

104  
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**ANALISIS INMUNOQUIMICO DEL VENENO DE ABEJA**

**Apis mellifera mellifera**

T E S I S

Que para obtener el título de

**B I O L O G O**

PRESENTA

**OSCAR LEYVA LOPEZ**

México, D.F.

1991.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## **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 está 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.

# I N T R O D U C C I O N

La abeja europea es originaria de zonas templadas con estaciones climáticas bien definidas durante el año, hecho que le ha conferido su característica de almacenamiento de miel para sobrevivir durante los rigores del invierno, además de su poca tendencia a enjambrar y relativa mansedumbre que facilita su manejo. Estas cualidades han sido inducidas a través de la selección que por siglos se ha venido realizando de manera natural y artificial.

Las abejas reinas presentan una longitud promedio de 17.38 mm, son abejas de color pardo oscuro, con abdomen amarillo naranja claro, emergen de sus celdas en 1-6 días como promedio. Se aparean con los zánganos en un promedio de 5 a 6 veces durante uno o más vuelos nupciales, los apareamientos se realizan con más frecuencia entre las 12 y 15 horas. Los zánganos presentan su abdomen color pardo oscuro con franjas amarillas cubierto de pelo amarillo claro, su tamaño puede ser de 15.63 mm o más, de cuerpo abultado, tienen ojos muy grandes y carecen de aguijón, su trabajo es fecundar a la reina en el vuelo nupcial.

Las abejas obreras, presentan comúnmente su abdomen de color pardo oscuro, con dos a cuatro franjas amarillas cubiertas con pelo amarillo claro y terminando en punta redondeada, las alas se mantienen replegadas junto al abdomen, y en general se desarrollan en 21 días.

En el mundo existen otros dos grandes tipos geográficos de abejas; las asiáticas y las africanas. Las abejas del Centro Sur del Continente Africano, especialmente la denominada Apis mellifera scutellata (adansonii, según otros autores) han sido destruidas durante milenios por numerosos enemigos naturales, incluyendo al hombre.

Entre las características que más diferencian a las abejas reinas africanas de las europeas, está la asombrosa capacidad de reproducción, es decir, llegan a ovopositar más de 2000 huevos diarios y frecuentemente llenan con cría todo el panal.

Los núcleos tienen prácticamente todos los panales llenos de cría, aunque tengan pocas abejas y miel. Las abejas reinas africanas llegan a medir 16.5 mm de longitud, es decir, 5% menos que las europeas y con un peso promedio al nacer de 196.26 mg y en postura unos 240 mg. Estas abejas reinas se aparean con los zánganos en un promedio de 7 a 8 veces durante el vuelo nupcial y lo realizan con más frecuencia entre las 14 y 17 horas.

Los zánganos presentan el abdomen de color pardo oscuro, pelo amarillo claro y miden aproximadamente de 14 a 15 mm. Las abejas obreras africanas tienen un promedio de desarrollo en celda de 19 días y llegan a vivir de 30 a 36 días, presentan un

color muy semejante al de la europea, generalmente las franjas amarillas son más oscuras, llegan a medir hasta 13 mm con un peso de 60 a 90 mg, el abdomen termina en punta redondeado, las alas están replegadas, pero ligeramente abiertas y levantadas (1, 2).

Si bien no existen diferencias morfológicas importantes entre la abeja europea y la africana, si hay diferencias muy importantes en cuanto al comportamiento de las colonias. La abeja africana tiene una tendencia a reproducirse mediante numerosos enjambres, así mismo se adapta fácilmente a diversas condiciones geográficas y climáticas y cuando son atacadas presentan alta capacidad de defensa.

#### **Ingreso de las abejas africanas en América**

La abeja africana fue traída de Tanzania y República del Sur Africa en 1956 por el genetista, Warwick Estévan Kerr cuando el Ministerio de Agricultura de Brasil, decidió importar abejas reinas. El objetivo de ésto era utilizar las abejas reinas en un programa de mejoramiento genético, en el que se cruzarían las abejas africanas con las europeas, para de esta manera eliminar las características indeseables de las abejas africanas como son: la tendencia continua de enjambrar, abandono, defensividad; así como las desventajas de la abejas europeas como es la poca adaptabilidad al medio ambiente, especialmente en las regiones húmedas y calientes de Brasil.

En teoría, la idea parecía buena, desafortunadamente un año más tarde (1957), 26 abejas reinas con sus enjambres que se

encontraban en un criadero experimental fueron liberadas accidentalmente. A partir de este momento las colonias de Apis mellifera scutellata

Demostraron estar perfectamente adaptadas al medio neotropical, e iniciaron un crecimiento explosivo que las llevó a desplazar, para mediados de los años sesenta, a cualquier colonia de abeja europea en Brasil. (3)

Desafortunadamente, al mismo tiempo que la abeja africana llevada a Brasil demostraba su capacidad reproductiva, continuaba manteniendo sus características negativas y su comportamiento migratorio, dispersándose rápidamente por Paraguay, Bolivia, Uruguay, alcanzando su límite climático en Argentina y teniendo al oeste la barrera física y climática de los Andes, la abeja africana alcanzó las Guayanas a principios de los setenta, e invadió Venezuela en 1979 y Colombia en 1981.

### **Dispersión de las abejas africanas en Centroamérica (3)**

Al continuar su avance migratorio constante, las abejas africanas emigraron por el Estrecho de Darien, ingresando a Panamá en marzo de 1982, posteriormente la abeja africana fue detectada en la zona sur de Costa Rica en 1983, avanzando por todo el litoral Pacífico y Atlántico, en 1984 ingresó a Nicaragua, a mediados de 1985 penetró en el sur de Honduras, llegando en el mismo año a El Salvador, y encontrándose en mayo de 1986 en Guatemala.

Durante su dispersión la abeja africana se ha cruzado ampliamente con las abejas de origen europeo produciéndose una

población híbrida, la llamada africanizada; este híbrido ha mantenido las características negativas y el comportamiento migratorio característico de la abeja africana. Actualmente ha reemplazado a las abejas europeas en la mayor parte del Continente Americano. En el avance de la abeja africanizada se ha observado que éstas se han detenido en aquellas regiones cuyas temperaturas son bajas, siendo su dispersión más lenta en las regiones de clima tropical húmedo. Cabe señalar que su velocidad de avance ha sido rápida en regiones que sufren sequías prolongadas.

#### **Pronósticos de dispersión en México**

Actualmente se ha detectado la presencia de la abeja africanizada en la fronteras del estado de Chiapas y en el Istmo en el estado de Oaxaca, sin embargo, de acuerdo a la trayectoria que ha seguido la abeja africanizada, se calcula que para 1995 la abeja estará presente en todo el territorio nacional, con excepción de la sierra de Chihuahua y las partes más altas de las montañas.

Si bien la mortalidad por ataques de la abeja africana es baja, el problema médico existe y no hay evidencia real de que el riesgo vaya decreciendo conforme la abeja se hibridiza con especies europeas.

La agresividad de la abeja africana está bien documentada y es esta característica la que le da una importancia médica particular. El mecanismo de su dramática agresividad no está completamente aclarado, aunque hay evidencia de que se debe a

una mayor respuesta a la Feromona de alarma, ya que existe una correlación positiva entre el número de sensores olfativos en las antenas de las obreras y el número de picaduras y distancias que las abejas pueden perseguir el objeto agredido, (5, 6) dicha relación no existe en las abejas itálicas. Además, se ha encontrado una mayor producción de la misma en líneas de abejas europeas más agresivas.

Lo anterior conduce a que el menor disturbio o cercanía a la colmena produce que el apiario explote fuera de control en segundos. La distancia que siguen el objeto picado y el tiempo requerido para recobrar la calma también difiere entre las abejas africanas y las europeas, encontrándose para las primeras un promedio de 160.2 m ( $\pm$  40.36) y 28.2 min y para las segundas 21.5 ( $\pm$  11.67) m y 2.9 min. (1)

Si bien mucho se ha escrito sobre la abeja africana, muy poca de esta información puede ser creíble en lo concerniente a su comportamiento agresivo; sin embargo, existen algunos reportes bien documentados, en donde se enfatiza que el avance de la abeja africana se asocia con numerosos casos de picaduras múltiples, con diversas manifestaciones clínicas; la falla renal aguda está considerada entre éstas. (7, 16, 17)

Hay muchas razones por las cuales el problema de salud en relación con la abeja africana no está bien documentado, uno de ellos es que la mayoría de ataques ocurren en el campo donde las víctimas reciben poca o ninguna atención médica.

