor disolución proteica de cada estadio de *T. molitor*, mediante una prueba de solubilidad para obtener una bebida con el mayor aprovechamiento de proteína.
- Administrar una bebida preparada a partir de los extractos de cada estadio de *T. molitor* con base en la concentración de proteína soluble, como tratamiento antes y durante la hepatocarcinogénesis experimental en el ratón, para conocer su efecto mediante análisis de biología celular y molecular en el tejido hepático del ratón.



V. HIPÓTESIS

La administración de las bebidas a base de los diferentes estadios de *Tenebrio molitor* inhiben o amortiguan los efectos de la hepatocarcinogénesis inducida por dietilnitrosamina en el ratón.



VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Obtención de material biológico

Los insectos de la especie *Tenebrio molitor*, se obtuvieron del Laboratorio de bioquímica y biología celular del Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Los tenebrios se mantuvieron en domos de plástico (Bisagra transparente y reforzada; 15 x 14 x 9 cm) (Figura 4); y se alimentaron con salvado de trigo y lechuga como una fuente de agua (Figura 5). Se separaron por estadios de vida (larva, pupa y adulto), de 100-150 especímenes por caja, se revisaron diariamente para monitorearlos, en el caso de que las larvas y/o pupas cambiaran de estadio, se colocaron en otro domo nuevo registrando la fecha de traslado.



Figura 4. Alojamiento de *Tenebrio molitor*



Figura 5. Alimentación de *Tenebrio molitor*



6.2 Elaboración de harina a base de *Tenebrio molitor*

Los insectos de cada estadio, se colocaron en una estufa de secado LUMISTELL a 60 °C, ya deshidratados se molieron en una licuadora marca Oster modelo 4655.

6.3 Análisis químico proximal

El análisis químico proximal (AQP) se realizó a cada estadio de vida de *T. molitor* de acuerdo a la AOAC (1999), siguiendo la técnica 925.09 para humedad, 957.01 para proteína cruda, 920.39 para extracto etéreo, y 923.03 para ceniza.

6.4 Prueba de solubilidad de proteína

Para obtener el porcentaje de solubilidad de los diferentes estadios de *T. molitor*, se siguió la metodología de Vielma y Medina (2006), para lo cual se pesaron 500 mg de cada extracto de *T. molitor*, y se diluyeron en 2125 μL de agua destilada y 375 μL de inhibidor de proteasas (Complete, ROCHE), para obtener una concentración de 200 mg mL⁻¹. Se agitó durante 5 min a 4°C, posteriormente se aforó a 25 mL con agua destilada. Las soluciones obtenidas se transfirieron a tubos cónicos para centrifugarlos a 6000 rpm durante 15 min a 4 °C. Para obtener la solución madre se obtuvo el sobrenadante con una concentración 20 mg mL⁻¹, el cual se ajustó a pH de 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0, utilizando una solución de HCl 0.1 N para acidificar y de NaOH 0.1 N para alcalinizar, respectivamente. Posteriormente se transfirieron 1.5 mL de cada solución madre de diferente pH, a un matraz volumétrico de 25 mL y se aforó, para obtener una concentración final de 1.2 mg mL⁻¹.



Cada solución permaneció en agitación durante 1 h a 5 °C; posteriormente se centrifugó a 4000 rpm durante 30 min a 4 °C. Para cuantificar proteína soluble, se utilizó un espectrofotómetro (JENWAY, modelo 6305) a 595 nm, se utilizaron 1.6 mL de muestra y 0.4 mL de reactivo de Bradford (BIO-RAD), la cual fue agitada durante 5 min, previo a la lectura.

6.5 Obtención de la bebida

Para elaborar la bebida se realizó una solución de 20 g de insecto (de cada estadio de vida) en 1 L de agua destilada. Posteriormente se centrifugó a 6000 rpm, durante 15 min a 4 °C, para obtener el sobrenadante, al cual se le ajustó el pH para larva de 6.5, para pupa 6.0 y para adulto de pH 7.0. Las soluciones con pH ajustado permanecieron en agitación durante 1 h, posteriormente se centrifugaron a 4000 rpm por 30 minutos a 4 °C, para obtener el sobrenadante que fue concentrado hasta 40 mL, en un rota vapor R-215 BÜCHI (Suiza) a 75 rpm a 60 °C; posteriormente, las muestras se centrifugaron a 6000 rpm por 30 min a 4 °C. Para obtener la cantidad de proteína soluble contenida en la bebida, se utilizó un espectrofotómetro (JENWAY, modelo 6305) a 595 nm, se utilizaron 1.6 mL de muestra y 0.4 mL de reactivo de Bradford (BIO-RAD), la cual fue agitada durante 5 min, previo a la lectura, para obtener una bebida con concentración $62.5 \mu\text{g mL}^{-1}$, la cual fue almacenada en tubos eppendorf a -20 °C, para su posterior uso.



6.6 Modelo de cáncer hepático

Se utilizaron 25 ratones (*Mus musculus*) de la Cepa C57BL/6, machos de 6 semanas de edad, con un peso de 20 g aproximadamente, obtenidos de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) CINVESTAV-IPN, Ciudad de México, México. Los animales permanecieron en condiciones de luz/oscuridad de 12 h a 21 °C y 50 % de humedad relativa, con agua y alimento *ad libitum* de acuerdo al protocolo aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de la UAEH, además se consideró la NORMA Oficial Mexicana 062-ZOO (1999), correspondiente a las “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”. Los animales se asignaron completamente al azar en 5 grupos identificados como Control (Ctrl), Dietilnitrosamina (DEN), DEN + Larva (D+L), DEN + Pupa (D+P) y DEN + Adulto (D+A), los cuales recibieron la bebida correspondiente durante todo el experimento (Figura 6).

La metodología empleada para la inducción al cáncer fue acorde a Schiffer *et al.*, (2005); para lo cual los animales en la semana 1, permanecieron en ambientación, de la semana 2 a la 11 a cada ratón, se le administraron 20 mg kg⁻¹ PV Dietilnitrosamina (DEN) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 2 veces por semana. En la semana 12, los animales permanecieron sin la aplicación de DEN, para posteriormente ser sacrificados de acuerdo a la NOM-033-SAG/ZOO-2014, en el laboratorio 50 del departamento de Biología Celular del CINVESTAV-IPN, Ciudad de México, México.

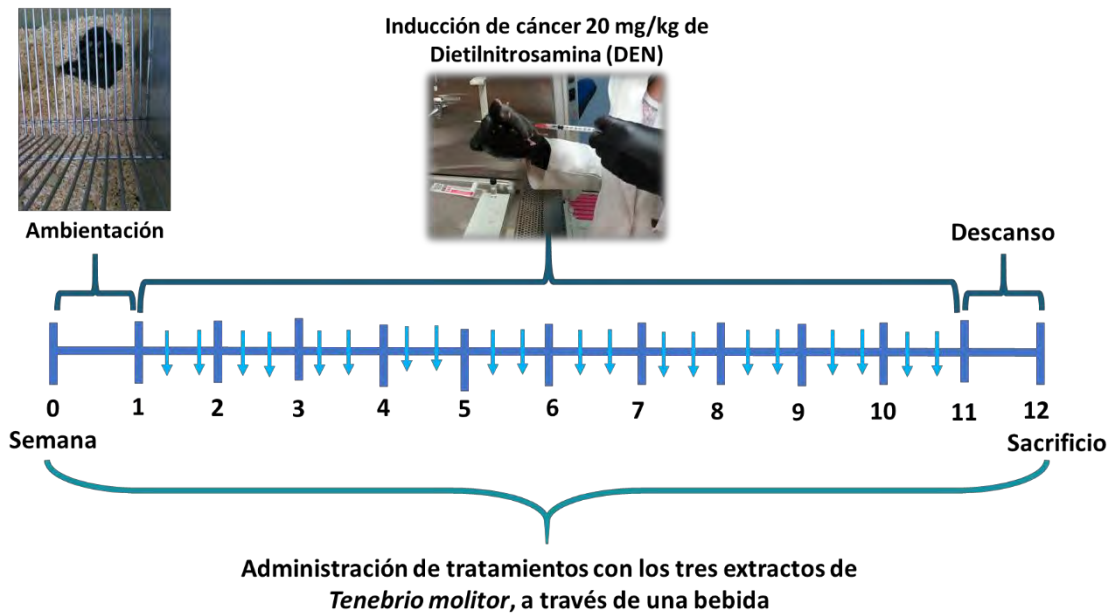


Figura 5. Esquema de la inducción de carcinoma hepatocelular y tratamiento.

Para la disección del tejido hepático, los animales fueron anestesiados con isoflurano (PiSA, Reg. SAGARPA Q-7833-22) inhalado de 3-5 s. Una parte del tejido hepático fue conservado en formaldehído al 4%, para la realización de las tinciones tricrómica de Masson y de hematoxilina y eosina (H&E), así como para la realización de pruebas de inmunohistoquímica (IHQ); otra parte del tejido se congeló en nitrógeno líquido para realizar los análisis de Western blot (WB).

6.7 Determinación de daño hepático, por Western blot

Para realizar el análisis de Western blot, se homogeneizaron de 0.09 - 0.1 g de tejido en 1 mL de amortiguador de inmunoprecipitación (AIP) más inhibidores (Complete, Phostop, PMSF 1mM, y NA_3VO_4 2 mM), en un homogeneizador GLAS-COL 099C K64, para cada una de las muestras, las cuales permanecieron en agitación en una



plataforma oscilante (GyroMini Nutating Mixer de Labnet), a 4° C por 20 min, se centrifugaron en una microcentrifuga (Heraeus Pico de Thermo Scientific) a 12000 rpm a 4° C durante 20 min, se recuperó el sobrenadante, para ser centrifugado a 12000 rpm 4° C durante 10 min, para extraer el residuos de grasa. Se tomó una alícuota de 20 μ L de cada tubo para realizar la cuantificación de proteínas de acuerdo al protocolo del ácido bicinconínico (BCA), utilizando una absorbancia de 562 nm en un espectrofotómetro Epoch de Bio Tek, de acuerdo a Hill y Straka (1988). Posteriormente se extrajeron 200 μ L de la proteína almacenada en ultracongelación, y se les agregó 50 μ L de amortiguador de carga 1x Laemmli, para preparar el stock 5x se mezcló: 2.4 mL de Tris 1M pH 6.8, 0.8 g de dodecilsulfato sódico (SDS), 4 mL de glicerol 100%, 0.1% de azul de bromofenol 0.01% 2.8 mL de agua y 1 mL de β -mercaptoetanol agregado al final. Una vez que todas las muestras tenían amortiguador de carga más el mercaptoetanol, se agitaron en el vortex y calentaron en un thermoblock marca Thermo Stat Plus a 96 °C por 10 min, e inmediatamente se colocaron en hielo y se almacenaron a -70 °C para análisis posteriores.

Para la electroforesis en gel de poliacrilamida se siguió la técnica de Mahmood y Ping-Chang (2015), con la diferencia de que se utilizaron geles separadores además de 10%, uno adicional de 12 %, con un concentrador de 5 % y un Tris 1.5 M con pH 8.8 y 1 M pH 6.8, con un voltaje de 70 V durante 30 min, y 120 V, durante 1.30 h, se transfirió por 3 h a 0.3 A. Los anticuerpos primarios se diluyeron en una solución de TBSt 1x y 5% leche, la dilución para cada anticuerpo fue la siguiente: Mouse, β -catenina (E-5) Santa Cruz SC-7963, 92 kDa, dilución 1:500; Rabbit, CiclinaD1 (H-295), Santa Cruz, SC-753, 37 kDa, dilución 1:1000, Rabbit, Cyp2e1, GeneT ex,



GTX32546, 57 kDa, dilución 1:4000; Rabbit, Gstp1, Sigma Aldrich, SAB3500265, 23-24 kDa, dilución 1:2000; Mouse, Pcna (PC10), Thermo Scientific, 133900, 29 kDa, dilución 1:1000. De acuerdo al anticuerpo primario utilizado se empleó el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), en solución de TBSt 1x y 5 % leche. Anti – Mouse, Jackson, 315-035-003, dilución 1:10000; Anti – Rabbit, Jackson, 111-035-003, dilución 1:10000.

6.8 Determinación de la localización estructural de las proteínas por análisis de inmunohistoquímica

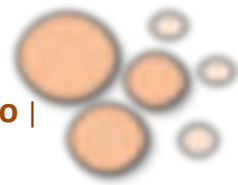
Se siguió la técnica de Arellanes-Robledo *et al.*, (2006), con la modificación de que se incubaron las laminillas con Tris-EDTA-Tween pH 9.01 en baño maría a presión durante 45 min (15 min de precalentado + 30 min de calentado), se hicieron 3 lavados con TBSt 1x por cada nueva solución agregada, se bloquearon con peroxidasa endógena durante 30 min, posteriormente con albumina al 1% en TBSt 1x durante 30 min, se incubó el anticuerpo primario a 4 °C durante toda la noche, diluido en albumina 1%, los anticuerpos usados fueron Mouse, β -catenina (E-5) Santa Cruz SC-7963, 1:500; Rabbit, Cyp2e1 GeneT ex, GTX32546, 1:100; Rabbit, Ki67 (SP6) GeneT ex, GTX16667, 1:100, se agregaron 2 gotas del Anti cuerpo secundario, incubándolo durante 30 min a temperatura ambiente. Anti – Mouse, Jackson 315-035-003, 1:10000; Anti – Rabbit, Jackson 111-035-003, 1:10000, se agregó la solución (1mL de DAB-sustrato + 1 gota de DAB-Cromógeno) con un tiempo de reacción 1 a 3 min se sumergen las laminillas en agua destilada, para cortar la reacción, se secan la laminillas en una superficie plana y se tiñen con hematoxilina durante 10 min se retiró el exceso del colorante con agua de la llave,



se calentó agua destilada en un coplin durante 30 s en el microondas y se colocaron las laminillas durante 3 min., se dejaron secar, se agregaron 3 gotas de solución de montar (EcoMount) y se cubrió la laminilla con un cubreobjetos para poder realizar las observaciones en el microscopio.

