

00524
/42

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO**



FACULTAD DE QUIMICA



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**

EFFECTO DEL VENENO DE ABEJAS SOBRE LA
PROLIFERACION DE LINFOCITOS Y LA SINTESIS DE
INTERLEUCINAS INFLAMATORIAS.

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A :
QUIROZ CABANAS YUVICELA



MEXICO, D. F.

2003.

A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

PAGINACION

DISCONTINUA

Journal of Management Studies is an international journal of research in the field of management. The journal covers a wide range of topics, including strategic management, organizational behavior, human resources, and international business. It is a leading journal in the field and is read by a wide range of management scholars and practitioners. The journal is published quarterly and is available in both print and electronic formats. The journal is indexed and abstracted in a number of leading databases, including the Journal of Management Studies Index, the Journal of Management Studies Abstracts, and the Journal of Management Studies Database. The journal is also available in Spanish and Chinese. The journal is a member of the Emerald Group Publishing Limited and is published by Emerald Group Publishing Limited. The journal is a leading journal in the field and is read by a wide range of management scholars and practitioners. The journal is published quarterly and is available in both print and electronic formats. The journal is indexed and abstracted in a number of leading databases, including the Journal of Management Studies Index, the Journal of Management Studies Abstracts, and the Journal of Management Studies Database. The journal is also available in Spanish and Chinese. The journal is a member of the Emerald Group Publishing Limited and is published by Emerald Group Publishing Limited.

Jurado asignado:

| | |
|-------------------|---------------------------------------|
| Presidente. | Prof. Saturnino de León Chapa |
| Vocal: | Prof. Fernando García Tamayo |
| Secretario: | Prof. Patricia Elvira Berron Ruiz |
| Primer suplente: | Prof. Mónica Berenice Heras Chavarria |
| Segundo suplente: | Prof. Alejandro Ortiz Osornio |

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 202, de Inmunología del Departamento de Biología
Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

Asesor del tema:


Dr. Fernando García Tamayo

Supervisor técnico:


M. en C. Maria Guadalupe Reyes Garcia

Sustentante:


Diana Cabañas Yuvicela

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

A MANERA DE ¿?

El linfocito es...

*Yo Yuvicela Quiroz Cabañas,
Soy de las selvas negras,
Mi madre me llevó consigo a las ciudades,
cuando estaba en su vientre.
Y el frío de los bosques estará en mí hasta que yo me muera.*

B.B.

Así comienza la historia de mi vida, de mi lucha....

DEDICO el presente trabajo como un homenaje, a todos aquellos que han influido de una forma u otra en mi vida, que me han hecho pensar, que me han hecho reflexionar, que me han hecho reír, que me han hecho llorar, que me han hecho gritar, que me han hecho soñar, que me han hecho ser libre y que me han hecho volar.

Salud, va por ustedes...

En primer lugar con admiración y respeto a mis primeros padres: Hortensia y Francisco "el guacho", a quienes les debo la vida y la sangre guerrillera que corre por mis venas y en segundo lugar con gran amor a mis segundos padres: Guillermina Cabañas y Josafat Quiroz a quienes les debo los apellidos, y son quienes me enseñaron a caminar, quienes me enseñaron el valor de la vida, quienes me enseñaron a luchar por lo que verdaderamente vale la pena.

A mi tío, que admiro profundamente por su entrega, por su valor, por su ejemplo, por la lealtad a su pueblo, por dar la vida por lo que siempre creyó justo, por ser Lucio Cabañas Barrientos.

*"Lucio para unos cuantos tu estas muerto,
más tu pueblo te recuerda
y en el corazón de los pobres,
seguirás viviendo"*

P.C.

Al otro Cabañas con cariño, porque siempre ha sabido guiarme y jalarme las orejas cuando me lo merezco, por amenizar las fiestas (hasta la de mis quince años), y porque siempre toma de pretexto la presión para echarse un brandy. Con gran amor a mi tío Pablo Cabañas.

A mi familia, que a pesar de todas las adversidades, las injusticias, la persecución, la cárcel, las torturas, siguen y siguen dándole a la lucha por un mundo mejor y más justo, y por que a pesar de todo le dan mucho sabor a nuestras vidas. A mis hermanos: Nidia por ser mi gran amiga (por siempre estar cuando la necesito) y Josa (el "chamaco"); a mi abuela Gudelia[†] que siempre me inculco el estudio; a mi abuelo Abel[†] porque se comía las moscas; a mi abuelos Felipe[†] y Aristeo[†] por inculcarnos siempre el amor y la unión en la familia; a mi tío Erasmo por ser un ejemplo de lucha y entrega; a mi tía Hilda; a mi tío güero por inducirme a la lectura subversiva; a mi tía Tere; a mis primos Felipe, Ix-Chel y Ernesto por sacarle canas verdes a sus papás; a mi tío Silvestre "el tieso" McCoy porque nos enseñó que no es buena la tiricia; a mi sobrina Zaira por su gran corazón; a mis primos Rafa, Eva, Luis, Gabriel, Juan y Adolfo por han sabido sobreponerse ante el dolor de perder a un padre; a mi tío Lino por nunca dejarse vencer a pesar de las torturas; a mi tío Gabriel porque siempre nos hace reír; a mi tía Yolanda por que a pesar de que es muy gritona la quiero mucho; a mis primos Kazan, Caid, Tania y Alvino por aquellos buenos vinos; a la tía Dominga por haber

criado a mis tíos Lucio y Pablo; a mi tía María por su gran vitalidad y entusiasmo; a mi tía Alejandra, a mis primos flaco, Beto y Tania por ser como son; a mi tía María del Rosario[†] aunque ya no este con nosotros; a la banda de Guerrero; a mi tío Lalo; a mi tía María; a mi prima Lorena por demostrar siempre su gran lealtad a nuestra amistad; a mi primo Lalo por dark; a mi tía Sofía por aguantarnos a todos cuando vamos en plan de grilla; a mi tío José por sacarse el bocado de la boca cuando alguien más lo necesita; a mi tío Alejandro por que con ese nombre nadie lo conoce, etc., etc., etc., a todos y cada uno de los miembros de mi familia que le han dado tanto sabor al caldo.

A los que ya no están con nosotros, no porque no hayan querido, sino porque los obligaron, a todos los desaparecidos forzados por los que dedico también no un minuto de silencio, sino toda una vida de lucha, por el dolor de mi familia y de todas las familias que han vivido esto en carne propia, desde la guerra sucia hasta la semana pasada.

A los necios que siguen luchando, de distintas formas, por la libertad, por la justicia, por la tierra, por la paz, por la salud, por la cultura, por la independencia, por la alimentación, por la democracia, por el techo, por la información, por el trabajo y por la educación. A todos ellos un saludo, a los de la sierra madre del sur, a los de las montañas del sureste mexicano, a Don Durito de la Lacandona, al calcetín, a la chaparrita, a Ana, a don Peter, a los chamacos de Ayotzi, a los del Mexe, a toda la FECSM, a los Cerezo, a los de Atenco, a la banda del Poli y la UAM que nos han echado la mano.

A toda la gente que ha participado en la brigada multidisciplinaria por contribuir con ese pequeño granito, no de arena sino de maíz, esperando que encuentre tierra fértil y germine en cabezas y corazones. A la gente de la sierra de Hidalgo, a los indígenas ñha-ñhu por habernos abiertos sus puertas y sus corazones.

A Pedro Zamudio, por que siempre ha demostrado ser el ejemplo de que el amor y los sueños son lo más importante que existe. No sabría como describirlo, porque las palabras no expresan bien los pensamientos, pero esto es bueno y me parece justo que el límite entre la genialidad y la demencia solo algunos la puedan entender.

Al Doctor Fernando García Tamayo y a Lupita Reyes, por aguantarme durante tanto tiempo, por tenerme paciencia, pero sobre todo por entender las muchas y disparatadas situaciones en las generalmente me encuentro metida, por todo lo que me han enseñado y que he aprendido, por su bondad y sencillez.

A los maestros que me enseñaron que lo verdaderamente importante no se aprende dentro de un salón de clases, a quienes me enseñaron con el ejemplo, a la Maestra Juanita, a la maestra de Literatura y el maestro de Ética de la preparatoria, al Doctor Rosales, al Dr. Baeza, y a todos los que no me han calificado pero que de algún modo han sido mis maestros.

A mis grandes amigos: al "pajita" Barrientos, por aquel viaje astral bajo las estrellas de invierno en compañía de los chaminés, que a pesar de que lo haya encogido la lluvia, pronto terminarán las aguas (por culpa de la lluvia quedó medio gacho el prólogo); a mi querido "Chabelito" Cruz Sánchez por que siempre ha sabido ser leña y compartir siempre una buena opinión acerca de un buen libro, también por la infinidad de chelas que hemos compartido con el famoso trío "casta de malditos"; al gran amor de mi vida: el "Chiflín" García, por aguantarme durante tantos años, por debrayar y compartir conmigo todas mis locuras, y tantas y tantas aventuras; a los "chilucas" (Elisa y Marco) por pachecos y por esos buenos pulques; a Ale y Beto por compartir la suite 5 con nosotros durante 9 meses; a Marianita y Lalo por su nuevo crío; a Ethel por esos grandes apretujones; al "champi" por romperme la chirimoya (aunque de por sí ya tenía sumida la mollera); a mi cuñadito Julio por revolucionario y revoltoso; a mi cuñada Félix por su gran entereza como mujer; al "morro" por ser mi compadre y yo madrina de su

chamaco; a Dios (el de Ciencias) por un mal café que ya se va compensando; al Chino y toda la banda del escuadrón de la muerte por todos los inolvidables días en la Vecindad "Mel Rose" Perrera; a los papás y hermanos de Chabelo por aguantarnos casi todos los fines de semana; a la primera banda del Cine Libre; a Sergio Muñiz y toda la antigua banda de la Nauyaca; a la banda y fans de nuestro programa de radio "De sueños y otros males"; al ya extinto colectivo "la carabina de Ambrosio"; a la banda Punk del chopo por feos; al "pelonchis" y al "ciro" por hacer tan buen ruido, al "piojo" [†], a Gonzo[†] y a mi clon Ricky[†] (que en paz descansen); a Sergio "werver" por que siempre nos aventamos unas buenas pláticas; a los mostros oscuros; el papi, la mami y el tlacuache (aunque no sea guampiro) por aquellos buenos aquelarres; al camaronchi por pervertido; al "calzorro" Odilón por estar siempre al pendiente de las injusticias de su colonia; al "temerario" Alejandro Marín por que es tan buena onda; a las Begoñas de España; a Donaji, al Dr. David Díaz y toda la banda que me ayudó mucho cuando estaba guardada.

A todas las chavas y no tan chavas que conocí cuando estuve en el RENO (o mejor dicho, retiro espiritual), por que conocí de cerca las muchas injusticias que suceden cuando tus hijos tienen hambre, a Cecilia mi vieja compañera de celda, porque la lucha no tiene fronteras. A los que iban a echarnos porras, a los que nos iban a cantar una rola, a los que nos llevaban un taco, a los que solo nos daban un abrazo, a los que compartieron nuestra gloria.

A mi México, lindo y querido:

¡Me-xihc-co. Me-xihc-co. Me-xihc-co.!, porque simboliza la dualidad existente en todo lo creado – manifestado por la presencia en el cielo del sol y la luna – y por otro lado, simboliza el ideal de alcanzar la unidad y la superación de la humanidad mediante la integración de una sola y armónica sociedad, en la cual quedan superados las contradicciones que separan los diferentes grupos humanos. La sabiduría y los anhelos de varios milenios, sintetizados en una sola palabra:

Me-xihc-co - Lugar en donde se unen el sol y la luna.

INDICE

| | |
|--|----------|
| I. INTRODUCCION | 2 |
| II. ANTECEDENTES | |
| 2.1. El veneno y las abejas | 5 |
| 2.1.1. Los venenos en general | 5 |
| 2.1.2. El veneno de las abejas | 9 |
| 2.1.3. Propiedades fisicoquímicas del veneno de abejas | 12 |
| 2.1.4. Composición química del veneno de abejas | 13 |
| 2.1.5. Usos clínicos del veneno de abejas | 15 |
| 2.2. El sistema inmune | 20 |
| 2.2.1. Generalidades | 20 |
| 2.2.2. Los linfocitos T | 23 |
| 2.2.3. Citocinas | 25 |
| 2.2.4. Las subpoblaciones T_H1/T_H2 | 29 |
| 2.2.5. Desequilibrio del sistema T_H1/T_H2 | 32 |
| 2.3. Citocinas inflamatorias | 36 |
| 2.3.1. Interleucina-1 (IL-1 β) | 36 |
| 2.3.2. Interleucina-6 (IL-6) | 43 |
| 2.3.3. El efecto del veneno de abejas sobre la inmunidad | 47 |
| 2.4. Las sales de tetrazolio y el MTT | 49 |
| III. OBJETIVO E HIPOTESIS | |
| 3.1. Objetivo | 56 |
| 3.2. Hipótesis | 56 |
| IV. DISEÑO EXPERIMENTAL | |
| 4.1. Estandarización de la técnica del MTT | 58 |
| 4.2. Medición de la proliferación linfocitaria | 59 |
| 4.3. Determinación de IL-1 e IL-6 | 61 |
| V. MATERIAL Y MÉTODOS | |
| 5.1. Animales | 63 |
| 5.2. Tratamiento | 64 |
| 5.3. Veneno de abejas | 65 |

| | |
|---|-----|
| 5.4. Linfoproliferación | 66 |
| 5.4.1. Sacrificio de los animales y obtención de muestras | 66 |
| 5.4.2. Extracción de los linfocitos | 67 |
| 5.4.3. Cuenta y ajuste celular | 68 |
| 5.4.4. Cultivo de las células y estimulación de la proliferación utilizando el mitógeno Concanavalina A | 70 |
| 5.4.5. Método de la reducción del MTT | 71 |
| 5.5. Cuantificación de citocinas | 72 |
| 5.6. Estandarización de la técnica del MTT | 75 |
| VI. RESULTADOS | |
| 6.1. Resultados de la estandarización. | 77 |
| 6.2. Evaluación clínica de los animales | 82 |
| 6.3. Variación de los pesos de los ratones | 83 |
| 6.4. Linfoproliferación (<i>in vitro</i>) utilizando la técnica del MTT | 85 |
| 6.4.1. Proliferación de los linfocitos en estado basal | 85 |
| 6.4.2. Proliferación de los linfocitos estimulados con Con-A | 87 |
| 6.4.3. Valores delta (Δ) | 89 |
| 6.5. Producción de citocinas | 91 |
| 6.5.1. Evaluación de la producción de IL-1 β en suero de ratones tratados con veneno de abejas. | 91 |
| 6.5.2. Evaluación de producción de IL-6 en suero de ratones tratados con veneno de abejas. | 95 |
| VII. DISCUSION | 100 |
| VIII. CONCLUSIONES | 111 |
| IX. BIBLIOGRAFIA | 113 |
| X. SOLUCIONES Y REACTIVOS | 125 |

Capítulo I

Introducción

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

*Ika tlen ni yakzi
Amitla ni tenyo tilliuh
Tlaciutlapan tlallipan
Keh ni kichiua noyolohzin
Azem motopalli tualla
Nemilliz in kueponiz tlallipan
Ti nezkayoto tiuh xochimeh
Ti nezkayoto tiuh kuikameh...
Netzahualcoyotl
Ze illnamikiz nin ezkayo
(Náhuatl)*

*¿Con quién he de irme?
¿Nada dejare en pos de mí sobre la tierra?
¿Cómo ha de actuar mi corazón?
¿Acaso en vano venimos a vivir, a brotar sobre la tierra?
Dejemos al menos flores
Dejemos al menos cantos...
Netzahualcoyotl
Un recuerdo que dejo
(Español)*

I. INTRODUCCIÓN

Las relaciones del ser humano con las abejas datan desde hace muchos siglos. En el área del Mediterráneo existen pruebas de recolección de miel en las pinturas rupestres de arte levantino, de la época paleolítica, encontradas en la península Ibérica como es el caso de las que se conservan en la Cueva de la Araña en Bicorp (Valencia) y en la Cueva de la Vieja de Alpera (Albacete) que algunos autores datan en unos 10.000 años. Más recientemente, en las tumbas del antiguo Egipto, China y Persia se han encontrado datos sobre la práctica de la apicultura y figuras sugestivas de que los productos de las abejas se utilizaban para el tratamiento de algunas enfermedades.

Al igual que otros productos de las abejas (miel, polen, propóleo, jalea real, cera) el veneno ha sido utilizado empíricamente en la medicina tradicional de Europa, Asia y África desde épocas remotas. Algunas citas, difíciles de confirmar, afirman que Hipócrates ya trataba su reumatismo con veneno de abeja y que Carlomagno utilizaba sus propiedades terapéuticas para aliviar sus dolores causados por la gota. Sin embargo no es sino hasta fines del siglo XIX y principios del XX cuando se difunden más ampliamente los resultados clínicos favorables obtenidos en pacientes artríticos tratados con veneno de abejas.

Este tipo de tratamiento, conocido como apiterapia, tuvo resultados favorables cuando se aplicó a los pacientes con artritis, según reportes clínicos de aquella época. En vista de esos buenos resultados, el uso del veneno se extendió al tratamiento de otras enfermedades caracterizadas por reacciones inflamatorias en diversos tejidos. En todos estos casos, su aplicación siguió siendo empírica, ya que no se conocían sus mecanismos de acción y su administración variaba desde la aplicación tópica hasta la inyección intradérmica con jeringas o directamente utilizando el aguijón de las abejas. No se puede negar que algunos de sus resultados fueron favorables, pero su uso como panacea le ganó la desconfianza de los médicos ortodoxos.

Hoy en día, en la literatura acumulada en revistas internacionales existe una gran cantidad de trabajos publicados sobre los efectos favorables del veneno de abeja administrado como tratamiento. Sin embargo, todavía la mayor parte de estos trabajos refieren observaciones clínicas que no tienen los controles adecuados y no ofrecen ninguna información sobre los mecanismos biológicos por los cuales el veneno puede ser efectivo como un producto anti-inflamatorio. Se puede decir que la finalidad de una buena parte de esos trabajos consiste en promover la venta de productos comerciales que contienen el veneno. En la actualidad el veneno de abejas ya se puede encontrar como un componente de numerosos productos farmacéuticos, cuya venta está permitida por las autoridades de salud en Europa y Estados Unidos. No obstante, su aplicación, dosificación e indicaciones continúan siendo totalmente empíricas.

Por todas las razones anteriores no debe extrañar que, más recientemente, algunos grupos de investigación hayan iniciado estudios sobre la composición química del veneno, su toxicidad y la naturaleza de sus mecanismos de acción, particularmente sus actividades biológicas sobre los sistemas inmune y neuroendocrino. Estas primeras investigaciones básicas ^(29, 30, 31, 32) han proporcionado resultados que confirman la utilidad del veneno, administrado por diferentes vías, para desensibilizar personas alérgicas, para bloquear la transmisión de los estímulos dolorosos o para reducir la intensidad de las respuestas inflamatorias. Esta información puede ser de utilidad a la industria farmacéutica que actualmente está interesada en la búsqueda de nuevos analgésicos y anti-inflamatorios con una toxicidad menor que los existentes.

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto del veneno de abeja sobre la respuesta del sistema inmune de ratones, particularmente sobre la proliferación *in vitro* de los linfocitos y la concentración en el suero de las interleucinas IL-1 e IL-6, que tienen una actividad biológica conocida sobre las reacciones inflamatorias.

Capítulo III

Antecedentes

TEJIS CON
FALLA DE ORIGEN

"Sólo con una ardiente paciencia conquistaremos la espléndida ciudad que dará luz, justicia y dignidad a todos los hombres. Así la poesía no habrá cantado en vano"

Pablo Neruda

"Quien tiene un por qué para vivir, encontrará casi siempre el cómo"
Friederich Nietzsche

II. ANTECEDENTES

2.1. El veneno y las abejas

2.1.1. Los venenos en general

Una gran diversidad de organismos terrestres y marinos producen venenos o toxinas de características fascinantes como mecanismos de defensa. Al mismo tiempo, muchos de estos venenos contienen potentes alérgenos que son capaces de producir severas reacciones clínicas en sus víctimas. Es necesario distinguir los efectos desfavorables de una respuesta alérgica y los efectos tóxicos del veneno.

A través del tiempo estos venenos se han utilizado en ceremonias religiosas o en la medicina tradicional, sin embargo en los últimos años se ha desarrollado investigación con venenos animales permitiendo avances espectaculares, especialmente gracias a los venenos de los moluscos gasterópodos del género (*Conus*) y de distintos tipos de arañas. Además son de interés otras toxinas descubiertas en serpientes como en *Dendraspis sp* y *Atractaspis sp*, lagartos como *Heloderma*, tunicados, dinoflagelados, ranas, avispa, abejas, hormigas y escorpiones como *Bathus sp* o *Androconus sp*.⁽⁶⁴⁾

El veneno de las ranas arborícolas venenosas era utilizado por los grupos étnicos sudamericanos para envenenar sus flechas. Por ejemplo, la rana Kokoi de Colombia segrega el veneno más potente que se conoce entre las diferentes especies de ranas, denominada batracotoxina el cual a su vez es más potente que la tetradoxina, veneno del pez globo de Japón, ya que con sólo 250µg de batracotoxina es suficiente para matar a un hombre. Una rana Kokoi mide 2.5cm y puede proporcionar veneno suficiente para envenenar 50 flechas. Sin embargo al igual que el curare, este veneno de las ranas se ha convertido en una droga medicinal tradicional a causa de sus propiedades relajantes de los músculos. Algunos laboratorios han utilizado este veneno para hacer estudios en el sistema

nervioso central, se ha descubierto que actúa del mismo modo que las hormonas segregadas por la glándula suprarrenal, bloqueando la transmisión de impulsos entre los nervios y los músculos. Grandes cantidades causan inmediatamente la muerte, pero a muy pequeñas dosis puede tener un valor terapéutico. ⁽⁶⁵⁾

Por otro lado, aunque existen alrededor de 650 especies de escorpiones distribuidas en todas las regiones del mundo, sólo algunas pueden resultar mortales para el hombre, como es el caso del *Scorpio viatoris* de África, el *Bathus occinatus* de España y México. Los venenos de escorpiones que contienen una gran variedad de toxinas actúan a nivel de los canales iónicos de Na⁺, K⁺, Ca²⁺ y Cl⁻. ^(64, 67)

Entre las 3,000 diferentes especies de serpientes que se conocen, apenas la sexta parte son verdaderamente venenosas. Algunas de estas serpientes venenosas son terrestres y otras son acuáticas, y aunque según los registros de la OMS se producen en el mundo 40,000 muertes anuales por mordedura de ellas, la mitad de estas ocurren en la India. En México según el IMSS el número de personas mordidas por año es de alrededor de 500 a 700, pero la mortalidad es baja porque no todas las serpientes son venenosas. Algunas especies de serpientes poseen venenos muy potentes y causan diferentes desordenes metabólicos, alterando las actividades celulares y enzimáticas en animales, como los neurotóxicos que se encuentran en el veneno de las serpientes pertenecientes a la familia *Elapidae*. Los venenos de serpientes han mostrado que poseen un amplio espectro de actividades biológicas que aun están en experimentación, tales como las propiedades antibacterianas y antineoplásicas (*principalmente* de la especie *Bothrops jararaca*); así como un incremento en la actividad funcional de macrófagos. Hay algunos reportes que muestran incrementos en los niveles de citocinas en el suero de ratones y pacientes que sufrieron mordeduras por las especies *Bothrops asper* y *Bothrops jararaca* y en sueros de ratones inyectados con el veneno de *Bothrops atrox*. Petricevich y colaboradores ⁽⁴²⁾ reportaron un incremento en los niveles de citocinas y producción de óxido nítrico en el suero de

ratones inyectados con el veneno de *B. Asper* y *B. jararaca*. Ambos venenos inducen elevaciones prominentes del factor de necrosis tumoral (TNF) e IL-1, IL-6, IL-10 en el suero de los ratones inyectados. Todas estas citocinas son inflamatorias, es decir que bien sea como facilitadoras o bien como inhibidoras de las reacciones inflamatorias, todas ellas participan activamente en la modulación de la inflamación. Por eso en el sitio de la mordedura se produce el edema y demás signos de la inflamación. Además, las estrechas relaciones funcionales y estructurales existentes entre estas toxinas venenosas (como las de los gasterópodos del género *Conus* y las de las serpientes del género *Naja*) o entre estas toxinas y moléculas endógenas (como las sarafotoxinas de serpiente y las endotelinas o toxinas de escorpiones y las defensas de los artrópodos) sugieren la existencia de relaciones filogenéticas de gran interés. ^(64 65 80, 82)

La picadura de diversos insectos, tales como las abejas, las hormigas de fuego, las avispas, entre otros causan alergias. Estos insectos tienen en común el que sus piquetes introducen al cuerpo cantidades variables de alérgenos, como la hialuronidasa y la fosfolipasa, sin embargo, con los piquetes también penetran al cuerpo sustancias venenosas. Se ha reportado que el envenenamiento por el veneno de abejas disminuye los niveles de algunas sustancias endógenas como adenosin deaminasa (ADA), colágeno, histamina, IgE, mioglobina y el factor de crecimiento en ciertos órganos de ratones. ⁽⁸²⁾

Las reacciones anafilácticas causadas por diversos piquetes de himenóptera – predominantemente abejas, avispas – son un problema médico común y producen aproximadamente 40 muertes por año en los Estados Unidos. Actualmente muchos de estos venenos se están estudiando en diversos laboratorios de algunos países, con la finalidad de purificar sus componentes alergizantes y utilizarlos para desensibilizar a los alérgicos y aplicar estos tratamientos como medidas profilácticas en el personal que trabaja en los apiarios o en otras personas ocupacionalmente expuestas a las abejas y/o avispas. Muchos investigadores han mostrado interés en estudiar varios venenos naturales

para ser utilizados en el tratamiento de varias enfermedades, un buen ejemplo de esto es el veneno de abejas. Sin embargo, se puede decir que aunque falta aún mucha investigación al respecto, se ha encontrado que tiene varias propiedades terapéuticas que pueden ser de gran utilidad para combatir varias enfermedades como más adelante se menciona.