Los registros de mortalidad son incompletos y a muy pocas víctimas se les ha practicado autopsia. Además no existen



reporte sobre la fisiopatología a consecuencia de la exposición a grandes dosis de veneno de abeja. (4)

Dadas las pocas estadísticas médicas, es difícil establecer la severidad de las picaduras múltiples como un problema de salud humano actualmente y más difícil establecer la seriedad de este problema en el futuro. Por estimaciones de acuerdo con publicaciones en periódicos, revistas y comunicaciones de organismos gubernamentales. Desde su inicio se sabe de un mínimo de 350 personas muertas por la abeja africana, pero debido a la poca información y registro, una aproximación más realista es de 700 a 1000 muertes y el número de ataques sin muerte de la víctima no puede ser estimado ya que este número depende de muchos factores.

En Venezuela se considera que hay una muerte por cada 100 a 200 casos no fatales; en este país existe una población de 14 millones de habitantes y 3,500 apicultores. Hasta antes de la llegada de la abeja africana no se tenía conocimiento de muertes por picaduras múltiples de abeja de 1977 a 1978, y de mediados de 1978 a 1981 por lo menos murieron 70 personas por la abeja africanizada. (4) Aunque las estadísticas de mortalidad son escasas, el problema médico existe y como se mencionó anteriormente, se estima que el territorio nacional estará poblado en casi toda su totalidad por la abeja africanizada, se prevee en consecuencias, la posibilidad de accidentes en humanos. (4)

México es el segundo exportador de miel del mundo y existen áreas de producción a todo lo largo y ancho del país,

con zonas densamente pobladas, lo cual puede elevar las probabilidades de accidentes en humanos por picaduras múltiples.

El tratamiento de los casos de envenenamiento de personas por picaduras masivas de abejas, es meramente sintomático; por lo que la Secretaría de Salud consideró de gran importancia la obtención de un suero capaz de neutralizar el veneno de abeja, para usarlo en los casos de accidentes en humanos, basados en la eficacia que ha mostrado la seroterapia en casos de envenenamientos por picadura de alacrán o mordeduras de serpientes.

#### **Alergia al veneno de abeja (29)**

El veneno de los insectos himenópteros; avispas, abejorros y abejas, etc., contiene diversos antígenos protéicos de los cuales algunos son especie específicos, y otros son comunes a todos los insectos que comprenden dicho orden. La sensibilidad del organismo al veneno de abeja varía según los individuos; la experiencia ha demostrado que las más sensibles son las mujeres, niños y personas de edad, y se ha observado al mismo tiempo que de 1 a 5 y hasta 10 picaduras de abejas son muy bien soportadas por un individuo en buen estado de salud y no provocan más que un enrojecimiento y una ligera hinchazón; de 50 a 100 picaduras simultáneas determina una intoxicación de todo el organismo con trastornos característicos, principalmente del sistema cardiovascular y del sistema nervioso; si el número de picaduras llega a ser más de 500

puede resultar mortal. Existen individuos hipersensibles a quienes una sola picadura de abeja puede provocar trastornos graves tales como migraña aguda, aparición de urticaria, diarrea y en algunos casos la muerte. Autopsias realizadas permiten suponer que en los casos de muerte instantánea, la causa fue una alergia al veneno de abeja.

Los tipos de reacciones por picadura de abeja, de acuerdo al grado de intensidad y desde el punto de vista clínico pueden clasificarse en: (8, 18)

### Locales

- a) Reacción normal. Después de la picadura, se presenta dolor, y prurito, habitualmente de poca importancia y con duración de algunas horas.
- b) Reacción local Severa. Este fenómeno es similar al anterior, aunándose infecciones secundarias en el sitio de implantación del aguijón, con formación de edema por el proceso inflamatorio agudo.

### Sistémico

- a) Reacción tóxica. Son reacciones debidas a la cantidad de sustancias tóxicas recibidas después de múltiples piquetes, generalmente 10 ó más que producen molestias intensas, caracterizadas por fiebre, cefaléa, vértigo, náuseas, vómito y dolores abdominales y musculares. Otro tipo de manifestaciones se relacionan con fenómenos de hipersensibilidad, entre los cuales se distinguen

reacciones alérgicas en el sitio de la picadura y reacciones anafilácticas sistémicas.

- b) Reacción alérgica sistémica tardía. Son reacciones que se presentan en forma retardadas, apareciendo hasta dos semanas después de la picadura; se caracterizan por fiebre, prurito, piliartritis, linfadenitis, y finalmente la muerte del enfermo.
- c) Reacción alérgica sistémica inmediata. Esta reacción se caracteriza por la aparición de fenómenos anafilácticos en los primeros 10 a 20 minutos, como son; urticaria generalizada, edema en párpados, labios, lengua, manos, etc.

En la laringe la inflamación produce disminución progresiva de la vía respiratoria, puede llegar hasta la oclusión total, con la consiguiente asfixia; observándose una coloración cianótica (azulosa), en los labios, dedos y lóbulos de las orejas que indican la falta de oxigenación sanguínea adecuada, la persona puede presentar variaciones en el tono de voz, frialdad de la piel, taquicardia e hipotensión.

El veneno de abeja es una mezcla de sustancias tóxicas que han estado en contacto con el ser humano desde tiempos prehistóricos, sin embargo, el conocimiento de su composición y modo de acción data de hace 20 a 30 años.

Hay tres razones para estudiar los venenos de animales, primero están los farmacológicos, puesto que cuentan con

componentes tóxicos en muy altas concentraciones además de su gran disponibilidad y utilidad práctica, estas sustancias son por lo general de importancia biológica, y pueden servir como modelo para estudiar el daño tisular (finalmente pueden ser utilizados para resolver problemas de bioquímica y farmacología). (11)

El veneno de abeja posee elementos farmacológicos y enzimáticamente activos, entre los componentes de bajo peso molecular predomina la histamina, esta sustancia está presente en baja concentración 0.1 a 1.5%, recientemente la dopamina y la noradrenalina han sido identificadas como constituyentes del veneno de abeja. (8)

Prácticamente todos los efectos del veneno han sido adjudicados a la actividad de la fosfolipasa, la aplicación de la electroforesis, los procedimientos de cromatografía de filtración, además de los análisis bioquímicos y farmacológicos han dado como resultado la diferenciación de dos enzimas llamadas fosfolipasa A y hialuronidasa, de una serie de polipéptidos tóxicos, también se ha logrado identificar y caracterizar a la apamina como agente neurotóxico y el MCD-peptido como agente degranulador de células cebadas, además de un factor llamado minimina. (9, 10)

Son muy pocos los estudios que se han realizado para conocer la composición del veneno de abeja así como las características bioquímicas, actividad farmacológica y fisiológica de cada uno de los elementos que lo forman. Sin embargo, se ha logrado establecer la existencia de 14

componentes. (tabla I) La mayoría de la literatura está enfocada en aquellos elementos que tienen una actividad como alergenos puesto que en personas hipersensibles al veneno de abeja puede tener consecuencias fatales. (24-29)

Hasta hace 20 ó 30 años sólo existían reportes aislados y muy generales en cuanto a los efectos tóxicos del veneno de abeja y no se habían identificado a los elementos que pudieran tener dicha actividad, fue hasta que la abeja africana empezó su diseminación por el continente americano con los efectos ya mencionados, que diferentes grupos de investigadores empezaron a estudiar desde otra perspectiva al veneno de abeja, coincidiendo todos en que algunos componentes de mediano y alto peso molecular tienen actividad de alergenos y que los componentes de bajo peso molecular tienen actividad neurotóxica, algunos elementos han sido estudiados más extensamente así tenemos que:

La melitina es un polipéptido que representa aproximadamente el 50% del peso seco del veneno total y es la principal toxina del veneno de abeja. Tiene un peso molecular de 2,840 daltones, su actividad hemolítica directa se estableció cuando fue separada electroforéticamente y puesta en contacto con una suspensión de eritrocitos; así se pudo separar la hemólisis directa debida a la melitina de la hemólisis indirecta debida a la fosfolipasa A. (11)

La melitina al igual que otros péptidos del veneno de abeja es una molécula fuertemente básica, sin embargo, ésta se

## TABLA I

### COMPOSICION DEL VENENO DE ABEJA

(Apis mellifera mellifera)

Componente	Pesos Moleculares	Composición %
Alergeno C	102,000	
Un componente	86,000	
Un componente	71,000	
Hialuronidasa	50,000	1-3
Fosfatasa ácida	49,000	
Fosfolipasa b	22,000	
Fosfolipasa A	15,800	6-12
Melitina	2,840	50
Péptido degranulador de células cebadas	2,593	2
Dopamina	2,038	2
Apamina		
Minimina		
Histamina	111	1-3
Moradrenalina		
Aminoácidos libres		
Glucosa, fructuosa		

fija mucho más firmemente a la carboximetil celulosa u otros componentes del veneno de basicidad comparable.