6.9 Análisis estadístico

Para realizar la prueba de solubilidad se realizó una curva, para cada estadio a diferentes pH. El consumo de bebida y el peso de los animales se determinaron a través de un análisis descriptivo a través del tiempo (en semanas). Las variables de porcentaje de peso relativo de los hígados, cuantificación de núcleos marcados por Ki67 y las densitometrías de los anticuerpos se analizaron bajo un diseño completamente al azar mediante un análisis de varianza (ANOVA), si estos presentaban diferencias estadísticamente significativas se evaluaron con el método de comparación de medias Tukey con una $P < 0.05$ con el programa IBM SPSS Statistics 20, (2011).



VII. RESULTADOS

7.1 Análisis químico proximal

En la Tabla 4, se muestra que el estadio de vida de larva presentó mayor extracto etéreo, menor de proteína cruda y cenizas; contrario al estadio de vida adulto, el cual presentó menor extracto etéreo, mayor contenido de proteína cruda y cenizas.

Tabla 4. Análisis químico proximal de tres estadios de vida de *Tenebrio molitor*

Análisis Químico Proximal				
Estadio	Humedad	Proteína	Extracto etéreo	Ceniza
	%		Base seca %	
Larva	62.42 ± 0.159	51.64 ± 0.505	29.60 ± 0.029	3.10 ± 0.015
Pupa	64.35 ± 0.064	57.82 ± 0.190	22.23 ± 0.394	3.23 ± 0.052
Adulto	63.84 ± 0.110	63.85 ± 0.119	17.10 ± 0.028	3.53 ± 0.202

Media ± el error estándar

7.2 Prueba de solubilidad de proteína

En la figura 7, se muestra que el extracto elaborado con larva presentó mayor solubilidad de proteína (47.6%) a un pH 6.5, seguido de pupa (34.6%) a un pH 6.0, y por último adulto (26.81%) con un pH 7.0. Cabe mencionar que la solubilidad de la proteína disminuyó considerablemente en los tres estadios con un pH de 3.0.

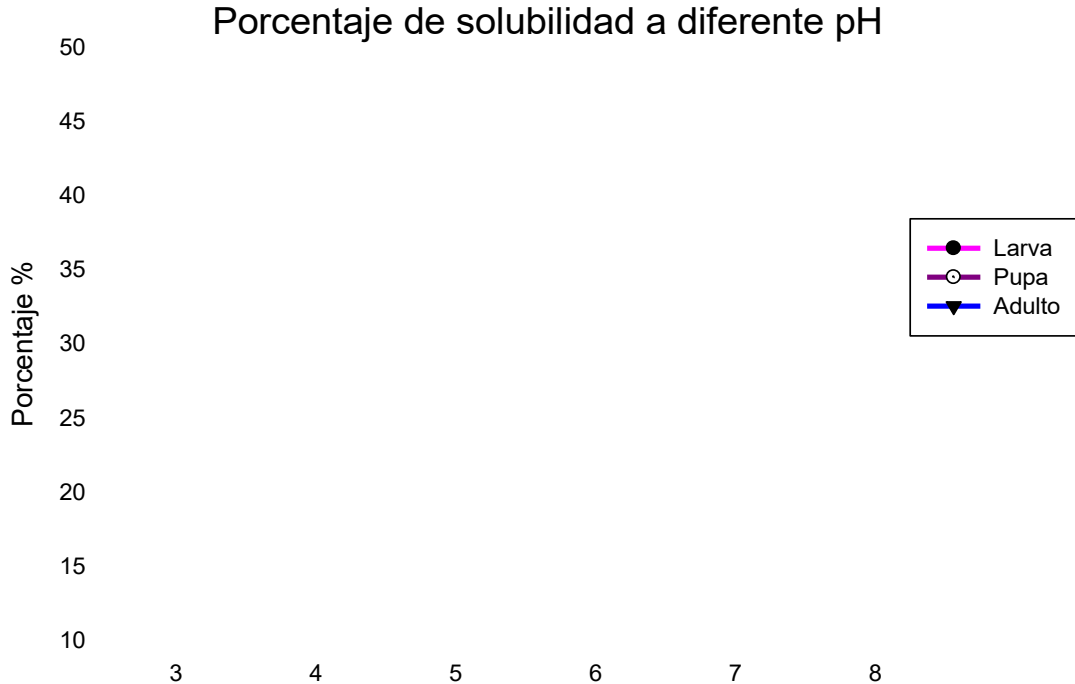


Figura 6. Solubilidad de la proteína de *Tenebrio molitor* a diferente pH.

7.3 Consumo de bebida

En la figura 8, se muestra el promedio semanal del consumo diario de bebida aceptada por los ratones, cabe mencionar que para el grupo de D+L se ofreció bebida a base de larva, para D+P bebida a base de pupa y para D+A bebida a base de adulto, mientras que el Ctrl y DEN se ofreció agua simple purificada. Para los grupos DEN, D+L y D+A, la aceptación de la bebida fue muy similar, de 2.69, 2.66 y 2.83 mL respectivamente, mientras que para el grupo D+P, la aceptación fue mayor con 3.48 mL y para el control fue de 4.32 mL.

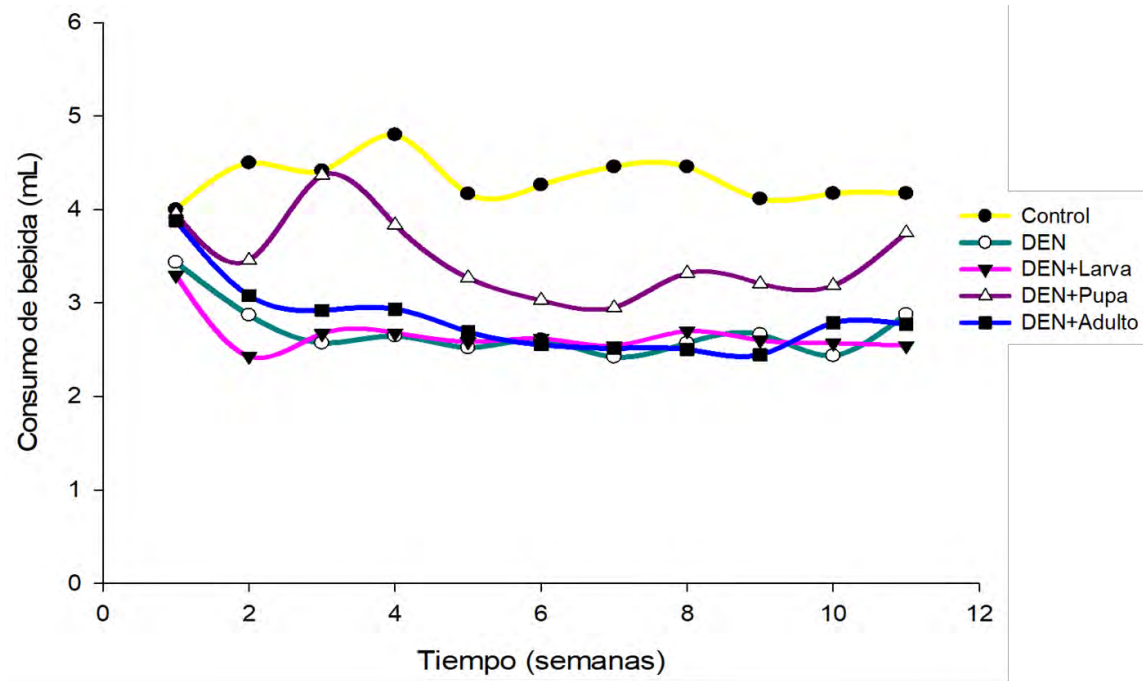


Figura 7. Consumo de bebida de ratones con hepatocarcinoma.
DEN: Dietilnitrosamina

7.4 Ganancia de peso de los animales

El peso de los ratones se muestran en la Figura 9, donde se puede observar que los animales a los cuales se les administro DEN, mantuvieron un peso constante, a diferencia del grupo control, los cuales incrementaron el peso a partir de la semana 6. En lo que se refiere al peso de los hígados con respecto al PV, no hubo diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$) entre tratamientos (Figura 10).

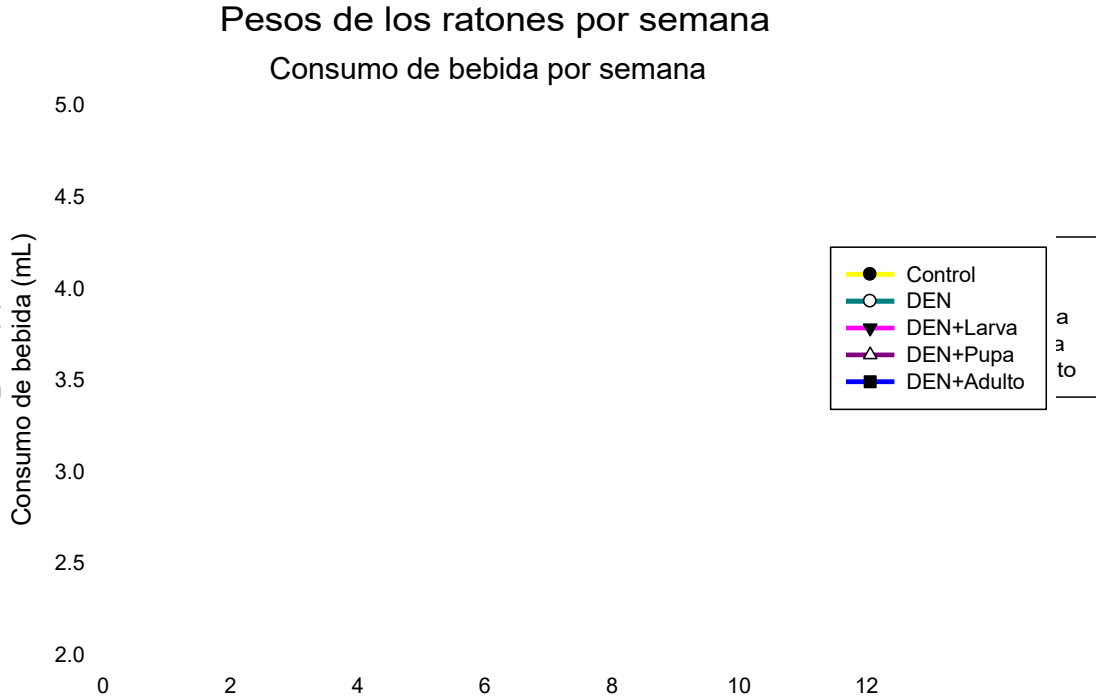


Figura 8. Peso semanal de ratones con hepatocarcinoma inducido, que consumieron bebida a base de *Tenebrio molitor*.

(*): Diferencia estadística significativa ($P < 0.05$), con respecto al grupo Control.

DEN: Dietilnitrosamina

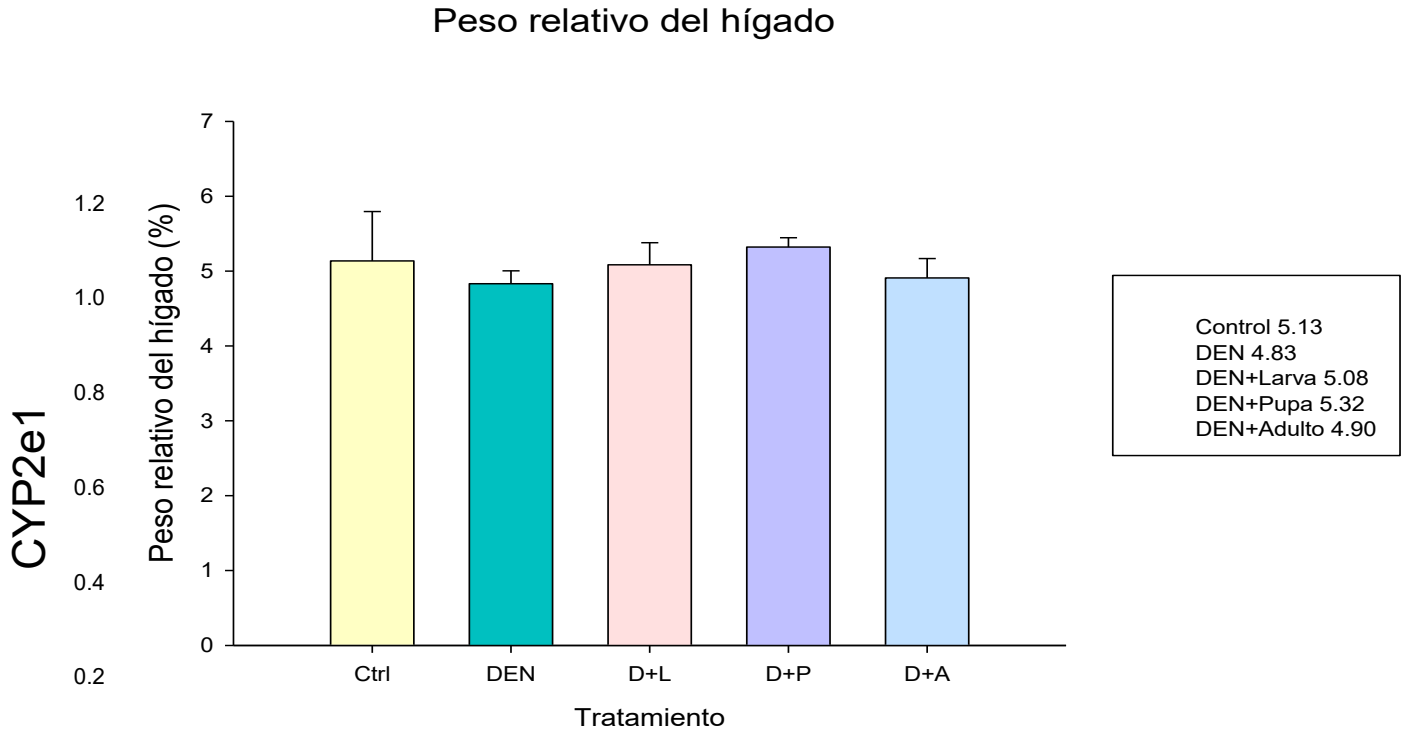


Figura 9. Peso de hígado con relación al peso vivo de ratones con hepatocarcinoma inducido, que consumieron bebida a base de *Tenebrio molitor*.

