

CAPÍTULO

14

.....

Potencial del veneno de abejas (*Apis mellifera*) en el control *in vitro*

de enterobacterias
patógenas para cuyes
(*Cavia porcellus*)

POR

Vicente ARTEAGA CADENA

Diego JÁUREGUI SIERRA

Santiago MAFLA ANDRADE

Introducción

El cuy (*Cavia porcellus*) es una especie animal autóctona de los Andes Latinoamericanos. Animal pequeño y muy nervioso, su carne es suave y apetitosa, jugosa y muy agradable, digestible y de gran valor biológico, y sus cualidades nutritivas se reflejan en su alto contenido de proteínas, energía y minerales que permiten a esta especie andina avanzar en la ganancia de mercado constituyéndose, como dicen Chauca, L., *et al.* (2006); Jaramillo, C. (2010) y Ataucusi, Q. S., (2015), en un renglón de sustento económico y nutricional para las familias campesinas de la serranía ecuatoriana; sin embargo, el mayor problema que enfrentan los cubayocultores es la presencia de enfermedades enterobacterianas causadas por *Escherichia coli*, *Yersinia pesutotuberculosis* y *Salmonella typhimurium* (Caycedo, L. A., 2000, Correa, 2004 y Chauca, L., *et al.*, 2006), y la mortalidad existente en la crianza de cuyes representa grandes pérdidas económicas (Lara, 2011, p 16).

Por otra parte, Fernández, M. (2005) sustenta sus argumentos en estudios de la Food and Drug Administration (FDA) estadounidense, así como Kenner, R. (2012) y Lara, (2011), coinciden al señalar que la producción de alimentos de origen animal debe seguir sistemas tecnológicos ya establecidos y sustentados en el uso de fármacos como antibióticos, quimioterápicos, antiinflamatorios, inmunológicos, desinfectantes y hormonas de síntesis o industriales, con usos indiscriminados y sin considerar, como señalan Sánchez, V. R., *et al.* (2015), Guamán, P. M. V., (2014) y Ortega, O. G., *et al.* (2015), los potenciales efectos residuales que los metabolitos de estos productos dejan en el organismos animal con el consiguiente riesgo de acciones colaterales en la salud de los consumidores de estos alimentos ofertados.

La apitoxina (BV), como producto apícola, es utilizada desde hace miles de años (Pick, T., 1986), citado por Donald, R. H. (2006). Su aplicación general ha sido mediante picaduras directas de abejas en la piel, que es factible al momento a través de administración parenteral con aguja y jeringas hipodérmicas, de igual manera enteral a través del agua de bebida, de preferencia vía sublingual, fundamentos sostenidos por Castro, H.J. *et al.* (2005); Baek, Y.H. *et al.* (2006) y Han, S. M. *et al.* (2010).

Son, D.J. *et al.* (2007), Han S.M., Lee K.G. *et al.* (2007_b), Matysiak, J. *et al.* (2011) y Peláez, H. A. (2013) confirman que este producto apícola está compuesto por lo menos de 18 ingredientes activos, tal es el caso de enzimas como fosfatasa ácida, hialuronidasa y fosfolipasa A2, una glicoproteína básica de 128 aminoácidos con un alto peso molecular poseedora de acciones bioquímicas muy importantes; posee además aminos biogénicos, polipéptidos como apamina y melitina. Todos estos compuestos otorgan a la apitoxina una cualidad única, acciones farmacéuticas desde analgésicas antibacterianas, antivirales, antitumorales y cualidades inmunes, en especial Jang, M. H. (2003); Wang, C. (2009) y Park, M.H., *et al.* (2010) han demostrado acciones antibacterianas fundamentalmente.

Han, S.M., Lee, K. G. *et al.* (2007_b) comprobaron que el veneno de abejas estimula al eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal, complejo sistema neuroendocrino que en el organismo animal produce corticoides de manera fisiológica y natural mejorando el sis-

tema inmunitario, la microcirculación y la oxigenación celular y tisular. Así, también Matysiak, J. *et al.* (2011) y Johnston, P. *et al.* (2016) comprobaron que a dosis frecuentes de apitoxina hay mayor efectividad en el organismo así tratado sin presencia de resistencia o generación de anticuerpos en su contra; además de que Chaudhry, Q., *et al.* (2010), Akbar, K. *et al.* (2012) y Han, S.M. *et al.* (2012) demostraron tolerancia de este veneno apícola en ratones y cuyes tratados con 150 mg/kg de peso vivo, mientras que Han, S. M. *et al.* (2010) demostraron las bondades del BV o apitoxina como estimulante del sistema inmunitario de aves que recibieron dosis diarias de BV en el agua de bebida.