Existe una amplia variedad de toxinas naturales que por sus propiedades pueden ser útiles para el estudio de muchos otros procesos biológicos. Aunque este tipo de investigación está dando sus primeros pasos ya se están utilizando toxinas naturales para el estudio de ciertos aspectos del comportamiento animal, de la coagulación, el cáncer y procesos metastásicos, la respuesta inflamatoria, el alcoholismo o la hipertensión arterial, lista que sin duda ira incrementando en los últimos años. ⁽⁶⁴⁾

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

2.1.2. El veneno de las abejas

Cualquiera de las especies de abejas sociales que pertenecen al género *Apis* merece el nombre de abeja *mellifera*, pero el adjetivo común suele asociarse con la abeja doméstica europea, *Apis mellifera*. Estos insectos forman colonias que sobreviven tras el invierno, merced a las reservas de alimento que han almacenado, de manera que un refugio determinado puede ser ocupado por tiempo indefinido. (4)

La colonia está constituida por una sola reina (hembra sexualmente madura), 50,000 a 60,000 obreras (hembras inmaduras sexualmente) y algunos centenares de machos o zánganos.

Las abejas melíferas son insectos que pertenecen:

- Reino *Animal*
- Subreino *Metazoarios*
- División *Artiozoarios*
- Rama *Artrópodos*
- Clase *Insectos*
- Orden *Himenopteros*
- Suborden *Aculados*
- Familia *Apidos*
- Género *Apis*
- Especie *Mellifera*

Incluyen 9 diferentes variedades entre las que se encuentran la *Apis dorsala* o abeja africana y la *Apis mellifera* o abeja europea. Esta última posee varias subespecies, entre las que se incluyen a la *Apis mellifera scutellata* o abeja africanizada, la *Apis cerana*, o a la *Apis florea* (la más pequeña de todas) entre

otras. ⁽¹⁾ La abeja doméstica (*Apis mellifera*), se caracteriza por presentar el cuerpo segmentado en 3 partes (cabeza, tórax y abdomen), con dos pares de alas y tres de patas. (Figura 1) Durante su desarrollo pasan por cuatro estadios: huevo, larva, pupa y adulto. ⁽²⁾

Anatomía de una Abeja

(*Apis mellifera*)

1. Ojos compuestos
2. Ojos simples
3. Antenas
4. Tórax
5. Abdomen
6. Alas membranosas
7. Tibia
8. Peine
9. Cesto y pinza
10. Cepillo
11. Aguijón
12. Corazón con ostiolo
13. Músculos cardíacos
14. Buche
15. Tubo digestivo
16. Ciegos gástricos
17. Sacos aéreos
18. Ganglios nerviosos
19. Glándula venenosa

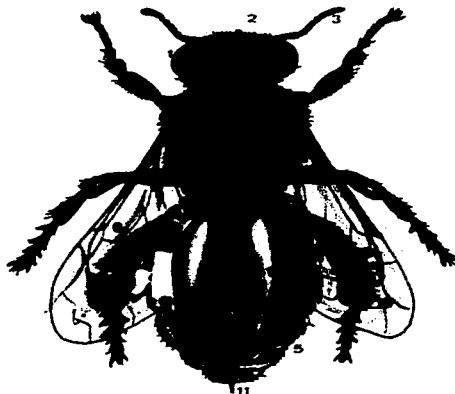


Figura 1. Anatomía de una abeja

Todas las abejas hembras (obreras), excepto las especies sin aguijón, tienen una modificación en el aparato ovopositor, el cual cumple con la función defensiva, también la abeja reina posee un aguijón pero solo lo utiliza al luchar con otra reina nacida en la colmena, que compete con ella. El aguijón propiamente dicho consiste en realidad en tres piezas unidas, dos de las cuales son similares a un anzuelo o arpon alargado y poseen entre 7 a 9 dientes. La tercera pieza es una especie de vaina que guarda en su interior más de la tercera parte de las dos

piezas que constituyen el aguijón. El conjunto se mantiene unido por un sistema de lengüetas y ranuras y permiten que las dos piezas laterales dentadas se deslicen hacia fuera para cumplir su función. Estas tres partes están dispuestas de manera que dejan un espacio libre entre ellas, en forma de canal, por donde fluye el veneno. Este sistema está unido a dos glándulas, una que secreta un conjunto de sustancias de tipo ácido y una glándula que segrega sustancias alcalinas; la mezcla de sustancias de ambas glándulas constituye el veneno de la abeja. Todo el conjunto, piezas del aguijón y las dos glándulas, está recubierto parcialmente por tejido muscular. ⁽⁸³⁾

Las abejas obreras son las principales productoras de veneno. Cada saco reservorio de las abejas obreras contiene en promedio de 0.15 a 0.30 mg de veneno, y al picar a un mamífero su aguijón queda atrapado dentro de la piel, junto con el saco del veneno, músculos y centro nervioso. Al retirarse la abeja, pierde esas partes de su cuerpo y muere dentro de las siguientes 24 horas.

En un estudio con diferentes especies de abejas, se demostró que las cantidades de veneno en el saco reservorio varía según la especie. ⁽⁸³⁾ Las abejas africanizadas¹ presentan pequeñas cantidades (0.117 ± 0.015 mg de veneno, una vez que éste ha sido liofilizado) en comparación con los híbridos *Carniolan*² (0.147 ± 0.024 mg) e *italiano*³ (0.139 ± 0.020 mg). Estos resultados van de acuerdo con Schumacher y colaboradores, quienes encontraron mayores cantidades de veneno en los sacos reservorios de las abejas Europeas (134.1 ± 53.5 µg) en comparación con las abejas Africanizadas (98.2 ± 35.9 µg). También la cantidad de veneno liberado varía según con la especie. Las abejas Africanizadas liberan mayores cantidades (0.0732 ± 0.012 mg) que los híbridos *Carniolan* (0.059 ± 0.013 mg) e *italiano* (0.057 ± 0.011 mg). Un mayor porcentaje del volumen de veneno en el saco reservorio fue liberado por las abejas Africanizadas que por los híbridos. ^(83, 84)

¹ *Apis mellifera*

² *Apis mellifera carnica*

³ *Apis mellifera linguistica*

2.1.3. Propiedades fisicoquímicas del veneno de abejas

El veneno de abejas o apitoxina es un líquido incoloro, de sabor amargo agudo, con olor característico. Es ligeramente ácido (pH 5.0 a 5.5). Cuando se encuentra seco es de color amarillo-café debido a la oxidación de algunas de sus proteínas y tiene un peso específico de 1.313 g/cm³. El veneno de abejas está compuesto tanto de sustancias hidrofílicas, como de sustancias hidrofóbicas, por lo que resulta una compleja mezcla de enzimas y proteínas que se pueden extraer de acuerdo a su solubilidad, la fracción soluble en agua, la fracción soluble en etilacetato y la fracción soluble en hexano. ⁽⁶⁹⁾

Por otro lado De Lima y colaboradores ⁽⁷⁰⁾ demostraron que el veneno de abejas tiene actividad proteolítica que puede participar en los procesos de maduración y activación de los componentes del veneno, teniendo como mecanismo principal una serina-proteasa.

2.1.4. Composición química del veneno de abejas

Se han utilizado modernos procedimientos analíticos como filtración en gel, intercambio iónico y cromatografía de fase reversa, entre otros métodos para separar e identificar los diferentes componentes.⁽⁶⁸⁾ La mayoría de los componentes del veneno de abeja se incluyen en la siguiente tabla: ^(70, 72, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78)

| | | PESO MOLECULAR (KDA) | PESO SECO (%) |
|---------------------------|--|-------------------------|------------------|
| PÉPTIDOS | Melitina ⁽⁷⁰⁾ | 2.84 | 40-50 |
| | apamina ⁽⁷⁵⁾ | 2.03 | 2-3 |
| | péptido desgranulador de mastocitos (MCDP) ⁽⁷⁰⁾ | 2.58 | 2-3 |
| | secarpina ⁽⁷²⁾ | - | 0.5 |
| | tertiapina ⁽⁷²⁾ | - | 0.1 |
| | adolapina ⁽⁷²⁾ | 11.50 | 1.0 |
| | inhibidor de proteasa ⁽⁷¹⁾ | 9.00 | <0.8 |
| | procamina u. ^{(1) 11} | - | 1-4 |
| | minimina ⁽⁷⁴⁾ | 6.00 | 2.3 |
| | cardiopep ⁽⁴³⁾ | - | <0.7 |
| ENZIMAS | Fosfolipasa A ₂ ⁽⁷⁸⁾ | 19.00 | 10-12 |
| | hialuronidasa ⁽⁷⁸⁾ | 38.00 | 1.5-2.0 |
| | fosfomonoesterasa ácida ⁽⁷⁸⁾ | 55.00 | 1.0 |
| | glucosidasa ⁽⁷⁸⁾ | 170.00 | 0.6 |
| | lisofosfolipasa | 22.00 | 1.0 |
| | | | |
| AMINAS ACTIVAS | histamina | - | - |
| | dopamina ⁽⁷⁷⁾ | - | 0.13-1.0 |
| | norepinefrina ⁽⁷⁷⁾ | - | 0.1-0.7 |
| | leucotrienos | - | - |
| COMPONENTES NO-PEPTIDICOS | carbohidratos como: Glucosa Fructosa ⁽⁷³⁾ | - - - | <2.0 |
| | | | |
| LIPIDOS | 6 Fosfolípidos ⁽⁷³⁾ | - | 4.5 |
| | | | |
| AMINOACIDOS | ácido r-aminobutírico ⁽⁷³⁾ | - | <0.5 |
| | ácido B-aminoisobutírico ⁽⁷³⁾ | - | <0.01 |

El análisis químico muestra que, además de mucha agua (88 % del peso), el veneno contiene diversas sustancias: ácido fórmico, clorhídrico y ortofosfórico,

colina, triptófano, los microelementos hierro, yodo, potasio, azufre, cloro, calcio, magnesio, manganeso, cobre y zinc, y otros compuestos.

El veneno de las abejas también es muy rico en sustancias nitrogenadas, en ácidos volátiles que desaparecen en el proceso de su desecación y contiene muchas diastasas además de la fosfolipasa A2 y la hialuronidasa, ya señaladas.

2.1.5. Usos clínicos del veneno de abeja

Actualmente se han reportado una gran cantidad de trabajos clínicos utilizando el **veneno de abeja completo**, sobre todo en problemas de reumatismo, con experimentos de laboratorio los cuales validan en buena medida su uso. Sin embargo actualmente sigue siendo utilizado de manera empírica como tratamiento alternativo. El gran auge que ha tenido este tipo de sustancias dentro de la medicina tradicional ha implicado que se le atribuyan una serie de propiedades curativas que no tienen ningún fundamento científico. No obstante, la evidencia científica demuestra que el veneno completo y sus componentes aislados tienen efectos terapéuticos beneficiosos en algunos padecimientos tanto en humanos como en animales.

Desde una perspectiva clínica, las formas alternativas de estimulación con agujas (acupuntura, incluyendo la electroacupuntura), han reportado que la inyección de veneno de abejas produce una estimulación nociceptiva persistente y causa activación neuronal en el cordón espinal. ⁽³⁴⁾ Se ha visto, que el veneno de abejas suprime la inflamación causada por la artritis inducida por la inyección de adyuvantes en ratas. Este efecto sobre las inflamaciones articulares de las ratas ha servido para que el veneno de las abejas sea propuesto como una alternativa para el tratamiento de la artritis en humanos. ⁽³³⁾

Por otro lado, en la *Universidad de Thessaloniki en Grecia* se encontró que el veneno de abejas puede tener una actividad antioxidante, ya que inhibe la peroxidación lipídica no-enzimática. También posee una considerable actividad de limpieza de radicales hidroxilo (OH^{\cdot}). ⁽³⁵⁾ Más recientemente, se ha demostrado que el veneno de abeja inhibe la captación de un cotransportador de glucosa/ Na^+ conocido como α -metil-d-glucosipiranosido (α -MG), en un cultivo primario de células del túbulo proximal renal en conejos. ⁽⁵¹⁾ El veneno de abejas completo también tiene un efecto hemolítico sobre eritrocitos, aunque este mismo fenómeno sucede con una mezcla de melitina y fosfolipasa A2 purificadas. ⁽⁵⁰⁾

Además de las aplicaciones clínicas, el veneno de abejas también puede tener aplicaciones en otras áreas, por ejemplo en la agricultura como insecticida biológico. La *Diatraea saccharalis* es un insecto que causa daños directos e indirectos en las plantas de la caña de azúcar, la larva de este insecto escarba en la caña causando pérdidas en el peso de la planta, fallas en la germinación y da origen a la penetración de el hongo *Colletotichum falcatum* el cual causa que la raíz se ponga roja. Este hongo es el responsable de la inversión de la sucrosa, incrementa las impurezas en el jugo reduciendo el azúcar y el alcohol. Se ha demostrado que las larvas y los huevos de este insecto son susceptibles al veneno de abejas no liofilizado, por lo que el veneno de abejas es un modelo interesante para desarrollar insecticidas con las mismas características biológicas de otros pesticidas utilizados en la actualidad. ⁽⁶¹⁾

La mayor parte de los estudios mencionados se han realizado utilizando el veneno completo, pero también existe una gran cantidad de estudios clínicos con componentes aislados del veneno de abeja, aunque desde el punto de vista inmunológico la investigación aún es escasa:

La **melitina** es el principal componente básico e hidrofóbico del veneno de abejas (50-70%) y por lo mismo ha sido el más estudiado. La melitina es un polipéptido de 26 aminoácidos, que ha sido reportado como un regulador de la actividad de la fosfolipasa A2 y la fosfolipasa D. ⁽⁶²⁾ Se ha demostrado que la melitina tiene efectos hemolíticos, a través de la formación de agujeros en las membranas. ⁽⁶⁴⁾ Por otro lado la melitina es un péptido anfipático con actividad antimicrobiana, que puede ser prometedor para la terapia de enfermedades infecciosas, por ejemplo contra *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma hominis*, ambas responsables de infecciones urogenitales. ⁽⁶⁵⁾ En algunos estudios realizados *in vitro*, se ha encontrado que la melitina es capaz de inhibir los efectos de la enfermedad de Lyme, causada por una espiroqueta (*Borrelia burgdorferi*) ⁽⁶⁶⁾

Extensos trabajos con melitina han mostrado, que el veneno de abejas tiene múltiples efectos, probablemente como resultado de su interacción con cambios

FALTA LAS PAGINAS

17

A

18

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

músculo de mamíferos. Ovcharov y colaboradores examinaron el efecto de la apamina en ratas, conejos y cobayos con inflamación experimental. La apamina también inhibe la serotonina y el edema en las garras de ratas, por lo que su producción puede ser considerada como un reacción de defensa contra la inflamación, cuando ésta es inducida por la inyección de aceite de algodón. También inhibe el incremento de haptoglobulina y mucoproteína en el suero de animales con inflamación experimental. ^(43, 47, 48, 85)

La **Hialuronidasa** del veneno de abejas, comparte el 30% de su secuencia con las hialuronidasas humanas. Esta enzima es un polipéptido de 349 aminoácidos que contiene cuatro cisteínas y tres sitios potenciales para la N-glicosilación. ⁽⁴⁴⁾ Induce la sobre-regulación de la activación de basófilos en individuos sensibilizados, sin embargo hay pocos estudios de la actividad clínica de la hialuronidasa del veneno de abejas. ⁽⁴⁵⁾

El **cardiopep** según Brooks y colaboradores, es un componente del veneno de abejas que tiene efectos beta adrenérgicos y anti-arritmicos. ⁽⁴³⁾

La **adolapina**, es un polipéptido básico, que muestra propiedades anti-inflamatorias, analgésicas y antipiréticas, también se ha demostrado que inhibe la ciclooxigenasa. Se ha encontrado que la adolapina inhibe la actividad de la fosfolipasa A2 del veneno de abejas e inhibe la lipoxigenasa de las plaquetas humanas. La adolapina causa una elevación de los niveles de GMPc en bazo y cerebro de ratas, así como también disminuye el AMPc en bazo de ratas. ^(31, 41,32)

Se puede observar que, paradójicamente, el veneno de abejas contiene tanto sustancias pro-inflamatorias como agentes anti-inflamatorios, probablemente éstos últimos son los responsables de los efectos clínicos favorables cuando empíricamente, el veneno de abejas ha sido utilizado para controlar las respuestas inflamatorias de diferente etiología.

2.2. El sistema inmune

2.2.1. Generalidades

La inmunología es una disciplina científica, relativamente joven, que durante muchos años estuvo incluida dentro de la microbiología. La palabra **inmunidad**, que deriva del latín *immunis* (exento de "cargos"), fue inventada por los griegos del siglo de oro para hacer referencia a la protección que las personas convalecientes adquirirían después de haber sobrevivido a las enfermedades contagiosas. Nosotros sabemos hoy en día que esas enfermedades están causadas por microorganismos, pero en la antigüedad se creía que eran castigos de los dioses y la capacidad para defenderse de las infecciones fue considerada un regalo de los mismos dioses.

Existen diversos mecanismos por medio de los cuáles los seres vivos obtienen protección contra las infecciones, los mecanismos defensivos más conocidos son las barreras físicas, entre las que se encuentran la piel, las secreciones de las mucosas, el pH ácido de algunas mucosas como la del estómago, los cilios de las células, etc. Todos estos mecanismos de defensa son naturales e inespecíficos y proporcionan una **inmunidad natural o innata**, la cual representa la primera línea defensiva contra los microorganismos. Estos mecanismos se encuentran presentes desde el momento de nacer y generalmente se activan de manera inespecífica, cuando los seres vivos entran en contacto con cualquier microorganismo o sustancia tóxica del medio ambiente. Los mecanismos que proporcionan la inmunidad innata no tienen memoria, es decir, la respuesta siempre es de la misma intensidad.

Sin embargo, existen otros mecanismos de defensa mucho más evolucionados y específicos, que proporcionan una **inmunidad adquirida o adaptativa**. Dichos mecanismos dependen de la respuesta del sistema inmune y se caracterizan por tener una especificidad exquisita contra las moléculas que estimulan los linfocitos del sistema inmune. El sistema inmune tiene una

capacidad extraordinaria para reconocer cualquier molécula extraña que logra vencer las barreras naturales o innatas de protección y penetra al interior del cuerpo. Las moléculas que son reconocidas por el sistema inmune han sido denominadas antígenos.

La respuesta inmune adquirida siempre es específica y con memoria, de tal forma que el sistema puede responder de manera diferente a distintos microorganismos, según éstos posean antígenos que el sistema inmune reconoce por primera vez o antígenos que el sistema ya ha reconocido anteriormente y para los cuales conserva una memoria. Gracias a esta capacidad de "recordar" cuando el sistema inmune queda expuesto a un antígeno extraño, mejora su capacidad para responder de nuevo frente a ese antígeno. ^(14, 16, 17, 19, 24)

El sistema inmune es una compleja red de células y órganos que trabajan juntos para darle protección al organismo contra cualquier sustancia o partícula extraña que se introduzca en el cuerpo. En esta definición se agrupan todos los microorganismos, tales como bacterias, virus, hongos, parásitos, entre otros. El corazón del sistema inmune es su habilidad por distinguir entre lo propio y lo extraño. ^(18, 24)

Las células más importantes del sistema inmune son los linfocitos, que tienen receptores para reconocer y responder específicamente contra los antígenos extraños. Sin embargo, en la respuesta del sistema inmune también participan otras células conocidas como células accesorias, que no son específicas para los diferentes antígenos, pero que al interactuar con los linfocitos inducen y amplifican las respuestas inmunitarias. Las células accesorias más importantes son los macrófagos, las células dendríticas, los monocitos, las células cebadas y los eosinófilos.

Los linfocitos, así como todas las demás células sanguíneas provienen de la multiplicación y diferenciación las células madre pluripotenciales, que se encuentran en la médula ósea. Brevemente, estas células madre se diferencian a

las dos líneas celulares: mieloides y linfoides, de las cuales derivan todas las células del tejido sanguíneo. De la línea mieloide derivan todas las células accesorias o células presentadoras de antígenos, y de la línea linfoide derivan los diferentes tipos de linfocitos. Los linfocitos se clasifican en T y B, debido a que su desarrollo tiene lugar en el timo (*Thymus gland*) y en la médula ósea (*Bone marrow*) respectivamente. Cada una de estas subpoblaciones de linfocitos (T y B), responde de manera diferente, dando lugar a las **respuestas celular y humoral**.

(14, 16, 17, 19, 24)

2.2.2. Los Linfocitos T

Los linfocitos T se dividen en linfocitos T citotóxicas (T_C) y linfocitos T colaboradores (T_H). Ellos son los encargados de iniciar las respuestas inmunitarias específicas de tipo celular, mientras que los linfocitos B inician las de tipo humoral y su respuesta conduce a la formación de anticuerpos. Pero, para poder iniciar esas respuestas las dos poblaciones de linfocitos deben primero reconocer un antígeno con sus respectivos receptores de membrana, conocidos como receptores de las células T (TCR) y receptores de las células B (BCR).

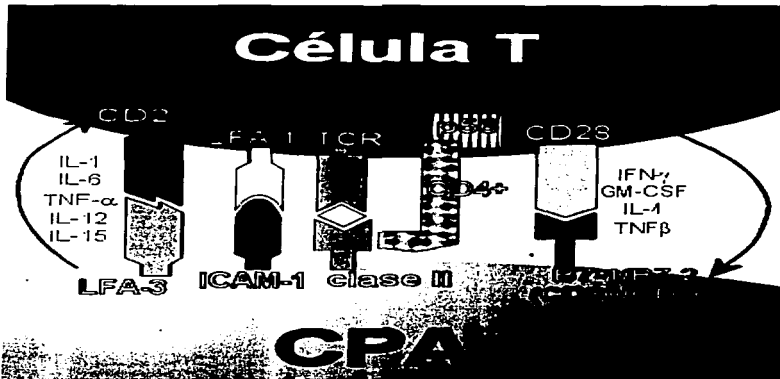


Figura 2. Principales moléculas que intervienen en la presentación de Antígeno por una célula CPA y en el reconocimiento de sus epítopes por el receptor (TCR) del linfocito T.

Para que los linfocitos T inicien su respuesta es necesario que primero reconozcan los epítopes de un antígeno que es presentado por una célula presentadora o CPA. Las interacciones entre las células que presentan antígenos y los linfocitos que las reconocen implican un intercambio masivo de información. La interacción principal (figura 2), altamente específica, es la que se produce entre el

complejo principal de histocompatibilidad MHC II-antígeno y el TCR; esta interacción se ve potenciada por las interacciones entre LFA-3 y CD2 e ICAM-1 y LFA-1, entre otras. ^(14, 16, 24)

Las células T reconocen a los antígenos unidos a las células que se encuentran asociados con moléculas MHC de clase I o II y expuestos en las superficies celulares. Las moléculas MHC de clase I y II presentan péptidos procedentes de antígenos endógenos y exógenos, respectivamente.

Los linfocitos T citolíticos (T_c , $CD8^+$) reconocen a los antígenos asociados a moléculas MHC de clase I y producen sustancias que son capaces de lisar células que presentan antígenos extraños, así como las células infectadas por virus y otros microorganismos intracelulares. Los linfocitos T colaboradores (T_H , $CD4^+$) reconocen a los antígenos asociados con moléculas MHC de clase II en células presentadoras de antígeno como células dendríticas interdigitantes (CDI), macrófagos y células B.

Los linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ secretan moléculas mensajeras llamadas **citocinas**, cuya función es promover la proliferación y diferenciación de otros linfocitos y células accesorias. ^(14, 17, 19)

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

2.2.3. Citocinas

Las citocinas son un conjunto de pequeñas proteínas solubles, de bajo peso molecular (generalmente de 8-25 kDa), que son secretadas por diferentes células, fundamentalmente del sistema inmune, como respuesta a una estimulación antigénica. ^(13 24)

Las citocinas, actúan en coordinación con otras señales procedentes del contacto directo entre las células, dando lugar a una red de comunicaciones que interviene en todas las actividades del sistema inmunitario, presentan una gran variedad de funciones, pero se pueden clasificar en unas cuantas categorías:

- Mediadores de la respuesta inmune innata (inflamación, quimiotaxis, activación de macrófagos, células NK) y adquirida (humoral y celular)
- Reguladores de la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos
- Estimuladoras del crecimiento de los precursores hematopoyéticos

Aunque las citocinas son un grupo de proteínas heterogéneas, comparten una serie de propiedades. Por ejemplo; son sintetizadas en las células que reciben un estímulo específico, es decir, no se encuentran pre-formadas y requieren de una señal para su posterior transducción al núcleo celular e iniciar la transcripción de su gen específico. Además, diferentes citocinas pueden ser liberadas por el mismo tipo de célula, ejercen múltiples efectos aún en la misma célula que pueden ser inmediatos o tardíos, inducen la síntesis de otras citocinas dando lugar a un fenómeno de cascada, y también pueden inhibir la producción de otras citocinas proporcionando un mecanismo regulatorio de control positivo o negativo para modular la respuesta inmune. ⁽¹⁵⁾

En muchas ocasiones las citocinas actúan en la regulación de la división celular, o también se comportan como factores que estimulan el crecimiento de células epiteliales, mesenquimatosas, y son claves en el proceso de reparación celular.

TESIS CON
PALMA DE ORIGEN

En general las citocinas pueden actuar en forma **autocrina**, estimulando a la misma célula que las produce, o **paracrina**, con acción sobre otras células vecinas, o por mecanismo **endocrino**, ejerciendo su acción a distancia.

Después que son sintetizadas, principalmente en los linfocitos y en los macrófagos, las citocinas se liberan al exterior y se unen a receptores específicos de la membrana de otras células que generalmente son vecinas a la célula que las produjo. (figura 3) La afinidad de cada receptor hacia su citocina correspondiente suele ser bastante alta, del orden de lo femtomolar (10^{-15} M) a lo picomolar (10^{-12} M), en donde van a ejercer su función, convirtiendo una señal extracelular, en una señal intracelular, con la activación de una enzima o de un factor de transcripción, iniciando una cascada de transducción intracelular de señal que altera el patrón de expresión génica, de modo que esas células diana producen una determinada respuesta celular específica. ^(15,16)

En la actualidad, las citocinas se clasifican en varias familias de acuerdo a sus funciones: linfocinas (algunas de las cuales se denominan interleucinas), las quimiocinas, los interferones (IFN), los factores estimulantes de colonias (CSF), los factores de necrosis tumoral (TNF) y los factores transformadores de crecimiento (TGF).

Las **interleucinas** son citocinas producidas por ciertas poblaciones de leucocitos sanguíneos para comunicarse con otros leucocitos. Al menos esta fue la definición inicial. Actualmente se conocen que no solo los leucocitos sino también otras células diferentes también las producen.