DEN: Dietilnitrosamina



7.5 Valoración histológica

El tejido hepático al ser sometido a una tinción de hematoxilina y eosina, no hubo diferencia entre el tratamiento que consumió agua de bebida a base de pupa de *T. molitor* con respecto al control (Figura 11). Al someter al tejido hepático a tinción de tricrómica de masson (Figura 12) se observó coloración azul de las fibras de colágeno en el tejido de animales a los cuales se les indujo cáncer y no se les proporcionó bebida a base de *T. molitor*, en cambio aquellos tratamientos que recibieron bebida a base del estadio de larva y pupa presentaron un comportamiento similar con el control.

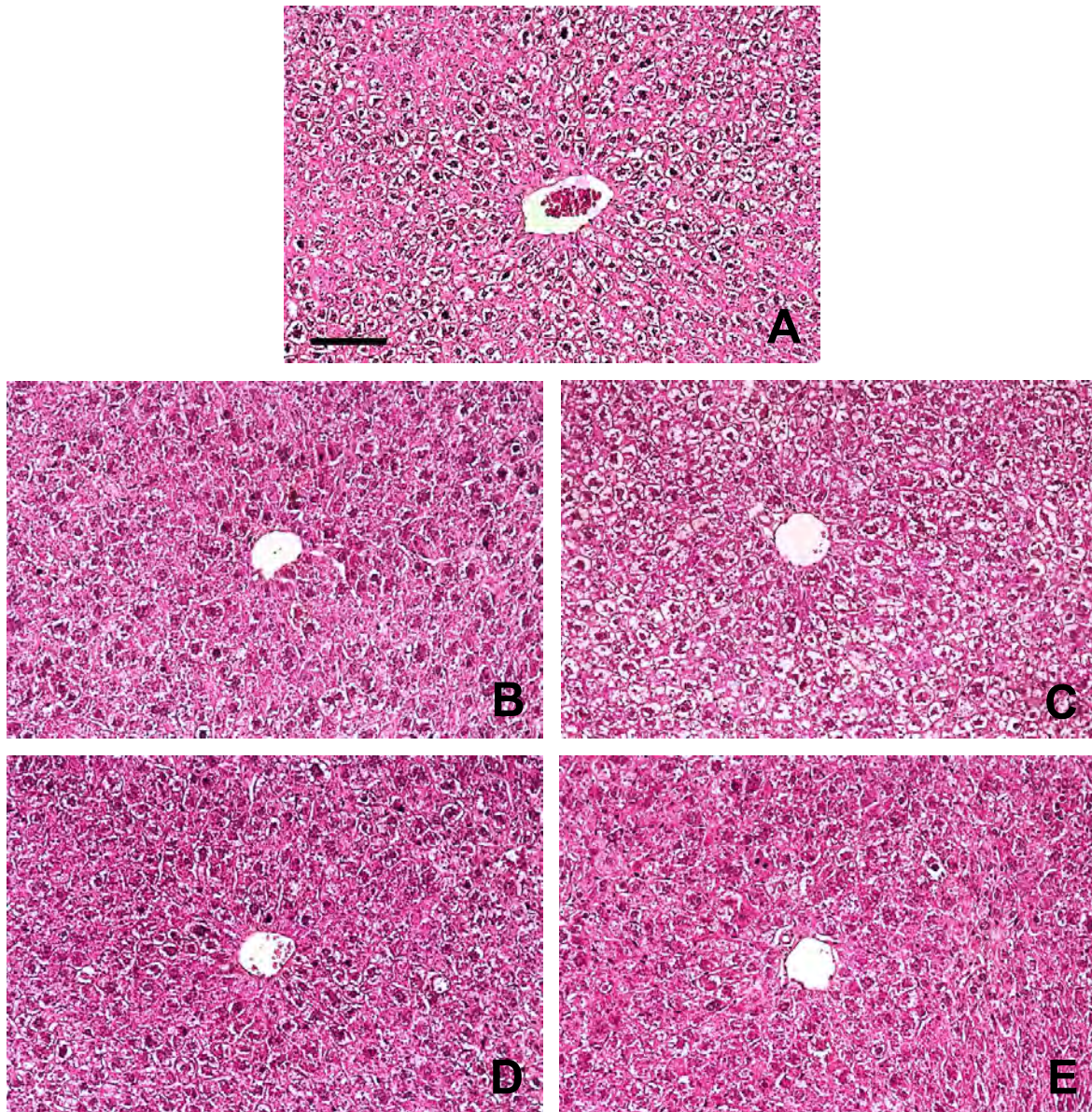


Figura 10. Determinación de la integridad del tejido hepático mediante la tinción de H&E.

Fotos tomadas en microscopio de epifluorescencia campo claro, aumento 20x. **A:** Grupo control, **B:** Dietilnitrosamina, **C:** DEN + larva de *T. molitor*, **D:** DEN + pupa de *T. molitor*, **E:** DEN + Adulto de *T. molitor*. Barra 100 μm .

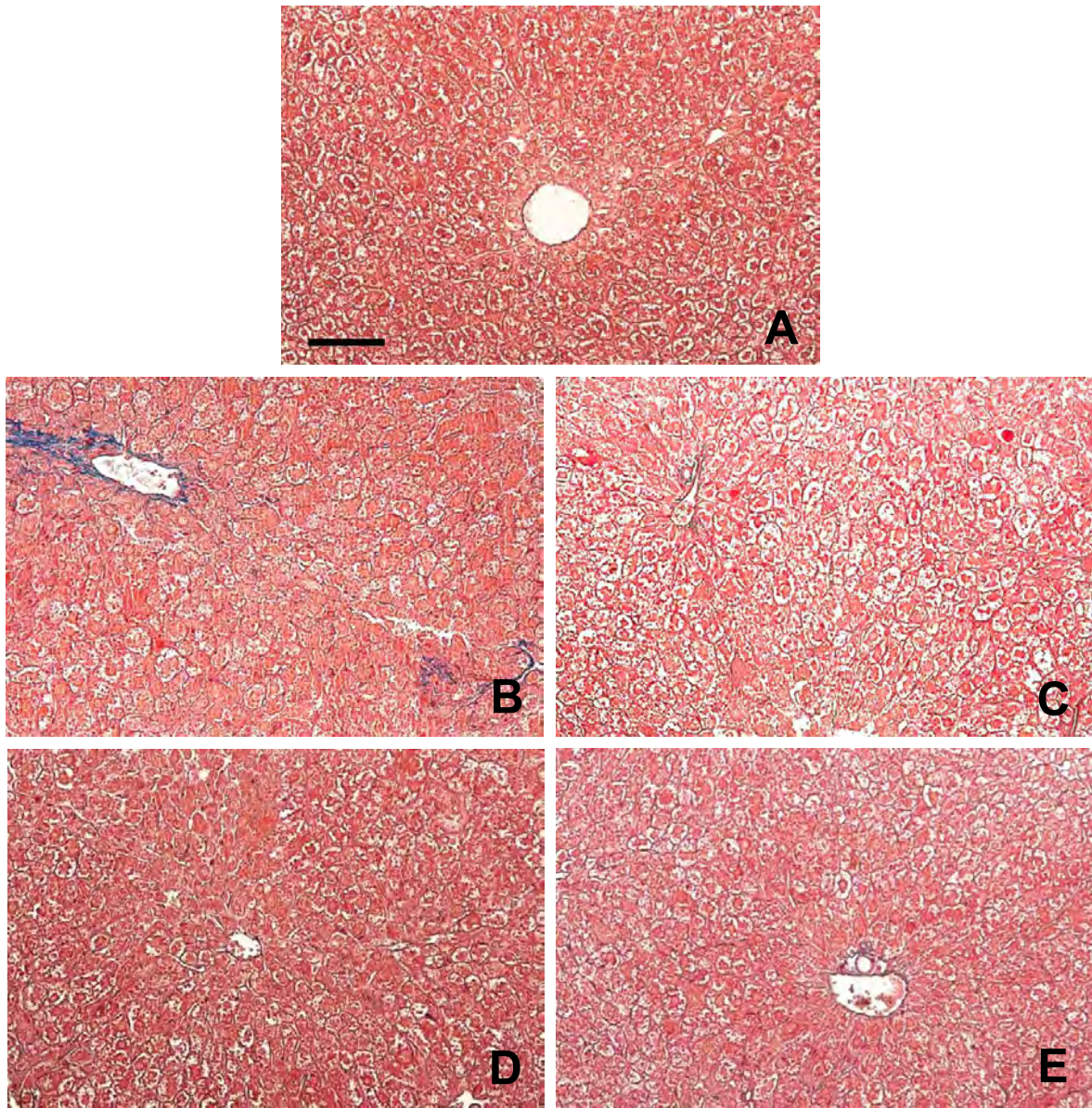


Figura 11. Determinación de la presencia de colágena en el parénquima hepático mediante tinción de tricrómica de masson. Fotos tomadas en microscopio de epifluorescencia campo claro, aumento 20x. **A:** Grupo control, **B:** Dietilnitrosamina, **C:** DEN + larva de *T. molitor*, **D:** DEN + pupa de *T. molitor*, **E:** DEN + Adulto de *T. molitor*. Barra 100 μ m.



7.6 Valoración inmunológica

El tejido hepático al ser valorado mediante una prueba inmunohistoquímica con el marcador de metabolismo del DEN Cyp2e1, se puede observar teñido en marrón, disminuye su expresión para todos los tratamientos que fueron inducidos con DEN, sin embargo, para el tratamiento que recibió bebida a base del estadio de pupa no se inhibió por completo su expresión (Figura 13).

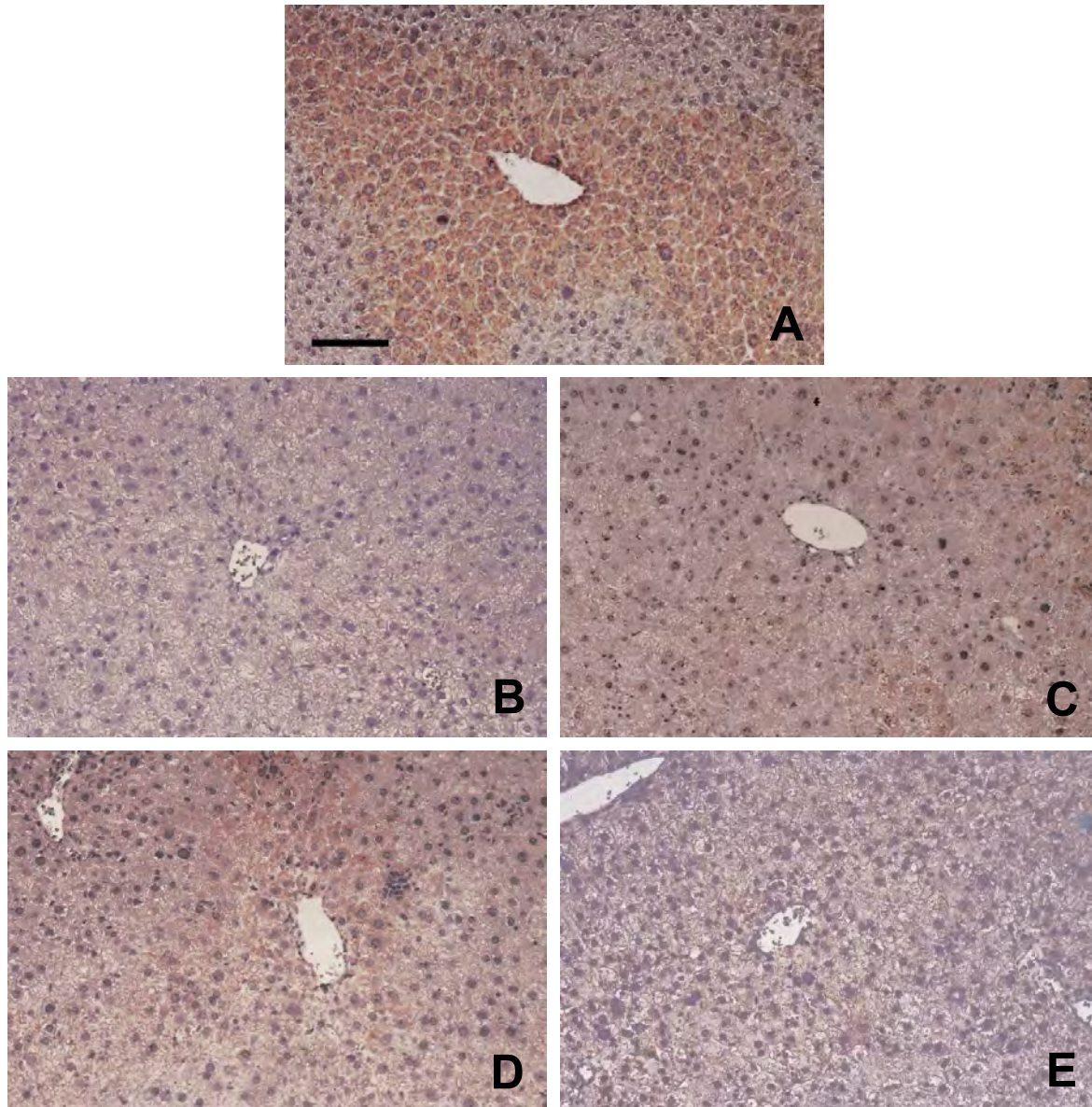


Figura 12. Expresión de Cyp2e1 por IHQ, en el tejido hepático de ratones Fotos tomadas en microscopio de epifluorescencia campo claro, aumento 20x. **A:** Grupo control, **B:** Dietilnitrosamina, **C:** DEN + larva de *T. molitor*, **D:** DEN + pupa de *T. molitor*, **E:** DEN + Adulto de *T. molitor*. Barra 100 μ m.