La melitina, principal componente de la apitoxina, de acuerdo con las afirmaciones de Raghuraman, H. y Chattopadhyay, (2006) y Park, *et al.* (2014), tiene acción hemolítica demostrada en células como los eritrocitos, para cuyo efecto se fusiona con los lípidos de las membranas celulares y por medio de procesos osmóticos colidalesde incita a alteraciones estructurales y fisiológicas en membranas celulares, acción corroborada por Wang, C. (2009) y Husseneder, C. *et al.* (2007) al comprobar a través de la permeabilidad acelerada de iones debido a la formación de poros en membranas, propiedad que les permite incrementar su permeabilidad, incluso hasta llegar al extremo de romperlas. Más aún, Johnston, P. *et al.* (2016) considera la posibilidad de buscar sinergismo entre apitoxina y antibióticos convencionales previa investigación de la concentración mínima inhibitoria de la apitoxina, ya que esta sensibiliza las membranas celulares de los patógenos por acción hemolítica facilitando así que moléculas como antibióticos clásicos penetren con facilidad y ejerzan su acción bactericida.

Además, según Raghuraman y Chattopadhyay, (2007), así como Husseneder, C., *et al.* (2016), el péptido citolítico melitina desarrolla selectividad para ciertos cationes gracias a la acumulación de polaridad (positiva) en el extremo carboxierminal, resaltándose de esta manera la función antifilica o anfipática propia de este polipéptido, incluso como sostienen Peters, B. *et al.* (2010); Oršolić, N. (2012) y Huang, M. *et al.* (2013), la melitina provoca la apoptosis celular, en especial de células cancerosas a través de la activación de la caspasa y metaloproteinasas de la matriz. Más aún, Oršolić, N. (2012) afirma que varias células cancerosas como células renales, de vejiga, de próstata, pulmonares, hepáticas y de mamas, incluso células de leucemia, pueden ser blancos de péptidos componentes de la apitoxina, este es el caso de la activación de la fosfolipasa A por parte de la melitina, constituyéndose en el proceso citotóxico fundamental para el control de las células cancerosas.

Leandro, L. F. *et al.* (2014) desarrollaron una investigación con la finalidad de evaluar el potencial antibacteriano del veneno de abejas (*Apis mellifera*) mediante la técnica de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente a bacterias consideradas agentes causales de la caries dental: *Streptococcus salivarius*, *S. sobrinus*, *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *Lactobacillus casei* y *Enterococcus faecalis*, lográndose como resultado una CMI entre 20 y 40 µg/ml, indicativo de una buena actividad antibacteriana, concluyéndose que la apitoxina y su componente melitina tiene una potencial aplicación contra patógenos orales.

A partir de la premisa de primero sembrar y luego curar que plantean Cercenado, E. y Saavedra-Lozano, J. (2009), la determinación del perfil de susceptibilidad de cepas de enterobacterias obtenidas mediante hisopados rectales de cuyes y luego sometidas a cultivos microbianos y confrontaciones ante agentes antimicrobianos *in vitro*, se puede hacer a través de diferentes metodologías que tienen variación en relación a dos criterios fundamentales; esto es, por una parte, de conformidad con el tipo de microorganismo que tenga crecimiento rápido, fastidioso, anaerobio estricto o facultativo; de otro lado, según el o los órganos afectados, por ejemplo, intestino, estómago, colecciones polimicrobianas, hemocultivos y otros más (Negróni, M. 2009).

Hay diferentes métodos de estudio y bases de la interpretación de la sensibilidad de enterobacterias a antimicrobianos *in vitro*. De conformidad con Toroco, R. et al. (2008), estos métodos pueden clasificarse en cuantitativos y cualitativos. Entre los cuantitativos se encuentran aquellos procedimientos que permiten determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM). Se acepta como CMI y CBM la concentración mínima de antibacteriano que en un período de tiempo establecido y con un inóculo que contiene una población bacteriana estandarizada tiene capacidad *in vitro* de inhibir el crecimiento o inducir la muerte del 99,9% de dichas bacterias respectivamente (Elissa A, 2008 y Malbrian, G. C. 2012).

Sin que importe el método a emplear, hay tres facetas o pasos que se deben considerar al estudiar la sensibilidad de los microorganismos a la acción de agentes antimicrobianos: el medio de cultivo a emplear, el antimicrobiano a utilizar y la cepa bacteriana a probar. Cualquiera que sea el método hay que controlar cada una de estas tres variables y cada una de ellas es importante a su manera (Malbrian, G. C. 2012 y Junoda, T. 2013).

Para Cercenad. E. y Saavedra-Lozano, J (2009), medir la sensibilidad de una bacteria frente a uno o varios antimicrobianos *in vitro*, como en el caso de la apitoxina, como confirman Jang, M. H. (2003) y Park, M.H., et al. (2010), constituye el propósito de un antibiograma o método de disco difusión considerado relativamente cuantitativo (Negróni, M. 2009), de manera que se puedan predecir los efectos aplicados en organismos vivos, metodología que permite conseguir, a través de la lectura e interpretación de los halos formados en torno a discos de papel filtro embebidos en solución acuosa de apitoxina, tanto evidencias cualitativas afines a la resistencia o sensibilidad de una bacteria a un antimicrobiano como resultados cuantitativos que determinan la concentración mínima inhibitoria (CMI) de un antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento de bacterias a concentraciones de $\mu\text{g/ml}$ o mg/l (MacGowan, A. P. 2008).