La melitina disminuye la tensión en la interfase entre el aire y la solución de sales a un grado comparable al de las hemolisinas, lisolectina o digitonina. (10, 11) La melitina incrementa la permeabilidad de eritrocitos y otras células, puesto que ésta tiene una acción fisicoquímica sobre la superficie celular. El análisis de aminoácidos revela la escasez de ácido aspártico, tirosina, fenilalanina, histidina y aminoácidos que contienen azufre en su molécula.

La formación de micelas, la baja tensión superficial y la hemólisis pueden ser manifestaciones de la estructura primaria de la melitina. Estudios con monocapas de lípidos, indican que la melitina tiene una marcada afinidad por la interfase aire-agua, además de la interfase lípido-agua.

La hemólisis, es un modelo simple para estudiar la acción de la melitina, ésta no sólo daña los eritrocitos, sino también los leucocitos y sus lisosomas con subsecuente liberación de enzimas. Mediante microscopía electrónica de leucocitos aislados, se observó una reducción en el diámetro, un incremento en la densidad de la matriz y fracturas en la membrana. (11)

En cuanto a los efectos directos, la melitina provoca liberación de serotonina de las plaquetas, histamina de células cebadas de rata, iones potasio y fosfato orgánico e inorgánico. En la aplicación local, dependiendo de la dosis y el organismo, la melitina puede provocar vasoconstricción y vasodilatación, depolarización y reducción del tejido vascular. También provoca una disminución en la contracción del músculo liso y causa un período de excitación seguidos de períodos sin excitación. (11)



Al igual que algunos detergentes, la melitina daña los sistemas enzimáticos de membranas celulares, tales como el del adenosintrifosfato, esto disminuye el transporte de electrones en mitocondrias y desacopla la oxidación en la fosforilación oxidativa, e inhibe también la acción de la acetilcolinesterasa. (9)

Muchos de los efectos mencionados pueden ser involucrados en intoxicaciones de animales experimentales la melitina es muy tóxica para las larvas de Drosophila sp en cantidades de un microgramo por animal, el daño local en el sitio de inyección se manifiesta con fuertes contracciones musculares y cuerpos negros. (9)

Por muchos años la acción neurotóxica del veneno de abeja ha sido conocida. Una fracción del veneno de abeja que pasa a través de membranas de celulosa produce convulsiones en el ratón. Sin embargo, no está claro si las manifestaciones excitatorias son debidas a una interacción de los componentes conocidos del veneno, si éstos son la causa de la asfixia terminal, o si se debe a una neurotoxina nueva.

Cuando se separó la fracción de péptidos del veneno total obtenido por filtración en gel, se encontró una fuerte neurotoxina que pudo ser purificada por cromatografía adicional sobre carboximetilcelulosa, y se le llamó Apamina. Cuando se inyecta en ratones a una dosis de 1 mg por kilogramo de peso o más, el animal, muere después de un período de 15 minutos, manifestándose ausencia de coordinación en los movimientos y terminando con convulsiones generalizadas. Finalmente mueren por falta de coordinación respiratoria.

La apamina es el más pequeño polipéptido conocido; es la única a la que se le ha establecido interacción con la médula espinal, diferenciándose de otras neurotoxinas, tales como la escorpamina del veneno de escorpión, o la cromatina del veneno de cobra. Estas

toxinas consisten de 60 aminoácidos y actúan exclusivamente en la unión neuromuscular. Ambas (la apamina y las neurotoxinas) tienen una alta basicidad y un alto contenido de azufre, y actúan a nivel de sistema nervioso central periférico. (11)

### **El péptido degranulador de células cebadas (MCD-péptido)**

MCD-péptido se ha identificado como un tercer componente del veneno de abeja, el cual es capaz de inducir la liberación de histamina. Se ha establecido que cuando se aplica fosfolipasa a una suspensión de células, ésta no es el principal liberador de histamina, ya que la melitina es mucho más potente. Fredholm y sus colaboradores (12) confirman lo anterior y enfatizan el poco paralelismo entre la liberación de histamina y la cantidad de melitina y fosfolipasa A en el veneno de abeja.

Además establecieron que el péptido degranulador de células cebadas (MCD-péptido) es 100 veces más activo que la melitina, a pesar de que la melitina constituye aproximadamente el 50% del veneno de abeja y el MCD-péptido representa sólo el 1-2%.

El MCD-péptido actúa disparando la degranulación; la melitina destruye la estructura subcelular, y la fosfolipasa A tiene un modo indirecto de acción promoviendo la formación de lisolecitina. (13, 14)

El MCD-péptido difiere de la melitina no sólo en su actividad específica, sino también en su modo de acción: la melitina es una fuerte hemolisina y libera serotonina de trombocitos; el MCD péptido es inactivo en ambos casos. La melitina aumenta la permeabilidad capilar en el conejo tanto como en la rata; el MCD-péptido es mucho más efectivo en las ratas que en el conejo. La inyección intravenosa del MCD-péptido en ratones prácticamente no es tóxica, las ratas sin embargo, desarrollan cianosis extrema después

de 0.5 mg/kg de peso. A concentraciones de 10mg/kg de peso en ratón disminuye la presión sanguínea posiblemente por liberación de histamina, altas dosis producen una excitación permanente pero de muy baja intensidad, con espasmos muy diferentes a los generados por la apamina. (15)

El MCD-peptido consiste de 22 aminoácidos (la melitina contiene 26 a.a.) y difiere de la melitina en que contiene por lo menos dos enlaces disulfuro; en esto se parece a la apamina, además parece existir en dos arreglos de basicidad diferente, las cuales pueden ser separadas por cromatografía de intercambio iónico. (11)

Otros constituyentes del veneno de abeja son: la minimina ha sido aislado del veneno de abeja, ésta tiene un peso molecular de 6000 y constituye aproximadamente el 3% del veneno total, es insoluble en metanol y soluble en acetona al 33% (v/v) en agua. Las larvas de *Drosophila* que sobreviven a la Dosis letal 50 (aprox. 0.005 gr) detienen su alimentación y crecimiento y caen en un letargo, las moscas a que dan lugar desarrollan sólo una cuarta parte de su tamaño normal. (10) Mientras que su alimentación, movilidad y progenie es igual al de las moscas normales.

La Hialuronidasa, se encuentra a una concentración de 2-3% es más activa que la hialuronidasa comercial purificada de testículo de buey, además difiere de las enzimas similares por su pH óptimo (4-5); tiene la misma actividad que la hialuronidasa comercial y una marcada toxicidad local o sistémica, la enzima abre el camino a otros constituyentes del veneno. (11)

La Fosfolipasa A hidroliza los enlaces 2-acyl de la fosfatidil colina, la fosfatidil etanolamida y fosfatidil serina. La enzima ataca fosfolípidos estructurales y puesto que éstos son parte de membranas biológicas provocan fallas en las funciones celulares. Sin embargo, los fosfolípidos estructurales de la superficie interna de

eritrocitos son resistentes a la enzima.

Un ejemplo del modo de acción de la fosfolipasa A y de la cooperación entre varios componentes, es la hemólisis indirecta causada por el veneno de abeja. Como ya se mencionó la melitina es una hemolisina directa pues cuando se mezcla con una suspensión de eritrocitos humanos, provoca fracturas en la membrana celular y en la de cualquier organelo celular, en contraste la fosfolipasa A no induce ninguna liberación de hemoglobina, sólomente cuando el sustrato adecuado está disponible tal como la clara de huevo o lipoproteínas inicia la lisis indirecta por formación de lisolecitina, los fosfolípidos de la superficie interna sin embargo, pueden estar disponibles por otra vía, combinando la acción de la melitina (que forma fantasmas de eritrocitos) y la acción de la fosfolipasa A se puede iniciar la hemólisis directa, esta acción cooperativa puede ocurrir en otras estructuras biológicas.

La fosfolipasa A es capaz de producir una serie de efectos farmacológicos como son la contracción del músculo liso, disminución de la presión arterial, incremento de la permeabilidad capilar y destrucción de células cebadas, es también muy importante su actividad sobre algunos sitios activos y sobre algunos complejos enzimáticos de los animales envenenados, lo cual puede ser también la causa de la muerte. Así, esta enzima destruye a la succinato deshidrogenasa, desacopla la fosforilación oxidativa, bloquea la cadena respiratoria, y destruye los lisosomas.