Una parte importante de las citocinas producidas por los linfocitos actúan principalmente activando y regulando las células que participan en las reacciones inflamatorias (macrófagos, neutrófilos y eosinófilos, por ejemplo). Pero algunas de estas citocinas también son responsables de la comunicación entre las células de los sistemas inmunitario y neuroendocrino. Por ejemplo, las interleucinas IL-1 e

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IL-6 pueden estimular el eje hipotalámico adrenal y aumentar la producción de algunas hormonas, mediando así las respuestas inflamatorias.

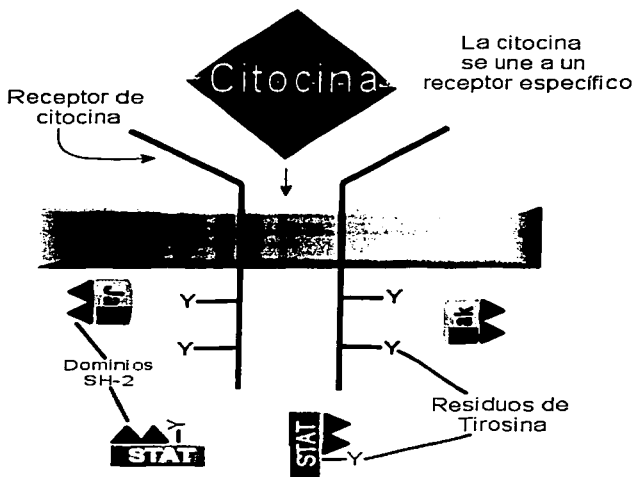


Figura 3. Unión de la citocina al receptor

Todos los receptores de citocinas conocidos son proteínas transmembrana de 2 o 3 cadenas de polipéptidos y sus dominios extracelulares se unen a la citocina, produciendo un fenómeno de agrupación de receptores específicos, lo cual proporciona el medio para la detección de la señal extracelular, de tal forma que se genera la activación del receptor en las regiones citoplasmáticas.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

La agrupación de los receptores proporciona una señal que activa a las cinasas de la familia Janus (Jak) asociadas a la fracción plasmática del receptor, induciendo la función autocatalítica de residuos de tirosina. Las Jak activadas catalizan posteriormente la fosforilación de los residuos de tirosina en las regiones intracelulares del receptor de las citocinas.

2.2.4. Las subpoblaciones T_H1/T_H2

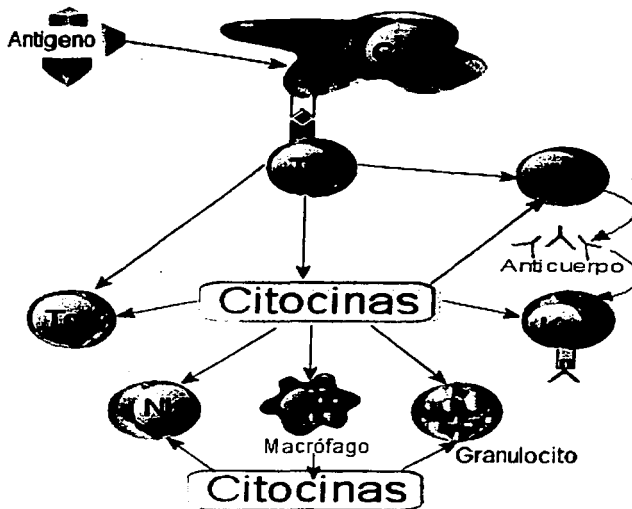


Figura 4. El papel central de las células T_H en la inmunidad mediada por células.

La diferenciación de los linfocitos T en distintas subpoblaciones de células T_H es un paso importante en la selección de los mecanismos efectores, es decir, cuando el sistema inmunitario se enfrenta a un organismo invasor debe seleccionar los mecanismos efectores más adecuados para combatir esa infección concreta, donde no todos los mecanismos efectores se activan en la misma medida. (24)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En 1986, Mosmann y colaboradores inician un concepto revolucionario en inmunología al dividir las células T colaboradoras (T_H) en dos subpoblaciones según los perfiles de citocinas implicadas, **los linfocitos T_H1 y T_H2** , cada una de estas subpoblaciones secreta un patrón característico de citocinas. De una manera general, las citocinas que liberan los linfocitos T_H1 tienden a activar macrófagos en los procesos de eliminación de antígenos intracelulares, como son virus y algunos tipos de bacterias y protozoarios mediante la activación de la fagocitosis, o en los procesos de activación de las células NK, y estimulan la producción de anticuerpos opsonizantes que fijan el complemento, para inducir la citotoxicidad de las células infectadas.

En cambio, las citocinas producidas por los linfocitos T_H2 por lo general aumentan cuando la estimulación antigénica se prolonga o cuando el estímulo antigénico inicial es de naturaleza soluble y no implica una infección intracelular, como por ejemplo helmintos, dichas citocinas están ligadas a la activación y diferenciación de las células B y estimulan la producción de anticuerpos que no fijan el complemento, especialmente la IgE, incrementan la producción de mastocitos y eosinófilos, también suprimen las respuestas de los macrófagos. ^(14, 17, 19, 20, 23)

Los linfocitos T_H1 , como respuesta a una estimulación antigénica producen citocinas pro-inflamatorias. Las principales citocinas efectoras de las células T_H1 son: la IL-2, $TNF\beta$ e $IFN\gamma$ y median respuestas de hipersensibilidad retardada. En cambio las células T_H2 producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 e inducen en las células B la liberación de anticuerpos.

Se ha demostrado que existe una relación cruzada entre las subpoblaciones T_H . Así por ejemplo, el $IFN\gamma$ y la IL-12 son las principales citocinas que promueven la diferenciación hacia T_H1 , el $IFN\gamma$ sin embargo controla el crecimiento de las células T_H2 , más que promover directamente la

diferenciación hacia T_H1 . Así mismo la presencia de IL-12, aumenta directamente la diferenciación hacia T_H1 .

Por otro lado la IL-4 es esencial para la diferenciación hacia T_H2 , aunque se reportado que la IL-10 promueve el desarrollo de T_H2 , su principal efecto es suprimir las células T_H1 al reducir la expresión de IL-12 por parte de las células presentadoras de antígeno. (23, 24)

2.2.5. Desequilibrio del sistema T_H1/T_H2

Normalmente existe un balance entre las respuestas de tipo T_H1 y tipo T_H2 . El balance T_H1/T_H2 es crítico para mantener la homeostasis inmune. Sin embargo, en algunas situaciones se impone el predominio prolongado de un tipo de respuesta y esto implica ciertos riesgos o se traduce en la aparición de ciertos síntomas.

En las fases iniciales de una infección es posible encontrar una mezcla de células T_H1 y células T_H2 : pero el equilibrio entre ambas se puede modificar según el tiempo o la edad, y suele inclinarse hacia una de ellas cuando la enfermedad persiste durante un período prolongado de tiempo. Las citocinas de las células T_H1 y T_H2 son mutuamente antagonistas, por lo que la evolución de la enfermedad dependerá de la subpoblación de células T que predomine finalmente (esto depende en gran medida del tipo de patógeno implicado, y en ocasiones puede ser impredecible).⁽²⁴⁾

Algunos microorganismos pueden utilizar sus propiedades adyuvantes para dirigir la respuesta inmunitaria en una dirección equivocada, induciendo la activación de una subpoblación inadecuada de células T_H . La existencia de este fenómeno se ha demostrado en un modelo de infección de ratones con *Leishmania major*. En este modelo, la activación de células T_H2 conduce a la muerte del animal sensible, puesto que la IL-4 producida por estas células inhibe la producción de IFN γ , mientras que la activación de las células T_H1 confiere protección total en animales resistentes, ya que la producción de IFN γ por parte de T_H1 activa a los macrófagos, que a su vez junto con las células B producen IL-12, y promueve el crecimiento de las células T_H1 activadas y de las células NK, así como la síntesis de una serie de citocinas anti-*Leishmania*, lo que lleva a la destrucción del parásito y evita el desarrollo de lesiones cutáneas.⁽²⁴⁾

Cuando se administran anticuerpos anti-IL-4 se obtiene un efecto curativo, ya que reduce la actividad de T_H2 con la consiguiente expansión de la

subpoblación T_H1 . Sin embargo, la administración de $IFN\gamma$ recombinante a los ratones susceptibles no es suficiente para curarlos, lo que indica que su susceptibilidad es debida a un exceso de actividad de T_H2 , y no a un defecto de actividad de T_H1 .⁽²⁴⁾

Es posible que la polarización en la producción de citocinas hacia un patrón T_H2 sea el fenómeno subyacente en algunos efectos inmunosupresores de estrés, esta posibilidad es apoyada por experimentos que muestran que el estrés hemorrágico reduce los niveles de $IFN\gamma$ y TNF producido por las células T_H1 . Una polarización de este tipo puede tener una gran importancia porque, teóricamente disminuye las defensas citolíticas y la fagocitosis frente a infecciones, pudiendo tener también implicaciones en el desarrollo de cáncer y enfermedades autoinmunes.⁽¹³⁾

Durante la vida fetal existe una notable polarización T_H2 , con una elevada expresión de citocinas anti- T_H1 ($IL-4$, $IL-10$, PGE_2 , etc.), cuya finalidad es taponar las respuestas T_H1 , que son tóxicas para la placenta. Tras el nacimiento, y durante un período variable y en gran medida como consecuencia del estímulo microbiano ambiental (patógeno o saprofito), se produce un cambio de las respuestas T_H2 hacia respuestas T_H1 frente a alérgenos ingeridos en alimentos e inhalados. La liberación de citocinas T_H1 protegerá entonces al organismo frente a la reactividad T_H2 potencialmente patógena, y sucesivas exposiciones al alérgeno consolidarían la memoria protectora T_H1 .

De hecho se ha comprobado que pacientes con esclerosis múltiple (una enfermedad mediada por T_H1) tienen menos prevalencia de asma y alergia. Así pues, los paciente atópicos tendrían una deficiente respuesta T_H1 , que sería incapaz de frenar y revertir las respuestas T_H2 , tal como sucede durante el período fetal/neonatal.⁽²⁵⁾

Por otro lado, en investigaciones recientes se ha demostrado que se puede redireccionar el tipo de respuesta T_H1/T_H2 utilizando vectores de ADN. Gizi Wildbawn y colaboradores, demostraron en modelos experimentales con artritis reumatoide y encefalomiелitis autoinmune inducidas (esta ultima sirve como modelo para la enfermedad de esclerosis múltiple en humanos), que se puede cambiar la polarización de T_H1 a T_H2 . Explorando el papel de la quimiocina IFN γ , que tiene un papel pro inflamatorio porque estimula las células T activadas hacia un tipo de respuesta T_H1 , se encontró que el IFN γ es inducido por la proteína 10 (IP-10). (21, 22)

La administración de un plásmido de ADN que codifica para la proteína 10 (IP-10), es capaz de romper la tolerancia inmunológica a IP-10, generándose una inmunidad específica contra el producto del gen vacunado, es decir contra la misma IP-10, neutralizando así la actividad de IP-10 *in vivo*, esto altera la polarización de las células T antígeno-específicas hacia T_H2 , dando lugar a una protección inmunológica contra ambas enfermedades: artritis reumatoide y encefalomiелitis autoinmune.

Aunque todavía no esta muy claro cual sea el mecanismo exacto de porque se genera protección contra dichas enfermedades, cuando es alterado el balance T_H1/T_H2 , hay varias teorías que aún se están estudiando y queda claro que esto tiene implicaciones muy importantes en la terapia génica con plásmidos de ADN, en la lucha por curar enfermedades degenerativas inflamatorias y/o autoinmunes (21, 22)

Existe una gran cantidad de evidencia de que el balance entre ambos tipos de respuestas T_H1/T_H2 es de vital importancia para mantener la homeostasis del organismo. Sin embargo, hay muchos factores que influyen o que pueden afectar el balance de las repuestas T_H1/T_H2 , entre los que se encuentran la cantidad o tipo de infecciones, el uso indiscriminado de antibióticos y la repetida exposición a alergenos. Es un hecho de que la respuesta inmune es regulada por el balance

entre las citocinas T_H1 y T_H2 . Ambos tipos de respuesta a menudo se excluyen mutuamente. En algunos casos, el predominio de una resulta en protección, mientras que el exceso en la producción del otro tipo de citocinas puede facilitar la progresión de la enfermedad, lo que evidencia que las citocinas tienen importantes funciones durante el desarrollo y como un mecanismo defensivo, pero también su actividad es parte muy importante en la patogenia de diversas enfermedades.

2.3. Citocinas inflamatorias

Muy brevemente, en este capítulo se van a describir algunas de las características y actividades biológicas más importantes de las interleucinas 1 y 6 (IL-1 e IL-6), ya que estas dos citocinas van a ser estudiadas en el presente trabajo. Los dos forman parte de la familia de las citocinas inflamatorias. La primera tiene una actividad pro-inflamatoria, mientras que la segunda actúa predominantemente como anti-inflamatoria. Aunque existen otras citocinas pro-inflamatorias (TNF α e INF γ) y anti-inflamatorias (IL-10 y TGF β) que no fueron estudiadas en el presente trabajo, son mencionadas por su importancia dentro de las respuestas inflamatorias.

2.3.1. Interleucina-1 (IL-1 β)

Inicialmente la Interleucina-1 (IL-1) se definió como un pirógeno endógeno, polipéptido estimulador de la maduración y la activación de las células T. Actualmente se sabe que la principal función de la IL-1 es como mediadora de las reacciones inflamatorias y ser potente estimulador de la respuesta inmune. Es sintetizada por diversos tipos de células tales como: macrófagos, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, linfocitos T y B, células dendríticas, neutrófilos, células del músculo liso, algunas células del sistema neuroendócrino y, en general, casi todas las células nucleadas de los organismos vertebrados. La producción de IL-1 por los fagocitos mononucleares puede desencadenarse por productos bacterianos como el LPS (lipopolisacáridos), por citocinas derivadas de macrófagos como el TNF α , factores estimulantes de colonias, el INF γ (que liberan las células T_{H1}) o la misma IL-1 y por el contacto con las células CD4⁺.^(14 17 24)

Su actividad más importante es la estimulación de la activación de los linfocitos T. La IL-1 promueve la generación de nuevos linfocitos T colaboradores (T_{H1}) los cuales liberan IL-2 e IFN γ , que a su vez estimulan la respuesta de los fagocitos y de los linfocitos T citotóxicos. Pero la IL-1 también es activa como estimulante de los linfocitos T_{H2} y además resulta un cofactor para estimular la

proliferación y diferenciación de los linfocitos pre-B, de los cuales depende la producción de anticuerpos e incrementa la citotoxicidad de los linfocitos NK. ^(17, 24)

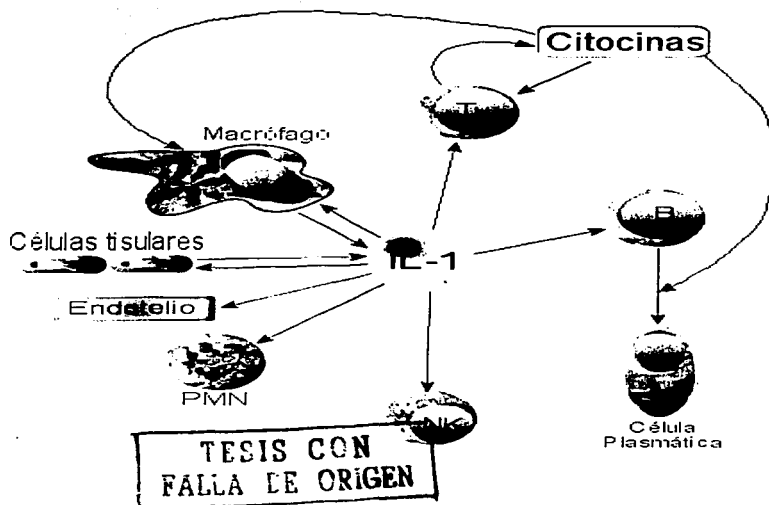


Figura 5. Acciones de IL-1 sobre las células del sistema inmune

La IL-1 es la primera de una larga serie de moléculas que forman la familia de las interleucinas. Actualmente se conocen 28 interleucinas diferentes. Algunas de ellas comparten actividades biológicas, mientras otras resultan antagónicas. Los efectos biológicos de la IL-1, de forma similar que los de TNF, dependen de las cantidades de citocina liberada. Aunque la IL-1 es activa a concentraciones muy bajas ($1 \times 10^{-15} \text{M}$), su producción no es continua y solo se lleva a cabo bajo la estimulación de los factores que ya han sido mencionados. A concentraciones

bajas, la principal función de la IL-1 es ser mediador de la inflamación local. Por ejemplo, la IL-1 actúa sobre las células endoteliales favoreciendo la coagulación y aumentando la expresión de moléculas de superficie que median la adhesión leucocitaria. La IL-1 no activa directamente a los leucocitos inflamatorios, como los neutrófilos, estimula a los fagocitos mononucleares y a las células endoteliales a producir quimiocinas que activan a los leucocitos, es decir, promueve de manera indirecta la quimiotaxis y la degranulación de neutrófilos y macrófagos. ^(14 17)

Cuando se secreta en cantidades mayores, debido a alguna infección, la IL-1 entra en la circulación y es capaz por sí misma de activar al eje hipotalámico-hipofisiario-adrenal, esta citocina es considerada como el más probable estimulador endocrino de origen inmune. Estimula a las células T y B e induce respuestas inflamatorias, como la producción de prostaglandinas y enzimas catabólicas como colagenasa. Junto con la IL-6, el TNF α , la IL-8 y las prostaglandinas, la IL-1 es uno de los principales mediadores de las reacciones inflamatorias contra infecciones, traumatismos, tumores, entre otros. Sin embargo, todas estas citocinas aunque son agentes inflamatorios se caracterizan porque al mismo tiempo inducen la síntesis de **glucocorticoides** anti-inflamatorios, a través de la estimulación del hipotálamo y la hipófisis y el aumento en la liberación de la hormona adreno-corticotrópica (ACTH), actuando como mediador endógeno de la fiebre y la anorexia, e incrementa la liberación de corticosteroides de los hepatocitos. En el hígado induce la producción de proteínas plasmáticas de fase aguda (como el amiloide sérico A) que son liberadas como respuesta a las lesiones, e induce el desgaste metabólico (caquexia). ^(13 17 24)

Los glucocorticoides se producen en la corteza de las glándulas suprarrenales. En los humanos, el cortisol (hidrocortisona), la corticosterona y la cortisona son glucocorticoides, de los cuales el más abundante es la hidrocortisona (95%). Entre los glucocorticoides sintéticos, la dexametasona resulta 20-30 veces más potente que el cortisol. La activación hipofisiaria-adrenal en respuesta a la IL-1 es mediada por la secreción del factor liberador de la

hormona adrenocorticotrópica (CFR) en el hipotálamo. La IL-1 también estimula la síntesis de varias sustancias inflamatorias que derivan del ácido araquidónico. Las prostaglandinas participan, lo mismo que los glucocorticoides, en un mecanismo de retroalimentación negativa que inhibe la síntesis de la IL-1. ^(13, 14, 17)

La importancia biológica de este circuito de regulación endocrina hace necesario considerar a la acción del sistema nervioso dentro de los mecanismos de regulación de la respuesta inmune.

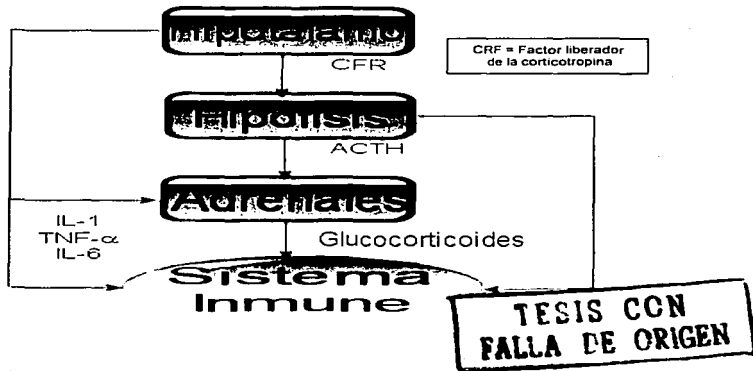


Figura 6. Circuito de regulación endocrina

De este modo, a través de la estimulación del eje hipotalámico – hipofisiario – adrenal (figura 6), la IL-1 asegura una modulación de sus principales actividades biológicas de naturaleza inflamatoria. Así por ejemplo los glucocorticoides inhiben la proliferación de los linfocitos T probablemente porque disminuyen la síntesis de IL-2, también estimulan la apoptosis de los timocitos más inmaduros en el timo, por lo que disminuye la producción de células y, además, inhiben la síntesis de los

productos derivados del ácido araquidónico. Esta última actividad inhibidora bloquea la síntesis de tres potentes agentes inflamatorios como los leucotrienos (vía lipooxigenasa), las prostaglandinas (vía ciclooxigenasa) y el factor activador de plaquetas o PAF.

Se han caracterizado dos clases de IL-1 que han sido denominadas α y β . Ambas son sintetizadas como un polipéptido precursor de 33 kDa que permanecen intracelularmente. Dichos precursores al ser hidrolizados por enzimas proteolíticas de la familia de las caspasas (enzima convertidora de IL-1 o ECI) derivan las formas biológicamente activas con un PM de 17kDa y muestran menos de un 30% de homología estructural entre ellas. Sin embargo, ambas se unen a los mismos receptores de superficie y sus actividades biológicas son esencialmente idénticas. Las formas de 17 kDa se pliegan en una estructura de forma de barril rica en bandas de hojas β plegadas. Ninguna de las secuencias de aminoácidos de ambas especies de IL-1 presenta señal hidrófoba que dirija el polipéptido recién sintetizado hacia el retículo endoplásmico, por lo que parece que ambas proteínas se sintetizan como proteínas citoplasmáticas y son llevadas al exterior de las células por transporte activo. Un tercer miembro de la familia de la IL-1, es un inhibidor natural de la IL-1, llamado antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra), es producido por los fagocitos mononucleares, es estructuralmente homólogo a la IL-1 y se secreta a través de vesículas formadas en el aparato de Golgi.^(5 14 17)

Como se mencionó anteriormente las dos IL-1 conocidas tienen el mismo peso molecular y actividades biológicas, pero son diferentes antigénicamente y tienen diferentes puntos isoeléctricos. Las dos IL-1 son codificadas por genes diferentes, aunque están localizados en segmentos cercanos al gen de la $\beta 2$ -microglobulina, en el cromosoma 2. Pero la síntesis de una u otra forma de IL-1 puede variar según el tejido y la especie. Así por ejemplo, al IL-1 β es la forma que se produce predominantemente en los monocitos y en las células del cerebro

humano. En cambio, en los macrófagos de ratón predomina la síntesis de IL-1 α , que generalmente se encuentra asociada a la membrana de las células.

Se han descrito dos clases diferentes de receptores para IL-1, los cuales han sido denominados IL-1R I y IL-1R II, ambos de la superfamilia de las Ig. El primero, de mayor peso molecular, predomina en los linfocitos T, en las células endoteliales, hepatocitos, queratinocitos, los fibroblastos y en general en casi todos los tipos celulares, mientras el segundo se encuentra en los linfocitos B y otras células como los monocitos y los neutrófilos. Tanto la IL-1 α , como la IL-1 β y los antagonistas del receptor de IL-1 (IL-1Ra) compiten por ambas clases de receptor. Sin embargo, la IL-1 α se une principalmente al receptor tipo I y es el receptor principal de las respuestas mediadas por IL-1, mientras que los receptores de clase II parecen tener mayor afinidad por la IL-1 β que por la IL-1 α .

La porción intracelular del receptor para IL-1 (IL-1R I) está asociada a varias enzimas cinasas (IRAK), que se autofosforilan y forman complejos de enzimas que activan los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, cuando se une con su correspondiente ligando. El NF- κ B se une al ADN y activa la transcripción de genes que codifican para la síntesis de citocinas pro-inflamatorias.

El IL-1R II (se encuentra en forma soluble o anclada en la membrana de las células) puede actuar como un señuelo que modula la actividad de la IL-1. Ya que no transmite ninguna señal biológica después de haberse unido a la IL-1, es decir es un inhibidor por competencia de la IL-1, por lo cual es una molécula con actividad anti-inflamatoria. La presencia del receptor II o la sobreexpresión del mismo (inducida por IL-4), modula la actividad de la interleucina -1 porque contribuye a reducir sus actividades biológicas.

Algo parecido ha sido propuesto para explicar la presencia del IL-1Ra, ya que la unión de esta molécula a cualquiera de los receptores no se traduce en

ninguna señal para la célula, es decir, es biológicamente inactivo y sin embargo, implica el bloqueo del receptor impidiendo que la IL-1 α se una a este. El IL-1R II y el IL-1Ra tienen estructuras tridimensionales similares. (5, 14, 17, 24)

También es posible utilizar inhibidores de la IL-1 como modificadores de la respuesta biológica en enfermedades causadas por producción excesiva o no regulada de citocinas como la artritis reumatoide. La inhibición de la acción de la IL-1 por IL-1Ra o los receptores solubles no ha demostrado ser beneficiosa en ensayos clínicos en casos de shock séptico, probablemente debido a la redundancia de las acciones de la IL-1 y el TNF. (14)

En el suero de personas que han sido inyectadas con LPS se ha podido demostrar la presencia de sustancias inhibitoras de las actividades biológicas de la IL-1. Una proteína inhibitora, que compite con IL-1 por su unión a su receptor específico, ha sido aislada de la orina de pacientes con leucemia. La administración de anticuerpos anti-IL-1R o la solubilización del IL-1R tienen efectos similares a la administración de IL-1Ra, es decir reducen la gravedad de las reacciones inflamatorias en varias enfermedades y, además, disminuyen las tasas de mortalidad elevadas que son características de ellas. (17)

2.3.2. Interleucina-6 (IL-6)

La interleucina-6 fue conocida inicialmente como factor de diferenciación de las células B para que inicien la producción de inmunoglobulinas o factor estimulante de los hepatocitos, sin embargo ahora sabemos que tiene múltiples actividades como citocina inflamatoria. La IL-6 tiene un espectro de actividades biológicas sumamente amplio.