El antibiograma o método de Kirby Bauer, de conformidad con Negróni, M. (2009), consiste en preparar una suspensión microbiana en solución fisiológica desde un cultivo puro o monomicrobiano de 24 horas de sembrado y de una cepa biotipificada y debidamente caracterizado. El cultivo es contrastado con un tubo de 0,5 de la escala Mc Farland, que equivale a una suspensión microbiana de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml; este procedimiento se hace en una caja Petri con medio selectivo, siguiendo apego estricto a las normas de microbiología relativas al tema, y luego de 18 a 20 minutos de sembrada la placa se colocan

los discos que contienen solución de apitoxina como antimicrobiano a probar, posteriormente se pone a incubar la caja Petri invertida a 36°C durante 18 a 24 horas. La lectura se hace midiendo en mm los diámetros de los halos de inhibición que se han formado en torno a los discos.

Se considera el microorganismo sensible al antimicrobiano si el diámetro del halo o zona de inhibición es de 3 mm o más, es intermedia la acción antimicrobiana para un microorganismo si el diámetro del halo es de 2 mm o más pero menor a 3 mm; mientras que será resistente si el diámetro del halo es menor a 2mm (Karaman et al. 2003 y Springfield et al., 2003).

En síntesis, el problema mayor que deben enfrentar los cobayocultores es la presencia de enfermedades enterobacterianas, de tal manera que la mortalidad existente en la cría de cuyes constituye la causa de pérdidas económicas, sumándose a todo esto las consecuencias dadas por el desconocimiento de alternativas “limpias” de solución en el área de salud animal que a su vez constituyan una ventaja competitiva práctica y eficiente. De manera que la siguiente interrogante identifica el desafío a resolverse con esta investigación: ¿Cuál es la concentración mínima de apitoxina que inhiba o controle *in vitro* a enterobacterias tales como *Yersinia pseudotuberculosis*, *Escherichia coli*, y *Salmonella typhimurium* procedentes de cuyes (*Cavia porcellus*)?

El objetivo fundamental de esta investigación consistió en determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de apitoxina mediante antibiogramas en cultivos de *Escherichia coli*, *Yersinia pseudotuberculosis* y *Salmonella typhimurium* obtenidas a través de hisopados rectales de cuyes, para su control *in vitro*.

■ Materiales y métodos

La actividad antimicrobiana del veneno de abejas se determinó a través del desarrollo de la metodología de antibiogramas o de disco difusión ejecutados en cultivos microbiológicos de tres especies de enterobacterias como *Escherichia coli*, *Yersinia pseudotuberculosis* y *Salmonella typhimurium*, debidamente muestreadas a través de hisopados rectales de cuyes (*Cavia porcellus*) y de tejidos específicos: bazo, hígado y ganglios mesentéricos.

Las colonias microbianas observadas fueron repicadas varias veces con la finalidad de obtener cepas puras y de esta manera poderlas caracterizar tanto bioquímica como molecularmente. Estas cepas fueron sembradas en caldo cultivo, en agar sangre, y luego en medios específicos como agar Eosina (ACUMEDIA®), agar SS (MERCK®) y agar Yersinia (MERCK®), posteriormente se prepararon soluciones de 0.1mg/ml, 0,2mg/ml, 0,3mg/ml, 0,4mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,6mg/ml, 0,7mg/ml y 0,8mg de apitoxina/ml de agua grado uno.

Se preparó una escala de suspensiones bacterianas ajustadas a un patrón, una por cada especie bacteriana, esto es, una solución de concentración bacteriana conocida, concretamente de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml, que corresponde con el 0,5 Mc Farland, y con la ayuda de un escobillón de algodón se tomó parte de la disolución de cada especie bacteriana y se sembraron en cajas Petri previamente preparadas e identificadas de manera

homogénea con medios especificados antes, de manera que se mantuvo un espesor de 4 mm de cada medio selecto para cada caja y especie bacteriana. Después de 20 minutos se colocaron los discos de papel filtro embebidos en las soluciones de apitoxina ya referidas y previamente preparadas y se pusieron a incubar las cajas portadoras de inóculos bacterianos y discos de apitoxina, a 38°C de manera que a las 24, 48, 72 y 96 horas se tomaron lecturas de los halos presentes en torno a los discos de apitoxina, determinándose de esta manera la inhibición de las especies bacterianas (CMI) y la muerte de bacteriana (CBM).

El proceso descrito se repitió por tres veces en diferentes períodos de tiempo y con cada una de las tres enterobacterias objeto de este estudio.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Stata 12.1 (Stata Corp LP). El nivel de significancia establecido fue de 5% ($\alpha = 0,05$).

Resultados

Las muestras de *Escherichia coli*, *Yersinia pseudotuberculosis* y *Salmonella thipimorium* que se aislaron, fueron secuenciadas a través de los laboratorios de Biotecnología de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, sede Ibarra (PUCESI), con la colaboración de los laboratorios MACROGEN.