Se valoró este marcador mediante un estudio de WB, y su expresión densitométrica se cuantificó mediante un programa de procesamiento digital de imagen ImageJ (2012), todos los tratamientos a los que se les indujo cáncer con DEN presentaron diferencia estadística significativa con respecto al control (Figura 14).

Nivel de expresión Cyp2e1

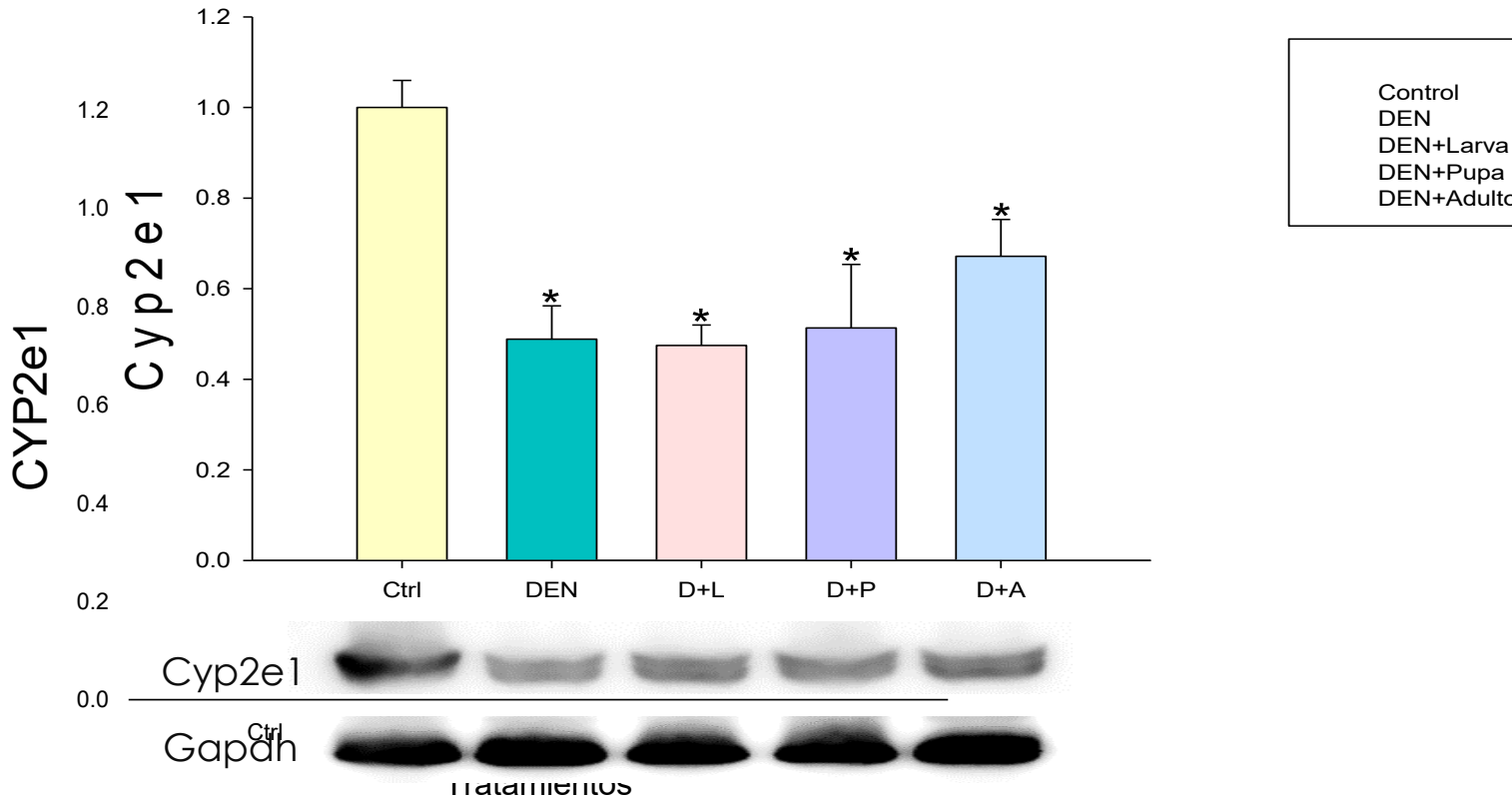


Figura 13. Efecto de DEN sobre la expresión de Cyp2e1.

(*) Diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) con respecto al grupo Control

DEN: Dietilnitrosamina

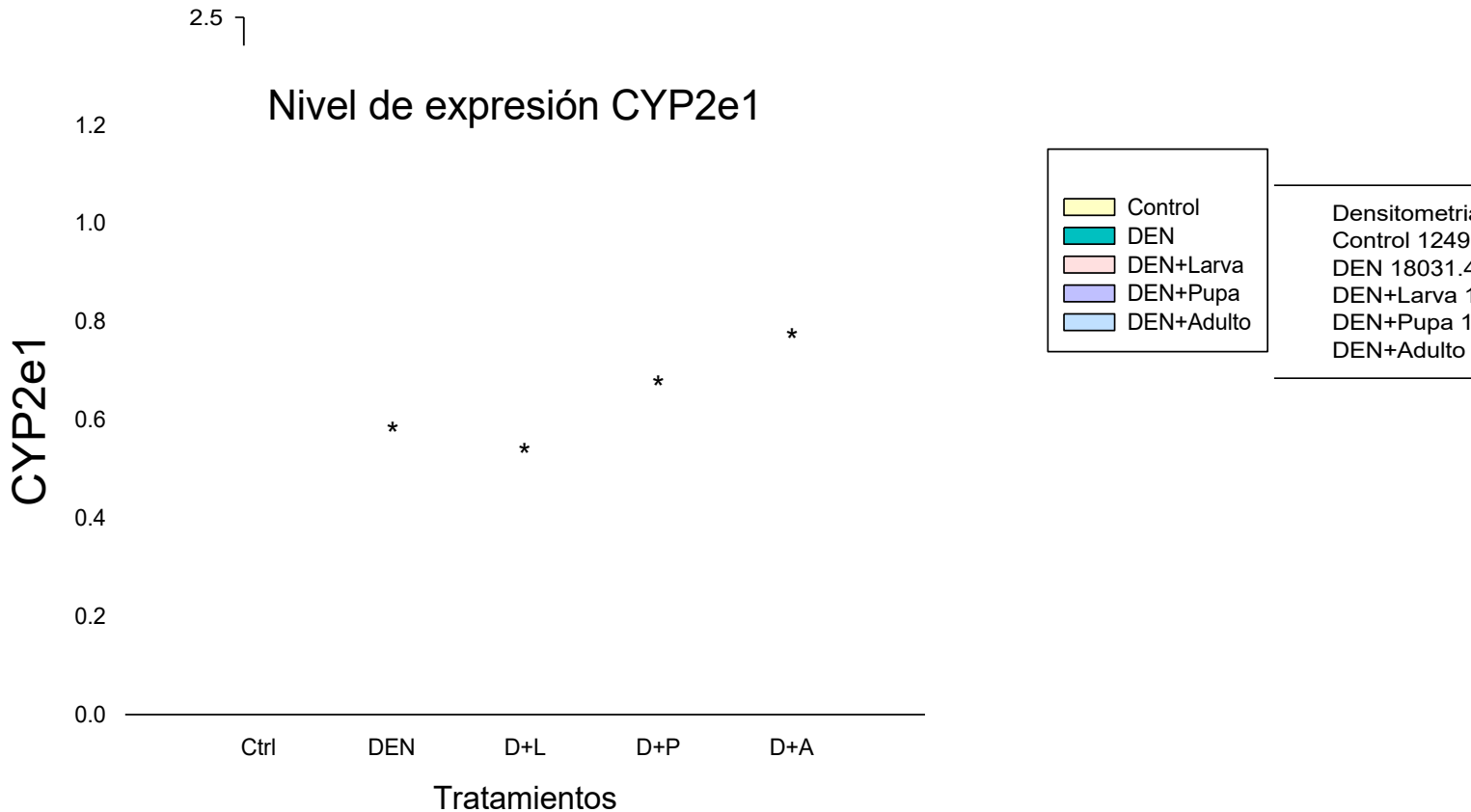
Gapdh marcador para normalización de la expresión de la proteína

Se valoró el nivel de expresión del marcador de hepatocarcinogénesis Gstp1 en el tejido hepático de los ratones, en donde se puede observar que el grupo al cual se le proporcionó bebida a base de pupa no presentó diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) con respecto al control; sin embargo, el grupo de D+L disminuyó de



manera significativa respecto del grupo de DEN. El grupo de D+A no inhibió la expresión del marcador Gstp1 (Figura 15).

Nivel de expresión Gstp1



(+) Diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) con respecto al grupo DEN
 (*) Diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) con respecto al grupo Control
 DEN: Dietilnitrosamina
 Gapdh marcador para normalización de la expresión de la proteína

Se realizó un estudio de inmunohistoquímica en el tejido hepático de los ratones con el marcador de proliferación celular ki67, se puede observar su presencia a través de los núcleos teñidos en gradiente de color café, el cual no se percibe en los animales que consumieron bebida a base de pupa al igual que los incluidos en el tratamiento control (Figura 16).

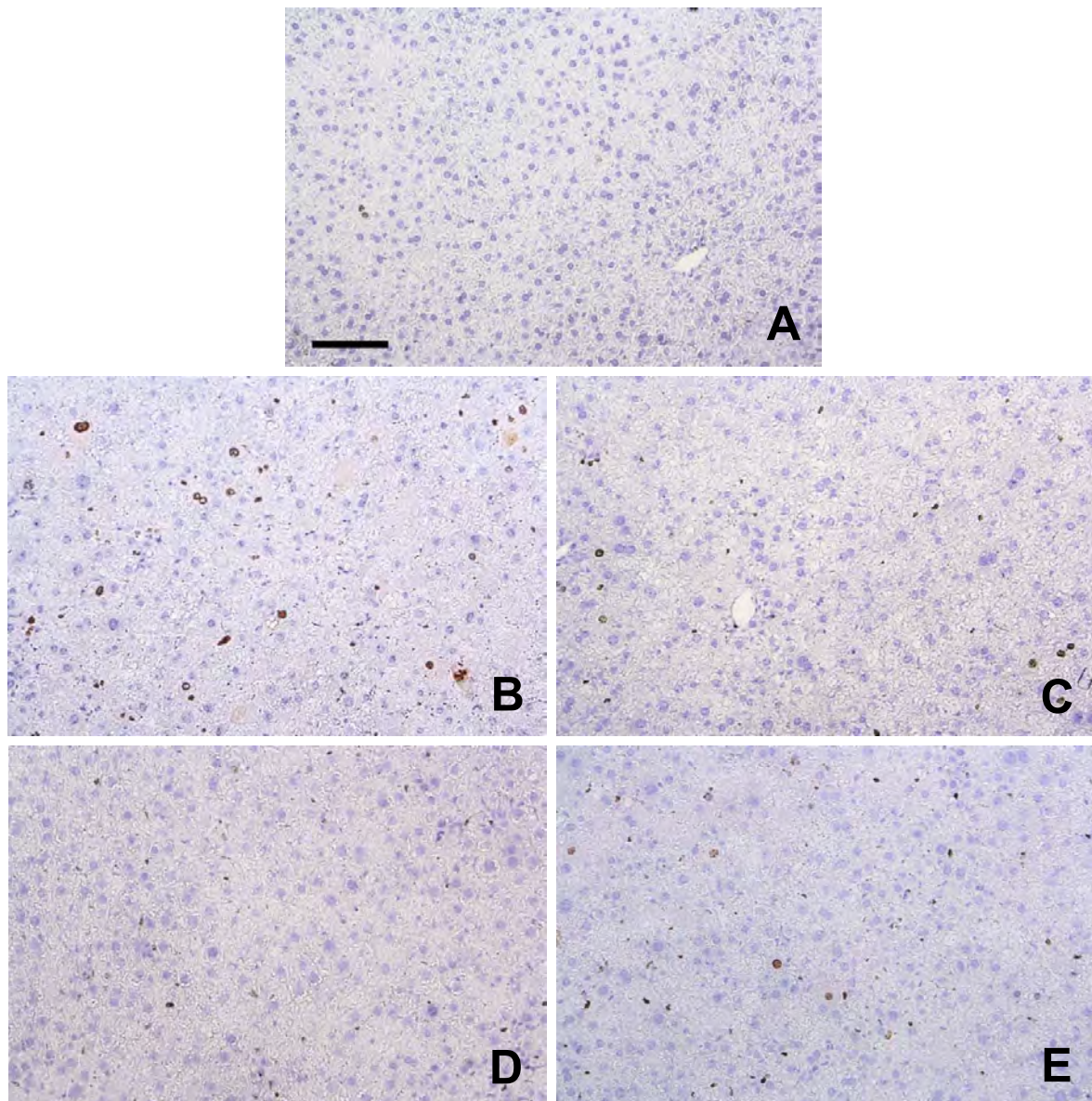


Figura 15. Expresión de Ki67 por IHQ, en el tejido hepático de ratones administrados con diferentes dosis de DEN. Fotos tomadas en microscopio de epifluorescencia campo claro, aumento 20x. A: Grupo control, B: Dietilnitrosamina, C: DEN + larva de *T. molitor*, D: DEN + pupa de *T. molitor*, E: DEN + Adulto de *T. molitor*. Barra 100 μ m.