Es una interleucina pleiotrópica porque puede actuar sobre varios tejidos diferentes estimulando distintas actividades biológicas. La IL-6 es una citocina de aproximadamente 26 kDa y su forma funcional es probablemente un homodímero, cada subunidad forma un dominio globular de cuatro hélices α como en las citocinas que se unen a los receptores de tipo I. La IL-6 es sintetizada por diversos tipos de células, entre las que se encuentran: los linfocitos T_H2 y B, los fibroblastos, los monocitos, los macrófagos, los leucocitos polimorfonucleares, los queratinocitos, las células endoteliales, los astrocitos, las células de la hipófisis, las células del estroma de la médula ósea, las células del mesangio, las células cebadas, las células del endometrio, las células del músculo liso y células tumorales (mixoma cardíaco, mieloma, hipernefoma, insulinooma, linfomas, adenocarcinomas, carcinomas).

La síntesis de IL-6 puede desencadenarse por la inducción de lipopolisacáridos (LPS), IL-1, TNF α , foskolina, AMPc e IL-18. Las endotoxinas son buenos inductores de la síntesis de IL-6 y, por ello, se la encuentra elevada en el suero de pacientes con infecciones por bacterias gramnegativas, de enfermos con SIDA o de la infusión de TNF. La concentración de la IL-6 ha sido encontrada aumentada en el suero de pacientes con varios tumores y en las células del estroma del tejido neoplásico. En algunos casos de enfermedades autoinmunitarias, el aumento de la síntesis de IL-6 ha sido relacionado con la producción de autoanticuerpos.

La concentración de IL-6 también se encuentra aumentada en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide y se ha encontrado un incremento en los niveles plasmáticos de esta citocina en animales de laboratorio sometidos a estrés por lo que puede relacionarse con una reactivación de varias enfermedades inflamatorias.¹¹³⁾ La IL-6 actúa como factor de crecimiento de células plasmáticas malignas (plasmocitomas o mielomas) y, de hecho, muchas células de los plasmocitomas secretan IL-6 como factor de crecimiento autocrino.

La IL-6 puede favorecer el crecimiento de células somáticas híbridas producidas por la fusión de células B normales con células de plasmocitoma, es decir "hibridomas" que producen anticuerpos monoclonales. Por esta razón, algunos han propuesto que la administración de anticuerpos monoclonales anti-IL-6 podría ser de utilidad para los pacientes con un mieloma.^{114,17)}

Para que IL-6 estimule la diferenciación de los linfocitos B, se necesita que otras citocinas (como IL-2, IL-4 e IL-5) hayan estimulado previamente su multiplicación. La IL-6 no influye sobre la multiplicación de los linfocitos B. La IL-6 puede ser producida por los linfocitos T_H2 que ya han reconocido un antígeno o que han sido estimulados por mitógenos, siempre y cuando estén en presencia de monócitos o de IL-1. Existen varias otras citocinas que son similares a la IL-6, como por ejemplo la IL-11, el factor inhibidor de leucemias (LIF), la oncostatina M (OSM), la cardiotropina -1 (CT-1) y el factor neurotrófico ciliar (CNTF). Todos ellos componen una familia de proteínas que son inductores de la síntesis de las proteínas de fase aguda. IL-6 es el principal regulador de los genes que codifican para la síntesis de varias proteínas plasmáticas, como el fibrinógeno, que contribuyen a la respuesta de fase aguda. De este modo, la IL-6 participa (lo mismo que IL-1 y el TNF) en la inducción de las reacciones inflamatorias que se necesitan para controlar las infecciones.

Así mismo la IL-6 junto con la IL-11 inducen diversos factores anti-inflamatorios como el IL-1Ra, receptores solubles de TNF, IL-10, inhibidores de

proteasas y proteínas supresoras de la señalización de las citocinas (SOCS), que suprimen la actividad de los macrófagos, los fibroblastos y los astrocitos, así como la producción de IFN γ , TNF α , IL-12, proteasas y moléculas de adhesión tanto *in vivo* como *in vitro*.

El receptor de la IL-6 (IL-6R) consta de dos unidades. La primera es una proteína ligadora de citocinas de 60 kDa y en cuya porción extramembranal contiene un dominio similar a los dominios de las inmunoglobulinas y un motivo de dos cisteínas /WSXWS característico de los receptores de las citocinas tipo I. La porción citoplásmica del IL-6R es relativamente pequeña y no está asociada con la enzima proteína tirosina cinasa (PTK). La segunda unidad del IL-6R es una glucoproteína de 130 kDa denominada subunidad transductora de señales, también contiene un dominio de inmunoglobulina y el motivo de dos cisteínas /WSXWS. La porción citoplásmica sí posee las secuencias de aminoácidos o motivos que se necesitan para interactuar con las enzimas PTK. Se cree que el agrupamiento de la subunidad de 130 kDa inducida por las interacciones con los complejos citocina-proteína ligadora específica dispara la señalización de la vía Jak/STAT.

La IL-6 es uno de los mensajeros que comunican el sistema inmunitario con el sistema neuroendócrino. Estimula directa o indirectamente la hipófisis y provoca un aumento en la producción de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), así mismo al igual que la IL-6, la ACTH puede ser producida tanto por los linfocitos y los macrófagos como por varias clases de células del sistema nervioso y de la hipófisis. La ACTH, a su vez estimula las adrenales y eleva la síntesis de glucocorticoides, que además de modular la respuesta inflamatoria inhiben la expresión de los genes que codifican para la IL-1 e IL-6. Por otro lado la IL-6 estimula la síntesis de los esteroides gonadales progesterona y estradiol.

IL-6 también estimula la expresión de las moléculas HLA de Clase I sobre la membrana de fibroblastos y es un modulador de la proliferación inicial del tejido

hematopoyético de la médula ósea. IL-6 actúa en unión de IL-4 y de varios factores más que son estimulantes de la formación de colonias. Su actividad sobre las células de la médula la complementa posteriormente la IL-3. También se ha informado que IL-6 puede influir sobre la diferenciación de varias células nerviosas y promover la síntesis y la expresión del receptor para IL-2. ⁽¹⁷⁾

2.3.3 El efecto del veneno de abejas sobre la inmunidad

Existen muy pocos estudios acerca de cómo influye el veneno de abejas sobre el sistema inmune. Sin embargo, algunos resultados son una evidencia de que el veneno de abejas tiene ciertos efectos anti-inflamatorios.

Por ejemplo, en un estudio con ratas con artritis reumatoide inducida, se demostró que la fracción soluble en agua del veneno de abejas, tiene un efecto antiartrítico, reduciendo el dolor y la inflamación producida por la artritis reumatoide. Según los autores, esto puede ser una consecuencia de que el veneno de abejas reduce los niveles de IL-6, que se encuentran elevados por la inducción de la artritis reumatoide, en comparación con los niveles observados en animales no artríticos. ⁽²⁶⁾

En otros trabajos se ha encontrado que el veneno de abejas suprime la expresión del gen que induce la α -1-glucoproteína ácida (AGP) en la fase aguda, durante etapas tempranas de la artritis inducida en ratas. La IL-1, IL-6, el TNF, los glucocorticoides y el veneno de abejas juntos son los responsables de la disminución de la expresión del gen AGP, lo que indica que este último juega un papel importante en el desarrollo de la artritis en ratas. ⁽²⁶⁾

El veneno de abejas puede influir sobre el sistema inmune cuando existen respuestas inflamatorias, como por ejemplo la artritis. Los trabajos realizados sobre personas alérgicas al veneno de abejas también muestran que al inyectar veneno de abejas como tratamiento desensibilizante, se pueden cambiar los perfiles de citocinas que están relacionadas con el tipo de respuesta T_H2 hacia un tipo de respuesta T_H1 .

El presente trabajo, además de estudiar el efecto del veneno de abejas sobre la respuesta proliferativa de los linfocitos, también tratará de conocer cuál es el efecto de la administración de pequeñas dosis del veneno de abejas sobre la producción de citocinas pro y anti - inflamatorias. De este modo se trata de

aportar un granito de arena al mejor entendimiento de cual podría ser el papel que juega el veneno de abejas, utilizado como una medicina alternativa, sobre las reacciones inflamatorias y la competencia del sistema inmune.

2.4 Las sales de tetrazolio y el MTT

La utilidad de los ensayos de proliferación celular utilizando el MTT, ha sido bien documentada en la literatura para muchas diferentes aplicaciones. Estas sales fueron preparadas por primera vez en 1894 y se utilizan para la detección de la actividad de la deshidrogenasa y de otros sistemas enzimáticos donde son generados equivalentes redox. Debido a éste hecho son una herramienta muy útil en la investigación académica y clínica, y han sido utilizadas ampliamente para cuantificar la proliferación celular o para evaluar la citotoxicidad, así como para muchas aplicaciones diagnósticas, tales como en investigaciones sobre el SIDA y cáncer, biología molecular y celular, diagnósticos enzimáticos y química clínica, Inmuno-histoquímica, histología y patología. ⁽¹²⁻¹⁶⁾

De las sales de tetrazolio más conocidas, se encuentra el nitroazul de tetrazolio (NBT), cuya reducción ocurre posiblemente por la interacción con la ubiquinona como un aceptor de electrones específico, el clorhidrato de trifeniltetrazolio (TTC) y el clorhidrato de neotetrazolio (NT) donde ambas reducciones se ven estimuladas por el citocromo c. Otra sal de tetrazolio muy conocida es el bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5 difeniltetrazolio (MTT), que se utilizó en el presente trabajo. El MTT es una sal de monotetrazolio, la cual se ha visto que es transformada por el sistema succinato-tetrazolio reductasa, donde el principal sitio de unión en condiciones aeróbicas entre el MTT y la cadena respiratoria involucra al citocromo oxidasa. Sin embargo, como se verá más adelante, la reducción del MTT no es una reacción exclusiva de las mitocondrias. ^(15-16, 50)

El uso del aceptor de hidrogeno bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2, 5 difeniltetrazolio (MTT) en un ensayo colorimétrico fue inicialmente descrito por Mosmann ⁽²⁰⁾ para medir la citotoxicidad y la proliferación celular. Más adelante este ensayo se generalizó y se le comenzó a utilizar en la medición de actividad celular. ⁽⁶⁸⁾

El utilizar una técnica como la reducción de sales de tetrazolio (en este caso MTT) para medir la viabilidad y el crecimiento celular tiene grandes ventajas, además de que es más seguro con respecto a otras técnicas. Por ejemplo, el procedimiento es relativamente simple y el equipo que se utiliza generalmente está disponible en la mayoría de los laboratorios, así mismo la técnica espectrofotométrica puede detectar cambios muy pequeños en el metabolismo celular, siendo más sensible que la prueba de viabilidad con azul tripano que a pesar de ser una forma muy simple de evaluar la integridad de la membrana celular (y así asumir la proliferación o muerte celular), no es un método sensible y por lo tanto no puede ser adaptado para una investigación de mayor capacidad. Por otro lado, aunque la medición de la proliferación celular con sustancias radiactivas ha sido muy aceptada, utilizando generalmente como marcador la timidina tritiada, éste método involucra grandes cantidades de tiempo y un gran riesgo al manejar manualmente sustancias radiactivas que son altamente cancerígenas y mutagénicas.

El uso del MTT depende de algunas variables que conviene tener en cuenta. Por ejemplo, en experimentos previos con líneas de células T citotóxicas, algunos autores ^(9, 10) han demostrado que la sensibilidad del método colorimétrico depende de la línea celular utilizada. Este método colorimétrico es al menos tan sensible como los ensayos con [³H]-timidina, a pesar de que no depende de la medida de la radioactividad y por lo tanto es ideal en investigaciones de gran capacidad donde se manejan un gran número de muestras individuales.^(8,7) Otras ventajas que presenta éste método colorimétrico, es la rapidez de la reacción, además de que es sencillo, económico y reproducible, con un alto grado de sensibilidad al utilizar un lector de ELISA. ^(8, 9, 10)

El "formazán" es el producto del MTT reducido y varía significativamente, entre las distintas líneas celulares, tanto en la cinética de formación como en el grado de saturación. La actividad específica del MTT se ve significativamente influenciada por un número de parámetros y la mayoría de los autores sugiere que

las condiciones de experimentación deben ser pre-establecidas o estandarizadas para minimizar la variabilidad en los resultados.

Las sales de tetrazolio son componentes orgánicos heterocíclicos cuaternarios de amonio solubles en agua, que son convertidos por reducción a formazanos. Los formazanos son insolubles en agua, solubles en solventes orgánicos y no son autooxidables. A causa de estas propiedades, este grupo de compuestos han sido empleados en la medición de agentes reductores y como aceptores de electrones sobre catalizadores enzimáticos. ⁽¹¹⁾

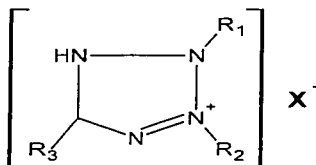


Figura 7. Fórmula general de las sales de tetrazolio.

Las sales de tetrazolio que se utilizan principalmente en la Bioquímica y en Biología Celular, son derivados aromáticos del 1,2,3,4 Tetrazol (sustituidos en posición 2,3 y 5).

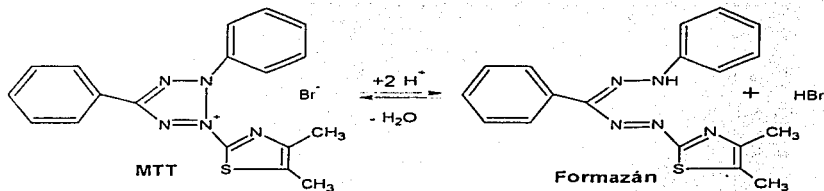


Figura 8. Reducción del MTT a Formazán.

Estas sales son precursores de color amarillento (amarillo-rojizo), que después de la reducción forman compuestos que son fuertemente pigmentados, en el caso del MTT el formazano que se forma es de color morado.

Anteriormente se mencionó que el MTT es reducido por el sistema "succinato-tetrazolio reductasa", el cual pertenece a la cadena respiratoria mitocondrial y es activo solo en células viables, pero la prueba del MTT, no se considera estrictamente un ensayo mitocondrial. A pesar de la plena aceptación de este ensayo, no se sabe exactamente la localización subcelular ni los eventos bioquímicos involucrados en la reducción del MTT. Estudios recientes sugieren que el transporte de electrones en la mitocondria puede jugar un papel menor en la reducción celular del MTT. Dicha reducción celular, se lleva a cabo principalmente en el citoplasma y probablemente involucre cofactores del nucleótido de piridina NADH y NADPH. ^(69, 90)

La participación de las mitocondrias en la reducción del MTT ha sido inferida por varios estudios con inhibidores respiratorios usando succinato como sustrato, pero la contribución de esta actividad sobre la reducción celular del MTT es aún desconocida. En 1963 Slater utilizó inhibidores de la cadena respiratoria para demostrar que la reducción del MTT dependiente de succinato en homogenizados de hígado de rata ocurría en dos sitios de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (coenzima Q y citocromo c). A partir de este hallazgo se ha tomado como evidencia que el MTT es reducido por mitocondrias activas de células viables, pero esto es una prueba insuficiente porque muchas deshidrogenasas no mitocondriales o la flavina oxigenasa pueden reducir el MTT.

(6, 11, 89)

Berridge y colaboradores ⁽⁶⁰⁾, investigaron la localización subcelular de la reducción del MTT utilizando succinato, NADH y NADPH como sustratos, en una línea celular derivada de la médula ósea (32D). A concentraciones óptimas de los sustratos, se observó que hay una mayor reducción del MTT con el NADH que con

el succinato. También se observó que utilizando succinato, la reducción del MTT se lleva a cabo principalmente fuera de la mitocondria que en las fracciones mitocondrial y mitocondrial/lisosomal, lo mismo ocurre cuando se utiliza el NADH y el NADPH, pero en este caso las cantidades de MTT reducido en la fracción mitocondrial es mucho menor en comparación con el succinato. Para caracterizar la reducción del MTT por la fracción mitocondrial, se utilizaron inhibidores de la cadena respiratoria para explorar como está involucrado el transporte de electrones en la reducción del MTT, cuyos resultados sugieren que cuando el succinato es usado como un aceptor de electrones, el 70-80% de la reducción mitocondrial del MTT ocurre subsecuente a la transferencia de electrones del citocromo *c* al citocromo oxidasa. En contraste con el succinato, la reducción mitocondrial del MTT dependiente de NADPH no fue afectado por ninguno de los inhibidores respiratorios probados, y la reducción dependiente de NADH solamente es inhibida por la cloropromazina (40-50%), lo que nos sugiere que la reducción del MTT se lleva a cabo principalmente de manera extramitocondrial e involucra mecanismos dependientes de NADH y NADPH que son insensibles a los inhibidores de la cadena respiratoria. Vistica en 1991, estableció una correlación entre la concentración de la D-glucosa en los medios de cultivo y la reducción del MTT a formazan en diferentes líneas celulares de tumores, y encontró que la concentración de la D-glucosa juega un papel importante en la reducción del MTT, ya que el transporte celular y el metabolismo constante de glucosa son esenciales para una máxima reducción de MTT, es decir entre más extenso sea el metabolismo de la glucosa por parte de las células, mayor será la cantidad de MTT reducido. Así mismo la disminución de la concentración celular de los nucleótidos de piridina NADH y NADPH se acompaña por una disminución concomitante en la producción de formazan. (Riv 1992)

Por otro lado, Nikkhah en 1992 y Shearman en 1995, encontraron que el formazan derivado del MTT era depositado intracelularmente en forma granular alrededor del núcleo y en una incubación prolongada con MTT se formaban cristales de formazan en la superficie de la célula. Más adelante Yuanbin Liu y

colaboradores encontraron que los sustratos relacionados con el NADH (tales como malato, glutamato o piruvato), son igualmente buenos para reducir lo mismo el MTT que el succinato en mitocondrias aisladas de cerebro de rata, pero que, como ya lo han mencionado otros autores, la mitocondria no tiene un papel exclusivo en la reducción del MTT. ^(90, 91, 93)

El MTT no es permeable a las membranas lipídicas, aunque la permeabilidad puede variar según el tipo de célula, lo que sugiere que el MTT es introducido a las células a través de la endocitosis y es reducido por una flavina oxidasa susceptible de N-etilmaleimida (NEM). El formazán se acumula en los compartimentos endosomal/lisosomal para después ser transportado a la superficie celular a través de la exocitosis. Ninguna de estas vesículas tiene que ver con la mitocondria, lo que sugiere que deben tener una importante función fisiológica. La endocitosis y la reducción del MTT aparentemente requieren de ATP y NADH generados a través de la glicólisis, lo cual explica el porque la D-glucosa y los nucleótidos de piridina afectan en la reducción del MTT. ⁽⁹⁰⁾

Aún no está muy claro el sitio y el sistema enzimático involucrado en la reducción del MTT, por lo que no es muy fácil explicar las discrepancias existentes entre la prueba del MTT y otros métodos para medir la proliferación celular y la viabilidad. Sin embargo, actualmente se realizan algunos estudios sobre la inhibición de la reducción celular del MTT con un indicador temprano específico de la enfermedad de *Alzheimer*. Las personas con este desorden tienen acumulaciones intracerebrales de la proteína β -amiloide, la cual actúa como neurotóxico en dicha enfermedad. Estos hallazgos están en estudio y pueden ayudar a clarificar el mecanismo por el cual la proteína β -amiloide inhibe la reducción del MTT y ayudarnos a comprender cuales son los mecanismos específicos involucrados en la reducción del MTT y en la patogenia de la enfermedad. ⁽⁹¹⁾

Capítulo III

Objetivos e hipótesis

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

"Sean capaces siempre de sentir, en lo más hondo, cualquier injusticia realizada contra cualquiera, en cualquier parte del mundo. Esta es la cualidad más linda del revolucionario"
Ernesto "Che" Guevara

"Ser pueblo, hacer pueblo y estar con el pueblo"
Lucio Cabañas

III. OBJETIVO E HIPÓTESIS

3.1. Objetivo

El presente trabajo tiene como objetivo conocer si la administración subcutánea de veneno de abeja en los ratones modifica o no la respuesta proliferativa *in vitro* de los linfocitos esplénicos de éstos animales y, además, la concentración en el suero de las citocinas inflamatorias IL-1 e IL-6.

3.2. Hipótesis

- 1) Al inyectar subcutáneamente diferentes dosis de veneno de abejas en ratones sanos de tres meses de edad, la respuesta proliferativa *in vitro* de los linfocitos del bazo se va a incrementar de una manera proporcional a la cantidad de veneno inyectada.
- 2) Al inyectar subcutáneamente diferentes dosis de veneno de abejas en ratones sanos de tres meses de edad, la concentración de la citocina anti-inflamatoria IL-6 en el suero va a aumentar al mismo tiempo que disminuye la concentración de la citocina pro-inflamatorias IL-1.

Capítulo IV

Diseño Experimental

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

"Nada esta por copiar, todo está por crear"
Gaston Bachelard
La biblia de Changall

*"Impregna mis escritos que el **valor del mundo** reside en nuestra interpretación (que quizás en alguna parte son posibles todavía otras interpretaciones que las meramente humanas); que las interpretaciones tradicionales son apreciaciones perspectivistas, gracias a las cuales podemos mantenernos con vida, es decir con voluntad de poder, de crecimiento del poder; que toda **elevación del hombre** comporta la superación de interpretaciones más limitadas; que todo refuerzo conseguido, toda extensión de poder, abre nuevas perspectivas y significa creer en nuevos horizontes. El mundo que **nos es un poco tolerable** es falso, es decir: no es ningún hecho, sino una invención poética y el redondeo a partir de una pequeña suma de observaciones; está «en flujo», como algo en devenir, como una falsedad siempre perpetuamente removida y que nunca se acerca a la verdad, pues no hay «verdad» alguna."*
Friederich Nietzsche

IV. DISEÑO EXPERIMENTAL

4.1. Estandarización de la técnica del MTT

Para este trabajo se utilizó inicialmente un grupo de ratones CD1 seleccionados al azar para el entrenamiento en el manejo de los animales, así como la inyección subcutánea, procedimientos de anestesia, disección de bazo, separación de las células esplénicas, punción retro-orbital, obtención de las muestras de sangre y separación de suero.

Una vez que este entrenamiento hubo terminado, fue necesario estandarizar la prueba colorimétrica de la reducción del MTT con el objetivo de obtener las mejores condiciones de trabajo, ya que, como se ha mencionado anteriormente, el formazán producido de la reducción del MTT varía de acuerdo al tipo de células utilizadas y a las diferentes variables que puedan afectar los resultados. Para lograr una estandarización satisfactoria, fue necesario modificar las diferentes variables y observar como influían éstas sobre los resultados, de tal manera que las células estimuladas lograsen reducir la máxima cantidad del MTT. Se realizaron cambios experimentales para conocer la cinética de la viabilidad y su probable modificación al añadir la solución con el mitógeno.

La estandarización del cultivo de células del bazo y de las condiciones para estimular la proliferación inespecífica de los linfocitos, se llevó a cabo en condiciones de esterilidad, trabajando en una campana de flujo laminar. La viabilidad del cultivo fue estandarizado de tal modo que se desechaban todas aquellas suspensiones con una viabilidad inferior al 95% al comienzo de los cultivos. La contaminación accidental de las muestras también implicaba la eliminación de ese material.

4.2. Medición de la proliferación linfocitaria

Una vez estandarizada la técnica bajo nuestras condiciones de trabajo, se procedió a seleccionar los animales que serían utilizados con fines experimentales y sus correspondientes controles, de acuerdo al diseño que se esquematiza en la siguiente figura. Brevemente se trabajó con tres grupos de ratones y de cada uno de ellos se obtuvieron muestras de células de bazo y de sangre periférica.

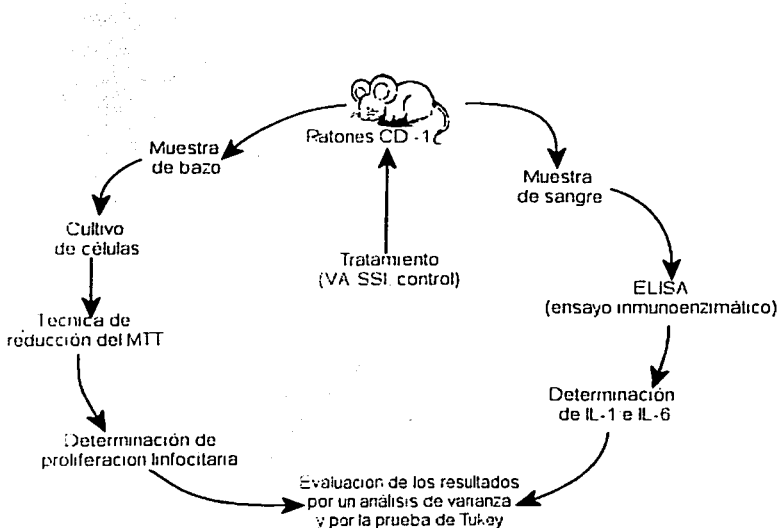


Figura 9. Esquema general del diseño de experimentos.

Se comenzó aplicando tres dosis del veneno de abejas (baja, media y alta) e inyectamos subcutáneamente los tres subgrupos de ratones que corresponden al grupo del veneno de abejas, esto se realizó cada tercer día durante un mes.

Lo mismo hicimos con el grupo que fue tratado con solución salina isotónica. El grupo control no fue tratado. En todos los casos los ratones fueron pesados antes de cada inyección. Los ratones al final del tratamiento con veneno de abejas y solución salina isotónica, así como los que no recibieron tratamiento fueron sacrificados para obtener las células de bazo y cultivarlas en presencia del mitógeno concanavalina (Con-A). La determinación de la respuesta proliferativa fue a través de la técnica del MTT.

4.3. Determinación de IL-1 e IL-6

De la sangre periférica obtenida de los animales, se utilizó el suero para determinar las concentraciones de IL-1 e IL-6 por medio de un ensayo inmunoenzimático (ELISA) utilizando la técnica del "sándwich".

Los resultados obtenidos de todos los experimentos se evaluaron mediante un análisis de varianza y por la prueba de Tukey al realizar las comparaciones inter-grupos, con un nivel de confianza de $p < 0.05$.

Capítulo V

Material y Métodos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

"¿Qué es lo que únicamente puede ser el conocimiento? -Interpretación, no «explicación»"
Friederich Nietzsche

*"¿Por qué será que el Che tiene esta peligrosa costumbre de seguir naciendo?
Cuanto más lo insultan, lo manipulan, lo traicionan, más nace.
El es el más nacedor de todos.*

*¿No será posible porque el Che decía lo que pensaba y hacía lo que decía?
¿No será que por eso sigue siendo tan extraordinario, en un mundo donde las
palabras y los hechos muy rara vez se encuentran, no se saludan, porque no se
reconocen?"*
Eduardo Galeana
El nacedor

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Animales

Se utilizaron ratones CD-1, machos, de 3 meses de edad y con un peso corporal entre 20 y 25g. Los animales fueron obtenidos del Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana, plantel Xochimilco, en donde permanecieron durante todo el tratamiento con veneno de abejas. Posteriormente se trasladaron al Laboratorio 202 de Biología Molecular (Inmunología) del Departamento de Biología en la Facultad de Química (UNAM), donde se llevó a cabo toda la parte experimental.