La fosfolipasa A del veneno de abeja ha sido purificada por filtración en gel sobre Shephadex G-25 y sobre SE-Sephadex G25, se le ha calculado un peso molecular de 19000 aunque según el análisis de aminoácidos es de 14500, la diferencia de peso se puede deber aparentemente, a que contiene algunos carbohidratos los cuales incrementan el tamaño y el peso molecular. (11)

La secreción y propiedades físicas, farmacológicas, bioquímicas y químicas del veneno de abeja han sido estudiadas por algunos autores, (19) así tenemos que cuando el veneno de Apis mellifera ligustica (Abeja europea) y Apis mellifera scutellata (Abeja africana), fueron pasados por una columna de filtración que contenía Sephadex G-75-120 de 2 x 3000 cm en una solución amortiguadora de formiato de amonio 0.1 M a pH 4.5 con un flujo de 0.031 ml por minuto o 1.9 ml por hora, se obtuvieron seis fracciones: en los dos tipos de veneno la melitina fue aproximadamente el 50% del material disuelto, la absorción ultravioleta de cada fracción del veneno de A.m. scutellata fue la misma a la obtenida en las fracciones de A.m. ligustica, así mismo, se determinó que las fracciones 1, 2, 4, de ambos tipos de veneno contenían el mismo porcentaje de material sólido. La fracción 3 del veneno de A.m. scutellata que contenía a la fosfolipasa tenía el doble de peso que el correspondiente a la fracción 3 del veneno de A.m. ligustica. El veneno de A.m. scutellata contenía un componente desconocido en esta fracción el cual no se encontró en el otro veneno, la fracción 5 de A.m. scutellata fue 1.5 veces más pesado que la fracción 5 de A.m. ligustica y la fracción 6 de A.m. scutellata que era la fracción de bajo peso molecular, fue solamente el 80% del peso de la misma fracción aislada del veneno de A.m. ligustica.

La fracción 6 de bajo peso molecular fue pasada por una columna de Sephadex G-25 de 2 x 300 cm, en una solución amortiguadora de formiato de amonio 0.1 M pH 4.5. (19) El perfil de elusión contenía 20 diferentes picos y estos fueron divididos en 9 fracciones.

En un tratamiento similar al veneno de A.m. ligustica resultó con 23 diferentes picos divididos en 11 fracciones, de estos solamente nueve son comunes a ambos casos, las cuales tenían la mayor concentración.

La dosis letal cincuenta ( $LD_{50}$ ) fue calculada por Shipman y col. de acuerdo al método descrito por Snedecor obteniendo para el veneno de A.m. scutellata 2.7 mg/kg, peso ratón, y para el veneno de A.m. liquistica fue de 5.6 mg/kg peso ratón.

El veneno de abeja africana parece ser aproximadamente dos veces más tóxico que el de la abeja europea, la toxicidad de las fracciones es similar, menos en la fracción 5 en la cual los componentes de la abeja europea parecen tener 2 ó 3 veces más potencia.

Los dos tipos de veneno y los componentes de cada fracción fueron examinados para determinar, si tienen capacidad de bloquear la transmisión nerviosa a nivel de la placa neuromuscular, para ésto, se hicieron preparaciones del diafragma del nervio frénico de rata, cada veneno o componente del veneno fue añadido a la solución de lavado de las preparaciones y se midió el tiempo de bloqueo neuromuscular. Se determinó que las fracciones 1 y 2 en los dos tipos de veneno no producen acción de bloqueo neuromuscular, mientras que la 3 y 4 bloquean la transmisión del impulso nervioso entre 20 y 60 minutos después de ser aplicado el baño, la fracción 5 de A.m. liquistica produce bloqueo a los 10 minutos, mientras que la fracción 5 de A.m. scutellata no produce bloqueo a ninguna de las concentraciones empleadas. (19)

Newman y Haberman (20) analizaron el veneno de abeja por electroforesis en papel, señalando que hay tres fracciones de proteína, y demostraron que la primera no tiene efectos farmacológicos, sin embargo, las dos siguientes son farmacológicamente activas y contienen proteínas básicas; la segunda fracción contiene la mayor toxina del veneno de abeja llamada melitina, y tiene una fosfolipasa A y una hialuronidasa.

O'Connor y col. (21) detectaron sólo cuatro bandas con el

veneno de Apis mellifera ligustica por electroforesis en disco en geles de poliacrilamida en 1967, además detectó 8 diferentes proteínas. Este mismo autor al descubrir aminoácidos libres y cadenas polipeptídicas de cadena corta, de aproximadamente 14 aminoácidos, consideró la posible existencia de alguna enzima proteolítica.

Recientemente los avances en el análisis del veneno de abeja muestran que hay diferencias en el patrón electroforético de proteínas de A. florea, A. cerana, y A. mellifera. Sin embargo, Mello (22) analizó el veneno de A.m. ligustica y A.m. scutellata, además del de Bombus atratus, por electroforesis en papel, electroforesis en geles de almidón y de acrilamida, en la electroforesis en papel se observó la existencia de 3 fracciones; en la electroforesis en agar se registraron 6 bandas y en la electroforesis en geles de acrilamida se registraron 10 bandas. En este estudio no se pudieron detectar diferencias entre el veneno de A.m. scutellata y de A.m. ligustica.

## MATERIAL Y METODOS

Para determinar los pesos moleculares de las diferentes fracciones antigénicas, se utilizaron marcadores de pesos moleculares bajos (Bio-Rad Laboratories Richmond C.A.) los cuales contienen fosforilasa b (97,400 d.); albúmina sérica Bovina (66200 d.); ovoalbúmina (42,699 d.); anhidrasa carbónica (31,000 d.); inhibidor de tripsina (21,500 d.); lisozima (14,400 d.) estos se sometieron junto con el veneno de abeja a electroforesis en geles de poliacrilamida SDS al 10% en condiciones reductoras. A continuación los geles se transfirieron a papel de nitrocelulosa, se teñieron con Rojo de Ponceau al 0.01% en ácido tricloro acético al 0.5%. Se calculó el rf. de cada marcador (rf=distancia migrada por la proteína entre la distancia de migración total) se hizo un análisis de regresión para establecer la ecuación de la recta que nos permita conocer el PM. de cada una de las proteínas del veneno de abeja. los rf se determinaron, una vez realizada la transferencia al papel de nitrocelulosa. (41)

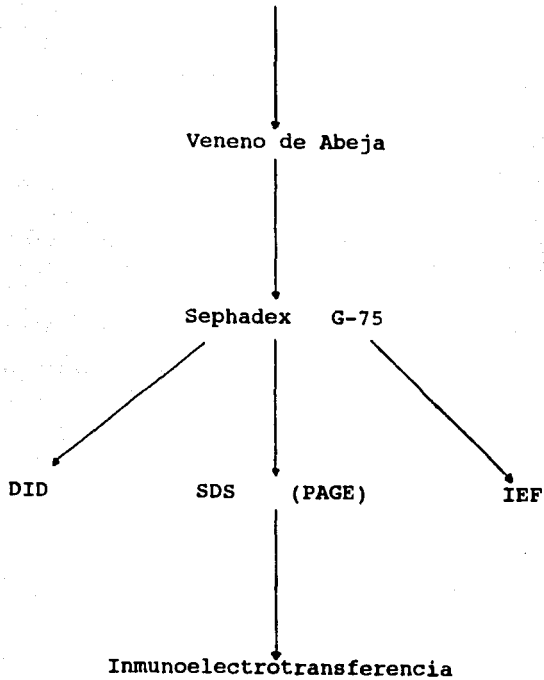


El veneno de abeja se analizó por medio de cromatografía de filtración, electroforesis en geles de acrilamida SDS, doble inmunodifusión, inmunolectroforesis e inmunolectrotransferencia. (Ver esquema I)

Para la realización del presente trabajo se utilizaron tres gramos de veneno de abeja, Apis mellifera mellifera, dos gramos fueron obtenidos por donación del Dr. Charles Mraz (Champlain Valley Apiaries Middlebury vt. y un gramo obtenido comercialmente Sigma Chemical Co. St. Louis Mo. USA), estos dos lotes se mezclaron para formar uno sólo.

Para la obtención de los sueros de borrego neutralizantes y no neutralizantes (Barbosa, et.al.) (23) se utilizaron 2 lotes de Borregos criollos, a los cuales se les inmunizó con veneno de abeja, polimerizado con glutaraldehído y veneno sin polimerizar; además de suero normal de borrego.