Para la cuantificación de núcleos teñidos se tomaron en cuenta cuatro animales por tratamiento y cuatro fotos por cada animal, la cuantificación se hizo con el programa ImageJ (2012), en donde se puede observar que para el grupo de DEN los núcleos teñidos van de 250-300, mientras que en un tejido sano la cuantificación es menor a 50 núcleos teñidos por campo, sin embargo, el grupo tratado a base de bebida de

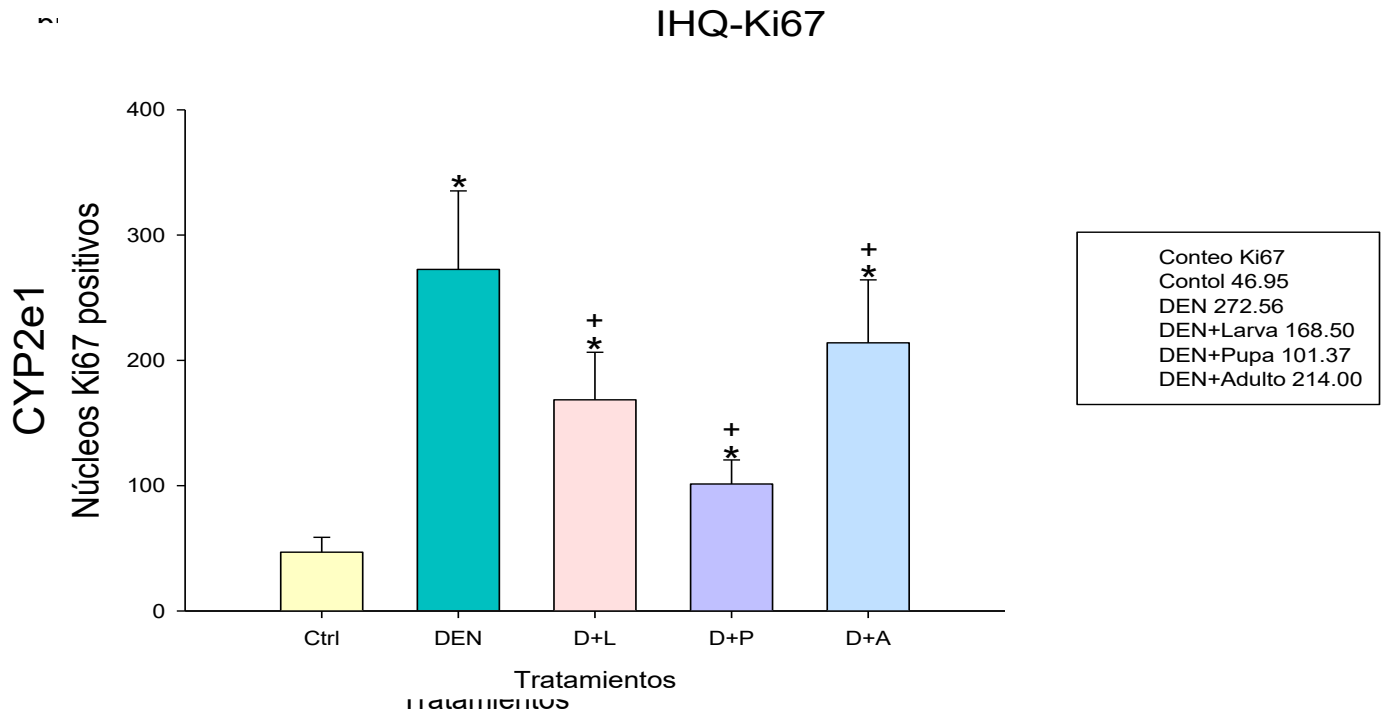


Figura 16. Efecto de DEN sobre la expresión de Ki67.

(+) Diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) con respecto al grupo DEN

(*) Diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) con respecto al grupo Control

DEN: Dietilnitrosamina

Se realizó una inmunohistoquímica del marcador de proliferación celular β -catenina, se observa un agrandamiento de los núcleos celulares y una sobre expresión en el tejido hepático de los ratones que fueron tratados con DEN y que no recibieron ningún tratamiento a base de *T. molitor*, sin embargo, el grupo tratado con bebida a base de pupa a pesar de presentar un agrandamiento de los núcleos celulares se



puede observar que la sobreexpresión de este marcador disminuyó, y tuvo un comportamiento similar al grupo control (Figura 18).

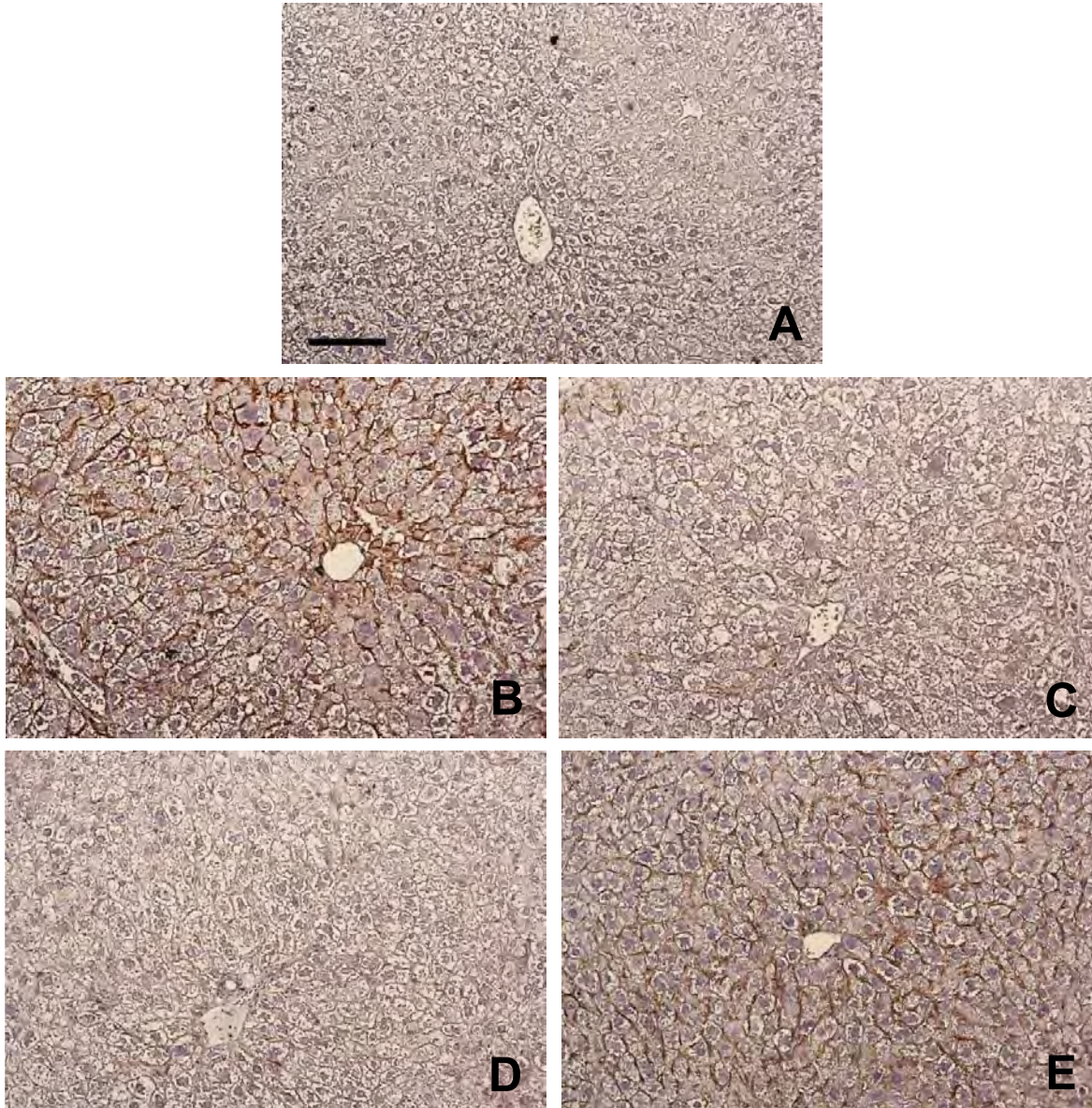
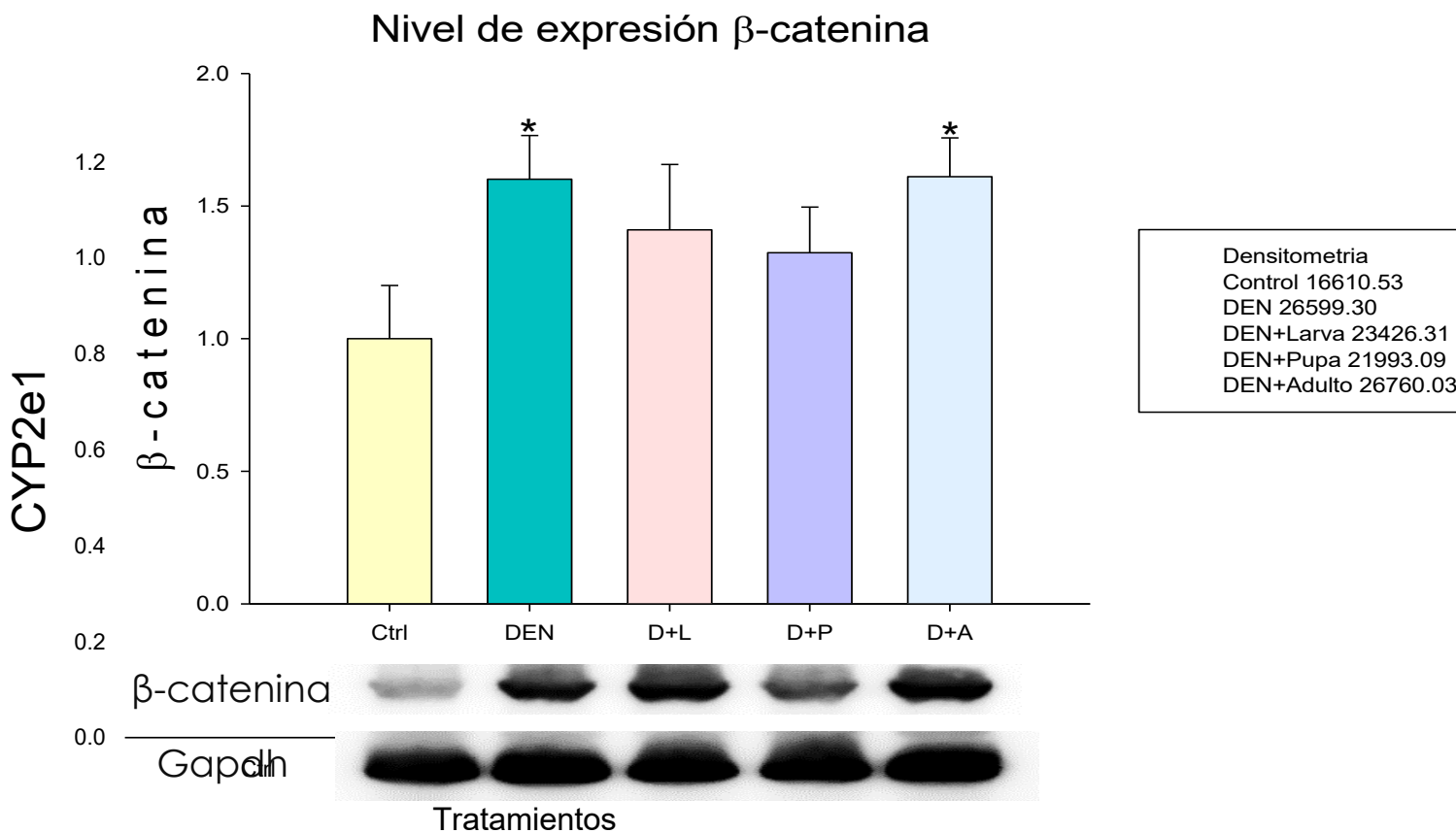


Figura 17. Expresión de β -catenina por IHQ, en el tejido hepático de ratones. Fotos tomadas en microscopio de epifluorescencia campo claro, aumento 20x. **A:** Grupo control, **B:** Dietilnitrosamina, **C:** DEN + larva de *T. molitor*, **D:** DEN + pupa de *T. molitor*, **E:** DEN + Adulto de *T. molitor*. Barra 100 μ m.