Mientras estuvieron vivos todos los animales, se mantuvieron en condiciones óptimas tomando en consideración su bienestar y salud, de acuerdo a las normas internacionales que existen para el cuidado y manejo de los animales de laboratorio que son utilizados en la investigación.

Durante el tiempo que los animales estuvieron bajo tratamiento, se observó su comportamiento, así como su aspecto físico, para detectar si el veneno de abejas les causaba algún efecto indeseable. También se registró su peso cada tercer día.

5.2. Tratamiento

Los animales fueron separados en tres grandes grupos de acuerdo al tratamiento recibido durante cuatro semanas. (I) En un primer grupo estaban los animales control que no recibieron tratamiento. (II) En un segundo grupo los ratones que fueron tratados con solución salina isotónica estéril y finalmente, (III) en un tercer grupo los ratones que recibieron el veneno de abejas. Este último grupo se dividió a su vez en tres subgrupos de acuerdo a la concentración de veneno administrado.

III.a. inyectados con 0.5 mg/Kg de veneno de abejas

III.b. inyectados con 1.0 mg/Kg de veneno de abejas

III.c. inyectados con 2.0 mg/Kg de veneno de abejas

Los animales se pesaron cada día que recibían las inyecciones para conocer si el peso corporal presentaba alguna variación durante el tiempo en el que los animales estuvieron bajo tratamiento. Por otro lado, también se observó el comportamiento y los animales que presentaron reducción en el peso o algún signo de enfermedad fueron descartados.

5.3. Veneno de abejas

La solución del veneno de abejas⁴ que fue inyectado en los ratones, se preparó utilizando veneno de abejas comercial liofilizado (*Sigma-Aldrich*) en solución salina estéril, para obtener las dosis de 2mg/Kg, 1mg/Kg y 0.5mg/Kg, bajo las condiciones de esterilidad adecuadas.

Todas las soluciones las dividimos en alícuotas de 1mL en tubos Eppendorf (*Accesolab*) y se congelaron hasta su uso, teniendo cuidado de no congelarlas y descongelarlas varias veces, ya que el veneno de abejas es muy sensible al calor debido a que se pueden desnaturalizar las proteínas y enzimas, perdiendo así su efecto.

⁴ Ver el apartado X, que corresponde a las soluciones y reactivos.

5.4. Linfoproliferación

5.4.1. Sacrificio de los animales y obtención de muestras

Para obtener las muestras de sangre periférica, fue necesario anestesiarse con éter a los animales, en una cámara de anestesia. Una vez que se durmió cada animal, se toma una muestra de sangre por punción retro-orbital. La sangre así obtenida, se coloca dentro de un tubo de ensayo y se deja reposar un tiempo hasta que se forma un coágulo, para separar el suero. El suero se guarda a -20°C, hasta su uso en la determinación de citocinas.

Posteriormente los animales se sacrificaron por dislocación cervical, se sumergieron en alcohol al 70% para desinfectar la piel, e inmediatamente y bajo condiciones de esterilidad, es decir en una campana de flujo laminar, se les abrió la cavidad abdominal para extraer el órgano linfóide.

5.4.2. Extracción de linfocitos

El bazo se coloca en una caja Petri que se encuentra sobre hielo con 5 mL de solución salina balanceada de Hanks⁵ (*Sigma-Aldrich*), posteriormente se perfunde el bazo con otros 5 mL de la misma solución con la ayuda de una jeringa que tenga una aguja de insulina, de tal forma que se disgreguen las células.

La suspensión así obtenida se centrifuga a 2000rpm durante 3 minutos. Las células se resuspenden con 1mL de solución hemolizante⁵, dejando reposar durante 5 segundos con el fin de eliminar los glóbulos rojos. Transcurrido este tiempo se adicionan 5mL de solución de Hanks y se centrifuga nuevamente a 2000rpm durante 3 minutos. Una vez eliminados los eritrocitos, las células se lavan dos veces con medio de cultivo RPMI 1640 sin suero.

Por último las células esplénicas se resuspenden en 1 mL de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con: suero fetal bovino al 10%, aminoácidos no esenciales, antibióticos, antimicótico y un amortiguador de pH.

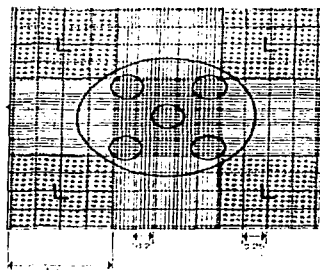
⁵ Ver el apartado X, que corresponde a la preparación de soluciones y reactivos

5.4.3. Cuenta y ajuste celular

Se cuentan las células para determinar la viabilidad de éstas con el colorante azul tripano. Para ello, se toma una alícuota de $20\mu\text{g}$ de la suspensión de linfocitos y se mezcla con un volumen igual de azul tripano, tratando de homogenizar muy suavemente la mezcla. Solamente se cultivaron aquellas suspensiones de células con una viabilidad superior al 95%.

Para determinar la viabilidad se utilizó un hematocitometro o cámara de Neubauer, así como un microscopio óptico. Se tomó una alícuota de $20\mu\text{g}$ de la suspensión anterior y se llenó cuidadosamente ambas cámaras de contaje del hematocitometro.

El conteo de las células ⁽¹¹⁴⁾ se llevó a cabo de la siguiente forma:



**TEJIS CGN
FALLA DE ORIGEN**

Figura 10. Esquema de las cuadrículas de la cámara de Neubauer, tal como se observan al microscopio.

Se cuentan las células del cuadro central y de los cuatro cuadros de las esquinas en el cuadrado central, que aparece rodeado por un círculo en la figura anterior. Las células muertas se tiñen de azul, de tal forma que la diferencia entre las células vivas y las células muertas es muy clara.

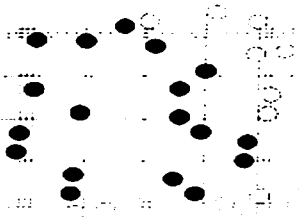


Figura 11. Esquema de una de las 5 cuadrículas seleccionadas, en la cual aparecen como puntos negros las células que deben ser contadas.

Se cuentan las células que tocan la línea superior y la línea izquierda del perímetro de cada cuadro, como aparece en la figura 11. No se cuentan las células que tocan la línea inferior y la línea derecha del perímetro de cada cuadro.

El número de células en la suspensión se calcula utilizando la siguiente fórmula.

$$\frac{\text{No. promedio de células contadas} \times 25 \times 10^4 \times 2}{5} = \text{Células/mL}$$

Donde: 25 es el factor de dilución,

10^4 es el factor de conversión de la cámara de Neubauer

5 es el número de cuadros en que se contaron las células

Una vez contadas las células viables, la suspensión fue ajustada a 300,000 células/100 μ L, es decir a 3×10^5 cél/mL.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

5.4.4. Cultivo de las células y estimulación de la proliferación utilizando el mitógeno Concanavalina A.

Las células provenientes de cada ratón se sembraron por sextuplicado utilizando microplacas de cultivo de 96 pozos (*Costar*), bajo condiciones de esterilidad. A cada pozo se agregaron 100 μ L de la suspensión celular previamente ajustada, posteriormente a tres de los seis pozos, se les adiciona 20 μ L de la solución de Con-A a una concentración de 5 μ g/mL con el fin de inducir la proliferación de las células. Se dejan tres pozos sin adicionar Con-A, que nos servirán para medir la actividad basal (sin estimulación) de las células, no obstante se les agregó 20 μ L de medio RPMI suplementado para conservar el volumen final igual en todos los pozos.

La microplaca se incubó a 37°C, 95% de humedad y 45% de CO₂, en una incubadora durante 48 horas.

5.4.5. Método de la reducción del MTT

Transcurridas las primeras 48 horas de incubación, a cada pozo de la microplaca se añadió 20 μ L de la solución de MTT, a una concentración de 5mg/mL en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS)⁶. Se incubó durante 4 horas a 37°C y 95% de humedad, con el fin de que se forme el formazán por la reducción del MTT.

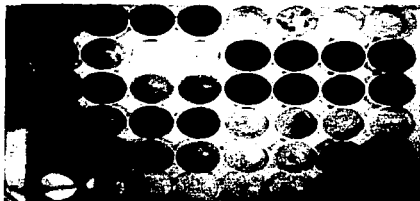


Figura 12. Fotografía de la microplaca después de haber añadido la solución de MTT y de haber incubado por 4 horas.

Una vez transcurridas las cuatro horas, las células se lisan añadiendo 100 μ L de una solución de lisis que contiene dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% en HCl 0.01N, esto hace que los cristales de formazán salgan del citoplasma de las células rotas y se disuelvan, así que se obtiene una solución homogénea.

La incubación se mantiene durante toda la noche y al día siguiente se mide la absorbancia en cada pozo utilizando un lector para microplacas (Dynex) a 490nm.

Se utilizó esta longitud de onda (490nm), según los resultados de los experimentos realizados para la estandarización de esta técnica que se describen más adelante, en la sección de resultados.

⁶ phosphate buffer solution

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.5. Cuantificación de citocinas

La cantidad de citocinas inflamatorias (IL-1 e IL-6), se determinó en las muestras de suero obtenidas de cada ratón, empleando la técnica de ELISA-sándwich.

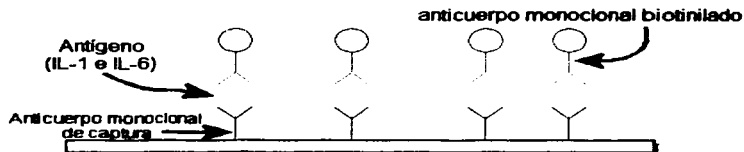


Figura 13. Esquema del fondo de un pozo de la microplaca de ELISA a la cual se han adherido, primero el anticuerpo monoclonal de captura; posteriormente, el antígeno (que viene en el suero analizado) y finalmente el segundo anticuerpo.

Para la determinación de la citocina IL-1 β se utilizó un kit comercial (*Quantikine® M - MLB00*) en el que los anticuerpos de captura anti-IL-1 β de ratón ya se encontraban adheridos a la placa de ELISA. Por ello sólo se tuvo que añadir las diluciones seriadas de a IL-1 β para la curva patrón y las muestras de los sueros de cada ratón. Se hicieron cinco lavados con 400 μ L del buffer de lavado (Part 8950024) y se adicionó 100 μ L a cada pozo del segundo anticuerpo anti-IL-1 β marcado con fosfatasa alcalina. Después de incubar por una hora a temperatura ambiente, se lavó otras diez veces la placa con 400 μ L del buffer de lavado.

Se adicionaron 100 μ L del sustrato de la enzima (H₂O₂/tetrametilbenzidina), dejando incubar por 30 minutos a temperatura ambiente, hasta que se desarrolla el color de la reacción. Finalmente se detiene la reacción adicionando a cada pozo 50 μ L de HCl diluido. La densidad óptica se determinó utilizando un lector de placas (*Dynex*) a 450nm. El rango de detección de la IL-1 β murina con este kit es de 500 a 7.5 pg/mL.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para determinar la IL-6, se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos anti-IL-6, los cuales se solubilizaron en un amortiguador de NaHCO_3 (J. T. Baker) 0.1M, pH 8.2. A cada pozo de una microplaca de ELISA (Costar) se agregaron $50\mu\text{L}$ de solución anterior con los anticuerpos de captura (anti-IL-6), dejando reposar durante toda la noche a 4°C para que los anticuerpos se adhirieran a la microplaca. Transcurrido este tiempo se hacen tres lavados con una solución de PBS/Tween-20 al 0.5% y se agregan a todos los pozos $100\mu\text{L}$ de una solución de PBS/BSA⁷ al 3% para bloquear el pegado no específico e incubando durante dos horas a temperatura ambiente.

Posteriormente se hacen otros cuatro lavados con PBS/Tween, y en algunos pozos se añadió por duplicado $100\mu\text{L}$ de IL-6_{rim} en las diluciones seriadas de la citocina recombinante para la curva patrón. En los pozos restantes se añadieron $50\mu\text{L}$ de PBS/BSA al 1% y $50\mu\text{L}$ de los sueros antes mencionados (un solo suero por cada dos pozos), dejando incubar toda la noche a 4°C .

Al finalizar este tiempo se hacen otros cuatro lavados más de los pozos de la microplaca utilizando una solución de PBS/Tween y posteriormente se añaden a cada pozo $100\mu\text{L}$ del segundo anticuerpo monoclonal, biotinilado específico para IL-6, solubilizado en PBS/BSA, dejando incubar la reacción durante una hora a temperatura ambiente.

En seguida se realizan otros seis lavados de los pozos de la microplaca con la solución de PBS/Tween y se añaden a cada pozo $100\mu\text{L}$ de una solución de estreptoavidina peroxidasa (S-HRP) disuelta 1:4000 en PBS/BSA al 1% dejando incubar por 45 minutos a temperatura ambiente. Al terminar esta incubación se realizaron otros ocho lavados con PBS/Tween y después se añadieron a todos los pozos de la microplaca $100\mu\text{L}$ de una solución del sustrato ABTS⁸ tapándose inmediatamente la microplaca para evitar la luz durante 20 minutos más de

⁷ Albúmina sérica bovina, en una solución amortiguadora de fosfatos al 3%

⁸ Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6 sulfónico) sustrato para la peroxidasa

incubación, hasta que se desarrolla el color de la reacción. Después de ese tiempo se puede detener la reacción añadiendo a cada pozo 50 μ L de una solución de DMF⁹/agua destilada al 50%. La lectura de absorbancia de la reacción se hizo a 405nm, en un lector de placas (*Dynex*). El rango de detección de esta prueba es de 2000 a 7.5pg/mL

La cuantificación de cada citocina se hizo interpolando los valores de las absorbancias registradas para cada muestra en la curva patrón correspondiente.

⁹ Dimetilformamida al 50% en agua destilada

5.6. Estandarización de la técnica del MTT

Los animales que se utilizaron para este fin, no recibieron ningún tratamiento previo. Para estandarizar esta prueba colorimétrica fue necesario realizar diversas variaciones a la técnica, hasta que obtuvimos los resultados óptimos en nuestras condiciones de trabajo. Se realizaron diferentes ensayos utilizando la técnica del MTT, con el fin de que las células esplénicas estimuladas reduzcan la mayor cantidad de sal de tetrazolio, mientras que las células esplénicas de ratones no estimuladas den valores de reducción considerablemente más bajas, debido a que se supone no hay proliferación celular. Se compararon los resultados obtenidos cuando las células del bazo eran separadas utilizando ficoll-hypaque o una solución hemolizante a base de NH_4Cl y Tris base.

En cada uno de estos casos se variaron la velocidad y los tiempos de centrifugación. Los resultados se leyeron a 450, 490 y 630nm en el lector de placas (*Dynex*).

Una vez seleccionado el procedimiento de la solución hemolizante y en cultivos celulares de prueba, se varió la concentración del mitógeno Con-A empleando cinco concentraciones diferentes 1, 2, 3, 4 y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, leyendo las absorbancias a 450, 490 y 630nm. Finalmente realizamos un barrido a diferentes longitudes de onda, utilizando 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Con-A para comparar los valores de absorbancia obtenidos entre las células estimuladas y las células no estimuladas. Además, durante cada experimento se monitoreó la viabilidad celular desde el primer día de experimentación hasta el día en que se detiene la reacción para hacer las lecturas de absorbancia. Todos los datos que obtuvimos fueron analizados por métodos estadísticos para obtener los valores promedio y sus correspondientes medidas de dispersión.

Capítulo VII

Resultados

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

¡Todo no vale nada, si el resto vale menos!
Bertolt Brecht

"El infierno de los vivos no es algo que será; hay uno, es aquel que existe ya aquí, el infierno que habitamos todos los días, que formamos estando juntos. Dos maneras hay de no sufrirlo. La primera es fácil para muchos: aceptar el infierno y volverse parte de él hasta el punto de no verlo más. La segunda es peligrosa y exige atención y aprendizaje continuos: buscar y saber reconocer quién y qué, en medio del infierno, no es el infierno, y hacerlo durar, y darle espacio."

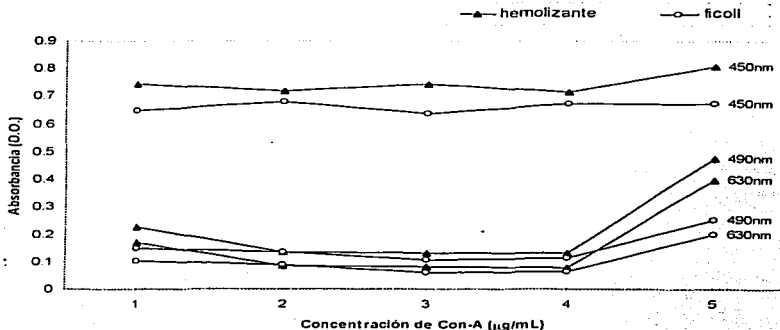
Italo Calvino
Las ciudades invisibles
El infierno de los vivos

VI. RESULTADOS

6.1 Resultados de la estandarización

Para la estandarización de la prueba colorimétrica del MTT, se utilizaron linfocitos provenientes del bazo de ratones, manteniendo la concentración de células constante (3×10^5 cel/pozo), se varió la concentración del mitógeno concanavalina-A en 1, 2, 3, 4 y $5 \mu\text{g/mL}$ y se utilizaron dos formas diferentes para separar las células blancas de todo el paquete celular. En el primer caso se utilizó Ficoll-hypaque y en el segundo utilizamos una solución hemolizante, en ambos casos se sembró por triplicado cada suspensión de células y las microplacas se leyeron a 450, 490 y 630nm, después de haberlas incubado en presencia del MTT, durante 4 horas.

Proliferación de linfocitos a diferentes longitudes de onda, comparando solución hemolizante vs ficoll.



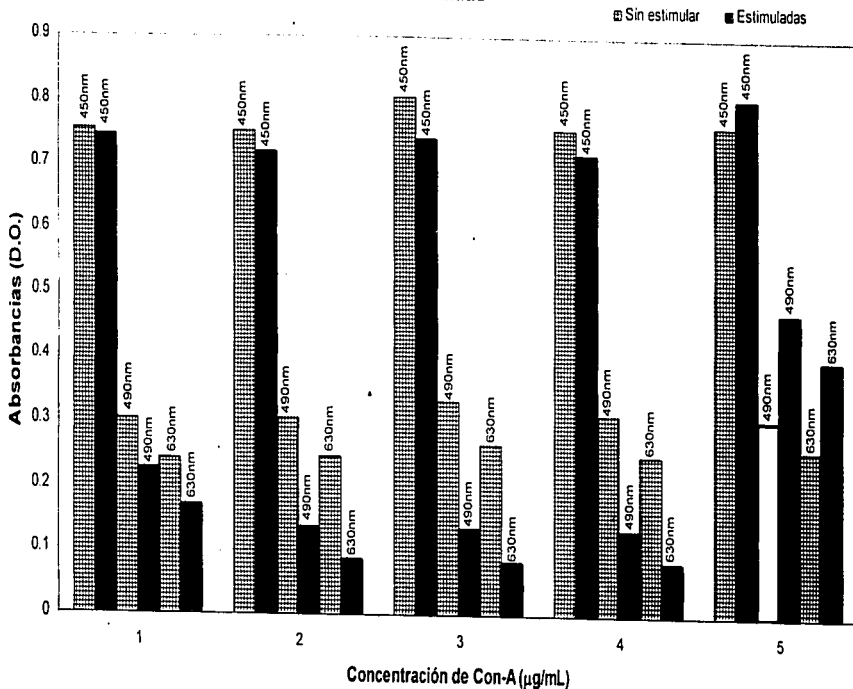
Gráfica No.1. Comparación de la técnica del MTT utilizando dos métodos de separación celular a diferentes longitudes de onda y diferentes concentraciones de Con-A.

Las absorbancias correspondientes a la formación del formazán en cada serie de pozos, se promediaron y se graficaron para obtener una curva de estimulación con Con-A a diferentes longitudes de onda, donde la densidad óptica (D.O.) representa la cantidad del MTT reducido por las células estimuladas a diferentes concentraciones de Con-A utilizando Ficoll y solución hemolizante. En ambos métodos se sigue el mismo patrón de reducción, es decir, la mayor reducción del MTT fue a 450nm. A esta longitud de onda se obtienen valores mayores en la absorbancia, aunque las diferencias son pequeñas en ambos métodos de separación de linfocitos. Cuando se estimulan las células con Con-A a una concentración de 5µg/mL a 490 y 630nm, hay una mayor reducción del MTT. Sin embargo, a 450nm pareciera que la reducción del MTT es muy parecida a cualquier concentración de Con-A. Por otro lado se observa claramente que se obtienen mejores resultados con la solución hemolizante que con el Ficoll. Por lo que se eligió trabajar con la solución hemolizante.

Los datos que se muestran en la gráfica No.2, representan la cantidad del MTT reducido por los linfocitos a diferentes concentraciones de Con-A y diferentes longitudes de onda. A 450nm hay una mayor reducción del MTT a todas las concentraciones de Con-A empleadas, sin embargo la diferencia de absorbancias entre las células estimuladas y no estimuladas es muy pequeña e incluso se puede observar que en algunos casos las células basales tienen un valor más alto de absorbancia que las células estimuladas.

A 490nm los valores de absorbancia en las células estimuladas con 1, 2, 3, 4µg/mL de Con-A son constantes y pequeños en comparación con los valores de absorbancia a 450nm, y en este caso también los valores de absorbancia de las células basales son mayores que las estimuladas, no obstante cuando las células son estimuladas con 5µg/mL del mitógeno hay un incremento muy significativo de los valores de absorbancia, es probable que la concentración de Con-A que estimula realmente a las células es de 5µg/mL y que las concentraciones menores a este valor no las esta estimulando, pareciendo inhibirlas.

Reducción del MTT utilizando diferentes concentraciones de Con-A a diferentes longitudes de onda, en células no estimuladas y células estimuladas



Gráfica No.2 Comparación entre las células no estimuladas y células estimuladas a diferentes concentraciones de Con-A y diferentes longitudes de onda

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS
DE LA BIBLIOTECA

Finalmente a 630nm, observamos que los valores siguen un patrón parecido al anterior, sólo que en este caso los valores de absorbancia son menores en comparación con los valores obtenidos a 490nm.

Se calcularon los valores delta (Δ) de estas reducciones, es decir, se restan los valores de absorbancia obtenidos de las células estimuladas menos los valores de absorbancia obtenidos de las células no estimuladas y observamos que a las tres longitudes de onda empleadas, los valores fueron negativos cuando se añadieron 1, 2, 3 y 4 $\mu\text{g/mL}$ de Con-A. Únicamente cuando las células fueron estimuladas a 5 $\mu\text{g/mL}$ del mitógeno se obtiene un valor Δ positivo, encontrándose que a 490nm el valor Δ es más alto.

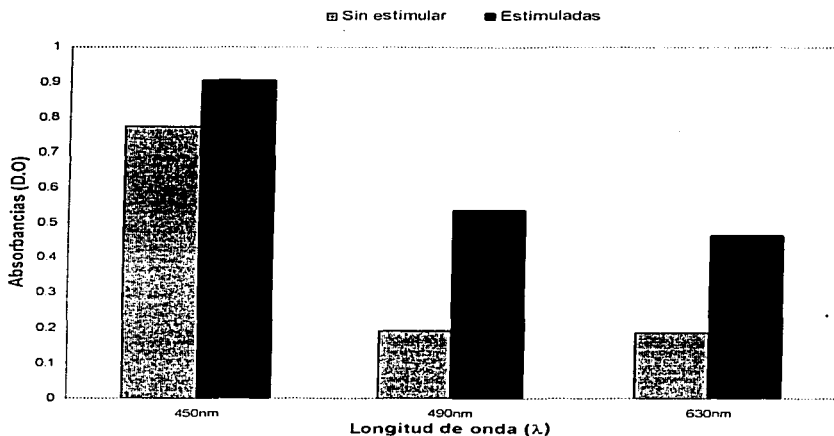
| Con-A | 450nm | 490nm | 630nm |
|--------------------|--------|--------|--------|
| 1 $\mu\text{g/mL}$ | -0.009 | -0.078 | -0.072 |
| 2 $\mu\text{g/mL}$ | -0.034 | -0.172 | -0.162 |
| 3 $\mu\text{g/mL}$ | -0.063 | -0.199 | -0.185 |
| 4 $\mu\text{g/mL}$ | -0.039 | -0.180 | -0.168 |
| 5 $\mu\text{g/mL}$ | 0.044 | 0.169 | 0.138 |

Tabla No.1. Valores delta (Δ) a las diferentes longitudes de onda y diferentes concentraciones del mitógeno.

Utilizando una concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$ del mitógeno, se realizó un barrido a diferentes longitudes de onda (450, 490 y 630nm) en las mismas condiciones experimentales. Los resultados así obtenidos fueron promediados y se muestran en la gráfica No.3, donde los valores de absorbancia corresponden a la cantidad del MTT reducido por las células estimuladas y no estimuladas. Al comparar las absorbancias obtenidas de las células basales y las estimuladas a las tres longitudes de onda mencionadas, se observa que a 490nm se presenta la mayor diferencia entre ellas.

Según los resultados mostrados en las gráficas anteriores, se puede ver que la concentración del mitógeno, en este caso concanavalina sí influye de forma significativa sobre los valores de absorbancia, así mismo la longitud de onda a la que se leen la microplacas también influye mucho para obtener los valores adecuados y disminuir los errores en la experimentación. Considerando lo anterior los valores óptimos seleccionados para nuestras condiciones de trabajo experimentales se obtienen a 490nm, utilizando $5\mu\text{g/mL}$ de Con-A.

