


EFFECTO ANTIPROLIFERATIVO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Ulomoides dermestoides* Chevrolat (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE) EN LINFOCITOS HUMANOS

Juan Pablo Dávila-Vega, Héctor Enrique Duarte-Martínez, Carlos Alberto López-Aguirre, Eduardo Pérez-Arteaga, Alejandro Amhed Zagal-Salinas, Guillermo Elías-Fernández y Karla Stephanie Martínez-Elizalde 

Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. De Los Barrios 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, C. P. 54090, estado de México, México.

 Autor de correspondencia: karmareli@gmail.com

RESUMEN. La coleópteroterapia basada en la medicina tradicional es usada en varios países, en México la ingesta de coleópteros como *Ulomoides dermestoides* es usado en el tratamiento de distintas enfermedades como el cáncer. El propósito de este trabajo fue evaluar la actividad antiproliferativa del extracto metanólico de *U. dermestoides* mediante la técnica de viabilidad celular por exclusión con azul tripán. Se encontró que existe un efecto antiproliferativo en la concentración 0.0625 mg/ml en linfocitos humanos estimulados con fitohemaglutinina (PHA), no existen diferencias significativas en comparación con el control positivo (Colchicina). La CL_{50} del extracto es de 0.156mg/ml, que de acuerdo con el Instituto Nacional de Cáncer esta concentración no es tóxica. Con respecto a la caracterización química del extracto, se detectó cualitativamente la presencia de fenoles, flavonoides y quinonas. Se determinó la concentración de fenoles totales (11.24 mgEAg/g) y flavonoides totales (0.033 mgEQ/g) así como la capacidad antioxidante (49.46 ppm). Por lo que se valida científicamente el uso tradicional de *Ulomoides dermestoides* como antiproliferativo.

Palabras clave: Coleópteroterapia, antiproliferativo, linfocitos humanos, extracto metanólico.

Antiproliferative effect of the methanol extract of *Ulomoides dermestoides* Chevrolat (Coleoptera: Tenebrionidae) in human lymphocytes

ABSTRACT. Coleopterotherapy based on traditional medicine is used in several countries, in Mexico the intake of Coleoptera as *Ulomoides dermestoides* is used in the treatment of different diseases such as cancer. The purpose of this work was to evaluate the antiproliferative activity of the methanolic extract of *U. dermestoides* by means of cell viability technique by trypan blue exclusion. It was found that there is an antiproliferative effect in the 0.0625 mg/ml concentration in human lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin (PHA), there are no significant differences compared to the positive control (Colchicine). The LC_{50} of the extract is 0.156mg / ml, which according to the National Cancer Institute this concentration is non-toxic. With respect to the chemical characterization of the extract, the presence of phenols, flavonoids and quinones was detected qualitatively. The concentration of total phenols (11.24 mgEAg/g) and total flavonoids (0.033 mgEQ/g) as well as the antioxidant capacity (49.46 ppm) were determined. Therefore, the traditional use of *Ulomoides dermestoides* as an antiproliferative is validated.

Keywords: Coleptherapy, antiproliferative, lymphocyte, methanolic extract.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad existen un gran número de enfermedades ocasionadas por una división celular anormal o acelerada, tal es el caso del cáncer. Estas se caracterizan por un crecimiento descontrolado en algún tipo celular del cuerpo humano, una de las causas es cuando el material genético de una célula se ve afectado o no se presenta una autorregulación durante el ciclo celular, dando origen a las células tumorales (Karp, 2010). Hay diferentes tipos de cáncer, los cuáles, se clasifican dependiendo del tejido en donde se producen. Los carcinomas se dan en tejidos epiteliales o glandulares, los sarcomas en tejido conectivo, los mielomas en células de la médula ósea, linfomas en tejidos dentro del sistema linfático y leucemias dentro de células de la sangre. La