TABLA 1. Resultados de la secuenciación de enterobacterias patógenas para cuyes (*cavia porcellus*)

Código	Secuencia representativa	Porcentaje de identidad	ID NCBI
A1	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	100	LT596221.1
A2	<i>Salmonella typhimorium</i>	100	KT027805.1
A3	<i>Escherichia coli</i>	100	CP021454.1

Fuente: ECAA y MACROGEN. Trabajos Desarrollados en Laboratorio de Biotecnología

Concentración Mínima Inhibitoria de apitoxina en solución acuosa

Luego de efectuadas 3 repeticiones/9 antibiogramas para un total de 27 antibiogramas, los resultados logrados son los siguientes:

TABLA 2. Concentración Mínima Inhibitoria determinada en relación al diámetro en milímetros de los halos y para especie de enterobacteria patógena de los cuyes

Enterobacteria en cultivos específicos	Cmi de apitoxina en agua (mg/ml)	Diámetro del halo en mm
<i>Escherichia coli</i>	0.7	12
<i>Salmonella typhimorium</i>	0.8	12.2
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	0.8	12.6

Fuente: Resultados de Trabajos en laboratorio de Microbiología

Las CMI desarrolladas a través del método de difusión con discos de papel filtro embebidos en diferentes concentraciones de apitoxina, medida en miligramos y disuelta en un mililitro de agua de grado uno, depositados en cada cultivo específico para cada enterobacteria patógena para cuyes, cuyos resultados se pueden apreciar en la **TABLA 2** de la siguiente manera: para *Escherichia coli*, cultivada en agar Eosina (ACUMEDIA®), y con discos portadores de apitoxina a una concentración de 0.7 mg/ml, para un diámetro de halo de 12 mm; para *Salmonella typhimorium* y *Yersinia pseudotuberculosis* cultivada en agar SS (MERCK®) y agar Yersinia (MERCK®), con discos embebidos de apitoxina a concentración de 0,8 mg/ml para las dos especies de enterobacterias, lográndose diámetros de halos de 12,2 mg/ml y 12,6 mg/ml respectivamente.

La **TABLA 3** expresa claramente la información lograda con los antibiogramas para *Escherichia coli* y a concentraciones de 0,1 a 0,7 mg de apitoxina por mililitro de agua grado uno, dilución embebida en discos de papel filtro para las lecturas correspondientes a la acción inhibitoria del veneno de abejas (*Apis mellifera*).

TABLA 3. Lectura de la CMI a diferentes concentraciones de apitoxina, cada 24 horas y en diámetros de halos en milímetros para la enterobacteria *Escherichia Coli*

Horas para las lecturas	Concentraciones de apitoxina (mg/ml) y radios de los halos medidos en milímetros.						
	0,1 (mg/ml)	0,2 (mg/ml)	0,3 (mg/ml)	0,4(mg/ml)	0,5 (mg/ml)	0,6 (mg/ml)	0,7 (mg/ml)
24	0,0 (mm)	0,0 (mm)	6,4 (mm)	6,6 (mm)	6,8 (mm)	7,2 (mm)	12,0 (mm)
48	0,0 (mm)	0,0 (mm)	6,6 (mm)	6,6 (mm)	7,2 (mm)	7,6 (mm)	12,0 (mm)
72	0,0 (mm)	0,0 (mm)	6,6 (mm)	7,0 (mm)	7,2 (mm)	8,0 (mm)	12,0 (mm)
96	0,0 (mm)	0,0 (mm)	6,6 (mm)	7,0 (mm)	7,2 (mm)	8,0 (mm)	12,0 (mm)

Fuente: Resultados de Trabajos en laboratorio de Microbiología

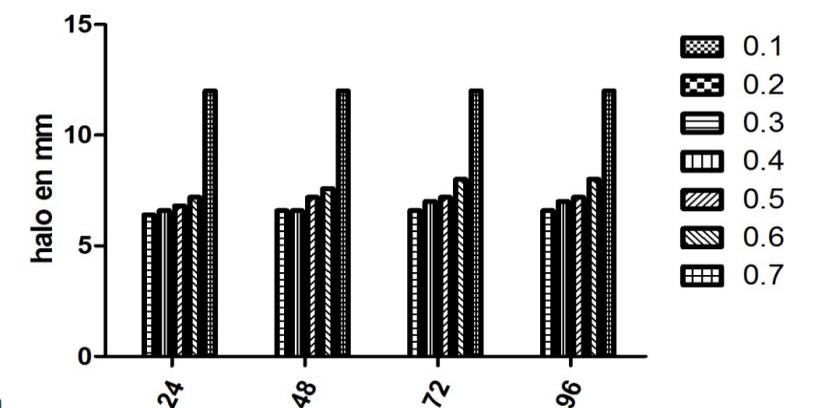


FIGURA 1

CMI *Escherichia coli*.