Comparación de las células sin estimular vs células estimuladas con Con-A ($5\mu\text{g/mL}$) a diferentes longitudes de onda



Gráfica No. 3. Barrido a diferentes longitudes de onda, donde se muestra que a 490nm se obtienen los valores óptimos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

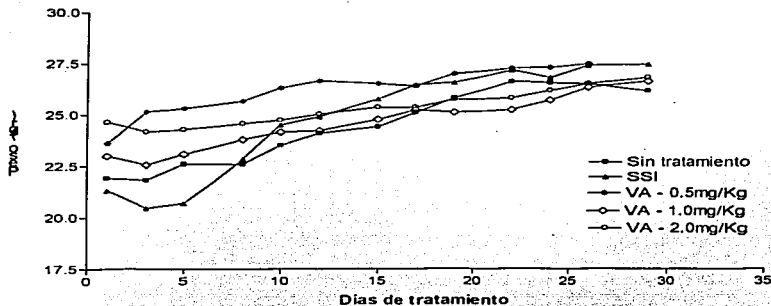
FALTA
PAGINA

82

6.3 Variación de los pesos de los ratones

El peso de cada animal se valoró y se registró cada tercer día. Hubo un ligero aumento de peso en todos los grupos de ratones debido al crecimiento normal de los animales. En la siguiente gráfica podemos apreciar que no hay ninguna tendencia diferente a lo esperado. Tanto el grupo que no recibió ningún tratamiento, como el grupo tratado con solución salina isotónica y los que recibieron tratamiento con veneno de abejas a diferentes dosis, no presentan variaciones significativas en cuanto a su peso.

Variación del peso de los ratones durante el tratamiento



Gráfica No. 4. Comparación de los pesos promedio entre los diferentes grupos de ratones durante el tratamiento.

Se promediaron los pesos de los ratones de cada grupo, siendo μ_{ST} , μ_{SSI} , $\mu_{0.5}$, $\mu_{1.0}$ y $\mu_{2.0}$ los pesos promedio verdaderos de los cinco tratamientos distintos. Posteriormente a estos valores se les aplicó un análisis de varianza o más brevemente ANOVA de un solo factor, cuando los tamaños muestrales son desiguales, con un nivel de significancia de $p < 0.05$; donde, las hipótesis relevantes son $H_0: \mu_{ST} = \mu_{SSI} = \mu_{0.5} = \mu_{1.0} = \mu_{2.0}$, que indica que los pesos de los

ratones son iguales para cada tratamiento, contra H_a : al menos dos de las μ son distintas.

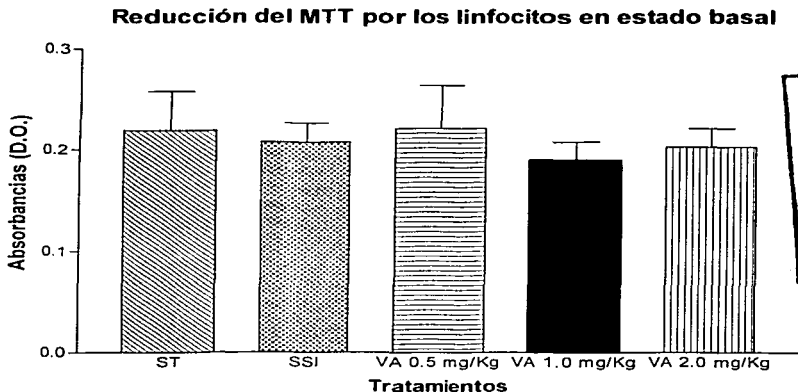
Los resultados fueron resumidos en un formato tabular denominado tabla de ANOVA. Como el valor crítico para la región de rechazo es $F_{0.05, 4, 59} = 2.53 > 2.31 = f$, la hipótesis nula es aceptada, es decir, no representa diferencias significativas entre los pesos de los ratones de los diferentes grupos.

| Fuente de variación | Grados de libertad | Suma de Cuadrados | Cuadrados medios | f |
|-----------------------------|--------------------|-------------------|------------------|------|
| Tratamientos (entre grupos) | 4 | 25.69 | 6.42 | 2.31 |
| Error (dentro de grupos) | 59 | 163.66 | 2.77 | |
| Total | 63 | 189.35 | | |

6.4 Linfoproliferación (*in vitro*) utilizando la técnica del MTT

6.4.1. Proliferación de los linfocitos en estado basal

En la siguiente gráfica, se muestra la proliferación de los linfocitos en estado basal, sin Con-A para estimularlos, donde el eje de las X muestra las barras correspondientes a la reducción del MTT por los linfocitos de cada grupo de ratones, no habiendo diferencias entre los diferentes grupos.



Gráfica No. 5 Representación de la respuesta proliferativa de los linfocitos esplénicos sin estimular

Se efectuaron los cálculos para comparar la cantidad del MTT reducido por los linfocitos esplénicos de ratón con los diferentes tratamientos: con y sin veneno de abejas. Los resultados de los cálculos estadísticos se muestran en la siguiente tabla de ANOVA. Representamos con μ , el promedio real de cada ensayo sin

estimulación con el mitógeno Con-A que corresponde a la densidad óptica (D.O.) y representa la cantidad del MTT reducido por cada grupo de ratones.

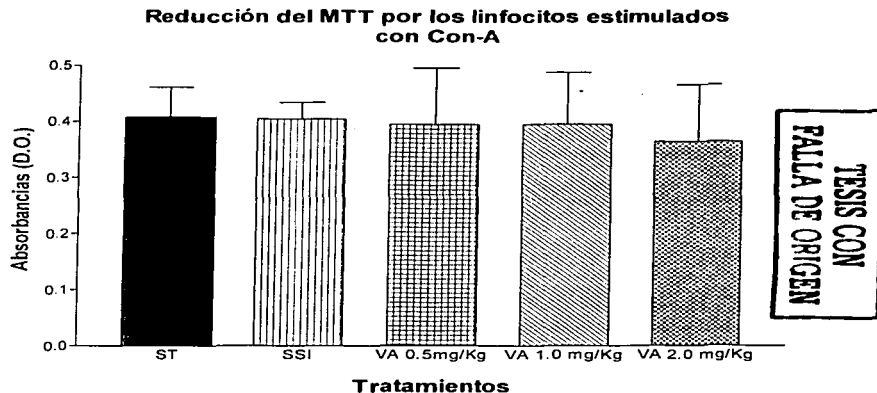
| Fuente de variación | Grados de libertad | Suma de Cuadrados | Cuadrados medios | f |
|-----------------------------|--------------------|-------------------|------------------|------|
| Tratamientos (entre grupos) | 4 | 0.0032 | 0.0008 | 0.92 |
| Error (dentro de grupos) | 20 | 0.0174 | 0.00087 | |
| Total | 24 | 0.0206 | | |

La hipótesis nula $H_0: \mu_{ST} = \mu_{SSI} = \mu_{0.5} = \mu_{1.0} = \mu_{2.0}$ establece que el promedio real de la cantidad de MTT reducido es idéntico para los cinco tratamientos. El valor crítico F para la región de rechazo es $F_{0.05, 4, 20} = 2.87$.

Según los datos de la tabla, observamos que $f = 0.92$ es menor que $F_{0.05, 4, 20} = 2.87$ y por lo tanto la hipótesis nula H_0 se acepta, indicando que la proliferación de los linfocitos no estimulados con Con-A entre los cinco grupos de ratones no son distinguibles, es decir no hay diferencia estadísticamente significativa al nivel de 0.05.

6.4.2. Proliferación de los linfocitos estimulados con Con-A

En la gráfica No. 6 se muestra la proliferación de los linfocitos estimulados con Con-A donde cada barra representa los valores promedio de las densidades ópticas correspondientes a la reducción del MTT por los linfocitos de cada grupo de animales.



Gráfica No. 6 Representación de la respuesta proliferativa de los linfocitos estimulados con el mitógeno.

Al igual que para los pesos de los ratones y la linfoproliferación en estado basal, analizamos los datos a través de una ANOVA. Los resultados se resumen en la siguiente tabla donde μ_i corresponde al promedio real de las densidades ópticas (D.O.) de cada grupo de animales y la hipótesis nula $H_0: \mu_{ST} = \mu_{SSI} = \mu_{0.5} = \mu_{1.0} = \mu_{2.0}$ establece que el promedio real de la reducción del MTT es idéntico en los cinco grupos de animales con diferentes tratamientos. El valor crítico F para la región de rechazo es el mismo que en el caso anterior puesto que utilizamos los

mismos animales bajo las mismas condiciones y por lo tanto los grados de libertad son los mismos, así que $F_{0.05, 4, 20} = 2.87$.

| Fuente de variación | Grados de libertad | Suma de Cuadrados | Cuadrados medios | f |
|-----------------------------|--------------------|-------------------|------------------|------|
| Tratamientos (entre grupos) | 4 | 0.0059 | 0.0015 | 0.23 |
| Error (dentro de grupos) | 20 | 0.1324 | 0.0066 | |
| Total | 24 | 0.1383 | | |

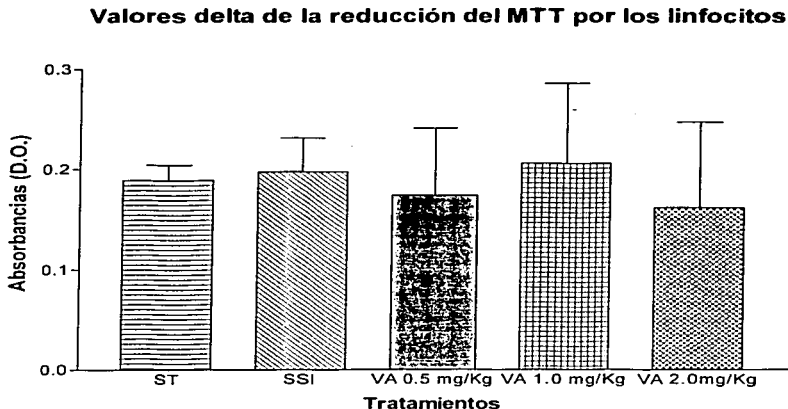
Podemos observar en los datos mostrados en la tabla, que $f = 0.23$, siendo menor que la F de tablas:

$$f = 0.23 < 2.87 = F_{0.05, 4, 20}$$

Por lo tanto la hipótesis nula es aceptada, lo que indica que tampoco en la proliferación de células estimuladas con Con-A hay diferencias significativas entre los cinco grupos.

6.4.3. Valores delta (Δ)

También realizamos un análisis de varianza a los valores delta (Δ) de la reducción del MTT por los linfocitos mostrados en la siguiente gráfica.



Gráfica No.7 Representación de la diferencia entre las repuesta proliferativa de los linfocitos estimulados menos la respuesta proliferativa de los linfocitos sin estimular

Los valores de densidad óptica (D.O.) representan la resta de los valores de D.O. de los linfocitos estimulados con Con-A menos los valores de D.O. de los linfocitos sin estimular correspondientes a la reducción del MTT de cada grupo de ratones.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

| Fuente de variación | Grados de libertad | Suma de Cuadrados | Cuadrados medios | f |
|-----------------------------|--------------------|-------------------|------------------|------|
| Tratamientos (entre grupos) | 4 | 0.0063 | 0.0016 | 0.39 |
| Error (dentro de grupos) | 20 | 0.0826 | 0.0041 | |
| Total | 24 | 0.0889 | | |

Aplicamos el análisis de varianza y encontramos una $f = 0.39$, siendo la misma F de tablas para este caso: $F_{0.05, 4, 20} = 2.87$.

$$\text{donde; } f = 0.39 < 2.87 = F_{0.05, 4, 20}$$

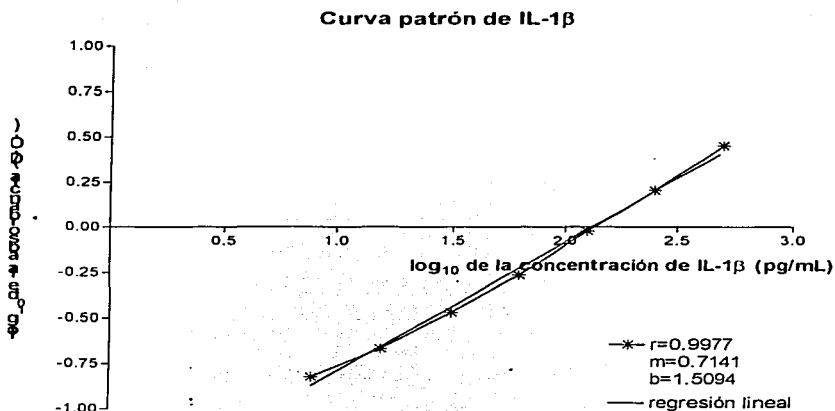
Lo que demuestra que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los cinco grupos, por lo que la hipótesis nula es aceptada $H_0: \mu_{ST} = \mu_{SS1} = \mu_{0.5} = \mu_{1.0} = \mu_{2.0}$, es decir las diferencias entre las células estimuladas y las células sin estimular no difieren entre los diferentes grupos.

Las diferencias de los valores de reducción del MTT, entre cada uno de los grupos estimulados y no estimulados, es tan pequeña que podemos pensar que el veneno de abejas no tiene efecto sobre la respuesta proliferativa de los linfocitos esplénicos.

6.5 Producción de citocinas

6.5.1. Evaluación de la producción de IL-1 β en suero de ratones tratados con veneno de abejas.

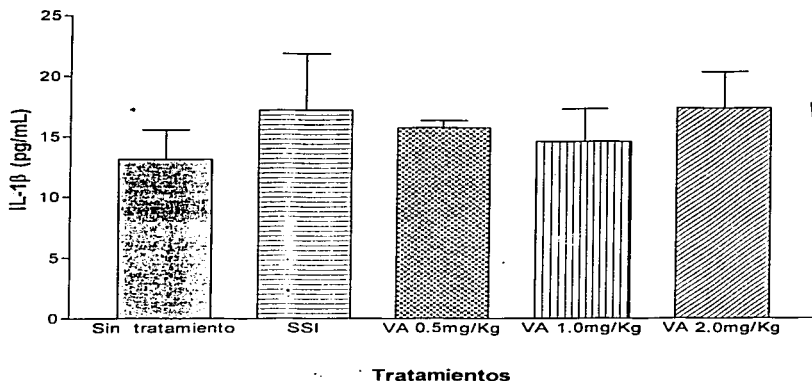
Se graficaron los datos de la curva estándar de una serie de diluciones de la citocina (IL-1 β), cuyos valores obtenidos fueron linealizados sacando el logaritmo base 10 de las concentraciones de IL-1 β de ratón contra el log₁₀ de las absorbancias (D.O.), mostrado en la siguiente gráfica, donde $r=0.9977$, $m=0.7141$ y $b=-1.5094$.



Gráfica No. 8. Curva estándar de concentración de la IL-1, los datos graficados son el log₁₀ de la concentración vs log₁₀ de la absorbancia.

Una vez graficada la curva estándar, se le buscó el logaritmo a los valores de absorbancia obtenidos durante la cuantificación de la interleucina-1, en cada una de las muestras de suero de los diferentes grupos de ratones y se interpolaron en ella para obtener su concentración. A los valores interpolados se les saca el antilogaritmo para obtener un valor real de la concentración de IL-1 β . En la gráfica No.9 podemos observar que los valores más altos de IL-1 β corresponden a los sueros de los ratones tratados con veneno de abejas a 2.0mg/Kg (17.35 \pm 3.02pg/mL), y los valores más bajos corresponden al grupo control (13.20 \pm 2.44pg/mL). Sin embargo, los resultados no muestran cambios significativos después del tratamiento con SSI o con veneno de abejas en comparación con los que no recibieron tratamiento.

Producción de IL-1 β en suero de ratones tratados con veneno de abejas a diferentes concentraciones



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gráfica No. 9. Cantidad de IL-1 β producida en el suero de ratones, que no recibieron tratamiento, que fueron inyectados con SSI y veneno de abejas a diferentes concentraciones.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor cuando los tamaños muestrales son desiguales, con un nivel de significancia de $p < 0.05$, promediando los datos de la concentración de IL-1 β a cada grupo de ratones que recibieron los diferentes tratamientos.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla de ANOVA, donde la hipótesis nula $H_0: \mu_{ST} = \mu_{SSI} = \mu_{0.5} = \mu_{1.0} = \mu_{2.0}$ establece que el promedio real de la concentración de IL-1 β producido en el suero de los ratones es idéntico para los cinco tratamientos (con y sin veneno de abejas), contra H_a : al menos dos de las μ_i son distintas, donde el valor crítico F para la región de rechazo es $F_{0.05, 4, 15} = 3.06$. Representamos con μ_i el promedio real de los valores de la concentración de la interleucina-1 β (pg/mL) por cada grupo de ratones.

| Fuente de variación | Grados de libertad | Suma de Cuadrados | Cuadrados medios | f |
|-----------------------------|--------------------|-------------------|------------------|------|
| Tratamientos (entre grupos) | 4 | 61.68 | 15.42 | 1.80 |
| Error (dentro de grupos) | 15 | 128.25 | 8.55 | |
| Total | 19 | 189.93 | | |

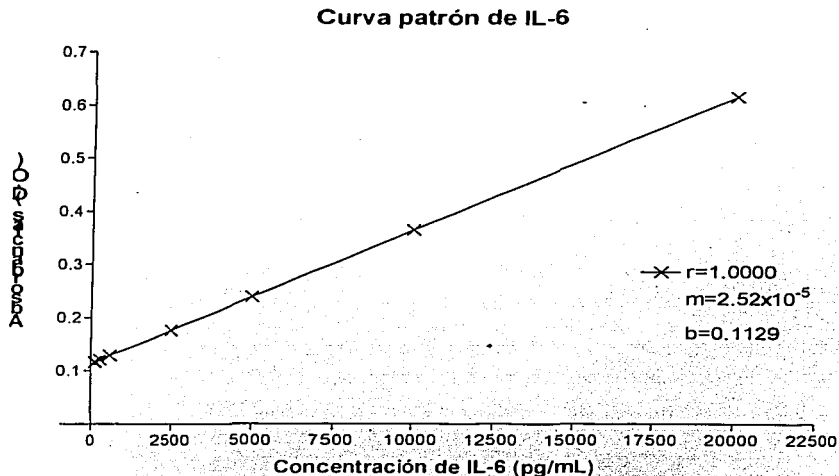
Observamos que $f = 1.80$ es menor que $F_{0.05, 4, 15} = 3.06$ y por lo tanto la hipótesis nula H_0 es aceptada, lo que indica que la producción de IL-1 β entre los cinco grupos de ratones es muy similar y no tiene diferencias estadísticamente importantes.

En este caso al nivel de significancia de $p < 0.05$ no se encontró ninguna diferencia considerable de la concentración de la IL-1 β entre ninguno de los grupos de animales que recibieron o no tratamiento con veneno de abejas, a pesar

de esto observamos que en el tratamiento con veneno de abejas a 2.0mg/kg hay una producción un poco mayor de la citocina con respecto a los otros grupos tratados con veneno de abejas. No obstante el grupo tratado con solución salina isotónica muestra una cantidad similar de producción de IL-1 β con respecto al grupo tratado con 2.0mg/Kg.

6.5.2. Evaluación de la producción de IL-6 en suero de ratones tratados con veneno de abejas.

Al igual que para la cuantificación de IL-1 β , se realizó una curva estándar de la IL-6 recombinante murina, haciendo una serie de diluciones de la misma. Los valores obtenidos se muestran en la siguiente gráfica.

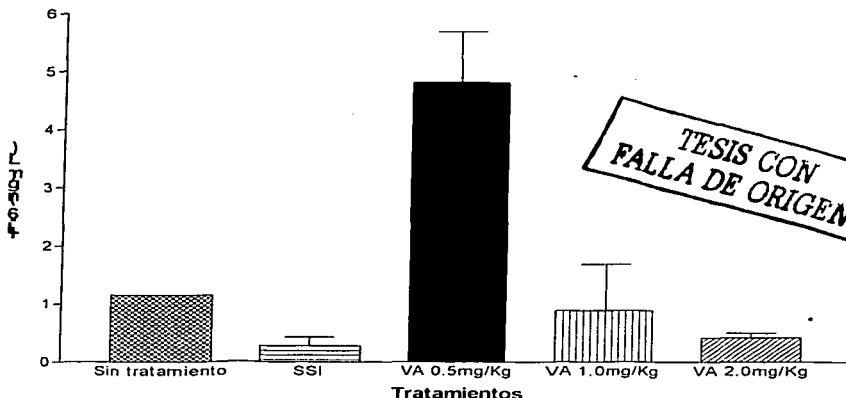


Gráfica No. 10. Curva estándar de la concentración de IL-6.

Los valores de absorbancia obtenidos de la lectura de las microplacas de ELISA para la IL-6 se interpolaron en la curva patrón y de este modo se evaluó la concentración de IL-6 para cada grupo de ratones. Estos datos fueron promediados y se muestran en la gráfica No. 11, donde el valor de concentración de IL-6 más alto se observa en el grupo de ratones tratados con veneno de abejas

a 0.5mg/Kg ($4.81 \pm 0.88 \text{ng/mL}$) y el valor de concentración de IL-6 más pequeño corresponde al grupo tratado con SSI ($0.28 \pm 0.16 \text{ng/mL}$). Los resultados en este caso muestran que hay una diferencia significativa entre el grupo tratado con 0.5mg/Kg de veneno de abejas y los demás grupos de animales.

Producción de IL-6 en el suero de ratones tratados con veneno de abejas a diferentes concentraciones



Gráfica No. 11. Cantidad de IL-6 producida en el suero de ratones que no recibieron ningún tratamiento, que recibieron tratamiento con SSI y con veneno de abejas a diferentes concentraciones.

Analizamos los datos a través de un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor cuando los tamaños muestrales de cada tratamiento no son iguales Sean μ_{ST} , μ_{SSI} , $\mu_{0.5}$, $\mu_{1.0}$ y $\mu_{2.0}$ los promedios reales de la concentración de IL-6 para los cinco grupos de animales, bajo condiciones dadas. La hipótesis nula es $H_0 = \mu_{ST} = \mu_{SSI} = \mu_{0.5} = \mu_{1.0} = \mu_{2.0}$ contra H_a : al menos dos de las μ son distintas, el

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

nivel de significancia es de $p < 0.05$. En este caso el valor crítico F para la región de rechazo es $F_{0.05, 4, 11} = 3.36$, basado en $I - 1 = 4$ grados de libertad en el numerador y $n - I = 16 - 4 = 11$ grados de libertad en el denominador. Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

| Fuente de variación | Grados de libertad | Suma de Cuadrados | Cuadrados medios | f |
|--------------------------------|--------------------|-------------------|------------------|-------|
| Tratamientos (entre grupos) | 4 | 32.22 | 8.055 | 32.09 |
| Error (dentro de grupos) | 11 | 2.76 | 0.251 | |
| Total | 15 | 34.98 | | |

Podemos observar en los datos mostrados en la tabla, que $f = 32.09$, siendo mayor que la F de tablas:

$$f = 32.09 > 3.36 = F_{0.05, 4, 11}$$

Así se debe rechazar la hipótesis nula a cualquier nivel razonable de significancia; hay pruebas convincentes para llegar a la conclusión de que la concentración de IL-6 promedio verdadero depende de la concentración del veneno de abejas que se administre, por lo que procedemos a continuar el análisis aplicando la prueba modificada de Tukey para hacer una comparación múltiple y saber cuales de las μ_i son diferentes entre sí.

El valor crítico para la distribución del rango estudentizado de tablas es en este caso: $Q_{0.5, 5, 11} = 4.57$ y el cálculo tomando en cuenta los tamaños de muestra para los datos de concentración de IL-6, de tal modo que: $J_{ST} = 2$, $J_{SSI} = 4$, $J_{0.5} = 2$, $J_{1.0} = 4$, y $J_{2.0} = 4$, quedando como sigue:

$$w_{ST, SSI} = 4.57 \cdot \sqrt{\frac{0.251}{2} \left(\frac{1}{2} + \frac{1}{4} \right)} = 1.40;$$

$w_{ST, 0.5} = 1.62$, $w_{ST, 1.0} = 1.40$, $w_{ST, 2.0} = 1.40$, $w_{SSI, 0.5} = 1.40$, $w_{SSI, 1.0} = 1.14$,
 $w_{SSI, 2.0} = 1.14$, $w_{0.5, 1.0} = 1.40$, $w_{0.5, 2.0} = 1.40$, $w_{1.0, 2.0} = 1.14$.

donde w_y es la diferencia mínima significativa.

Ordenamos de manera creciente las medias muestrales correspondientes a cada grupo de ratones:

| | | | | |
|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| \bar{X}_{SSI} | $\bar{X}_{2.0}$ | $\bar{X}_{1.0}$ | \bar{X}_{ST} | $\bar{X}_{0.5}$ |
| <u>0.28</u> | <u>0.41</u> | <u>0.89</u> | <u>1.15</u> | 4.81 |

Para saber si las μ_i son considerablemente diferentes entre sí, restamos cada par de las medias muestrales. Como por ejemplo: $\bar{X}_{SSI} - \bar{X}_{2.0} = 0.13 < 1.14 = w_{SSI, 2.0}$, se concluye que μ_{SSI} y $\mu_{2.0}$ no son considerablemente diferentes y así sucesivamente.

En el esquema de subrayado, se muestra que el grupo de animales tratados con veneno de abejas (0.5mg/Kg), parecen diferir en forma significativa con los demás grupos, es decir la producción de IL-6 en el suero de ratones incrementa de forma significativa cuando estos son tratados con VA a una concentración de 0.5 mg/Kg.

$$\bar{X}_{ST} - \bar{X}_{0.5} = 3.66 > 1.62 = w_{ST, 0.5};$$

$$\bar{X}_{SSI} - \bar{X}_{0.5} = 4.53 > 1.40 = w_{SSI, 0.5};$$

$$\bar{X}_{0.5} - \bar{X}_{1.0} = 3.92 > 1.40 = w_{0.5, 1.0};$$

$$\bar{X}_{0.5} - \bar{X}_{2.0} = 4.39 > 1.40 = w_{0.5, 2.0};$$

Mientras que en los ratones que no recibieron ningún tratamiento, como los que recibieron solución salina isotónica y los que fueron tratados con veneno de abejas a 1.0 y 2.0 mg/Kg la producción de IL-6 parece no sufrir ningún incremento considerable.

Capítulo VIII

Discusión

TESIS CON
FALSA DE ORIGEN

"Círculo es la existencia, y mal hacemos cuando al querer medirla le asignamos la muerte y el sepulcro como extremos"
Manuel Acuña

"No llores por un mundo que lucha, lucha por un mundo que llora"
Anónimo

"Al fin y al cabo, somos lo que hacemos para cambiar lo que somos"
Eduardo Galeano

VII. DISCUSIÓN

La utilidad del MTT como un marcador cuantitativo de células viables fue probada para determinar la relación entre un número de células viables y la reducción del MTT a formazán. Los datos obtenidos en la estandarización de la técnica de reducción del MTT sugieren que los linfocitos metabólicamente activos reducen el MTT al derivado formazán de color morado, haciéndose evidente que la concentración del mitógeno es importante para la proliferación de los linfocitos, sin embargo también es evidente que el metabolismo basal de las células no estimuladas reducen el MTT de manera significativa, ya que cuando las células son estimuladas el incremento en la reducción del MTT tan solo es un 25% mayor en comparación con las células que no fueron estimuladas con la Con-A. Por esta razón hay que tener cuidado con la cantidad de Con-A que se utilice. Este hecho puede afectar los resultados de la absorbancia delta, dando valores negativos por lo que los resultados se analizaron de forma independiente.