leucemia es un tipo de cáncer que afecta a los glóbulos blancos; estos ayudan al organismo a combatir las infecciones. Las células que conforman a la sangre se forman en la médula ósea, sin embargo, en la leucemia, la médula ósea produce glóbulos blancos anormales, estas células reemplazan a las células sanguíneas sanas y dificultan que la sangre cumpla su función. En la leucemia linfocítica aguda, también llamada leucemia linfoblástica aguda, hay demasiados glóbulos blancos de un tipo específico llamados linfocitos o linfoblastos. Este tipo de leucemia es el cáncer más común en niños (NCI, 2015). Algunos tratamientos utilizados para contrarrestar ésta enfermedad son la radioterapia, quimioterapia, cirugía para extirpar el bazo y terapia dirigida, sin embargo, algunas deterioran la salud del paciente, causando daños neurológicos, trombosis, pérdida de peso y cabello, además de tener un alto costo, por lo que la búsqueda de tratamientos alternativos hoy en día es una prioridad (NCI, 2015). Se ha generado un gran interés en el uso de la medicina tradicional como es el caso de la coleopteroterapia, la cual se basa en la ingesta de escarabajos para tratar diferentes enfermedades, y aunque no existen referencias sobre el seguimiento clínico y/o de experimentación científica en los casos de pacientes que practican la coleopteroterapia, su uso y eficacia se divulga a partir de testimonios (Cupul-Magaña, 2010). *Ulomoides dermestoides* ha sido estudiado debido a la presencia de benzoquinonas y pentadecenos que son secretadas por las glándulas localizadas en el tórax y el abdomen de este organismo, las cuales son utilizadas por el coleóptero como repelentes o irritantes para defenderse contra sus depredadores y que se han aislado a partir de extractos de distintas polaridades para demostrar que poseen capacidad antioxidante, actividad antiproliferativa, efecto anti-inflamatorio y actividad citotóxica en células mononucleares (Santos *et al.*, 2010; Villaverde *et al.*, 2009; Eisner *et al.*, 1998; Attygalle *et al.*, 1993; Attygalle *et al.*, 1991; Blum 1981; Wirtz *et al.*, 1978). Sin embargo, el efecto sobre modelos de leucemia no ha sido comprobado. Por lo que el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto antiproliferativo del extracto metanólico de *Ulomoides dermestoides* en linfocitos humanos *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODO

Se obtuvo una colonia *Ulomoides dermestoides* donada por un productor particular y se llevó a cabo el proceso de identificación de especie por medio de diferentes claves dicotómicas (Spilman, 1987; Brues y Melander, 1932)

Para la obtención del extracto se seleccionaron escarabajos en su etapa adulta y se realizó una maceración exhaustiva con metanol (grado químico). Posteriormente se dejó el extracto en evaporación para eliminar el exceso de solvente.

Para determinar el efecto antiproliferativo se aislaron los linfocitos humanos mediante centrifugación por gradiente de densidad (Lomonte, 2007), a partir de una muestra de 10 ml de sangre periférica de un donador anónimo, una vez aislados los linfocitos, se mantuvieron en solución salina al 0.9 %. Para la preparación del medio de cultivo se tomaron 50 ml de medio SFM adicionado con glutamina (Gibco), se añadieron 2.5 ml. de suero fetal bovino y 2.5 ml. de solución antibiótica. Posteriormente en una placa de 24 pozos, se colocaron en cada uno de los pozos 2 ml de medio. Se añadieron 10,000 linfocitos por cada pozo y se les adicionó 20 μ l de Fitohemaglutinina (PHA), todo se manejó bajo condiciones estériles y se siguió el protocolo para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos de acuerdo a la NORMA Oficial Mexicana (NOM-253-SSA1-2012).