# ESQUEMA I



### **Doble inmunodifusión**

La doble inmunodifusión se realizó de acuerdo al método descrito por Ouchterlony (31) para ello se utilizó agar al 1% en PBS, se colocaron aproximadamente 25 ml del agar sobre cada inmunomarco que contenía seis porta-objetos completamente limpios, se dejó solidificar el agar a 4°C en cámara húmeda, se perforó el agar en los inmuno-marcos, el agar se extrajo de cada pozo y se agregaron al mismo tiempo el antígeno en el pozo central y el anticuerpo en los pozos de la periferia, se dejaron difundir en cámara húmeda durante 24 a 48 hs a temperatura ambiente, se lavaron tres veces al día con una solución NaCl 0.15 M más azida de sodio 0.02% durante 2 a 3 días, se lavaron los inmunomarcos con agua destilada, se cubrieron con papel filtro y se dejaron secar, se les quitó el papel filtro y se tiñeron con amido negro 0.1% en ácido acético al 10% durante 10 minutos, el exceso de colorante se eliminó con ácido acético al 10%.

### **Inmuno electroforesis**

La inmuno electroforesis de la muestra de veneno se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Grabahar, P. y Williams, C.A. (30), para ello se utilizó un aparato para electroforesis Gelman Instrument Company, modelo 5117 0.1. Se colocaron 25 ml de agar al 1% en una solución amortiguadora de barbital 0.05 M pH 8.5, en un inmunomarco que contenían seis portaobjetos

completamente limpios, se perforó un canal y dos pozos, uno a cada lado del canal. El agar se extrae de cada pozo y se coloca en éstos al antígeno, se colocaron los inmunomarcos en la cámara de electroforesis con la misma solución amortiguadora de barbital, se formó un puente de corriente con tiras de papel filtro y se aplicó una corriente de 2 mA por cada portaobjeto a temperatura ambiente durante tres horas, al terminar la electroforesis del antígeno se quitó al agar del canal previamente marcado y se añadió a cada canal 100 microlitros del anticuerpo, se dejó difundir durante 24 a 43 horas a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Se almacenaron los inmunomarcos a 4°C y se lavaron tres veces al día con una solución de NaCl 0.15 M, posteriormente se lavaron con agua destilada durante 2-3 días después de lo cual se cubrieron con papel filtro y se dejaron secar, se les quitó el papel filtro y se tñieron con amido negro al 0.1% en ácido acético al 10% durante 10 minutos, el exceso de colorante se eliminó con ácido acético al 10%.

#### **Fraccionamiento del veneno de abeja**

El fraccionamiento del veneno de abeja se realizó por cromatografía de filtración, para ello se utilizó una columna de Sephax G75-120 de 1.2 cm. de diámetro por 2 m de largo, equilibrada con una solución amortiguadora de formiato de amonio 0.1 M pH 4.5 a una velocidad de 1 ml/h, se colectaron fracciones de 1 ml, para ésto se utilizó un colector de

fracciones marca LKB Broma 2111 multirac, en cada corrida se pasaron 100 mg de Veneno de Abeja. Las fracciones así obtenidas fueron leídas a 280 nm en un espectrofotómetro marca Karl-Zeiss M4QIII, se graficaron los valores de absorbencia obtenidos contra el número de fracciones, se mezclaron las fracciones correspondientes a cada pico y se liofilizaron en una liofilizadora marca Labconco. Las fracciones se resuspendieron en 1 a 2 ml de una solución amortiguadora de formito de amonio 0.1 M pH 4.5 y se dializaron contra una solución amortiguadora de tris-glicina 0.2 M a pH 8.6. A cada fracción obtenida se le determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry.

#### **Determinación de proteínas**

La cuantificación de proteínas se realizó de acuerdo al método descrito por Lowry. (34)

#### **Acoplamiento de peroxidasa a la IgG de conejo antiborrego (35, 36, 37)**

Se pesaron 8 mg de peroxidasa (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo. USA), y se disolvieron en 1 ml de agua desionizada, después se añadieron 0.1 ml de una solución de peryodato de sodio 0.1 M la cual se mantuvo en agitación suave por 20 minutos, a continuación se dializó contra una solución amortiguadora de acetato de sodio 1 mM pH 4.4 a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se ajustó el pH de la solución que contenía a la peroxidasa agregándole 0.02 ml de una solución amortiguadora de

carbonatos 0.2 M pH 9.5, inmediatamente después, se adicionaron 10 mg del anticuerpo previamente dializado contra una solución amortiguadora de carbonatos 0.01 M pH 9.5 y se dejó en agitación suave a temperatura ambiente por dos horas. Después de la agitación se le adicionó 0.1 ml de una solución de borohidruro de sodio (4 mg/ml en agua destilada) y se dejó reaccionar durante dos horas a 4°C, posteriormente se dializó contra una solución amortiguadora de boratos 0.1 M pH 7.4 durante toda la noche; para eliminar la peroxidasa no acoplada al anticuerpo se utilizó una columna de Sephadex G-200 de 1.6 cm de diámetro por 35 cm de longitud, se usó un amortiguador de boratos 0.1 M pH 7.4 y se corrió con un flujo de 5 ml/h colectando fracciones de 2.5 ml por tubo. Las fracciones obtenidas se leyeron en un espectrofotómetro Marca Karl Zeiss M4QIII a 280 nm, las lecturas de densidad óptica se graficaron contra el número de tubo y las fracciones que comprendían el primer pico en la gráfica se mezclaron hasta 1 ml en una celda de Amicon con membrana XM-50, finalmente para conservarlos y almacenarlos se añadió glicerol hasta una concentración final del 50% y cloruro de benzalconio al 0.02%.

#### **Actividad de los conjugados**

Los anticuerpos peroxidados se ajustaron a una concentración de 1 mg/ml, a partir de esta solución se hizo una dilución 1:1000 en PBS. A continuación se agregaron 0.020 ml de la solución del conjugado a 3 ml del sustrato, este se preparó con 10 ml de

una solución amortiguadora de citratos 0.1 M pH 4.5 y con 4 mg de orto-fenilendiamina (Sigma Chemical Co. St. Louis; Mo. USA) al cual se añadieron 0.004 ml de  $H_2O_2$  (Merck México, S.A.) al 30%, a continuación se colocaron 200 microlitros de la solución conjugado-sustrato en 16 pozos removibles para ELISA Inmunolón II (Dinatech Laboratories) parando la reacción de los primeros dos pozos a los 0 minutos y los demás con un intervalo de 5 minutos, para ello se usaron 50 microlitros de una solución 2M de  $H_2SO_4$ . La reacción se leyó inmediatamente después de agregar el  $H_2SO_4$  en un lector de ELISA Minireader II a 492 nm. Se graficó la absorbancia obtenida contra el tiempo, una lectura de 1.0 a los 10-15 minutos y una lectura de 1.5 a los 25-30 minutos se consideraron como una adecuada actividad de la enzima.

#### **Electroforesis SDS en geles de poliacrilamida**

Se realizó de acuerdo al método descrito por Laemmli (32) en todos los casos las muestras de dializaron contra una solución amortiguadora de tris-glicina 0.2 M pH 8.3. Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) SDS tanto del veneno polimerizado como del no polimerizado, así como de las fracciones obtenidas por cromatografía de filtración. Se utilizó un aparato para electroforesis vertical marca LKB Bromma, el gel concentrador se corrió a 20 mA y el gel resolutor se corrió a 40 mA. Los geles se tiñieron con plata según la técnica descrita por Heuskeshoven y col. (33)

### **Inmunolectrotransferencia (38, 39, 40)**

Las proteínas del veneno no polimerizado de abeja (VNPA) así como de sus fracciones se separaron por electroforesis en geles de poli(acrilamida) en presencia de SDS, se procedió a transferirlas a papel de nitrocelulosa, para ello se utilizó papel con un poro de 0.45 micras marca Schleicher & Schuell de acuerdo a la técnica descrita por Towbin y col.

Se utilizó un aparato Transphor Electrophoresis Unit serie TE. El papel de nitrocelulosa se sumergió en agua destilada por 15 a 20 minutos. Se hizo un "sandwich" de la siguiente manera, una lámina de polietileno, una lámina de fibra Scotch Brite, dos hojas de papel filtro 3MM, una hoja de papel de nitrocelulosa, el gel de acrilamida, procurando remover todas las burbujas que se formen entre estos dos, se colocaron en seguida dos hojas de papel filtro 3 MM seguida de otra capa de fibra Scotch Brite y finalmente otra lámina de polietileno.