Fuente: Elaboración propia

Concentraciones de apitoxina y halos de sensibilidad microbiana (cultivos) *Escherichia coli*

En la **FIGURA 1** Se aprecia la relación existente entre mg de apitoxina/ml de agua, mientras crece la concentración de solución de apitoxina

TABLA 4. Lectura de la CMI a diferentes concentraciones de apitoxina, cada 24 horas y en diámetros de halos en milímetros, para la enterobacteria *Salmonella typhimorium*

Horas para las lecturas	Concentraciones de apitoxina (mg/ml) y radios de los halos medidos en milímetros							
	0,1 (mg/ml)	0,2 (mg/ml)	0,3 (mg/ml)	0,4(mg/ml)	0,5 (mg/ml)	0,6 (mg/ml)	0,7 (mg/ml)	0,8 (mg/ml).
24	0,0 (mm)	0,0 (mm)	0,0 (mm)	6,2 (mm)	7,0 (mm)	7,6 (mm)	11,5 (mm)	12,2 (mm)
48	0,0 (mm)	0,0 (mm)	0,0 (mm)	6,2 (mm)	7,0 (mm)	7,6 (mm)	12,0 (mm)	12,2 (mm)
72	0,0 (mm)	0,0 (mm)	0,0 (mm)	6,2 (mm)	7,0 (mm)	7,6 (mm)	11,7 (mm)	12,2 (mm)
96	0,0 (mm)	0,0 (mm)	0,0 (mm)	6,2 (mm)	7,0 (mm)	7,6 (mm)	12,2 (mm)	12,2 (mm)

Fuente: Resultados de Trabajos en laboratorio de Microbiología.

Concentraciones de apitoxina y halos de sensibilidad microbiana (cultivos) *Salmonella typhimorium*

Para el caso de la enterobacteria *Salmonella typhimorium*, las concentraciones de 0,8 mg/ml son las que más diámetro del halo demostraron, con 12, 2 mm, incluso se mantiene por más de 96 horas.

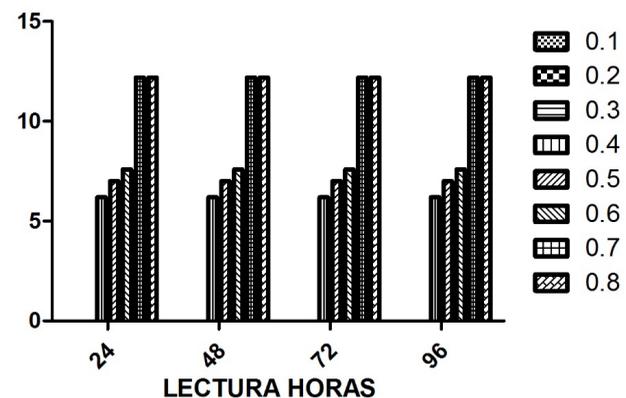


FIGURA 2
Halo en *Salmonella*.
Fuente: Elaboración propia

Concentraciones de apitoxina y halos de sensibilidad microbiana (cultivos) *Salmonella typhimorium*

Las concentraciones de apitoxina 0,4 mg/ml en adelante y hasta llegara 0,8 mg de apitoxina/ml de agua grado uno manifiestan halos de inhibición al crecimiento de la bacteria patógena, los que fueron medidos en milímetros de sus diámetros.

Con los antibiogramas para la enterobacteria *Yersinia pseudotuberculosis*, las concentraciones de 0,8 mg/ml son las que más diámetro del halo demostraron, con 12, 6 milímetros, incluso se mantiene en las 96 horas de realizadas las lecturas.

TABLA 5. Lectura de la CMI, a diferentes concentraciones de apitoxina, cada 24 horas y en diámetros de halos en milímetros, para la enterobacteria *Yersinia pseudotuberculosis*

Horas para las lecturas	Concentraciones de apitoxina (mg/ml) y radios de los halos medidos en milímetros							
	0,1 (mg/ml)	0,2 (mg/ml)	0,3 (mg/ml)	0,4(mg/ml)	0,5 (mg/ml)	0,6 (mg/ml)	0,7 (mg/ml)	0,8 (mg/ml).
24	0,0 (mm)	0,0 (mm)	0,0 (mm)	6,2 (mm)	7,0 (mm)	7,6 (mm)	8,2 (mm)	12,6 (mm)
48	0,0 (mm)	0,0 (mm)	0,0 (mm)	6,2 (mm)	7,0 (mm)	7,6 (mm)	8,2 (mm)	12,6 (mm)
72	0,0 (mm)	0,0 (mm)	0,0 (mm)	6,2 (mm)	7,0 (mm)	7,6 (mm)	8,2 (mm)	12,6 (mm)
96	0,0 (mm)	0,0 (mm)	0,0 (mm)	6,2 (mm)	7,0 (mm)	7,6 (mm)	8,2 (mm)	12,6 (mm)