Se utilizaron las siguientes concentraciones del extracto metanólico de *U. dermestoides* 0.0625 mg/ml, 0.125 mg/ml, 0.250 mg/ml, como control positivo se utilizó Colchicina (1mg/ml) y como control negativo DMSO al 1 %, cada tratamiento contó con cuatro repeticiones. Finalmente se

incubaron durante 96 hrs a 37 °C con 5 % de CO₂. Para observar la viabilidad celular se utilizó el método de azul tripán y se llevó a cabo un conteo de los linfocitos teñidos de color azul de cada tratamiento, utilizando cámara de Neubauer. Se obtuvieron los promedios de cada tratamiento y se realizó un Análisis estadístico de Varianza (ANOVA); la Concentración letal media (CL₅₀) se calculó mediante un análisis de regresión (Porcentaje de supervivencia versus concentración logarítmica), se tomó en cuenta el criterio de toxicidad del Instituto Nacional de Cáncer (Cordell *et al.*, 1993). Para ambos análisis se utilizó el paquete estadístico Graph Pad Prism 6.0. Se determinó Capacidad Antioxidante midiendo el grado de decoloración de una solución metanólica de 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) por la adición del ácido ascórbico a diferentes concentraciones de 1-100 ppm, de la misma forma fue procesado el extracto, pero con concentraciones 50-1000 ppm, se midió la absorbancia a 505 nm (Okusa *et al.*, 2007).

Para la caracterización química se determinaron cualitativamente la presencia de fenoles con indicador Cl₃Fe, flavonoides utilizando la técnica de Shinoda (Dominguez, 1973) y Quinonas con indicador de Tolueno (Martínez *et al.*, 2008). Para la cuantificación de fenoles totales se utilizó el método de Singleton (Singleton *et al.*, 1999) realizando una curva patrón de ácido gálico y leyendo en espectrofotómetro a una longitud de onda de 760 nm., obteniendo así los resultados en mgEA/g de muestra. Los flavonoides totales fueron determinados por el método modificado de Dowd (Amaya *et al.*, 2013) usando una curva patrón de Quercetina de 1 a 100 ppm y leyendo a espectrofotómetro una longitud de onda de 420 nm, expresando los resultados en mgEQ/g de muestra.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 se muestran los resultados del efecto antiproliferativo del extracto metanólico de *U. dermestoides*, donde se puede observar que al cabo de 96 horas los linfocitos en presencia de fitohemaglutinina (PHA) proliferan en un 50 %, esto se debe que PHA estimula la división de los linfocitos B y T, logrando que las células reingresen al ciclo celular debido a la inducción de los genes Hox, los cuales codifican para proteínas que funcionan como factores de transcripción que controlan procesos de diferenciación y desarrollo.

Con respecto a los resultados obtenidos aplicando Colchicina demuestran una inhibición del ciclo celular, ya que el número de células se mantuvo en 10000, de acuerdo a Voet y Voet (2006), la colchicina inhibe los procesos celulares dependientes de microtúbulos mediante la inhibición de la polimerización de los protómeros de la tubulina, evitando la formación del huso mitótico, por lo tanto, la mitosis no puede llevarse a cabo y la célula es incapaz de duplicarse. La concentración de 0.0625 mg/ml de extracto, tuvo un efecto similar al de la Colchicina ya que no se encontró una diferencia significativa entre ambos tratamientos ($F = 0.99$, $p \leq 0.05$), por lo que podemos inferir que ésta concentración es antiproliferativa al mantener la población de linfocitos en 10,000. Sin embargo, en la concentración de 0.125 mg/ml hay una ligera reducción en la viabilidad de los linfocitos debido a un posible efecto citotóxico del extracto; ya que en el tratamiento de mayor concentración en la contabilización de linfocitos se observa una disminución de 10,000 a 5000 linfocitos encontrando diferencias significativas ($F = 0.0223$, $p \leq 0.05$), por lo que se determinó que la concentración letal media (CL₅₀) es de 0.156mg/ml, sin embargo está concentración no es tóxica de acuerdo con los estándares del Instituto Nacional de Cáncer (NCI por sus siglas en inglés), se consideran como tóxicos los valores de CL₅₀ de ≤ 20 µg/ml para extractos y ≤ 4 µg/ml para compuestos puros (Cordell *et al.*, 1993).