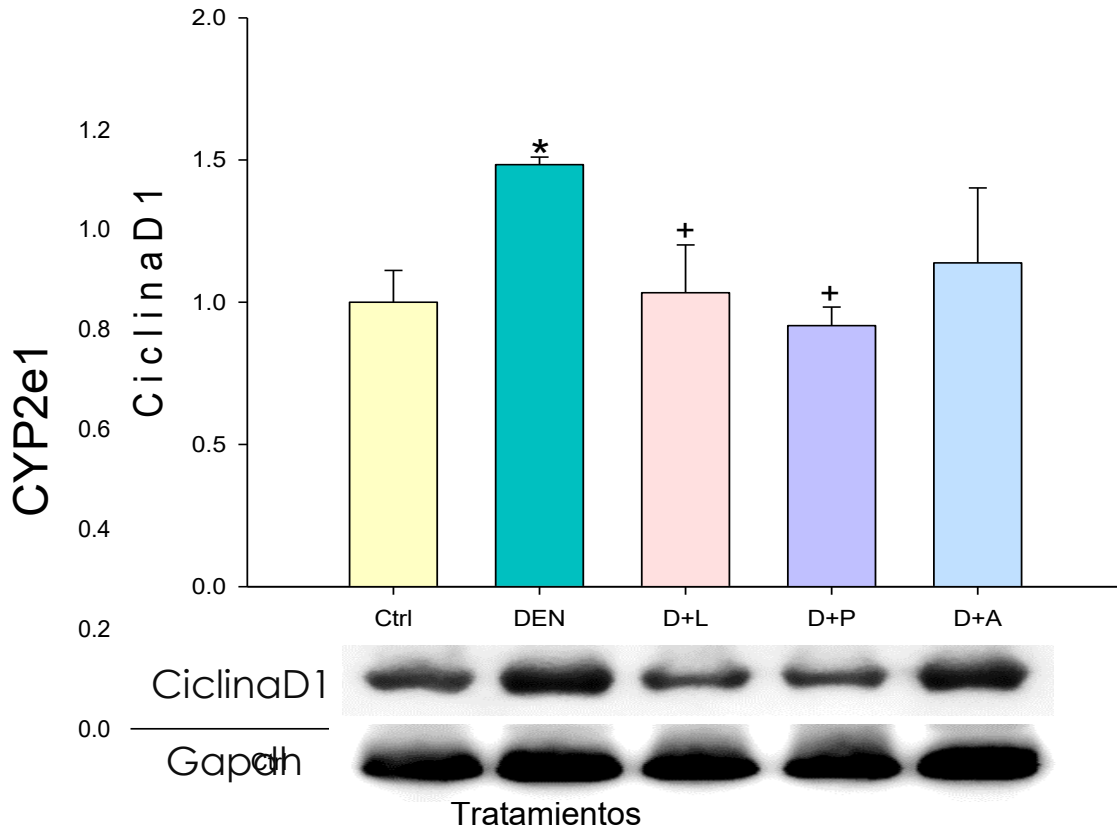
Se valoró el nivel de expresión del marcador de proliferación celular β -catenina en el tejido hepático de los ratones, a través de la cuantificación de la densitometría del WB, se puede observar que los tratamientos de bebida a base de *T. molitor*, de los estadios de larva y pupa tiene un comportamiento similar al grupo control (Figura 19); al igual que CiclinaD1 presentó el mismo comportamiento que β -catenina (Figura 20).



(*) Diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) con respecto al grupo Control
 DEN: Dietilnitrosamina
 Gapdh marcador para normalización de la expresión de la proteína



Nivel de expresión de CiclinaD1



Densitometria
Control 19601.67
DEN 29082.42
DEN+Larva 20259.35
DEN+Pupa 17990.98
DEN+Adulto 22315.48

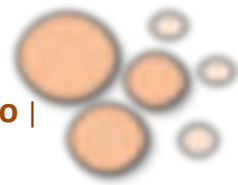
(+) Diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) con respecto al grupo DEN
 (*) Diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) con respecto al grupo Control
 DEN: Dietilnitrosamina
 Gapdh marcador para normalización de la expresión de la proteína



VIII. DISCUSIÓN

La realización del presente trabajo, tuvo como finalidad potenciar el consumo de insectos, ya que su ingesta, no sólo aporta valores nutricionales (Dreassi *et al.*, 2017), sino que además, en diversas culturas alrededor del mundo son utilizados como recursos nutracéuticos (Mendoza y Fals, 2013). Su consumo es poco frecuente, sin embargo, en algunas regiones forman parte de la dieta humana, incrementando cada vez más la entomofagia, éstos se pueden consumir en diferentes etapas o estadio de vida (huevos, larvas, pupas o adultos) (Yi *et al.*, 2016).

Tenebrio molitor, siendo un coleóptero, presenta los 4 estadios de vida (insectos holometábolos), no obstante, para este estudio, sólo se trabajaron con tres de sus estadios (larva, pupa y adulto). Los análisis químico proximales realizados en el insecto se reportaron en base seca para poderlos comparar con otros autores, siendo su porcentaje de humedad de 60% aproximadamente. Los porcentajes de extracto etéreo y proteínas que integran los valores nutricionales del insecto van de 17.1 a 29.6 y de 51.64 a 63.85 respectivamente, siendo la larva la de mayor contenido en grasa y menor porcentaje proteico, caso contrario a la etapa adulta, la cual presentó menor porcentaje de grasa y mayor contenido proteico, aunque, esta variación podría explicarse o atribuirse a que algunas cantidades de nitrógeno pueden unirse a los exoesqueletos de los insectos, en este caso la quitina, la cual abunda en la etapa adulta de los escarabajos (Yi *et al.*, 2013).



Los resultados que se reportan, varían con lo referenciado por otros autores, esto se puede explicar porque, el cambio de sustratos y fuentes de agua en *T. molitor* producen diferencias en los aportes nutricionales del mismo, así como el contenido de humedad. De acuerdo con Argueta y Ramos (2013), quienes trabajaron con dos tipos de sustrato (salvado de trigo y arroz) y tres fuentes de agua (manzana, papa y zanahoria), tuvieron como resultado que el arroz aporta al insecto una cantidad abundante de grasa en comparación con el salvado de trigo, y observaron que la dieta donde obtienen mayor cantidad de proteínas fue a base de la combinación de salvado de trigo y papa con aportes de 66.41% de humedad, 57.56% de proteína y 28.65% de grasa.

Otros autores como Dreassi *et al.*, (2017), reportan resultados de 6 dietas diferentes que van desde pan de harina de trigo a combinaciones de levadura de cerveza, harina de trigo, harina de avena y harina de maíz, teniendo porcentajes de grasa muy elevados para estos insectos, con valores que van desde 39.75 a 48.31% para la etapa larvaria y de 34.37% al 40.87% para la pupa.

Con estos estudios, se puede observar que de acuerdo a la literatura reportada, los insectos, en este caso *T. molitor* tienen un gran aporte proteico, sin embargo, para este estudio, se tuvo como objetivo principal, demostrar un beneficio en su consumo, en este caso, un efecto anticancerígeno o hepatoprotector, a través de la ingesta del insecto, en forma de bebida, por lo cual, también se efectuó una prueba de solubilidad, ya que con lo reportado por Yi *et al.*, (2016), expresaron que el mayor porcentaje de digestibilidad de la proteína de larva de *T. molitor* se encuentra en la parte soluble, con un aprovechamiento de un 80%.



La prueba de solubilidad (figura 7), mostró que a pH más ácido, la proteína es menos soluble, y a un pH cercano al neutro la proteína de los tres estadios, alcanza su máxima solubilidad. Azagoh *et al.*, (2016), hicieron una extracción y caracterización fisicoquímica de la larva de *T. molitor*, con diferentes tratamientos, que fueron: harina de larva, harina de larva desengrasada, larva y larva desengrasada, de acuerdo a sus resultados indicaron que existe un aumento significativo en la solubilidad a medida que se acercan a valores cercanos a un pH neutro.

Con estos dos parámetros (porcentaje proteico y solubilidad), se pudieron hacer las formulaciones para las bebidas a base de *T. molitor*, y así todas las bebidas tuvieron las mismas concentraciones de proteína soluble (62.5 µg/mL). Cabe mencionar que al no existir antecedentes de propiedades medicinales del consumo de *T. molitor*, las concentraciones de ingesta del mismo, se tomaron en cuenta basándose con lo reportado por Deloya-Brito y Deloya, (2014), quienes investigaron que de acuerdo a la medicina tradicional china, se consume el insecto *Ulomoide dermestoides* para diferentes afecciones, entre ellas cáncer, el consumo habitual son de aproximadamente 4970 animales en un lapso de 140 días. Con estos valores se pudo tener una aproximación basal de consumo de insectos y extrapolarla a ratones.

Además, existen algunas investigaciones que reportan un posible potencial anticancerígeno del uso de algunas especies de insectos, algunos de ellos pertenecientes a la familia Tenebrionidae, como: extractos etanolicos y acetonicos de *U. dermestoides* con propiedades antioxidantes (Mendoza-Meza y España-Puccini, 2016); extractos polares y extractos de diclorometano de *U. dermestoides* con efecto antiinflamatorio y propiedades citotóxicas y genotóxicas sobre línea



celular en cáncer de pulmón (Santos *et al.*, 2010; Mendoza y Fals, 2013); aislamiento de proteínas del coleóptero *Zophobas morio* con efecto antioxidante (Zhang *et al.*, 2011); péptidos antimicrobianos extraídos de *Copris tripartitus* con actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer (In-Woo *et al.*, 2013), por mencionar algunos.

Sin embargo, este es el primer reporte *in vivo*, no sólo para la familia Tenebrionidae, sino también de manera general para los insectos, donde se demuestra un efecto hepatoprotector y preventivo de cáncer, siendo el estadio de pupa el que presentó mayor actividad.

Esto puede manifestarse debido a que los ratones fueron inyectados con DEN, el cual es un químico muy agresivo y se ha comprobado que origina cáncer en hígado de roedores, puesto que su exposición constante provoca un aumento inicialmente grande en la tasa mitótica de células iniciadas, de igual manera ocasiona la formación aductos en el DNA, los cuales son reparados lentamente, y una exposición constante de este químico genera la acumulación de aductos y alquilaciones en el DNA (Travis *et al.*, 1991; Tolba *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2018).

Además, se ha mostrado que la administración constante de DEN a una concentración de 20 mg/kg de peso, en ratones de la cepa C57BL/6, por un lapso de 18 semanas origina tumores, este estudio se realizó por 10 semanas, en donde el grupo de DEN presentó inflamación en tejido hepático, se ha estudiado que la inflamación crónica y continua constituyen un estímulo y factor constante de proliferación y crecimiento de los hepatocitos, que a su vez originan el proceso de fibrogénesis, cuyo propósito es el de limitar el daño tisular producido por lesiones hepáticas crónicas, produciendo un acúmulo progresivo de matriz colágena



extracelular, depositándose en el tejido conectivo del hígado (Páramo *et al.*, 2010; Buey *et al.*, 2012; Berzigotti *et al.*, 2018).

Los resultados obtenidos mediante las tinciones de H&E (figura 11) y de tricrómica de Masson (figura 12), permitieron hacer estas observaciones en el tejido, dado que la primer tinción se enfoca en la visualización de cambios morfológicos (Fischer *et al.*, 2008), y la segunda técnica se enfoca en evidenciar los componentes conjuntivos, en especial con contenido en fibras colágenas (Abanto, 2014), los resultados muestran al menos cualitativamente, que el tratamiento a base de pupa fue el que presentó mejores resultados, ya que tuvo un comportamiento similar al grupo control.

Para este estudio, también se determinó la modificación respecto a la expresión de proteínas que están vinculadas de manera directa con el daño hepático, dado que son enzimas que participan en la desintoxicación de sustancias endógenas al organismo, a través de su metabolismo químico, en primera instancia está el marcador Cyp2e1, son un grupo de proteínas mediadoras del metabolismo oxidativo (Galli y Feijoo, 2002; Gaviria *et al.*, 2016). Participan en la fase I del metabolismo de fármacos y xenobioticos, haciendo más hidrosoluble el sustrato a través de oxidaciones (Quiñones *et al.*, 2006).

Su evaluación se llevó mediante análisis de IHQ (figura 13) y WB (figura 14), en donde se observó que todos los tratamientos a los que se les administro DEN tuvieron comportamientos similares, por lo que dicha proteína esta siendo inhibida, de acuerdo a Gao *et al.*, (2018), reporta una disminución progresiva de esta enzima incluso desde la semana 0 de la inducción con el carcinógeno.



La otra enzima que se evaluó mediante WB, fue Gstp1 (figura 15), la cual participa en la fase II del metabolismo de fármacos (Li *et al.*, 2015; Gurioli *et al.*, 2018), juega un papel crítico en el proceso de desintoxicación, presentando actividad anormal y sobreexpresión en varios tipos de cáncer (Li *et al.*, 2015). Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento de pupa tuvo un comportamiento intermedio entre el grupo control y el grupo de DEN.