Fuente: Resultados de Trabajos en laboratorio de Microbiología

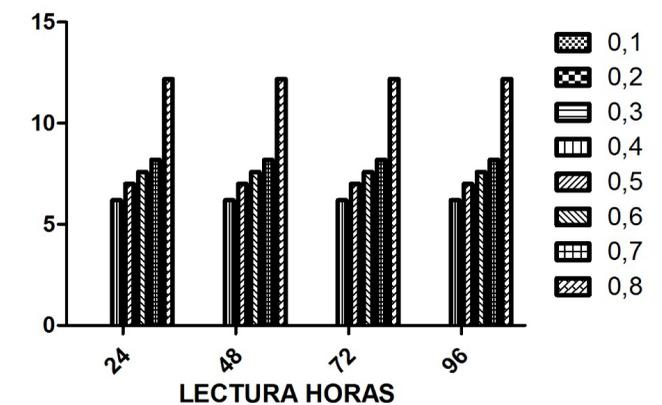


Figura 3
Halo en *Yersinia*.
Fuente: Elaboración propia

Concentraciones de apitoxina y halos de sensibilidad microbiana (cultivos) *Yersinia pseudotuberculosis*

Como puede apreciarse en la **FIGURA 3**, las concentraciones de apitoxina, a medida que se incrementan los miligramos de este polipéptido en solución acuosa, se incrementan los diámetros de los halos en torno a los discos de papel, a partir de 0,4 mg/ml y hasta 0,8 mg/ml para un diámetro de halos de 12,6 mm, manteniéndose hasta las 96 horas consecutivas.

Discusión de resultados

En los resultados obtenidos del ensayo de sensibilidad bacteriana se observa que a una concentración de 0,7 mg/ml de apitoxina en agua de grado uno presenta actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, mientras que para las bacterias *Yersinia pseudotuberculosis* y *Salmonella typhimorium* fueron necesarios 0.8 mg/ml de apitoxina en agua de grado uno. Estos resultados pueden interpretarse en un potencial que posee la apitoxina y sus componentes péptidos, enzimáticos y lipoproteínas frente a agentes microbianos.

Se puede fundamentar la acción bactericida de la apitoxina por el hecho de que uno de los mecanismos de acción, de manera especial por el polipéptido melitina, considerada entre los mayores componentes del veneno de abejas (*Apis mellifera*), que desarrolla acción de disrupción en la membrana celular bacteriana posiblemente a través de tres alternativas de acción, una a través de la afectación de la estabilidad y equilibrio estructural de las membranas celulares bacterianas, en especial Gram negativas como las enterobacterias (Jang, M. H. 2003); y Park, M.H., et al. 2010), una segunda a través del incremento de la permeabilidad de la membrana celular a iones pequeños, ya que se forman túbulos o poros incluso por intervención de las posfolipasas A2 (Wang, C. 2009 y Park, M.H., et al. 2010), y finalmente a través de la alteración o desequilibrio de procesos de empaquetamiento de capas dobles o bicapas lipídicas, de igual manera por acción de enzimas posfolipasas: cualquiera de estos tres procesos de acción compleja y todavía no bien dilucidada desarrollados por la apitoxina y sus componentes, causan la muerte de células bacterianas (Peters, B. et al. 2010; Oršolić, N. 2012. y Huang, M. et al. 2013).

Podría decirse, junto con Han, S.M., Lee, K. G. et al. (2007), que la mayor acción sensibilizante de la apitoxina a bacterias Gram negativas se debería además de a los aspectos bioquímicos, a la estructura más simple de la membrana que poseen una capa simple de mureina muy delgada (Oršolić, N. 2012) un péptidoglicano o copolímero muy resistente que protege a las membranas de las bacterias que la poseen, pues gracias a este, las bacterias no sufren ruptura osmótica y es el compuesto protector que les da la forma característica a cada espécimen bacteriano (Wang, C. 2009 y Park, M.H., et al. 2010).

Conclusiones

La apitoxina como compuesto molecular integrado de varios ingredientes piogénicos tiene acción antimicrobiana, produce apoptosis celular mediante la potenciación de enzimas y coenzimas con el polipéptido melitina, en especial al desarrollar hemólisis de membranas celulares, entre ellas las de bacterias patógenas. De igual manera se cuenta con la posibilidad de encontrar sinergismo entre apitoxina y antibióticos convencionales, ya que la primera sensibiliza las membranas celulares de los patógenos por acción hemolítica facilitando así que moléculas como antibióticos clásicos penetren con facilidad y ejerzan su acción bactericida, a cuyo efecto la melitina se fusiona con los lípidos de las membranas celulares y mediante procesos osmóticos colidales conducentes a alteraciones estructurales y fisiológicas en membranas celulares, tal como afirman Park, M.H. et al. (2010) y Johnston, P. et al. (2016).

En la determinación de la MIC, el método de difusión con discos es el más utilizado por su sensibilidad. Práctico y eficiente, necesita cantidades mínimas de reactivos, razón por la cual es factible desarrollar mayor número de réplicas. Por cierto, como señalan Malbrian, G. C. (2012) y Junoda, T. (2013), sin importar el método a desarrollarse, es necesario considerar tres pasos a considerar para estudiar la sensibilidad de las enterobacterias a la acción de la apitoxina: el medio de cultivo, el antimicrobiano o veneno

de abejas y las cepas bacterianas objeto de estudio, lo importante es controlar estas tres variables, ya que todas son importantes en conjunto.