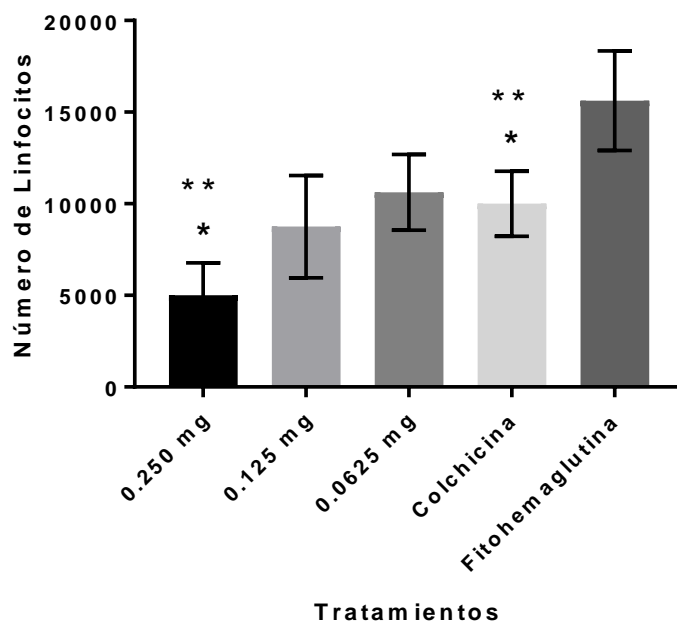


Figura 1: Efecto antiproliferativo del extracto metanólico de *Ulomoides dermestoides*. Los resultados se muestran como el dato promedio de cuatro repeticiones \pm la desviación estándar. *diferencia significativa con respecto a la colchicina (Dunnet's) $p \leq 0.05$. **diferencia significativa con respecto a la fitoheماغlutina (Dunnet's) $p \leq 0.05$.

Los resultados anteriores se relacionan directamente con la presencia de fenoles, flavonoides y quinonas en el extracto metanólico de *U. dermestoides* (Cuadro 1), debido a que en el grupo de las quinonas se encuentran las benzoquinonas y está reportado que estos compuestos pueden causar daño genotóxico a las células (Pandey *et al.*, 2009; Ruiz-Ramos *et al.*, 2005, Hiraku y Kawanishi, 1996), pero a bajas concentraciones puede detener la proliferación celular (Deloya-Brito y Deloya 2014). De esta manera probablemente el extracto de *U. dermestoides* en altas concentraciones puede producir factores oxidativos que afectan directamente a la estructura del DNA de células tumorales, lo cual disminuye su viabilidad y, por lo tanto, en la concentración de 0.250 mg/ml resulta ser citotóxico, y en bajas concentraciones del extracto el efecto es antiproliferativo.

Cuadro 1: Determinación cualitativa de metabolitos secundarios en el extracto metanólico de *Ulomoides dermestoides*

Metabolitos	Ensayo	Coloración	Intensidad
Quinonas	Borntranger	Rosa	+
Fenoles	FeCl ₃	Verde	++
Flavonoides	Shinoda	Roja	++

+ Poca presencia ++ Presencia moderada

La capacidad antioxidante media del extracto es de CA₅₀:49.46 ppm, estos resultados se relacionan directamente con la concentración de fenoles (11.24 mgEA/g) y flavonoides (0.033 mgEQ/g) presentes en el extracto de *U. dermestoides*. Éste efecto está relacionado con la estructura química que presentan, ya que son dos anillos aromáticos bencénicos unidos por un puente de tres átomos de carbono (con la estructura general C₆-C₃-C₆), los cuales les brindan propiedades quelatantes de hierro y secuestradoras de radicales libres (Bravo, 1998; Decker *et al.*, 1997), además de la inhibición de la lipooxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa y la xantina oxidasa; evitando así la formación de especies reactivas de oxígeno y de hidroxiperóxidos orgánicos

(Helaine y Hagerman, 2006). Así mismo se ha visto que también inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A2; al mismo tiempo que estimulan otras con propiedades antioxidantes, como la catalasa y la superóxido dismutasa, como lo reporta Escamilla *et al.* (2009). Comparando la CA₅₀ del extracto con la del ácido ascórbico (CA₅₀: 8.69 ppm) podríamos decir que la capacidad antioxidante del extracto es baja, sin embargo se debe considerar que el ácido ascórbico es un compuesto puro y el extracto de *U. dermestoides* es una mezcla de compuestos en donde los compuestos activos están presentes en trazas.