Los valores de absorbancia de las células colocadas en condiciones basales fueron mucho más elevados de lo que se esperaba, quizá porque se utilizaron todas las células blancas del bazo, es decir un grupo heterogéneo de células en lugar de utilizar específicamente ciertas subpoblaciones de linfocitos aislados. Por otro lado algo que también pudo influir sobre esos valores basales elevados puede ser el mitógeno utilizado. Tal vez hubiese sido necesario probar varios mitógenos y seleccionar al que indujera una mayor proliferación para obtener diferencias más grandes entre ambas células (estimuladas y sin estimular).

Se observó que cantidades pequeñas de Con-A ($1-4\mu\text{g/mL}$) no estimulan suficientemente a las células para su proliferación, esto se refleja en los bajos valores de absorbancia a 490 y 630nm (Gráfica No 2). Cuando las lecturas se llevan a cabo a una longitud de onda de 630 nm, los valores de absorbancia son muy

pequeños y al comparar las células basales de las estimuladas podemos ver que estas últimas reducen en menor cantidad el MTT.

A pesar de todas estas diferencias se logró estandarizar una técnica que permitiera obtener los resultados óptimos bajo nuestras condiciones de trabajo experimentales y fue aplicada a la evaluación de la linfoproliferación.

En 1986 *Hyre* y colaboradores realizaron estudios sobre proliferación y ellos refieren que en ratones que recibieron cuatro inyecciones subcutáneas de veneno de abejas incrementó de manera significativa la respuesta proliferativa de linfocitos esplénicos, sin embargo ellos utilizaron una dosis mucho más alta que la que se utilizó en este trabajo. ⁽⁹⁶⁾

En ese mismo año también se estudio la actividad de la linfoproliferación (*in vitro*) por la estimulación del veneno de abejas en un grupo de pacientes que eran alérgicos al piquete de abeja y en grupo de apicultores, encontrando que los apicultores no tenían una actividad proliferativa aumentada y mostraban inhabilidad para producir IL-2 después de la estimulación con veneno de abejas. ⁽⁹⁷⁾

No se encontró mucha información en la literatura con respecto a la proliferación de células esplénicas de ratones estimuladas con veneno de abejas, pero es probable que la proliferación esté relacionada con la dosis administrada. Por esa razón se decidió utilizar un rango alrededor una dosis menor a 2.5mg/kg que *Schmidt* había recomendado en sus estudios como segura y efectiva en ratones, tomando en cuenta que a dosis más altas es tóxico para los animales. De acuerdo a los resultados de proliferación linfocitaria, no se encontró relación entre la dosis y la proliferación de las células, aunque no quedaría descartado un estudio posterior utilizando un rango más amplio de la dosis de veneno y tiempos diferentes de administración para evaluar la relación dosis – respuesta y la LD₅₀, y así tener más elementos para una discusión más amplia.

En la actualidad existen pocos trabajos científicos sobre la relación entre el veneno de abejas y el sistema inmune. Por lo general, entre estos pocos trabajos existen muchas contradicciones con respecto a las respuestas inmunológicas que produce el veneno. Por ejemplo, en un trabajo realizado en la *Universidad de Thessaloniki en Grecia en 1988*,⁽⁹⁷⁾ los autores aseguran que la producción de IL-1 en esplenocitos de ratas tratadas con veneno de abejas incrementa en comparación con los niveles normales, sugiriendo que sus resultados mostraban que el tratamiento con veneno de abejas afecta la producción de IL-1 directamente en los macrófagos. Lo anterior es contrario a los resultados que se obtuvieron en el presente trabajo, es decir, no hay diferencia significativa de los niveles de IL-1 β en el suero de los animales tratados con veneno de abejas a tres concentraciones diferentes (0.5, 1.0 y 2.0mg/Kg) cuando se compara con los grupos control. Sin embargo, nuestros resultados muestran una tendencia a que los valores más altos de IL-1 correspondan a las dosis más elevadas de veneno.

Este resultado probablemente se refleja en la baja respuesta proliferativa linfocitaria, ya que se sabe que una de las principales funciones de la IL-1 es estimular la proliferación de los linfocitos T, principalmente los T_H1 .^(17, 24) Por otra parte, el discreto aumento de la IL-1 después de administrar el veneno de abeja también guarda relación con la escasa potencia inflamatoria del veneno y, en cierto sentido, explica en parte la falta de efectos adversos en las personas que reciben apiterapia como un tratamiento anti-alérgico y/o anti-inflamatorio.

Por otra parte, nuestros resultados apoyan a los datos obtenidos por *Rekka*⁽⁹⁸⁾ y colaboradores en 1990, quienes encontraron que hay una supresión de la producción de IL-1 *in vitro* causada por el veneno de abejas, además de la reducción de la peroxidación lipídica no enzimática y una probable actividad antioxidante relacionada con actividad anti-inflamatoria del veneno de abejas. Estos resultados no necesariamente son contradictorios. Los datos mencionados por *Rekka* están nuevamente en favor de la utilidad del uso clínico del veneno y sugieren que puede tener otras ventajas (probablemente anti-oxidante) además de

sus comprobados efectos anti-inflamatorios. Si el veneno estimulara la producción de la IL-1 que es una citocina pro-inflamatoria, entonces sería difícil proponer su utilidad como un medicamento alternativo anti-inflamatorio. Sin embargo, es necesario aceptar que las diferencias en los resultados obtenidos por diferentes autores también pueden deberse a toda la diversidad de variables que existan en las diferentes condiciones experimentales en las que se trabaje, por ejemplo: el tipo animales usados en la experimentación, el tipo de polen que toman las abejas de las flores, la estación del año, el origen y la potencia del veneno, el método para extraer las células, el mitógeno, los tiempos de incubación, las pruebas para medir la actividad celular, etc.

Todo lo antes mencionado puede ser importante para tratar de explicar, el efecto anti-inflamatorio del veneno de abejas, ya que como es sabido la IL-1 es una citocina pro-inflamatoria y al encontrar baja su producción, se puede proponer que las inyecciones de veneno de abeja disminuyen lo efectos inflamatorios. Cabe mencionar que también es probable que ese efecto anti-inflamatorio se deba a que se encuentren elevados los niveles de glucocorticoides en el suero de los animales tratados con veneno de abejas como lo han reportado Akdiz y colaboradores ⁽¹⁰⁹⁾, lo que a su vez provoca una inhibición de la síntesis de la IL-1.

Se ha encontrado que los pacientes con artritis reumatoide tienen elevados los niveles de IL-1 y TNF α , los cuales a su vez inducen la síntesis de la proteína estimuladora de fosfolipasa-A2, la cual es un importante mediador de la generación de eicosanoides. Hay que tener en cuenta que se ha demostrado que una fracción purificada del veneno de abejas conocido como melitina incrementa la producción de IL-1 y TNF α de forma dependiente del tiempo y la dosis ⁽¹¹⁰⁾. Los resultados de este estudio demuestran que la síntesis de la proteína estimuladora de fosfolipasa-A2 puede ser inducida por citocinas, pero también esta proteína puede regular la síntesis de citocinas y así perpetuar la respuesta inflamatoria. Por otra parte, no pueden ser los mismos los resultados que se obtienen cuando se

inyecta el veneno completo a los que se obtienen cuando se inyecta solamente una fracción del mismo.

A pesar de todo, algo en lo que coinciden muchos investigadores es que el veneno completo o ciertas fracciones del mismo, tienen un efecto sobre el sistema inmune y en la producción de algunas citocinas.

Nuestros resultados sugieren que hay un incremento importante en la producción de IL-6 en el suero de los animales que fueron tratados con veneno de abejas a una dosis de 0.5mg/Kg. Pero, a pesar de ese incremento significativo en la producción de esta citocina, no hubo un incremento similar cuando se administraron dosis más elevadas del veneno de abejas. No obstante, Kwon de la Universidad Nacional de Seúl en Corea, al utilizar solamente la fracción soluble en agua del veneno de abejas provocó una disminución en los niveles de IL-6 en suero de ratas con artritis reumatoide inducida por el adyuvante de Freund, ⁽²⁹⁾ ya que como es sabido en pacientes con esta enfermedad degenerativa, los niveles de IL-6 se encuentran elevados. Sin embargo tenemos que tomar en cuenta que Kwon utilizó únicamente una parte del veneno de abejas, con la administración de una sola dosis (0.9mg/Kg) vía subcutánea y los niveles de IL-6 fueron determinados después de 3 semanas. Así mismo, es necesario considerar que la IL-6 es una citocina pleiotrópica que en ciertos procesos fisiológicos y/o patológicos puede actuar como una citocina pro-inflamatoria, mientras que en otros su actividad resulta claramente anti-inflamatoria.

Otros investigadores han encontrado elevados los niveles de TNF- α e IL-6 en animales inyectados con veneno de la serpiente *Bathrops jararaca* ⁽⁹⁶⁾ y, en el suero de pacientes picados con el escorpión *Tityus serrulatus*, ⁽¹⁰⁰⁾ encontraron elevados los niveles de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8, sugiriendo que las manifestaciones fisiopatológicas del envenenamiento son mediadas en parte por las citocinas. Pero conviene considerar que también la respuesta anti-veneno del

organismo puede estar mediada por citocinas con efectos antagónicos a las primeras.

Se ha publicado que el veneno de abejas incrementa los niveles de glucocorticoides en humanos ⁽¹⁰⁰⁾, es probable que esto se deba a la IL-6, ya que ella puede actuar como citocina anti-inflamatoria y reducir la producción de otras citocinas pro- inflamatorias, así mismo inducir la producción de glucocorticoides, suprimir la actividad de macrófagos y aumentar la producción de moléculas de adhesión. ⁽⁹⁹⁾ La IL-6 puede actuar directamente sobre el hipotálamo y estimular no solamente los centros que controlan la temperatura corporal sino también los que estimulan una activación del eje hipotalámico-hipofisiario-adrenal. Se han reportado varios trabajos donde se muestra que el veneno de abejas tiene efectos anti-inflamatorios. ^(32 33 34) En el presente trabajo se muestra que la administración del veneno de abejas puede incrementar los niveles de IL-6 en suero, esto podría explicar los efectos anti-inflamatorios que han sido descritos en la apiterapia anti-alérgica y en otras enfermedades crónicas como la artritis reumatoide.

En un estudio realizado por Yianguo y colaboradores ⁽²⁸⁾ se encontró que la administración del veneno de abejas en ratas con artritis inducida por adyuvantes, suprimía significativamente la artritis y la expresión del gen que induce la α -1-glicoproteína ácida (AGP) en la fase aguda hepática debido a la IL-6, IL-1 y el TNF α , lo cual es un ejemplo del mecanismo por el cual el veneno de abejas ejerce su efecto anti-inflamatorio. ⁽²⁸⁾ Además, esos resultados confirman que la respuesta a las inyecciones de veneno de abejas involucran definitivamente la respuesta del sistema inmune.

El incremento de IL-6 después de la administración de veneno de abejas a una dosis baja de 0.5 mg/Kg, durante cuatro semanas, no es una prueba de que el veneno de abejas tenga actividad anti-inflamatoria. Nuestro trabajo no utilizó animales con reacciones inflamatorias. Naturalmente, este resultado únicamente muestra un incremento en los niveles de IL-6. Sin embargo, cuando los animales

se trataron con veneno de abejas a 1.0 y 2.0mg/Kg no se observaron cambios significativos de esta interleucina en comparación con los grupos de animales controles, es decir, los que se trataron con solución salina isotónica y los que no recibieron ningún tratamiento. Este hecho puede significar que el incremento de los niveles de IL-6 depende de que la concentración de la apitoxina tenga un nivel óptimo. Lo mismo podemos pensar cuando proponemos una modulación de la respuesta inflamatoria a través del sistema neuroendócrino. No cualquier dosis es efectiva. Por todo esto pensamos que la importancia de la IL-6 radica en el hecho de que es un potente estimulador de la hipófisis, que a su vez incrementa la síntesis de ACTH que estimula las adrenales y eleva la síntesis de glucocorticoides, los cuales inhiben la expresión de los genes que codifican para la IL-1 e IL-6. Pero no se deben olvidar todas las otras actividades biológicas de esta citocina pleiotrópica. Además, cualquier aumento en los niveles de corticosteroides es un factor que retroalimenta negativamente la producción de IL-6, ya que, al unirse a su receptor y formar un complejo que penetra al núcleo de las células, los glucocorticoides restringen la producción de la IL-6.

A pesar de que no hicimos una evaluación de los perfiles de citocinas de uno u otro tipo de respuestas (T_H1 o T_H2), es importante mencionar que el veneno de abejas puede inducir un cambio en los perfiles de citocinas cambiando la respuesta de T_H2 a T_H1 . Estos cambios en los patrones de citocinas se han mostrado en pacientes alérgicos al veneno de abejas que recibieron apiterapia, lo que sugiere que el veneno de abejas tiene efectos directos sobre las células T. ⁽¹⁰¹⁾ Pero no necesariamente esos cambios en las subpoblaciones de linfocitos T_H implican un cambio paralelo en los índices de linfoproliferación.

La inmunoterapia induce cambios inmunoregulatorios en pacientes alérgicos al veneno de abejas o de avispas, encontrándose incrementos en la IL-10 e $IFN\gamma$, lo que indica que la inmunoterapia induce un rápido cambio en la expresión de citocinas de T_H2 a T_H1 , así como la inducción de la citocina inmunosupresora IL-10, la cual puede ser importante para limitar el daño potencial

producido por las respuestas T_H1 específicas al alérgeno. Los cambios descritos en la expresión de citocinas pueden ser responsables del incremento de IgG4 específicas del antígeno y a disminución de IgE. Altas cantidades del alérgeno administradas durante la inmunoterapia generan preferencialmente citocinas del tipo T_H1 y anticuerpos IgG4 en las células B de memoria. ⁽¹⁰⁴⁾ Investigaciones recientes han demostrado que la supresión de las células T por la IL-10 en procesos activos depende de la expresión y participación de CD28. ^(104, 107)

Una citocina que favorece el tipo de respuesta T_H1 es la IL-12, ya que suprime la respuesta T_H2 incluyendo la síntesis de IgE y que depende a su vez de la IL-4. ⁽¹⁰²⁾ En el presente trabajo no medimos la cantidad de IL-12 en el suero de ratones; sin embargo, recientes experimentos muestran que hay una producción elevada por los macrófagos peritoneales de ratones tratados con veneno de abejas a 1.0 mg/Kg. ⁽⁵⁾ Se sabe que es una citocina anti-inflamatoria y que incluso juega un papel importante en la terapia contra el cáncer. ⁽¹⁰⁸⁾ Estos otros resultados confirman que el veneno de abejas afecta la producción de citocinas y puede por lo tanto influir sobre la evolución de enfermedades con síntomas que dependen de una sobreproducción de algunas clases de citocinas.

En 1996, fue publicado un artículo en donde se midieron los perfiles de citocinas *in vitro* en células mononucleares de sangre periférica utilizando fitohemaglutinina como mitógeno, en pacientes alérgicos al veneno de abejas. Estas personas habían sido previamente tratadas con inmunoterapia alérgeno-específica y en ellas se encontró que la respuesta al alérgeno en los pacientes alérgicos fue predominantemente de naturaleza T_H2 , con niveles altos de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 y niveles bajos de $INF\gamma$, mientras que los pacientes control mostraron una respuesta predominantemente T_H1 con altos niveles de $IFN\gamma$, IL-2 y $TNF\alpha$. ⁽¹⁰³⁾ La producción de IL-6 está relacionada con un tipo de respuesta T_H2 y los resultados de este estudio apoyan este hecho. Sin embargo en otros estudios se ha demostrado que en pacientes alérgicos al veneno de abejas que recibieron

inmunoterapia hay un cambio rápido en el tipo de respuesta hacia T_H1 , pero no fue evaluada la producción de IL-6. ^(101, 104)

En cambio, en un estudio realizado entre apicultores por *Annala* en 1998, ⁽⁴⁰⁾ se encontró que la sensibilización al veneno de abejas y las reacciones sistémicas es común entre ellos, se evaluaron las subpoblaciones de linfocitos de sangre periférica, IgE e IgG. Se encontró que en los apicultores sensibilizados, asintomáticos dominó una respuesta de tipo T_H2 en comparación con los sujetos alérgicos y que las IgG's específicas están correlacionadas directamente con el grado de exposición al veneno de abejas.

Nuestros resultados coinciden parcialmente con algunos estudios realizados, pero no podemos compararlos puesto que todos fueron realizados bajo condiciones experimentales completamente distintas y los patrones de citocinas evaluados no fueron los mismos, ni tampoco los objetivos de cada uno de los trabajos mencionados. Sin embargo todos esos resultados nos sirven como referencia para darnos cuenta de la complejidad de las reacciones inmunológicas y tomarlas en consideración para futuras investigaciones.

Algunos investigadores ^(105, 106) han utilizado únicamente ciertas fracciones del veneno de abejas, por ejemplo la fosfolipasa A2, la cual representa el principal alérgeno del veneno de abejas. *Akdis* y colaboradores en 1988, ⁽¹⁰⁵⁾ realizaron estudios utilizando diferentes variantes conformacionales y estructurales de la fosfolipasa-A2, en individuos que no eran alérgicos, pero que fueron sensibilizados con piquetes del veneno de abejas. Ellos encontraron que la molécula que tiene una estructura tridimensional correctamente plegada mostraba una alta afinidad a los fosfolípidos de la membrana y era reconocida por los anticuerpos de los pacientes alérgicos al piquete de abejas, induciendo una alta producción de IL-4, IL-5 e IL-13 en las células mononucleares de sangre periférica, en contraste con la fosfolipasa-A2 desnaturalizada (no tiene una estructura tridimensional correctamente plegada) que indujo una alta producción de INF γ e IL-2, así como

una mayor respuesta proliferativa. Las células B presentadoras de antígeno solamente reconocen la conformación natural de la fosfolipasa-A2 y estimulan las citocinas de tipo T_H2 e inducen anticuerpos IgE. Así mismo, la fosfolipasa-A2 no plegada es reconocida exclusivamente por los monocitos e inducen predominantemente las citocinas de tipo T_H1 que a su vez inducen la producción de IgG4 por las células B.

De alguna forma la tolerancia inmunológica en la inmunoterapia alérgeno-específica puede ser una consecuencia de la disminución de citocinas de tipo T_H2 o un incremento en las citocinas de tipo T_H1 , mientras que cuando no existe tal tolerancia la respuesta inmunológica es de tipo T_H2 . Aunque en estos últimos estudios mencionados no se han evaluado los niveles de IL-6 e IL-1, sería interesante en el futuro realizar la evaluación y cuantificación de los patrones de citocinas de ambos tipos de respuestas (T_H1 y T_H2) tanto *in vivo* como *in vitro* bajo diferentes condiciones experimentales, los niveles de glucocorticoides, ACTH, prostaglandinas, etc., en animales con artritis reumatoide inducida (o cualquier otra enfermedad inflamatoria) y en animales sanos para poder tener un panorama más amplio de cómo es que el veneno de abejas tiene, tanto efectos inflamatorios como anti-inflamatorios y al mismo tiempo tratar de descifrar los mecanismos por los cuales actúa. Por otro lado, también sería interesante hacer lo mismo pero con cada fracción que compone el veneno de abejas, para saber exactamente cuales son los componentes que, en base a sus efectos biológicos nos puedan servir para buscar análogos que ayuden a combatir este tipo de enfermedades en el humano.

Capítulo VIII

Conclusiones

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

"Hay hombres que luchan un día y son buenos. Hay otros que luchan un año y son mejores. Hay quienes luchan muchos años y son muy buenos. Pero hay los que luchan toda la vida: esos son los imprescindibles"
Bertolt Brecht

*"La moderación es otra de las palabras que les gusta usar a los agentes de la colonia.
Son moderados todos los que tienen miedo o todos los que piensan traicionar de alguna forma.*

El pueblo no es de ninguna manera moderado"
Ernesto "Che" Guevara
Mensaje a las juventudes, 28 de julio de 1960

VIII. CONCLUSIONES

1. Al estandarizar la técnica de la reducción del MTT, los valores óptimos obtenidos en nuestras condiciones de trabajo fueron $5\mu\text{g/mL}$ de Con-A para estimular los linfocitos cultivados y 490nm como longitud de onda para realizar las lecturas colorimétricas.
2. Después que los ratones sanos CD-1, maduros de tres meses de edad fueron inyectados por vía subcutánea con tres dosis diferentes (0.5 , 1.0 y 2.0mg/kg de peso) de veneno de abejas, no hubo cambios significativos en la respuesta proliferativa de los linfocitos esplénicos que fueron estimulados *in vitro* con la Con-A.
3. Tampoco se encontraron diferencias significativas en la concentración de IL-1 en el suero de sangre periférica de ratones sanos CD-1, machos de tres meses de edad, después de la administración subcutánea de veneno de abejas a las dosis mencionadas, cada tercer día durante un mes de tratamiento, cuando se comparan con los niveles de IL-1 evaluados en los grupos de ratones control que no recibieron ningún tratamiento y los que fueron tratados con solución salina isotónica.
4. En cambio cuando se administró el veneno de abejas a una dosis de 0.5 mg/Kg , se encontró que la concentración de la IL-6 incrementó significativamente en el suero de sangre periférica de los ratones mencionados anteriormente, no así cuando administramos veneno de abejas a 1.0 y 2.0 mg/Kg .
5. El resultado anterior sugiere que la administración subcutánea de veneno de abejas puede influir en la producción de citocinas pro-inflamatorias.

Capítulo IX

Bibliografía

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

"Pensar es fácil. Actuar es difícil. Actuar conforme se piensa es lo más complicado."
Goethe

*"El peor analfabeto es el político.
El no ve, no habla, no participa de los acontecimientos políticos.
El no sabe que el costo de vida, el precio del pescado, de la harina, del alquiler, del
calzado o e remedio, dependen de decisiones políticas.
El analfabeto político es tan burro que se enorgullece e hincha el pecho diciendo
que odia la política. No sabe, q̄ imbécil, que de su ignorancia política nace la
prostituta, el menor abandonado, el asaltante y el peor de los bandidos, que es el
político corrupto y lacayo de las empresas nacionales y multinacionales"*
Bertolt Brecht

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Reyes García MG, García Tamayo F. *Venenos para morir y para curar*. Ciencia y Desarrollo 160. Septiembre – Octubre (2001) 67-73.
2. López Valdez HE. *Uso potencial del Veneno de abeja (Apis Mellifera) en la Terapéutica Médica*. 1992. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria. UNAM
3. Rosendo E, Olivé B. *Cuaderno Didáctico "Etnobotánica: Apicultura" con la colaboración de Agustín Arias (apicultor)*, Universidad de Alcalá, otoño, 1999. I.S.S.N. 1135-7274.
4. Burton M, Burton R. *Enciclopedia de la vida animal*. Tomo I. Bruguera Mexicana de Ediciones, S.A. México, 1979. Pág. 10-13.
5. Reyes García MG. *Efecto del veneno de abejas sobre el sistema inmune de ratones con diferentes edades*. 2001. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM
6. Slater TF, Sawyer B, Stráuli U. *Studies on succinate-tetrazolium reductase systems III. Points of coupling of four different tetrazolium salts*. Biochimica et Biophysica Acta, 77 (1963) 383-393
7. Kim MH, Christopher, Bee Informed, J of the American Apiteraphy Society (autumn issue, 1997)
8. Green LM, Reade JL, Ware CF, *Rapid Colorimetric Assay for Cell Viability: Application to the Quantitation of Cytotoxic and Growth Inhibitory Lymphokines*. Journal of Immunological Methods. 70 (1984) 257 – 268.
9. Carmichael J, Mitchell JB, DeGraff WG. *Chemosensitivity testing of human lung cancer cell lines using the MTT assay*. Br J Cancer. 1998 Jun;57 (6):540-7
10. Sargent JM, Taylor CG. *Appraisal of the MTT assay as a rapid test of chemosensitivity in acute myeloid leukaemia*. Br J Cancer 1989 Aug; 60(2):206-10

11. Altman FP. **Tetrazolium salts and formazans**. Prog. Histochem Cytochem 1976; 9:1-56
12. **Tetrazolium Salts – highly sensitive colour indicators of enzymatic redox reactions**.
http://www.serva.de/products/latest/tetrazolium_shtml
13. Espinosa E, Bermúdez RF. **Relación conductiva – inmunidad: el papel de las citocinas**. Revista de Investigación Clínica 2001; 53(3): 240 – 253.
14. Abbas AK. **Inmunología Celular y Molecular**. Tercera edición. Ed. Interamericana Mc. Graw Hill. España, 1999. Pág. 4-15, 17-35, 124, 276-277,299-308
15. De Zubiría E, **Citocinas y Asma**. Revisión de temas. Unidad de Inmunología y Alergia. Hospital Universitario de la Samaritana. Bogotá Colombia.
16. Iáñez PE. **Curso de Inmunología General**. Departamento de Microbiología. Universidad de Granada, España.
<http://www.ugr.es/~eianez/inmuno/Programa97.htm>
17. García TF, **Introducción a la Inmunología**. Departamento de Biología Celular, Facultad de Química, UNAM. 2000
<http://depa.pquim.unam.mx/inmuno/entrada.html>
18. Woods SL. **How the Immune System Works**. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health. No. 92-3229 (June 1992)
19. Stites DP, Stobo JD. **Inmunología básica y clínica**. Sexta edición. El Manual Moderno. México 1988, Pág. 1-10
20. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW. **Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins**. J Immunol 1986; 136: 2348-57
21. Wildbaum G, Netzer N, Karin N. **Plasmid DNA Encoding IFN- γ -Inducible Protein 10 Redirects Antigen-Specific T cell polarization and Suppresses Experimental Autoimmune Encephalomyelitis**. The Journal of Immunology, 2002, 168: 5885-5892.