Referencias

- Akbar Karimi; Farhad Ahmadi; Kazem Parivar; Mohammad Nabiuni; Saied Haghighi; Sohrab Imani; Hossein Afrouzi (2012) Effect of Honey Bee Venom on Lewis Rats with Experimental Allergic Encephalomyelitis, a Model for Multiple Sclerosis. *Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran J Pharm Res.* Spring;11(2):671-8.
- Ataucusi, Q. S. (2015) *Manejo Técnico de la Crianza de Cuyes en la Sierra del Perú.* Programa PRA Buenaventura CSE Arequipa. Editado por: Cáritas del Perú. JPG Corporación S.A.C.
- Baek, Y.H.; Huh, J.E.; Lee, J.D.; Choi, Do, Y; Park, D.S. (2006) *Antinociceptive effect and the mechanism of bee venom acupuncture (apipuncture) on inflammatory pain in the rat model of collagen-induced arthritis: Mediation by (2- adrenoceptors.* *Brain Res.*, 16, 305-310.
- Caicedo, L.A. (2000) *Experiencia Investigativas en la Producción de Cuyes: Contribución al Desarrollo Tecnológico de la Especie.* Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias.
- Castro, H.J.; Méndez-Inocencio, J.I.; Omidvar, B.; Omidvar, J.; Santilli, J.; Nielsen, H.S.; Pavot, A.P., Richert., J.R.; Bellanti, J.A. (2005) *A Phase I Study of the safety of honey bee venom extract as a possible treatment for patients with progressive forms of multiple sclerosis.* *Allergy Asthma Pro.*, 26, 470-476.
- Cercenado, E.J.; Saavedra-Lozano, J. (2009) *El antibiograma. Interpretación del antibiograma: conceptos generales desde el laboratorio a la clínica.* *An Pediatr Contin.* Madrid. España.7 (4):214-217.
- Chaudhry, Q.; Piclin, N.; Cotterill, J.; Pintore, M.; Price, N.R.; Chrétien, J.R.; Roncaglioni, A. (2010) Global QSAR models of skin sensitizers for regulatory purposes. *Chem. Cent. J.*, 4, S5.
- Chauca, L.; Higaona, R.; Muscari, R.; Pinto, J. (2006) Caracterización de la carcasa de seis genotipos de cuyes. En: *Reunión Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal.* Huancayo: APPA.
- Elissa, A.; Ostrosky, E.A.; Mizumoto, M.K.; Lima, M.R.L.; Telma, M.; Kaneko, T. M.; Nishikawa, S.O.; Freitas, B.R. (2008) Métodos para la evaluación de la actividad antimicrobiana y determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de extractos de plantas. *Revista Brasileira de Farmacognosia, Sao Paulo- Brasil*, 18(2). doi.org/10.1590/S0102-695X2008000200026
- Fernández, M. (2005) *Efectos inesperados en la carne de pollo* [en línea], disponible en: <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnologia>.
- Guamán, P.M.V. (2014) Determinación del género y especie de *Salmonella* en cuyes mestizos en diferentes sistemas de crianza en la comunidad de Oñacapac del cantón Saraguro. Tesis de grado no publicada, Universidad politécnica Salesiana Sede Cuenca, Facultad de MEDICINA Veterinaria y Zootecnia.