Se estableció una relación molecular con los compuestos encontrados en el extracto; las quinonas en altas concentraciones generan radicales libres que afectan genotóxicamente a la célula, sin embargo los fenoles y flavonoides actúan de manera antioxidante, captando esos radicales libres evitando así que afecten a todas las células. Tomando en cuenta la manera en que son ingeridos los coleópteros se puede inferir que el extracto actúa inicialmente como un antiproliferativo en concentraciones de 0.0625 mg/ml hasta llegar a un efecto citotóxico con 0.250 mg/ml de concentración, por lo cual podría ser usado en enfermedades relacionadas con una alta proliferación celular.

CONCLUSIÓN

El extracto metanólico de *Ulomoides dermestoides* presenta actividad antiproliferativa en linfocitos humanos estimulados con PHA, los compuestos responsables de esta actividad son fenoles, flavonoides y quinonas gracias a su capacidad antioxidante y a que intervienen en la regulación del ciclo celular; con este trabajo se valida el uso etnomedicinal de *Ulomoides dermestoides*.

Agradecimientos

El proyecto fue financiado por el Módulo de Investigación Científica III de la carrera de Biología de la FES-Iztacala (UNAM). Agradecemos el apoyo de la M. en C. Martha Fregoso y la Dra. Margarita Canales Martínez por sus enseñanzas y apoyo.

Literatura citada

- Amaya, R. K. Portillo. 2013. *Determinación de fenoles, flavonoides y Capacidad Antioxidante en Melaza, Azúcar Blanco y Moreno en el Ingenio Chaparrastique por el método de Espectrofotometría Ultravioleta-Visible*. Tesis de Licenciatura. Universidad de el Salvador. San Salvador.
- Attygalle, A. B., Blankespoor, C. L., Meinwald, J. and T. Eisner. 1991. Defensive secretion of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Chemical Ecology*, 17: 805–809.
- Attygalle, A. B., Xu, S. C., Meinwald, J. and T. Eisner, 1993. Defensive secretion of the millipede *Floridobolus penneri*. *Journal of Natural Products*, 56: 1700–1706.
- Blum, M. S. 1981. *Chemical Defenses of Arthropods*. Academic press, New York. 562 pp.
- Bravo, L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56: 317–333
- Brues, C. T. y A. L. Melander. 1932. Order Homoptera in Classification of insects a key to the known families of insects and other terrestrial Arthropods. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology at Harvard College*, 73: 1–672.
- Cordell, G. A., Kinghorn, A. D. and J. M. Pezzuto. 1993. *Separation, Structure Elucidation and Bioassay of Cytotoxic Natural Products*. Pp. 195–216. In: S. M. Colegate, and R. J. Molyneux. (Eds.). *Bioactive Natural Products*. Florida: CRC Press, Inc.
- Cupul-Magaña, F. 2010. Sobre el uso de *Ulomoides dermestoides* (Chevrolat, 1878), (Coleoptera, Tenebrionidae, Diaperini) en la coleopteroterapia: informe de un caso en Ixtapa, Jalisco, México en la coleopterapia. *Boletín Asociación Española de Entomología*, 34: 419–422.