22. Salomon I, Netzer N, Wildbaum G. **Targeting the Function of INF- γ -Inducible Protein 10 Suppresses Ongoing Adjuvant Arthritis**. The Journal of Immunology, 2002, 169: 2685-2693.
23. Constant SL, Bottomly K, **Induction of TH1 and TH2 CD4+T cell Responses: The Alternative Approaches**. Annual Reviews Immunology. 1997, 15:297-322.
24. Roit I, Brostoff J, Male D. *Inmunología*. Ed. Harcourt Brace. Cuarta edición España 1997. Pág. 2.9-2.10, 8.4-8.16, 9.1-9.14
25. Nieto GA. **Alergia e Infección**. Alergol. Inmunol. Clin 2000; 15 (Núm. 2) 109-112.
26. Kwon YB, Lee HJ, Mar WC. **The water-soluble fraction of bee venom produces antinociceptive and anti-inflammatory effects on rheumatoid arthritis in rats**. Life Science, 2002 May 31; 71(2):191-204.
27. Know YB, Kim HW, Ham TW. **The anti-inflammatory effect of bee venom stimulation in a mouse air pouch model is mediated by adrenal medullary activity**. Journal of Neuroendocrinology, 2003 January; 15 (1):93-96.
28. Yiangou M, Kondaris C, Victoratos P. **Modulation of alpha 1-acid glycoprotein (AGP) gene induction following honey bee venom administration to adjuvant arthritic (AA) rats; possible role of AGP on AA development**. Clin Exp Immunol Oct; 1994(1): 156-62.
29. Somerfield SD, Stach JL, Mraz C. **Bee venom mellitin blocks neutrophil O₂ + production**. Inflammation. 1986 Jun; 10(2). 175-82.
30. Ribardo DA, Kuhl KR, Peterson JW. **Role of mellitin-like region within phospholipase A(2) - activating protein in biological function**. Toxicon 2002 May; 40(5):519-26.
31. Koburova KL, Michailova SG, Shkenderov SV. **Further investigation on the anti-inflammatory properties of adolapin-bee venom polypeptide**. Acta Physiol Pharmacol Bulg. 1985; 11(2):50-5.
32. Shkenderov S, Kaburova K. **Adolapin - a newly isolated analgetic and anti-inflammatory polypeptide from bee venom**. Toxicon 1982; 20(1): 317-21.

33. Kang SS, Pak SC, Choi SH. *The effect of whole bee venom on arthritis*. Am J Chin Med. 2002; 30(1):73-80
34. Kwon YB, Kang MS, Kim HW. *Antinociceptive effects of bee venom acupuncture (apipuncture) in rodent animal models: a comparative study of acupoint versus non-acupoint stimulation*. Acupunct Electrother Res 2001; 26(1-2):59-68.
35. Rekka E, Kourounakis L, Kourounakis P. *Antioxidant activity of and interleukin production affected by honey bee venom*. Arzneimittelforschung. 1990 Aug; 40(8):912-3.
36. Buku A, Blandina P, Gazis D. *Solid phase synthesis and biological activity of mast cell degranulating (MCD) peptide: a component of bee venom*. Int J Pept Protein Res, 1989 Feb; 33(2):86-93.
37. Banks BE, Dempsey CE, Vernon CA. *Anti-inflammatory activity of bee venom peptide 401 (mast cell degranulating peptide) and compound 48/80 results from mast degranulation in vivo*. BR J Pharmacol, 1990 Feb; 99(2):350-4.
38. Martin W, Hartter P. *Structure-activity studies on the anti-inflammatory effects of derivatives and fragments of the MCD-peptide*. Hoppe Seylers Z Physiol Chem 1980 Apr; 361(4):525-35.
39. Ziai MR, Russek S, Wang HC. *Mast cell degranulating peptide: a multifunctional neurotoxin*. J Pharm Pharmacol 1990 Jul; 42(7):457-61. Review, Tutorials.
40. Annala I, Hurme M, Miettinen A. *Lymphocyte subpopulations, cytokine release and specific immunoglobulin G in reactive and nonreactive beekeepers*. J Investig Allergol Clin Immunol 1998 Mar-Apr, (8):109-14.
41. Koburova KL, Michailova SG, Shkenderov SV. *Antipyretic effect of a polypeptide from bee venom – adolapin*. Eksp Med Morfol 1984, 23(3):143-8.
42. Petricevich VL, Teixeira CF, Tambourgi DV. *Increments in serum and nitric oxide levels in mice injected with Bathrops asper and Bothrops jararaca snake venoms*. Toxicon 2000 Sep; 38(9):1253-66.

43. Brooks R Jr, Vick JA, Shipman WH. **Beta adrenergic and anti-arrhythmic effects of cardipep, a newly isolated substance from whole bee venom.** Toxicon 1974 Mar, 12(2): 139-44.
44. Gmachl M, Kreil G. **Bee venom hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm.** Proc Nat Acad Sci USA 1993 Apr 15; 90(8):3569-73.
45. Binder M, Fierlbeck G, King T. **Individual hymenoptera venom compounds induce upregulation of the basophil activation marker ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 (CD203c) in sensitized patients.** Int Arch Allergy Immunol 2002 Oct; 129(2):160-8.
46. Habermann E. **Neurotoxicity of apamin and MCD peptide upon central application.** Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1977 Nov, 10;300(2):189-91
47. Renaud JF, Desnuelle C, Schmid-Antomarchi H. **Expression of apamin receptor in muscles of patients with myotonic muscular dystrophy.** Nature 1986 Feb 20-26; 319(6055):678-80.
48. Dale TJ, Cryan JE, Chen MX. **Partial apamin sensitivity of human small conductance Ca(2+)-activated K(+) channels stably expressed in Chinese hamster ovary cells.** Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2002 Nov; 366(5):470-7.
49. Moreira LA, Ito J, Ghosh A. **Bee venom phospholipase inhibits malaria parasite development in transgenic mosquitoes.** J Biol Chem, 2002 Oct 25; 277(43):40839-43.
50. Deregnacourt C, Schr vel J. **Bee venom Phospholipase A2 induces Stage-specific growth arrest of the Intraerythrocytic Plasmodium falciparum via Modifications of human serum components.** J. Biol Chem, Vol 275, Issue 51, 39973-39980, December 22, 2002.
51. Han HJ, Park SH, Lee JH. **Involvement of stress in bee venom-induced inhibition of Na+/glucose cotransporter in renal proximal tubule cells.** Clin Exp Pharmacol Physiol, 2002 Jul; 29(7):564-8.

52. Fernard D, Lambeau G, MAurin T. **A peptide derived from bee venom-secreted phospholipase A2 inhibits replication of T-cell tropic HIV-1 strains via interaction with the CXCR4 chemokine receptor.** Mol Pharmacol 2001 Aug; 60(2):341-7.
53. Zhao M, Brunk UT, Eaton JW. **Delayed oxidant-induced cell death involves activation of phospholipase A2.** FEBS Lett 2001 Dec, 14; 509(3):399-404.
54. Blondelle SE, Houghten RA. **Hemolytic and antimicrobial activities of the twenty-four individual omission analogues of melittin.** Biochemistry 1991 May 14; 30(19):4671-8
55. Lazarev VN, Parfenova TM. **Induced expression of melittin, an antimicrobial, inhibits infection by Clamydia trachomatis and Mycoplasma hominis in a HeLa cell line.** Int J Antimicrob Agents 2002 Feb; 19(2):133-7
56. Lubke LL, Garon CF. **The antimicrobial agent melittin exhibits powerful in vitro inhibitory effects on the Lyme disease spirochete.** Clin Infect Dis. 1997 Jul; 25 Suppl 1:s48-51
57. Yang S, Carrasquer G. **Effect of melittin on ion transport across cell membranes.** Zhonggou Yao Li Xue Bao. 1997 Jan; 18(1):3-5
58. Rudenko SV, Bojok GA, Nipot EE. **Bee venom-induced shrinkage of erythrocyte ghosts.** Biochemistry (Mosc) 1997 Jan; 62(1):104-9.
59. Ownby CL, Powell JR, Jaing MS. **Melitin and phospholipase A2 from bee (Apis mellifera) venom cause necrosis of murine skeletal muscle in vivo.** Toxicol 1997 Jan; 35(1):67-80.
60. Ribardo DA, Crowe SE, Kuhl KR. **Prostaglandin levels in stimulated macrophages are controlled by phospholipase A2-activating protein and by activation of phospholipase C and D.** J Biol Chem 2001 Feb 23;276(8):5467-75.
61. Rizzo Mt, Nguyen E, Aldo-Benson M. **Secreted phospholipase A2 induces vascular endothelial cell migration.** Blood 2000 Dec 1; 96(12):3809-15.
62. Cherubini E, Ben Ari Y, Gho M. **Long-term potentiation of synaptic transmission in the hippocampus induced by a bee venom peptide.** Nature 1987 Jul 2-8; 328(6125):70-3.

63. Neumann R, Ari YB, Cherubini E. *Cell Degranulating peptide increases the frequency of spontaneous miniature postsynaptic currents in CA3 rat hippocampal neurons*. Eur J Neurosci 1991 Jun; 3(6):523-530.
64. J.M Martínez – Martos, M.J. Ramírez – Expósito. *Las neurotoxinas naturales como herramientas farmacológicas para el estudio del sistema nervioso central*. Rev Neurol 1998; 26(152):584-591.
65. Burton M, Robert Burton R. *Enciclopedia de la vida animal*. Tomo 15. Bruguera Mexicana de Ediciones, S.A. México, 1979:2252-2253.
66. Tay ZJ, Díaz SJG. *Serpientes y Reptiles de importancia médica en México*. Departamento de Parasitología y microbiología, Laboratorio de Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.
67. Burton M, Burton R. *Enciclopedia de la vida animal*. Tomo 7. Bruguera Mexicana de Ediciones, S.A. México, 1979:965-967
68. Azhitskii G, Azhitskii DG. *Development of a highly efficient method for separating bee venom components*. Ukr Biokhim Zh 1993 Jul-Aug; 65(4):7-11.
69. Han HJ, Yoon BC, Oh YJ. *The water-soluble fraction (<10 KD) of Bee venom (Apis mellifera) produces inhibitory effect on apical transporters in renal proximal tubule cells*. Kidney Blood Press Res. 2002; 25(6):375-383.
70. Fredholm B. *Studies on a mast cell degranulating factor in bee venom*. Biochem Pharmacol 1966 Dec; 15(12): 2037-43.
71. Schkenderov S. *A protease inhibitor in bee venom. Identification, partial purification and some properties*. FEBS Lett 1973 Jul 15; 33(3):343-7
72. Gaudie J, Hanson JM, Rumjanek FD. *The peptide components of bee venom*. Eur J Biochem 1976 Jan 15; 61(2):369-76.
73. Nelson DA, O'Connor R. *The venom of the honeybee (Apis mellifera) free amino acids and peptides*. Can J Biochem 1968 Oct; 46(10):1221-6.
74. Lowy PH, Sarmiento L, Mitchell HK. *Polypeptides minimize and melittin from bee venom. Effects on Drosophila*. Arch Biochem Biophys. 1971 Jul; 145(1):338-43.

75. Hebermann E, Reiz KG. *[On the biochemistry of bee venom peptides, melittin and apamin]* Biochem Z. 1965 Nov 15; 343(2):192-203. German.
76. Shkenderov S, Todorov S. *[Effect of bee venom and its low- and high-molecular fractions on embryogenesis in rats]* Eksp Med Morfol 1979; 18(3):160-5. Bulgarian
77. Owen MD, Bridges AR. *Catecholamines in honey bee (Apis mellifera L.) and various vespid (Hymenoptera) venoms.* Toxicon. 1982; 20(6):1075-84.
78. Habermann E, Cheng-Raude D. *Central neurotoxicity of apamin, crotamin, phospholipase A and alpha-amanitin.* Toxicon 1975 Dec; 13(6):465-73.
79. De Lima PRM, Brochetto-Braga MR, Chaud-Netto J. *Proteolytic activity of Africanized honeybee (Apis mellifera: hymenoptera, apidae) venom.* J Venom Anim Toxins V.6 N.1 Botucatu 2000.
80. Da Silva RJ, Fechio D, Barraviera B. *Antitumor effect of snake venoms.* J Venom Anim Toxins V. 2 N. 2 Botucatu 1996.
81. Bonfanti-Almeda JC, Gobbi N, Palma MS. *Bioinsecticide action of the venom of africanized bees Apis mellifera Linnaeus 1758 (Hymenoptera: Apidae): I – The most susceptible age of Diatraea saccharalis Fabricius 1794. (Lepeltier: Pyralidae) eggs to the venom action.* J Venom Anim. Toxins V. 2 N. 1 Botucatu 1996.
82. Lipps BV. *Sub-lethal injection of honeybee venom decreased the levels of endogenously present substances in organs of mice.* J Venom Anim. Toxins V. 8 N. 2 Botucatu 2002.
83. Funari RC, Zeidler PR, Rocha HC. *Venom production by Africanized honeybees (Apis mellifera) and Africanized-European hybrids.* J Venom Anim Toxins V. 7 N. 2 Botucatu Dic. 2001.
84. Schumacher MJ, Schmidt JO, Egen NB. *Biochemical variability of venoms from individual European and Africanized honeybees.* J Allergy Clin Immunol., 1992. 90. 59-65.
85. Ovcharov R, Shkenderov S, Mikhailova S. *[The effect of apamine on the inflammatory process]* Eksp Med Morfol 1975; 14(1):1-6. Bulgarian

86. Liu X, Chen D, Xie L. *Effect of honey bee venom on proliferation of K1735M2 mouse melanoma cells in-vitro and growth of murine B16 melanomas in-vivo*. J Pharm Pharmacol. 2002 Aug; 54(8):1083-9.
87. Heeg K, Reimann J, Kabelitz D. *A rapid colorimetric assay for determination of IL-2 producing helper T cell frequencies*. J Immunol Methods 1985 Mar 18; 77(2):237-46
88. Gerlier D, Thomasset N. *Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation*. J Immunol Methods 1986 Nov 20; 94(1-2):57-63.
89. Berridge MV, Tan AS. *Characterization of the cellular reduction of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction*. Arch Biochem Biophys 1993 Jun; 303(2):474-82.
90. Liu Y, Peterson DA, Kimura H. *Mechanism of Cellular 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction*. Journal of Neurochemistry. 1997 Vol. 59(2): 581-593.
91. Shearman MS, Hawtin SR, Tailor VJ. *The intracellular component of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction is specifically inhibited by beta-amyloid peptides*. J Neurochem 1995 Jul; 65(1):218-27.
92. Vistica DT, Skehan P, Scudeiro D. *Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production*. Cancer Res 1991 May 15;51 (10):2515-20.
93. Nikkhah G, Tonn JC, Hoffmann O. *The MTT assay for chemosensitivity testing of human tumors of central nervous system. Part I: Evaluation of test-specific variables*. J Neurooncol 1992 May 13(1):1-11.
94. Jay LD. *Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias*. Quinta edición. Editorial. Thomson Learning. México 2001.
95. Hyre HM, Smith RA. *Immunological effects of bee (Apis mellifera) venom using BALB/c mice*. Toxicon 1986; 24(5): 435-40.

96. Lomnitzer R, Rabson AR. *Lack of responsiveness of beekeeper mononuclear cells to in vitro stimulation with pure bee venom*. J Allergy Clin Immunol 1986 Jul; 78(1 pt 1):25-30.
97. Hadjipetrou-Kouronakis L, Yiangou M. *Bee venom, adjuvant induced disease and interleukin production*. J. Rheumatol 1988 Jul; 15(7):1126-8.
98. Rekkas E, Kourounakis L, Kourounakis P. *Antioxidant activity of interleukin production affected by honey bee venom*. Arzneimittelforschung 1990 Aug; 40(8):912-3.
99. Zamuner SR, Teixeira CF. *Cell adhesion molecules involved in the leukocyte recruitment induced by venom of the snake Bothrops jararaca*. Mediators Inflamm 2002 Dec; 11(6):351-7.
100. Fukuhara YD, Reis ML, Dellalibera-Joviliano R. *Increased plasma levels of IL-1beta, IL-6, IL-8 and TNF-alpha in patients moderately or severely envenomed by Tityus serrulatus scorpion sting*. Toxicon 2003 Jan; 41(1):49-55.
101. McHugh SM, Deighton J, Stewart AG. *Bee venom immunotherapy induces a shift in cytokine responses from TH2 to a TH1 dominant pattern: comparison of rush and conventional immunotherapy*. Clin Exp Allergy 1995 Sep; 25(9):828-38.
102. Germann T, Guckes S, Bongartz M. *Administration of IL-12 during ongoing immune responses fails to permanently suppress and can even enhance the synthesis of antigen-specific IgE*. Int Immunol 1995 Oct; 7(10):1649-57.
103. McHugh S, Deighton J, Rifkin I. *Kinetics and functional implications of TH1 and TH2 cytokine following activation of peripheral blood mononuclear cells in primary culture*. Eur J Immunol 1996 Jun; 26(6):1260-5.
104. Bellinghausen I, Metz G, Enk AH. *Insect venom immunotherapy induces interleukin-10 production and a TH1 to TH2 shift, and changes surface marker expression in venom-allergic subjects*. Eur J Immunol 1997 May; 27(5):1131-9

105. Akdis CA, Blesken T, Wymann D. *Differential regulation of human T cell cytokine patterns and IgE and IgG4 responses by conformational antigen variants*. Eur J Immunol 1998 Mar, 28(3):914-25.
106. Von Garnier C, Astori M, Kettner A. *Allergen-derived long peptide immunotherapy down-regulates specific IgE response and protects from anaphylaxis*. Eur J Immunol 2000 Jun, 30(6):1638-45.
107. Blaser K, Akdis CA, Faith A. *Differential regulation of allergen-specific antibodies in allergy and specific immunotherapy*. Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frank A M 1999;(93):243-51; discussion 252.
108. Brunda MJ, Gately MK. *Interleukin-12: potential role in cancer therapy*. Important Adv Oncol 1995, 3-18.
109. Akdis CA, Blesken T, Akdis M. *Glucocorticoids inhibit human antigen-specific and enhance total IgE and IgG4 production due to differential effects on T and B cells in vitro*. Eur J Immunol 1997 Sep; 27(9):2351-7.
110. Bomalaski JS, Ford T, Hudson AP. *Phospholipase A2-activating protein induces the synthesis of IL-1 and TNF in human monocytes*. J Immunol 1995 Apr 15; 154(8):4027-31.
111. Schmidt JO. *Toxicology of venoms from the honey bee genus Apis*. Toxicon 1995, 33:917.

Preparación de soluciones y reactivos

...por que la universidad es eso, un universo de pensamientos que aprenden a convivir, que no a sucumbir, sino con otros...

...No vendré yo a decirles lo que significa llevar ese nombre sobre el pecho. Ustedes lo saben bien porque lo llevan con dignidad. Ese escudo, no es sólo la pertenencia a una casa de estudios superiores, es también una marca que provocara orgullo o vergüenza en quien lo porta, dependiendo del lugar que en el mañana se ocupe. Nosotros quienes somos el color de la tierra, pensamos que la mejor forma de asomarse al mañana es mirando hacia abajo. Nuestros más antiguos nos enseñaron que la verdad suele buscar su nido pegado al suelo, y que la mentira busca las alturas para así saberse impune y poderosa. En la tierra que crece hacia arriba, arriba está el poder del dinero y abajo está quien sobre su espalda sostiene las torres y sin embargo, debe conformarse con recoger las sobras y las basuras que de lo alto vienen. Abajo está el que somos color de la tierra, el indígena, el obrero, el campesino, el empleado, el maestro, el estudiante, el ama de casa, el colono, el intelectual, el artista, el religioso, el homosexual, la lesbiana, el desempleado, el joven, el hombre, la mujer, el anciano, el niño...

...A los estudiantes y estudiantas queremos pedirles que estudien y luchén. Que sin dejar de luchar terminen sus estudios. Que se vayan de la universidad, que no se queden en ella, con todo y ser universal, es limitada. Que allá afuera hay también otro universo y son necesarios y necesarias ahí para que luchén ahí. Que allá afuera estamos nosotros y muchos otros como nosotros, que con nosotros tienen un lugar y no un número. Que no hagan de la juventud que tienen el pretexto para intentar hegemonizar y homogenizar al otro alumno, al otro profesor, al otro trabajador, al otro diferente.

A los profesores y profesoras, a los investigadores e investigadoras: Les queremos pedir que enseñen a aprender. Que vean y enseñen a ver todo, incluyéndonos a nosotros, con espíritu crítico y científico. Que enseñen y se enseñen a ver al otro, porque verlo es respetarlo, y respetar al otro es respetarse a uno mismo. Que no permitan que su trabajo de docencia e investigación sea tazado según la lógica mercantil, donde importa el volumen de cuartillas y no los conocimientos que se producen, donde sólo vale la firma al pie del desplegado en apoyo al señor rector, donde el criterio para que un proyecto tenga presupuesto es el número de horas invertido en audiencias y cortejos a funcionarios grises y analfabetas. Que no hagan del saber un poder que pretenda hegemonizar y homogeneizar al otro profesor, al otro investigador, al otro alumno, al otro trabajador.

A los trabajadores y trabajadoras: Queremos pedirles que recuerden que ustedes escribieron antes páginas gloriosas en la lucha por mejores condiciones laborales. Que no olviden que fueron ejemplo de solidaridad con las causas justas en México y en el mundo. Que, ustedes lo saben mejor que nosotros, hagan memoria y vean que el libro de su historia no ha llegado a la página final todavía.

A todos los universitarios y universitarias: Que nunca dejen de mirar hacia abajo, que no dejen de buscar un niño, que no dejen de buscar ni de encontrar un mañana que, como tal, será colectivo o no será...

Fragments del discurso del subcomandante Marcos en la UNAM el 21 de marzo de 2001. (24)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

X. SOLUCIONES Y REACTIVOS

- **Solución hemolizante**

Solución A:

| | |
|---------------------------------|-------|
| NH ₄ Cl (0.16M)..... | 0.83g |
| H ₂ O destilada..... | 100mL |

Solución B:

| | |
|---------------------------------|-------|
| Tris Base (0.17M)..... | 2.06g |
| H ₂ O destilada..... | 100mL |

Tomar 8 partes de la solución A y mezclarlas con 2 partes de la solución B.

Ajustar el pH a 7.2 – 7.4

Esterilizar por filtración con membrana y guardar a 2-8 °C hasta su uso.

- **Solución de veneno de abejas**

| | |
|---|-------|
| Veneno de abejas liofilizado (<i>Sigma- Aldrich</i>)..... | 2.0mg |
| Solución salina isotónica, estéril..... | 5.0mL |

La solución se filtra a través de una membrana de nylon estéril, con poro de 0.22µm en una campana de flujo laminar y se guarda en alícuotas de 1.0mL en tubos eppendorff estériles a -20°C hasta su uso.

- **Solución salina isotónica**

| | |
|---------------------------------|-------|
| NaCl (<i>Baker</i>)..... | 0.85g |
| H ₂ O destilada..... | 100mL |

Esterilizar por filtración con una membrana con poro de 0.22µm y guardar a 2-8 °C hasta su uso.

- **Medio de cultivo suplementado**

| | |
|---|---------|
| Suero bovino fetal (<i>Gibco</i>)..... | 10.0 mL |
| (Inactivado a 56°C, durante 30 minutos) | |
| Amortiguador HEPES (<i>Gibco</i>)..... | 0.5mL |
| Aminoácidos no esenciales (<i>Gibco</i>)..... | 1.0mL |
| Antibióticos (<i>Gibco</i>)..... | 1.0mL |
| (Penicilina G sódica 10, 000U/mL sulfato de 10, 000µg/mL y anfotericina B 25 µg/mL) | |

Agregar todo lo anterior a 87.5mL de medio de cultivo RPMI 1640 con rojo de fenol y glutamina (*Gibco*), bajo condiciones de esterilidad.

- **Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 10X**

| | |
|--|---------|
| Na ₂ HPO ₄ | 2.1689g |
| NaH ₂ PO ₄ | 0.2645g |
| NaCl..... | 9.0000g |
| H ₂ O destilada..... | 1L |

Ajustar el pH a 7.2 – 7.4

Esterilizar por filtración con una membrana con poro de 0.22µm y guardar a 2-8 °C hasta su uso.

- **Solución del MTT**

Bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5 difeniltetrazolio (MTT).....5.0mg

El MTT se disuelve en 1.0mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 10X, para obtener una concentración de 5mg/mL. Para esterilizar, se pasa a través de una membrana de 0.22µm y se guarda en un tubo eppendorff protegido de la luz con papel aluminio a 2-8°C hasta su uso.

- **Solución del mitógeno Con-A**

Concanavalina A.....5.0mg

(*Canavalia ensiformis*)

Medio RPMI suplementado, estéril.....5.0mL

Esterilizar por filtración con una membrana con poro de 0.22µm, vaciar en tubos eppendorff estériles en alícuotas de 0.5mL y guardar en congelación a -20 °C hasta su uso.

- **Solución de PBS/BSA al 1% con Tween-20 (PBS/BSA/Tween)**

Albúmina sérica bovina.....1.0g

Tween-20(0.5%).....0.5mL

PBS estéril pH = 7.2 - 7.4.....100mL

Preparar el día de su uso y mantener a 2-8 °C.

- **Solución PBS/BSA al 3%**

Albúmina sérica bovina.....3.0g

PBS estéril pH = 7.2 - 7.4.....100mL

Preparar el día de su uso y mantener a 2-8 °C.

Citocinas recombinantes y anticuerpos monoclonales para ELISA.

La IL-1 se determinó utilizando como anticuerpo de captura un anticuerpo policlonal específico para IL-1 β de ratón (PART 890407, R&D Systems, Minneapolis) y 100mL un anticuerpo policlonal específico conjugado concentrado (PART 890000, R&D Systems, Minneapolis) contra IL-1 β de ratón para la detección y para la curva estándar se utilizó IL-1 β recombinante (PART 890256, R&D Systems, Minneapolis), la cual se reconstituye con 5mL de un diluyente calibrado (RD5T). Se hacen diluciones seriadas desde 500pg/mL hasta 7.8pg/mL.

La IL-6 se midió utilizando como anticuerpo de captura, 2 μ g/mL del anticuerpo de rata (mAb) IgG1 (MP5-20F3, PharMingen, San Diego California) y como anticuerpo de detección 1mg/mL del mAb IgG2a de rata biotinilado (MP5-32C11, PharMingen, San Diego California) ambos dirigidos contra IL-6 de ratón. La IL-6 recombinante de ratón (19252V, PharMingen, San Diego California) fue usada para obtener la curva estándar en diluciones seriadas 2X, desde 2000 hasta 15pg/mL.