El sandwich se colocó en la cámara de electrotransferencia llena con una solución amortiguadora de tris-glicina 0.2 M pH 8.6 metanol al 20% con el papel de nitrocelulosa hacia el ánodo. Se corrió a 100 volts por 90 minutos, una vez terminada la transferencia, el papel de nitrocelulosa se tiñió con una solución de rojo de Ponceau al 0.01% en ácido tricloroacético al 0.5% por 10 minutos para observar la calidad de la transferencia, el papel de nitrocelulosa se destiñió con agua. Se lavó el papel con una solución amortiguadora de tris HCl 0.01M NaCl 0.15 M pH 7.4 (TBS). Se incubó el papel de



nitrocelulosa con TBS conteniendo 5% de leche descremada marca Sveltes (Nestlé) y 0.02% de NaN, por 12 horas a 4°C en agitación suave, se lavaron con TBS durante 5 minutos, se incubaron con los sueros de borrego antiveneno de abeja (dilución 1:10) durante 12 horas, se lavaron con TBS por cinco minutos y se incubaron con TBS más 5% de leche descremada conteniendo 10 ug/ml de anti-cuerpos de borrego peroxidados preparados en conejo.

Se lavaron las tiras de papel de nitrocelulosa con TBS tres veces cada 10 minutos, posteriormente se lavaron con Tris-HCl 0.02 M pH 6.8 (TB) por cinco minutos, los anticuerpos peroxidados fueron detectados con una solución que contenía un volumen de 4-cloro-1-naphtol (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo. USA) al 0.3% en metanol más cuatro volúmenes de TB agregando 0.33 microlitos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por mililitro de mezcla, se incubaron 5-30 minutos y se paró la reacción con agua destilada.

Para la determinación de Pesos Moleculares de las moléculas reconocidas por los SN y SnN se determinó la ecuación que relacionara la distancia de migración expresada en rf de los Pesos Moleculares bajos (Bio-Rad Laboratories) y el peso molecular de cada una de estas moléculas una vez obtenida dicha ecuación se substituyó en (X) el valor de rf de cada una de las bandas problema. Tabla II.

## R E S U L T A D O S

Los resultados obtenidos en la doble inmunodifusión con los sueros neutralizantes y no neutralizantes se observan en la Fig. IA. El título obtenido con los sueros neutralizantes fue de 1:64 a diferencia de los títulos de los sueros no neutralizantes de 1:32.

La inmunolectroforesis del veneno de abeja mostró un mayor número de bandas reconocidas por los sueros neutralizantes Fig. 1B e 1C.

El fraccionamiento del veneno de abeja mediante cromatografía en Sephadex G75, 120 permitió obtener 3 fracciones: la primera correspondió al 62%, la segunda al 27% y la tercera al 3% de los 100 mg que se metieron en cada corrida. (Fig. 2)

En la electroforesis del veneno en geles de policacrilamida SDS al 10% se lograron separar 20 componentes diferentes los cuales se encuentran entre 123 y 13 KD (Fig. 3)

En la Inmunolectrotransferencia del veneno de abeja total

se detectaron 12 diferentes bandas (Fig. 4, Tabla III), en la fracción I se encontraron 4 nuevos componentes (Fig. 5, Tabla IV) en la fracción II, 4 componentes nuevos (Fig. 6, Tabla V) y en la fracción III se detectó 1 componente nuevo (Fig. 7, Tabla VI).

En el porcentaje de reconocimiento en los sueros neutralizantes (SN) y los no neutralizantes (SnN) se observó que los segundos reconocen a 16 de los componentes que forman el veneno de abeja mientras que los sueros neutralizantes (SN) reconocen al 100% de los componentes del veneno. En el caso de los SnN las bandas no reconocidas son la 1, 13, 14 y 20 que tienen un peso molecular de 123, 27, 24 y 14 kilodaltones respectivamente, de las 16 bandas reconocidas 7 son al 100%, 5 se reconocen al 83.3%, 2 al 66.6%, una es reconocida al 50% y finalmente 1 es reconocida al 33.3%.

Por otro lado con los sueros neutralizantes 17 bandas son reconocidas al 100% y 3 bandas son reconocidas al 50%.

→ La Tabla VII muestra el patrón de bandeo del veneno de abeja, el número de banda, su rf, el peso molecular y la fracción o fracciones en la cual se detectó, con la inmunoelectrotransferencia. Para su elaboración, primero se determinaron todos los rf de todas las bandas encontradas en las transferencias realizadas, después se enlistaron de menor a mayor encontrándose un total de 39 bandas aproximadamente. Considerando que pudieran existir pequeñas variaciones en el tamaño del papel de nitrocelulosa (+ 0.1 cm) o errores de

medición se decidió establecer intervalos de (+ 0.1 cm) para aquellas bandas que se encontraban con rf muy cercanos así se pudo definir un patrón de 20 bandas.

La Tabla VIII muestra las frecuencias de reconocimiento de los SnN y Sn, en el patrón de corrimiento del veneno de abeja, las frecuencias de las bandas se establecieron en aquella fracción en la cual dicha banda aparecía más nítidamente.

La Fig. VIII A y B muestra las gráficas de las frecuencias de reconocimiento de los SN y SnN, se pueden observar claramente diferencias entre ambos sueros, resulta importante destacar que los SnN no reconocen las bandas 1, 13 y 14, por otro lado, estos sueros tampoco reconocen la banda 20 mientras que estas bandas son reconocidas a frecuencias por los menos del 50% por los sueros con capacidad de neutralizante.

# T A B L A    I I

## DETERMINACION DE PESOS MOLECULARES

	P.M.	Movilidad	rf	Y	PM
Fosforilasa b	97,400	2.6	0.255	4.93	85,113
Albúmina sérica bovina	66,200	3.5	0.343	4.82	66,069
Ovoalbúmina	42,699	4.9	0.480	4.63	42,658
Anhidrasa car- bonica bovina	31,000	6.7	0.657	4.49	30,903
Inhibidor de tripsina de soya	21,500	8.6	0.843	4.33	21,380
Lyzosima	14,400	9.7	0.950	4.15	14,125

$$Y = A + BX$$

$$Y = (521) + (-1.1) (X)$$

$$X = d$$

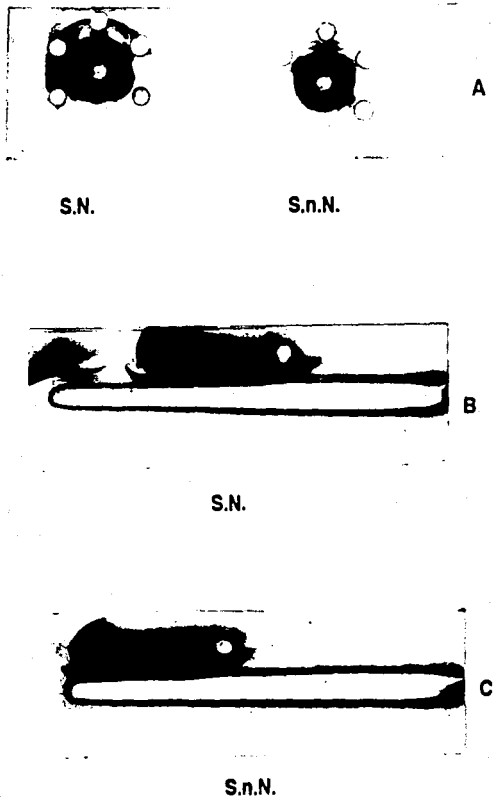


Fig. I. Doble inmuno difusión e Inmuno electroforesis del veneno de abeja *Apis mellifera mellifera* tratadas con sueros neutralizantes (SN) y sueros no neutralizantes (SnN)

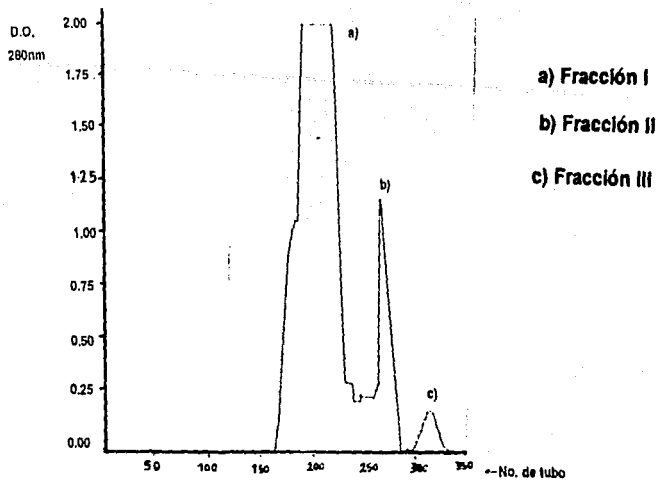


Fig. 2. Cromatografía de filtración en Shephadex G-75,120 se utilizó una columna de 1.2x200 cm equilibrada con una solución amortiguadora de formiato amonio 0.1M pH 4,5 a una velocidad de 1 ml/hora. Se colectaron fracciones de 1 ml.