Sin embargo, cabe mencionar que el metabolismo de DEN a grandes dosis puede aumentar la producción de radicales libres de oxígeno (ROS) (Quiñones *et al.*, 2006), que conllevan al desacoplamiento del complejo Wnt/ β -catenina, cabe mencionar que β -catenina es una proteína encargada de regular procesos como, la regeneración de tejidos, la diferenciación de células madre y la proliferación celular (Nejak-Bowen y Monga, 2011; Mantilla *et al.*, 2015), si ésta no se encuentra normalizada en el citoplasma, tiende a aumentar sus niveles celulares y entra al núcleo ocasionando la activación de ciertas proteínas involucradas en la proliferación celular como Ciclina D1 y Ki67 (Ochoa- Hernández *et al.*, 2012; Chowdhury *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2016; Preziosi *et al.*, 2017).

Por lo cual fue necesario evaluar estas proteínas, para el caso de β -catenina se realizó a través de análisis de IHQ (figura 18) y WB (figura 19), en donde se observó nuevamente que el grupo de pupa tuvo una disminución de la sobreexpresión de este marcador, al no mostrar diferencias estadísticas significativas con respecto al control. Sabiendo que β -catenina activa a Ciclina D1, la cual es una proteína involucrada en proliferación celular, comúnmente sobreexpresada o desregulada en varios tipos de cáncer (Chen *et al.*, 2018; Diehl *et al.*, 2018), también fue evaluada



mediante WB (figura 20), en donde los resultados corroboraron que β -catenina, no activó la proliferación desmesurada de Cilclina D1, en el grupo de pupa.

La estimulación de la proliferación también se evaluó con otro marcador importante, Ki67, esta proteína nuclear está presente durante todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2 y M) (Li *et al.*, 2015). Por lo que su expresión aumentada está fuertemente asociada con la proliferación y el crecimiento de las células tumorales (Cidado *et al.*, 2016).

Su detección se hizo a través de una IHQ (figura 16), para poder presenciar núcleos en gradientes de color café, la cuantificación se realizó por medio de un software analizador de imágenes (ImajeJ), esta proteína mostró nuevamente la eficacia del tratamiento a base de pupa al tener una inhibición evidente de las mismas.

Con estos resultados podemos deducir y comprobar que *T. molitor*, en su estadio de pupa, tiene un efecto favorable sobre las etapas tempranas de carcinogénesis, inhibiendo la proliferación de ciertos marcadores clave, sin embargo, a pesar de que estos resultados no pueden extrapolarse a humano, son los primeros indicios que muestran la eficacia medicinal de este insecto, siendo así los primeros resultados *in vivo* reportados.



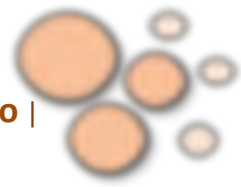
IX. CONCLUSIONES

- Las pruebas de Análisis químico proximal permitieron evidenciar que el insecto en sus tres estadios presenta gran cantidad de proteína.
- Las concentraciones de $62.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de la proteína soluble del estadio de pupa del escarabajo *T. molitor* fueron favorables en la inhibición de ciertas proteínas clave, involucradas en la proliferación celular anormal inducida durante la hepatocarcinogénesis experimental.



X. PERSPECTIVAS

- Valorar el efecto del estadio larva a dosis más altas para determinar su efectividad, debido a que este estadio mostró ciertos resultados favorables.
- Valorar el efecto de la bebida a base de pupa a diferentes dosis para verificar las dosis más convenientes
- Evaluar diferentes fracciones de los extractos de *T. molitor* a base de pupa.
- Realizar estudios adicionales sobre la posible genotoxicidad que podría ocasionar el estadio adulto del coleóptero *T. molitor*.



XI. REFERENCIAS

- Abanto, A. J. (2014). Determinación de la afinidad tintorial del colorante tricrómico de masson en el estudio histológico de cerebro y cerebelo de conejo (*Oryctolagus cuniculus*). (Tesis de licenciatura. Universidad Nacional de Cajamarca. 7-10.
- ACS. American Cancer Society (2016). ¿Qué es el cáncer? Recuperado el 23 de febrero de 2017 de: <http://www.cancer.org/es/cancer/aspectos-basicos-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer.html>
- Ally, A., Balasundaram, M., Carlsen, R., Chuah, E., Clarke, A., Dhalla, N., & Marra, M. A. (2017). Comprehensive and integrative genomic characterization of hepatocellular carcinoma. *Cell*, 169(7), 1327-1341.
- AOAC Internacional. Official methods of analysis of AOAC International. (1999). The Scientific Association.
- Arellanes-Robledo, J., Márquez-Rosado, L., Pérez-Carreón, J. I., Fattel-Fazenda, S., Aguirre-García, J., & Villa-Treviño, S. (2006). Celecoxib induces regression of putative preneoplastic lesions in rat liver. *Anticancer research*, 26(2A), 1271-1280.
- Argueta, R. L., & Ramos, G. K. (2013). Contenido de Proteína, Grasa, Calcio, Fósforo en larvas del escarabajo molinero (Coleoptera: Tenebrionidae: *Tenebrio molitor* L.) alimentadas con diferentes sustratos y fuentes de agua; para ser utilizadas como alimentación de animales silvestres (Doctoral dissertation, Universidad de El Salvador). 11-34.



- Azagoh, C., Ducept, F., Garcia, R., Rakotozafy, L., Cuvelier, M.-E., Keller, Lewandowski, S., R., & Mezdour, S. (2016). Extraction and physicochemical characterization of *Tenebrio molitor* proteins. *Food Research International*, 88, 24-31.
- Barrales-Cureño, H. J., & de la Rosa M. R. (2014). Uso de hongos endófitos en la producción del fármaco anti-cáncer Taxol. *Biotecnología Vegetal*, 14(1).
- Belluco, S., Losasso, C., Maggioletti, M., Alonzi, C. C., Paoletti, M. G., & Ricci, A. (2013). Edible insects in a food safety and nutritional perspective: a critical review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(3), 296-313.
- Berzigotti, A., França, M., Martí-Aguado, D., & Marti-Bonmati, L. (2018). Cuantificación de la fibrosis hepática mediante biomarcadores de imagen. *Radiología*, 60(1), 74-84.
- Bin, B. P., Choi, W. H., Kim, S. H., Jin, H. J., Han, Y. S., & Kim, N. J. (2014). Developmental characteristics of *Tenebrio molitor* larvae (Coleoptera: Tenebrionidae) in different instars. *International Journal of Industrial Entomology*, 28(1), 5-9.
- Buey, L. G., Mateos, F. G., & Moreno-Otero, R. (2012). Cirrosis hepática. *Medicine-Programa de formación médica continuada acreditado*, 11(11), 625-633.
- Cahuich-Campos, D., & Flores, F. (2014). Entomoterapia: curaciones entre los antiguos pueblos mayas de la península de Yucatán, México. *ELOHI. Peuples indigènes et environnement*, 5-6, 39-54.



- CDC. Centro para el Control y la prevención de enfermedades. (2017). Prevención y control del cáncer. Recuperado el 23 de febrero de 2017 de: <https://www.cdc.gov/spanish/cancer/international/statistics.htm>
- Chen, J., Li, X., Cheng, Q., Ning, D., Ma, J., Zhang, Z. P., Chen, X. P., & Jiang, L. (2018). Effects of cyclin D1 gene silencing on cell proliferation, cell cycle, and apoptosis of hepatocellular carcinoma cells. *Journal of cellular biochemistry*, 119(2), 2368-2380.
- Ching-Chiung, W., Wu, C. H., Hsieh, K. J., Yen, K. Y., & Yang, L. L. (2000). Cytotoxic effects of cantharidin on the growth of normal and carcinoma cells. *Toxicology*, 147(2), 77-87.
- Chowdhury, MKH, Montgomery, MK, Morris, MJ, Cognard, E., Shepherd, PR, & Smith, GC (2015). El glucagón fosforila la serina 552 de β -catenina lo que conduce a una expresión aumentada de ciclina D1 y c-Myc en el hígado de rata aislado. *Archivos de fisiología y bioquímica*, 121 (3), 88-96.
- Cidado, J., Wong, H. Y., Rosen, D. M., Cimino-Mathews, A., Garay, J. P., Fessler, A. G, Rasheed, Z. A, Hicks, J, Cochran, R. L, Croessmann, S, Zabransky, D. J. & Park B. H. (2016). Ki-67 is required for maintenance of cancer stem cells but not cell proliferation. *Oncotarget*, 7(5), 6281-6293.
- CONABIO. (2017). Escarabajo negruzco, *Tenebrio molitor*. Recuperado el 23 de febrero de 2017 de: <http://bios.conabio.gob.mx/especies/10053800>
- Deloya-Brito, G. G., & 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.

- Dhanasekaran, R., Bando, S., & Roberts, L. R. (2016). Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma and impact of therapeutic advances. *F1000Research*, 5. Doi 10.12688/f1000research.6946.1
- Diehl, J. A., & Knudsen, K. E. (2018). Splice Variants and Phosphorylated Isoforms of Cyclin D1 in Tumorigenesis. *In D-type Cyclins and Cancer*, Springer, Cham, 91-109.
- Dreassi, E., Cito, A., Zanfini, A., Materozzi, L., Botta, M., & Francardi, V. (2017). Dietary fatty acids influence the growth and fatty acid composition of the yellow mealworm *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Lipids*, 52(3), 285-294.
- El-Serag, H. B., & Rudolph, K. L. (2007). Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*, 132(7), 2557-2576.
- FAO Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2018). Recuperado 19 de septiembre de 2018 <http://www.fao.org/docrep/018/i3264s/i3264s00.pdf>
- Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J., & Zeller, R. (2008). Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2008(5), doi: 10.1101/pdb.prot4987.
- Gajski, G., & Garaj-Vrhovac, V. (2013). Melittin: a lytic peptide with anticancer properties. *Environmental toxicology and pharmacology*, 36(2), 697-705.



- Galli, E., & Feijoo, L. U. I. S. (2002). Citocromo P-450 y su Importancia Clínica Revisión Actualizada. *Revista de NeuroP-siquiatria*, 65, 187-201.
- Gao, J., Wang, Z., Wang, G. J., Zhang, H. X., Gao, N., Wang, J., Zhao, C. E., Fang, Y., Zhang, Y., Zhou, J., Jim, H., & Ling, H. (2018). Higher CYP2E1 activity correlates with hepatocarcinogenesis induced by diethylnitrosamine. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. DOI: 10.1124/jpet.117.245555.
- Gaviria, M. M., Correa Arango, G., & Navas, M. C. (2016). Alcohol, cirrosis y predisposición genética. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 31(1), 27-35.
- González, M. S., & Sánchez, J. F. (2014). Consenso mexicano sobre el diagnóstico y manejo del carcinoma hepatocelular. *Revista de Gastroenterología de México*, 79 (4), 250-262.
- Gurioli, G., Martignano, F., Salvi, S., Costantini, M., Gunelli, R., & Casadio, V. (2018). GSTP1 methylation in cancer: a liquid biopsy biomarker?. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. DOI <https://doi.org/10.1515/cclm-2017-0703>.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
- Hill, H. D., & Straka, J. G. (1988). Protein determination using bicinchoninic acid in the presence of sulfhydryl reagents. *Analytical biochemistry*, 170(1), 203-208.



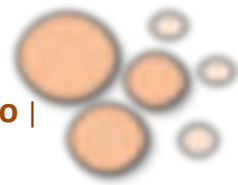
- Illana-Esteban, C. (2014). Taiwanofungus camphoratus un hongo medicinal endémico de Taiwán. *Boletín de la Sociedad Micologica*, Madrid 38, 215-221
- In-Woo, K., Lee, J. H., Kwon, Y. N., Yun, E. Y., Nam, S. H., Ahn, M. Y., & Hwang, J. S. (2013). Anticancer activity of a synthetic peptide derived from harmoniasin, an antibacterial peptide from the ladybug *Harmonia axyridis*. *International journal of oncology*, 43(2), 622-628.
- Joong-Wong, P., Chen, M., Colombo, M., Roberts, L. R., Schwartz, M., Chen, P. J., & Sherman, M. (2015). Global patterns of hepatocellular carcinoma management from diagnosis to death: the BRIDGE Study. *Liver International*, 35(9), 2155-2166.
- Lewin, B. (2004). Genes IX, Eds. Mc Graw Hill. México, 889-893.
- Li, L. T., Jiang, G., Chen, Q., & Zheng, J. N. (2015). Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer. *Molecular medicine reports*, 11(3), 1566-1572.
- Li, Q. F., Li, Q. Y., Gao, A. R., & Shi, Q. F. (2015). Correlation between promoter methylation in the GSTP1 gene and hepatocellular carcinoma development: a meta-analysis. *Genet Mol Res*, 14(2), 6762-6772.
- Ligresti, A., Moriello, A. S., Starowicz, K., Matias, I., Pisanti, S., De Petrocellis, L., & Di Marzo, V. (2006). Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 318(3), 1375-1387.



- Lizhang, W., Montesinos, J. L., & Dinghong, Y. (2008). Los insectos como fuente de alimento: Análisis del contenido en proteína y grasa de 100 especies. *Bol. Mus. Mun. Funchal, Sup.*, 14, 55-70.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (1995). *Molecular cell biology* (Vol. 3). New York: Scientific American Books. 937-945.
- Loraine, S., & Mendoza-Espinoza, J. A. (2010). Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41(4), 18-27.
- Ma, S., Yang, J., Li, J., & Song, J. (2016). The clinical utility of the proliferating cell nuclear antigen expression in patients with hepatocellular carcinoma. *Tumor Biology*, 37(6), 7405-7412.
- Mahmood, T., & Yang, P. C. (2015). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*, 4(9), 429-434.
- Manjarrez, Á. (1998). ONCOGENES. *Vertientes. Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 1(2), 41-45.
- Mantilla, C., Suárez, I., Duque, A., & Navas, M. C. (2015). Mecanismos de señalización por B-catenina y su papel en la carcinogénesis. *CES Medicina*, 29(1), 109-127.
- Marit-Saskia, W., & Wink, M. (2006). Pharmacologically active natural products in the defence secretion of *Palembus ocularis* (Tenebrionidae, Coleoptera). *Journal of ethnopharmacology*, 106(1), 51-56.