- Decker, E. A. 1997. Phenolics: Prooxidants or antioxidants. *Nutritional Reviews*, 55: 396–398.
- Deloya-Brito, G. y C. Deloya. 2014. Sustancias producidas por el coleóptero *Ulomoides dermestoides*: efecto antiinflamatorio y citotóxico. *Acta Zoológica Mexicana (n. s.)*, 30(3): 655–661.
- Dominguez, X. A. 1973. *Métodos de investigación fitoquímica*. Centro Regional de Ayuda Técnica. Ed. Limusa. México, 281 pp.
- Eisner, T., Eisner, M., Attygalle, A. B., Deyrup, M. and J. Meinwald. 1998. Rendering the inedible edible: circumvention of a millipede's chemical defense by a predaceous beetle larva (Phengodidae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 1108–1113.
- Escamilla, C. I., Yanes, E. y J. Guevara, 2009. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 52(2): 73–75.
- Helaine M. A. y A. E. Hagerman. 2006. *Oxidative Stress, Exercise and Aging*. Imperial College Press, EE.UU. 171 pp.
- Hiraku, Y. y S. Kawanishi, 1996. Oxidative DNA damage and apoptosis induced by benzene metabolites. *Cancer Research*, 56: 5172–5178.
- Karp, C. 2010. *Biología Celular y Molecular*. 8va edición. Ed. McGraw Hill. México. 869 pp.
- Lomonte, B. 2007. *Manual de Métodos Inmunológicos*. Universidad de Costa Rica. Disponible en: <http://www.icp.ucr.ac.cr/~blomonte/>. (Fecha de consulta: 4-IV-2009).
- Martínez, A., Amparo, G., Jiménez, N., Mesa, M. y E. Galeano. 2008. *Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia y fitoquímica*. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia, 45 pp.
- National Cancer Institute (NCI). 2015. *Cancer; statistics*. Gobierno de los Estados Unidos de America. Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es/estadistica>. (Fecha de consulta: 5-VIII-2015).
- NOM-253-SSA1-2012. Norma Oficial Mexicana. *Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos*. México DF.
- Okusa, P. N., Penge, O., Devleeschouwer, M. y P. Duez. 2007. Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gillettii* De Wild (Boraginaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 112: 476–481.
- Pandey, A. K., Gurbani, D., Bajpayee, M., Parmar, D., Ajmani, S. and A. Dhawan. 2009. In silico studies with human DNA topoisomerase-II alpha to unravel the mechanism of in vitro genotoxicity of benzene and its metabolites. *Mutation Research*, 661: 57–70.
- Ruiz-Ramos, R., Cebrian, M. E. and E. Garrido 2005. Benzoquinone activates the ERK/MAPK signaling pathway via ROS production in HL-60 cells. *Toxicology*, 209: 279–287.
- Santos, R. C., Lunardelli, A., Caberlon, E., Bastos, C. M., Nunes, F. B., Pires, M. G., Biolchi, V., Paul, E. L., Vieira, F. B., Resende do Carmo, A., Corseuil, E. and J. Rodrigues de Oliveira. 2010. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Ulomoides dermestoides* on induced pleurisy in rats and lymphoproliferation. *In Vitro Inflammation*, 33: 173–179.
- Singleton, V. L., Orthofer, R. and R. M. Lamuela-Raventó. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299: 152–178.
- Spilman, T. J. 1987. Darkling beetles (Tenebrionidae, Coleoptera). Pp. 185–214. In: J. R. Gorham. (Ed.): *Insects and mite pets in food: an illustrated key*: U.S. Department of Agriculture. Washington, D.C.
- Villaverde, M. L., Girotti, J. R., Mijailovsky, S. J., Pedrin N. and M. P. Juárez. 2009. Volatile secretions and epicuticular hydrocarbons of the beetle *Ulomoides dermestoides*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part B, 154: 381–386.
- Voet, D. y G. J. Voet. 2006. *Bioquímica*. Médica Panamericana. Tercera Edición. Buenos Aires, Argentina, 1776 pp.
- Wirtz, R. A., Taylor, S. L. and H. G. Semey. 1978. Concentrations of substituted pbenzoquinones and 1-pentadecene in the flour beetles *Tribolium confusum* (J. du Val) and *Tribolium castaneum* (Herbst). *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part B 61: 25–29