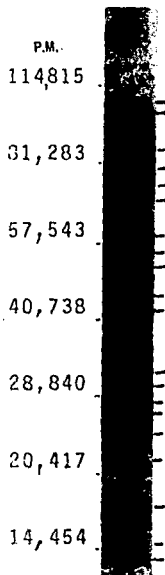


Fig. 3. Electroforesis SDS PAGE al 10% de acuerdo a la técnica descrita por Laemli se metieron 100µgr por carril de veneno de abeja *Apis mellifera mellifera*. Los pesos moleculares fueron calculados con la ecuación establecida en este trabajo. (Tabla I)

# T A B L A      I I I

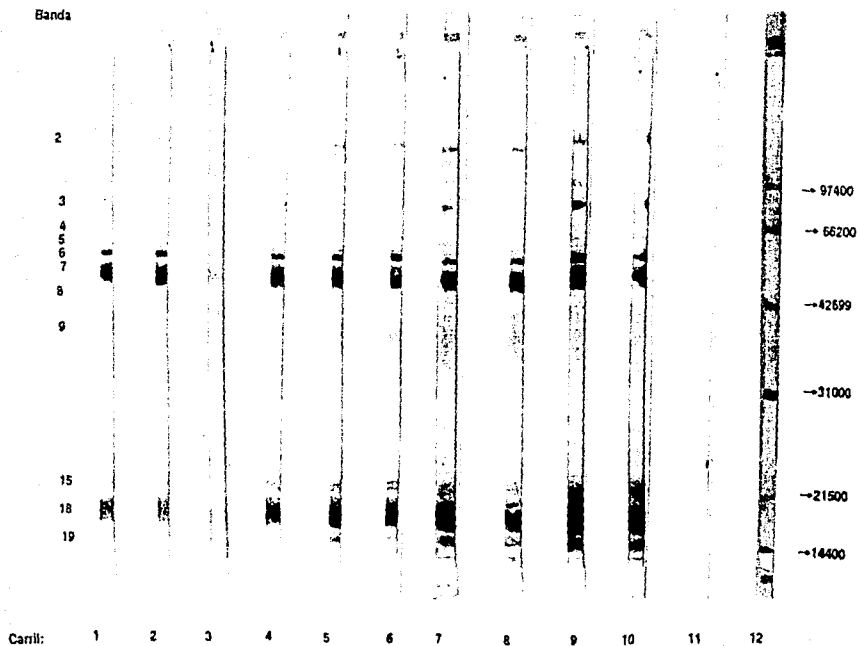
Bandas rf	X	Y	P.M.
$\frac{2.0}{10.2}$	0.196078	4.99431	98698.328
$\frac{3.1}{10.2}$	0.303922	4.87568	75106.928
$\frac{3.7}{10.2}$	0.362745	4.81098	64711.2814
$\frac{3.8}{10.2}$	0.372549	4.800196	63124.2164
$\frac{3.9}{10.2}$	0.382352	4.789412	61576.07
$\frac{9.1}{10.2}$	0.401960	4.767844	58592.7659
$\frac{4.5}{10.2}$	0.441176	4.724706	53052.51
$\frac{4.7}{10.2}$	0.460784	4.703137	50482.520
$\frac{8.5}{10.2}$	0.833333	4.293333	19648.6628
$\frac{9.1}{10.2}$	0.892156	4.228628	16928.87117
$\frac{9.6}{10.2}$	0.941117	4.174771	14954.479
$\frac{9.9}{10.2}$	0.970588	4.142353	13878.346

Determinación del peso molecular de las bandas reconocidas en la transferencia del veneno de abeja total. Solamente se señalan las empleadas para la construcción del patrón de bandeado del veneno de abeja.

$Y = (5.21) + (-1.1) (X)$   
 $Y = (5.21) + (-1.1) (0.196078)$   
 $Y = 4.9943142$   
 Artlog de Y = 98699.328  
 P.M. = 98699.328



Figura 4. Transferencia del Veneno de abeja total



Carril 1;2;3;4;5;6 sueros no neutralizantes; carril 7; 8; 9; 10 sueros neutralizantes; carril 11 suero normal de borrego; carril 12 Marcadores de pesos moleculares; Fosforilasa b 97400; Albúmina Sérica Bovina 66200; Ovoalbúmina 42699; Anhidrasa carbónica 31000; Inhibidor de tripsina 21500; Lisozima 14400 daltones.

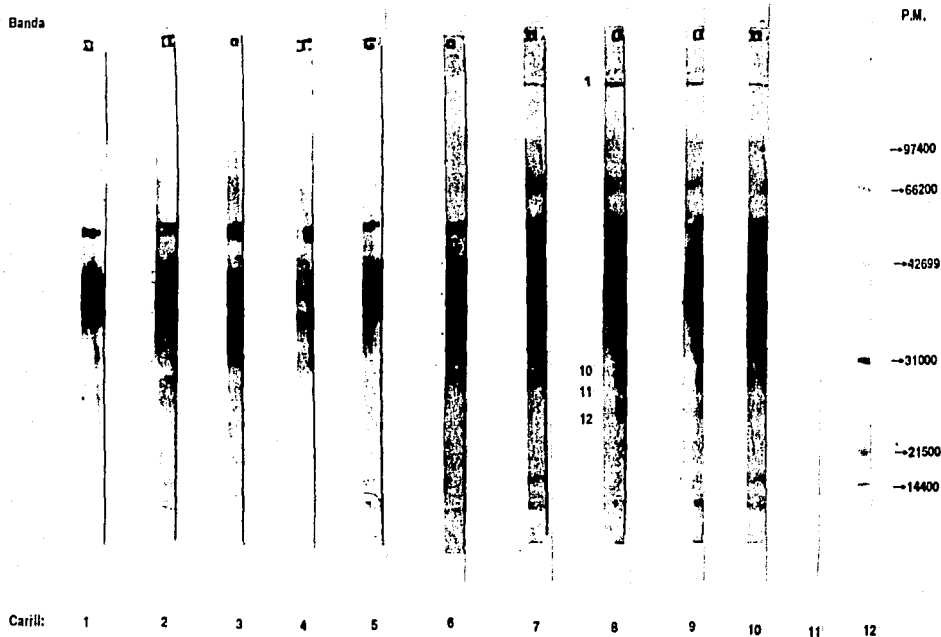
# T A B L A    I V

Bandas rf	X	Y	P.M.
3.8	0.372549	4.800196	63124.2104
10.2			
4.7	0.460784	4.703137	50482.0520
10.2			
5.4	0.529411	4.6276479	44427.5447
10.2			
6.8	0.666666	4.476667	29968.6652
10.2			
6.3	0.617647	4.530588	33930.3469
10.2			
1.1	0.107843	5.091372	123416.3505
10.2			
2.0	0.196078	4.99431	98698.374
10.2			
3.1	0.303922	4.87568	75106.928
10.2			
4.2	0.411767	4.757056	57155.2725
10.2			
4.3	0.421568	4.746275	55753.8933
10.2			
5.3	0.519607	4.638432	43494.29543
10.2			
6.0	0.588235	4.5629415	36554.5548
10.2			
6.1	0.598039	4.552157	35628.0098
10.2			
6.6	0.647058	4.498236	31494.6074
10.2			
8.7	0.852941	4.271764	18696.6974
10.2			
9.1	0.892156	4.228628	16928.87117
10.2			

Determinación de pesos moleculares de las bandas reconocidas en la transferencia del veneno de abeja Fracción I se señalan las bandas reconocidas "de novo" utilizadas para la construcción del patrón de bandeos del veneno de abeja.

X = rf  
 Y = A - BX  
 Y = 5.21 + (-1.1) (X)  
 Y = 5.21 + (-1.1) (0.372549)  
 Y = 4.800196  
 Antilog de Y = 63124.2164  
 P.M. = 63124.2164

Figura 5. Transferencia del Veneno de abeja fracción I



Carril 1;2;3;4;5;6 sueros no neutralizantes; carril 7; 8; 9; 10 sueros neutralizantes; carril 11 suero normal de borrego; carril 12 Marcadores de pesos moleculares; Fosforilasa b 97400; Albúmina Sérica Bovina 66200; Ovoalbúmina 42699; Anhidrasa carbónica 31000; Inhibidor de tripsina 21500; Lisozima 14400 daltones.