- Mendoza, D. & Fals, C. M. (2013). Evaluación del contenido de fenoles totales y actividad captadora de radicales libres de extractos hidrometanólicos del escarabajo *Ulomoides dermestoides* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*, 1(25), 135-141.
- Mendoza-Meza, D. L., & España-Puccini, P. (2016). Cytotoxic and genotoxic activity of phenolic fractions from *Ulomoides dermestoides* Fairmaire, 1893 (Coleoptera, Tenebrionidae), in *HaCat Cells*. *TIP*, 19(2), 83-91.
- Meza-Junco, J., Montaña-Loza, A., & Aguayo-González, A. (2006). Bases moleculares del cáncer. *Revista de investigación clínica*, 58(1), 56-70.
- Moore, A. J., Devine, D. A., & Bibby, M. C. (1994). Preliminary experimental anticancer activity of cecropins. *Peptide research*, 7(5), 265-269.
- Namba, H. (1996). El hongo Maitake, potente anticancerígeno y adaptógeno. *Natura Medicatrix*, 43, 26-28.
- Nejak-Bowen, K. N., & Monga, S. P. (2011). Beta-catenin signaling, liver regeneration and hepatocellular cancer: sorting the good from the bad. *In Seminars in cancer biology*, 21(1), 44-58.
- NIH. Instituto Nacional del Cáncer (2016). ¿Qué es el cáncer? Recuperado del 20 de octubre de 2017 de: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>
- NOM, Norma Oficial Mexicana. 062-ZOO-1999. (2001). Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.



- NOM, Norma Oficial Mexicana .033-SAG/ZOO-2014. (2015). Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres.
- Ochoa-Hernández, A. B., Juárez-Vázquez, C. I., Rosales-Reynoso, M. A., & Barros-Núñez, P. (2012). La vía de señalización Wnt- β -catenina y su relación con cáncer. *Cirugía y Cirujanos*, 80(4), 389-398.
- Olmedo, D. A., Paredes, M., Shantall, N., Espinosa Rivas, A. F., Guerra Torres, C. P., & Prashad Gupta, M. (2016). Evaluación de la actividad antiproliferativa de extractos metanólicos de plantas de la familia leguminosae. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(3), 272-283.
- OMS. Organización Mundial de la Salud (2017). Centro de prensa, cáncer. Recuperado el 23 de febrero de 2017 de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- Páramo, D. B., Otero, W., & Pineda, L. F. (2010). Fibrogénesis hepática. *Rev. Col. Gastroenterol*, 25(2), 187-197.
- Park, B. T., Na, K. H., Jung, E. C., Park, J. W., & Kim, H. H. (2009). Antifungal and anticancer activities of a protein from the mushroom *Cordyceps militaris*. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 13(1), 49-54.
- Pascual, S., Herrera, I., & Irurzun, J. (2016). New advances in hepatocellular carcinoma. *World journal of hepatology*, 8(9), 421-438.
- Pilco, D. V. & Hidalgo, D. R. (2015). Obtención de una bebida proteica a base de pulpa de tomate de árbol amarillo (*Solanum betacea*), y soya (*Glycine max*). Tesis de grado, Guaranda, Ecuador.



- Preziosi, ME, Singh, S., Valore, EV, Jung, G., Popovic, B., Poddar, M., & Monga, SP (2017). Los ratones que carecen de β -catenina específica del hígado desarrollan esteatohepatitis y fibrosis después de la sobrecarga de hierro. *Revista de hepatología*, 67 (2), 360-369.
- Quiñones, L., Lee, K., Varela, N., Escala, M., García, K., Godoy, L., & Cáceres, D. (2006). Farmacogénica del cáncer: Estudio de variaciones genéticamente determinadas en la susceptibilidad a cáncer por exposición a xenobióticos. *Revista médica de Chile*, 134(4), 499-515.
- Ramos-Elorduy, J., & Viejo-Montesino, J. (2007). Los insectos como alimento humano: Breve ensayo sobre la entomofagia, con especial referencia a México. *Boletín Real Sociedad Española de Historia Natural. Sección Biología*, 102(1-4), 61-84.
- Ravzanaadii, N., Kim, S. H., Choi, W. H., Hong, S. J., & Kim, N. J. (2012). Nutritional value of mealworm, *Tenebrio molitor* as food source. *International Journal of Industrial Entomology*, 25(1), 93-98.
- Rivera, J. A., Muñoz-Hernández, O., Rosas-Peralta, M., Aguilar-Salinas, C. A., Popkin, B., & Willett, W. C. (2008). Consumo de bebidas para una vida saludable: recomendaciones para la población Mexicana. *Salud Pública de México*, 50(2), 173-195.
- Rumpold, B. A., & Schlüter, O. K. (2013). Potential and challenges of insects as an innovative source for food and feed production. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 17, 1-11.



- Santos, R. C. V., Lunardelli, A., Caberlon, E., Bastos, C. M. A., Nunes, F. B., Pires, M. G. S., & Corseuil, E. (2010). Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Ulomoides dermestoides* on induced pleurisy in rats and lymphoproliferation *in vitro*. *Inflammation*, 33(3), 173-179.
- Schiffer, E., Housset, C., Cacheux, W., Wendum, D., Desbois-Mouthon, C., Rey, C., & Rosmorduc, O. (2005). Gefitinib, an EGFR inhibitor, prevents hepatocellular carcinoma development in the rat liver with cirrhosis. *Hepatology*, 41(2), 307-314.
- Siemanowska, E., Kosewska, A., Aljewicz, M., Skibniewska, K. A., Polak-Juszczak, L., Jarocki, A., & Jedras, M. (2013). Larvae of mealworm (*Tenebrio molitor* L.) as European novel food. *Agricultural Sciences*, 4(6), 287-291.
- Singal, A. G., & El-Serag, H. B. (2015). Hepatocellular carcinoma from epidemiology to prevention: translating knowledge into practice. *Clinical gastroenterology and hepatology*, 13(12), 2140-2151.
- Smetana, S., Larki, N. A., Pernutz, C., Franke, K., Bindrich, U., Toepfl, S., & Heinz, V. (2017). Structure design of insect-based meat analogs with high-moisture extrusion. *Journal of Food Engineering*. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2017.06.035
- Soto, I. (2003). Transducción de señales y cáncer. Vertientes. *Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 6(1), 45-50.
- Tolba, R., Kraus, T., Liedtke, C., Schwarz, M., & Weiskirchen, R. (2015). Diethylnitrosamine (DEN)-induced carcinogenic liver injury in mice. *Laboratory animals*, 49(S1), 59-69.



- Tovar, V., Villanueva, A., & Llovet, J. M. (2007). Biología celular y genética en el cáncer de hígado. *Gastroenterología y hepatología*, 30(6), 360-369.
- Travis, C. C., McClain, T. W., & Birkner, P. D. (1991). Diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats: a theoretical study. *Toxicology and applied pharmacology*, 109(2), 289-304.
- Uribe, E. M., García, M., Chávez, N., & Román, J.J. (2010). Carcinoma hepatocellular. *Revista de Gastroenterología de México*, 2(75), 168-176.
- Ushakova, N. A., Kovalzon, V. M., Bastrakov, A. I., Kozlova, A. A., Revishchin, A. V., Pavlova, G. V., & Pavlov, D. S. (2015). The ability of *Alphitobius diaperinus* homogenates immobilized on plant sorbent to block the development of mouse parkinsonism. *In Doklady Biochemistry and Biophysics*, 461(1), 94-97.
- Vielma, R. R. A., & Medina, A. L. (2006). Determinación de la composición química y estudios de solubilidad en la harina de lombriz *Eisenia foetida*. *Revista de la facultad de farmacia*, 48, 1.
- Wang, M. Y., & Su, C. (2001). Cancer preventive effect of *Morinda citrifolia* (Noni). *Annals of the New York Academy of Sciences*, 952(1), 161-168.
- Yan-Feng, L., Ma, R. L., Wang, S. L., Duan, Z. Y., Zhang, J. H., Wu, L. J., & Wu, C. F. (2003). Expression of an antitumor–analgesic peptide from the venom of Chinese scorpion *Buthus martensii karsch* in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*, 27(2), 253-258.

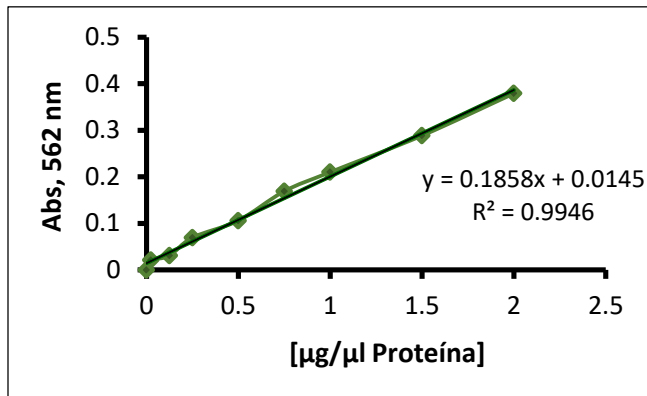


- Yi, L., Lakemond, C. M., Sagis, L. M., Eisner-Schadler, V., van Huis, A., & van Boekel, M. A. (2013). Extraction and characterisation of protein fractions from five insect species. *Food chemistry*, 141(4), 3341-3348.
- Yi, L., Van Boekel, M. A., Boeren, S., & Lakemond, C. M. (2016). Protein identification and *in vitro* digestion of fractions from *Tenebrio molitor*. *European Food Research and Technology*, 242(8), 1285-1297.
- Yung-Choon, Y., Shin, B. H., Hong, J. H., Lee, J., Chee, H. Y., Song, K. S., & Lee, K. B. (2007). Isolation of fatty acids with anticancer activity from *Protaetia brevitarsis* larva. *Archives of pharmacal research*, 30(3), 361-365.
- Zhang, J. X., Guo, Q., He, G. M., & Liu, N. (2011). Evaluación del aislamiento, la purificación y la actividad antioxidante de la proteína soluble en agua del escarabajo gusano de la harina gigante (*Zophobas morio*) Larvas [J]. *Ciencia de los Alimentos*, 18 (006).



XII ANEXOS

Anexo 1. Cantidad indicada para cargar en los geles de acuerdo a los µg de proteína.



Grupos	Abs		Factor dil		ug en	más	[ug/ul]	pra	para	
	Abs1	Abs2	Prom	[µg/µl]	alicota	amortiguador	en 250 ul	50ug	100ug	
D+L 1	0.1385	0.1735	0.156	0.762	15.23	3046.29	50.00	12.19	4.10	8.2
D+L 2	0.1715	0.2125	0.192	0.955	19.11	3821.31	50.00	15.29	3.27	6.5
D+L 3	0.1835	0.1955	0.1895	0.942	18.84	3767.49	50.00	15.07	3.32	6.6
D+L 4	0.1465	0.2075	0.177	0.875	17.49	3498.39	50.00	13.99	3.57	7.1
D+P 1	0.1245	0.1775	0.151	0.735	14.69	2938.64	50.00	11.75	4.25	8.5
D+P 2	0.1585	0.1875	0.173	0.853	17.06	3412.27	50.00	13.65	3.66	7.3
D+P 3	0.1885	0.1965	0.1925	0.958	19.16	3832.08	50.00	15.33	3.26	6.5
D+P 4	0.1345	0.1545	0.1445	0.700	13.99	2798.71	50.00	11.19	4.47	8.9
D+A 1	0.1115	0.1355	0.1235	0.587	11.73	2346.61	50.00	9.39	5.33	10.7
D+A 2	0.1345	0.1655	0.15	0.729	14.59	2917.12	50.00	11.67	4.29	8.6
D+A 3	0.1275	0.1515	0.1395	0.673	13.46	2691.07	50.00	10.76	4.65	9.3
D+A 4	0.1395	0.1715	0.1555	0.759	15.18	3035.52	50.00	12.14	4.12	8.2
D+A 5	0.1735	0.2005	0.187	0.928	18.57	3713.67	50.00	14.85	3.37	6.7
DEN 1	0.1655	0.1835	0.1745	0.861	17.22	3444.56	50.00	13.78	3.63	7.3
DEN 2	0.1265	0.1835	0.155	0.756	15.12	3024.76	50.00	12.10	4.13	8.3
DEN 3	0.1535	0.1935	0.1735	0.856	17.12	3423.04	50.00	13.69	3.65	7.3
DEN 4	0.1475	0.1695	0.1585	0.775	15.50	3100.11	50.00	12.40	4.03	8.1
Ctrl 1	0.1725	0.1915	0.182	0.902	18.03	3606.03	50.00	14.42	3.47	6.9
Ctrl 2	0.1535	0.1835	0.1685	0.829	16.58	3315.39	50.00	13.26	3.77	7.5
Ctrl 3	0.1755	0.1885	0.182	0.902	18.03	3606.03	50.00	14.42	3.47	6.9
Ctrl 4	0.1775	0.2025	0.19	0.945	18.89	3778.26	50.00	15.11	3.31	6.6
Ctrl 5	0.1965	0.2195	0.208	1.041	20.82885	4165.77	50.00	16.66	3.00	6.0