- Han, S.M.; Lee, K.G.; Yeo, J.H.; Oh, B.Y.; Kim, B.S.; Lee, W.; Baek, H.J.; Kim, S.T.; Hwang, S.J.; Pak, S.C. (2010) *Effect of honeybee venom supplementation in drinking water on growth performance of broiler chickens*. Poultry Science Association. Inc. Korea, 42: 253-268, doi: 10.3382/ps.2010-00915.
- Han, S.M.; Lee, G.G.; Pak, K.K. (2010) *Antibacterial and antiinflammatory effects of honeybee (*Apis mellifera*) venom against acne-inducing bacteria*, J. Med. Plant. Res., 4, 459-464.
- Han, S.M.; Lee, K.G.; Yeo, J.H.; Kweon, H.Y.; Woo, S.K.; Lee, M.L.; Baek, H.J.; Kim, S.Y.; Park, K.K. (2007b). Effect of honey Bee venom on microglial cells nitric oxide and tumor necrosis factor - production stimulated by LPS. *J. Ethnopharmacol.* 111: 176-181.
- Huang, M.; Hu, M.; Song, Q.; Song, H.; Huang, J.; Gu, X. (2013) Hybrid Melittin Cytolytic Peptide-Driven Ultrasmall Lipid Nanoparticles Block Melanoma Growth in Vivo. *American Chemical Society*.
- Husseneder, C.; Donalson, J.R.; Foil, L.D. (2016). Genetically Engineered Yeast Expressing a Lytic Peptide from Bee Venom (Melittin) Kills Symbiotic Protozoa in the Gut of Formosan Subterranean Termites. *PLOS ONE*, 3:1-9.
- Jaramillo, C. (2010) *Epidemiología Veterinaria*. Primera Edición. Editorial El Manual Moderno, S.A. México. pp.112-114.
- Jang, M.H. (2003) *Bee venom induces apoptosis and inhibits expression of cyclooxygenase-2 mRNA in human lung cancer cell line NCI-H1299*. J. Pharmacol. Sci., 91, 95-104.
- Johnston, P.; Dobson, A.; Rolff, J. (2016) Genomic Signatures of Experimental Adaptation to Antimicrobial Peptides in *Staphylococcus aureus*. *G3 (Bethesda)*.
- Junoda, T.; López-Martina, J.; Gädickea, P. (2013) *Estudio de susceptibilidad antimicrobiana de Salmonella entérica en muestras de origen animal y alimentario*. Rev Med Chile; 141: 298-304
- Kenner, R. (director) (2012), *Alimentos contaminados* [Película], Minesota, EEUU: Magnolia Picture/ Riverroad Entertainment.
- Lara, M.A. (2011) *Efecto de la tilización del ajo macerado (*allium sativum*) en el control de Yersinia pseudotuberculosis y Escherichia coli en cuyes, etapa crecimiento – engorde*. Riobamba, Ecuador.
- Leandro, L.F.; Mendes, C.A.; Casemiro, L.A.; Vinolis, A.H.; Cunha, W.R.; de Almeida, R.; Martins, C.H. (2014) *Actividad antimicrobiana de apitoxina, melitina y fosfolipasa A2 de abejas melíferas (*Apis mellifera*) contra los patógenos orales*. Anales de la Academia Brasileña de Ciencias. Versión impresa ISSN 0001-3765 / Versión en línea ISSN 1678-2690. w.w.w.scielo.br/aabc. 147-155. Doi.org/10.1590/0001-376529130511.
- MacGowan, A.P. (2008) *Clinical implications of antimicrobial resistance for therapy*. J Antimicrob Chemother. 62 (2):105-114.
- Malbrian, G.C. (2012) *Método de Determinación de Sensibilidad Antimicrobiana por Dilución*. MIC, Testing Clinical and Laboratory Standars Instotute. 32(2).
- Matysiak, J. et al. (2011) Characterization of honeybee venom by MALDI-TOF and nanoESI-QqTOF mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 54 (2011) 273–278.
- Negrón, M. (2009) *Microbiología estomatológica: Fundamentos y Guía Práctica*. Edit. Médica Panamericana, Universidad de Buenos Aires, Córdoba-Argentina.
- Ortega, O.G.; Jiménez, A.R.; Ara, G.M.; Morales, C.S. (2015) La salmonelosis como factor de riesgo de mortalidad en cuyes. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. (26)4. Doi.org:10.15381.
- Oršolić, N. (2012) Bee venom in cancer therapy. *Springer Science+Business Media*, 31:173–194.
- Park, M.H.; Choi, M.S.; Kwak, D.H.; Oh, K.W.; Yoon, D.Y.; Han, S.B.; Song, H.S.; Song, M.J.; Hong, J.T. (2010) Anti-cancer effect of bee venom in prostate cancer cells through activation of caspase pathway via inactivation of NF- κ B. *Prostate*, 17, 801-812.
- Peláez, H.A. (2013). Allergens of Hymenopteran venoms, Clin Rev. Allergy, 137-198.
- Peters, B.; Shirliff, M.; Jabra-Rizk, M. (2010) Antimicrobial Peptides: Primeval Molecules or Future Drugs? *ONEPLUS*.
- Raghurama, H.; Chattopadhyay, A.E. (2006) Melitina: un péptido activo en membranas con diversas funciones. DOI: 10.1077/S105-40-006-9030-Z. Biosci Rep. 27: 189-223.
- Sánchez, V.R.; Silva, J.M.; Jiménez, A.R.; Zea, M O. (2015) Efecto de Desinfectantes Químicos y Extractos de Plantas sobre la Carga Bacteriana en Carcasas de Cuyes (*Cavia porcellus*). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. (26)2, doi.org/10.15381.
- Son, D. J.; Lee, J.W.; Lee, Y.H.; Song, H.S.; Lee, C.K.; Hong, J.T. (2007) Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds, *Pharmacology & Therapeutics* 115 (2007) 246–270.
- Springfield, E.P.; Amabeoku, G.F.; Weitz Mabusela, W.; Johnson, Q. (2003) Una evaluación de dos especies *Carpobrotus* extractos de los potenciales agentes antimicrobianos. *Phytomedicine* 10: 434-439.
- Taroco, R.; Seija, V.; Vignoli, R. (2008) Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. In *Temas de bacteriología y Virología Médica*. Edit. Picazo. España. pp. 663-572. Retrieved from. <http://w.w.w.higiene.edu.uy/cefa>.
- Wang, C.; Chen, T.; Zhang, N.; Yang, M.; Li, B.; Lü, X.; Cao, X.; Ling, C. (2009) Melittin, a major component of bee venom, sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)- induced apoptosis by activating CaMKII-TAK1-JNK/p38 and inhibiting I κ B kinase-NF κ B. *J. Biol. Chem.*, 284, 3804-3813.