# T A B L A V

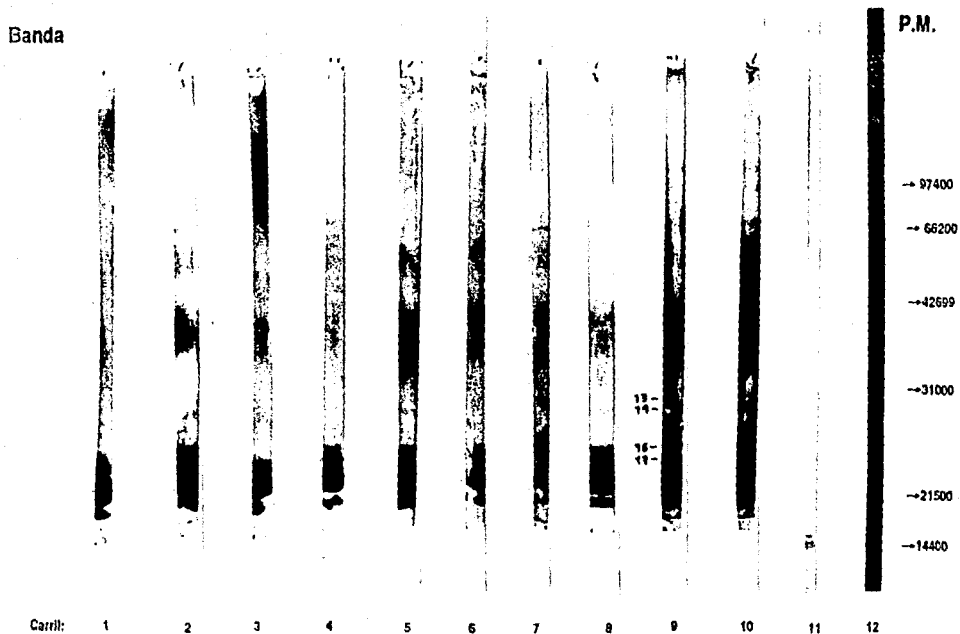
Bandas rf	X	Y	P.M.
<u>8.4</u>	0.823529	4.3041176	20142.6980
10.2			
<u>8.5</u>	0.833333	4.293333	19648.6779
10.2			
<u>9.1</u>	0.892156	4.228627	16928.8497
10.2			
<u>9.6</u>	0.941176	4.1747058	14952.2270
10.2			
<u>4.3</u>	0.421568	4.746275	55753.8933
10.2			
<u>6.1</u>	0.598039	4.552157	35628.0098
10.2			
<u>6.6</u>	0.647058	4.498236	31494.6074
10.2			
<u>8.7</u>	0.852941	4.271764	18686.6974
10.2			
<u>4.7</u>	0.460784	4.703137	50482.0520
10.2			
<u>3.1</u>	0.303922	4.87568	75106.928
10.2			
<u>3.3</u>	0.323529	4.854117	71468.9903
10.2			
<u>5.6</u>	0.549019	4.606078	40371.8295
10.2			
<u>7.2</u>	0.705882	4.433529	27134.9741
10.2			
<u>7.6</u>	0.745098	4.390392	24569.2645
10.2			
<u>8.2</u>	0.803921	4.325686	21168.31427
10.2			
<u>8.8</u>	0.862745	4.260980	18238.1381
10.2			
<u>8.9</u>	0.872549	4.250196	17790.8246
10.2			

Determinación de pesos moleculares de las bandas reconocidas en la transferencia del veneno de abeja Fracción II se señalan las bandas reconocidas "de novo" utilizadas para la construcción del patrón de bandeado del veneno de abeja.

X = rf  
 Y = A + BX  
 Y = 521 + (-1.1) (P)  
 Y = 521 + (-1.1) (0.823529)  
 Y = 4.3041176

\*Arbitrio de Y = 20142.6982  
 P.M. = 20142.6982

Figura 6. Transferencia del Veneno de abeja fracción II



Carril 1;2;3;4;5;6 sueros no neutralizantes; carril 7; 8; 9; 10 sueros neutralizantes; carril 11 suero normal de borrego; carril 12 Marcadores de pesos moleculares; Fosforilasa b 97400; Albúmina Sérica Bovina 66200; Ovoalbúmina 42699; Anhidrasa carbónica 31000; Inhibidor de tripsina 21500; Lisozima 14400 daltones.

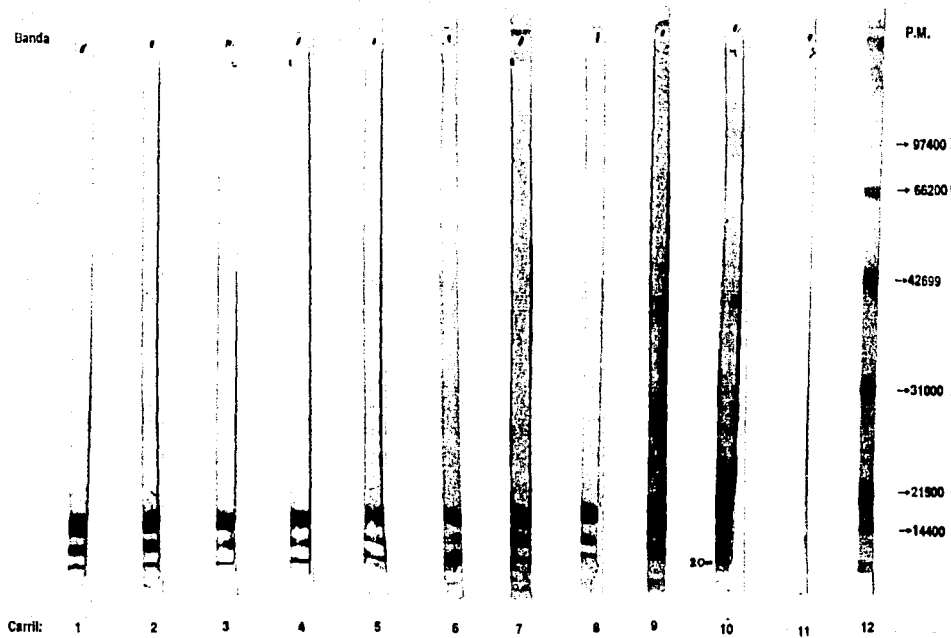
# T A B L A VI

Bandas rf	X	Y	P.M.
$\frac{8.9}{10.2}$	0.872549	4.250196	17790.8246
$\frac{9.1}{10.2}$	0.901960	4.217844	16513.68515
$\frac{9.6}{10.2}$	0.941176	4.174706	14957.2948
$\frac{9.9}{10.2}$	0.970588	4.1423523	13878.8409

Determinación de pesos moleculares de las bandas reconocidas en la transferencia del veneno de abeja Fracción III se señalan las bandas reconocidas "de novo" utilizadas para la construcción del patrón de bandeo del veneno de abeja.

$X = rf$   
 $Y = A + BX$   
 $Y = (5.21) + (-1.1) (X)$   
 $Y = (5.21) + (-1.1) (0.872549)$   
 $Y = 4.250196$   
 Antlog de Y = 17790.8246  
 P.M. = 16696.6974

Figura 7. Transferencia del Veneno de abeja fracción III



Carril 1;2;3;4;5;6 sueros no neutralizantes; carril 7; 8; 9; 10 sueros neutralizantes; carril 11 suero normal de borrego; carril 12 Marcadores de pesos moleculares; Fosforilasa b 97400; Albúmina Sérica Bovina 66200; Ovoalbúmina 42699; Anhidrasa carbónica 31000; Inhibidor de tripsina 21500; Lisozima 14400 daltones.

# T A B L A VII

## PATRON DE BANDEO DEL VENENO DE ABEJA

Banda	Movilidad	Pesos Moleculares	Fracción
1	1.1	123 416.3	F1
2	2.0	98.698.3	T
3	3.1	75 106.9	T-F2-F1
4	3.7	67 711.2	T
5	3.8	63 122.2	T
6	3.9	61 576	T
7	4.1	58 592.7	T-F2-F1
8	4.5	53 052.5	T-F1
9	4.7	50 482.0	T-F2-F1
10	5.4	44 427.5	F1
11	6.0-1	36 554.5	F1-F2
12	6.6	34 494.6	F1-F2
13	7.2	27 134.9	F2
14	7.6	24 596.2	F2
15	8.5	19 648.6	T-F2-F1
16	8.7	18 696	F2-F1
17	8.9	17 790.8	F2-F3
18	9.1	16 648.6	T-F1-F2-F3
19	9.6	14 954	T-F2-F3
20	9.9	13 878	T-F2-F3

Patrón de bandeo del veneno de abeja elaborado a partir de las bandas reconocidas por los SN y SnN del veneno de abeja en lo Inmunolectrotransferencia. T = veneno total. F1 = Fracción 1, F2 = Fracción 2, F3 = Fracción 3 y representan las fracciones obtenidas por la cromatografía de filtración en las cuales se detectó determinada banda.



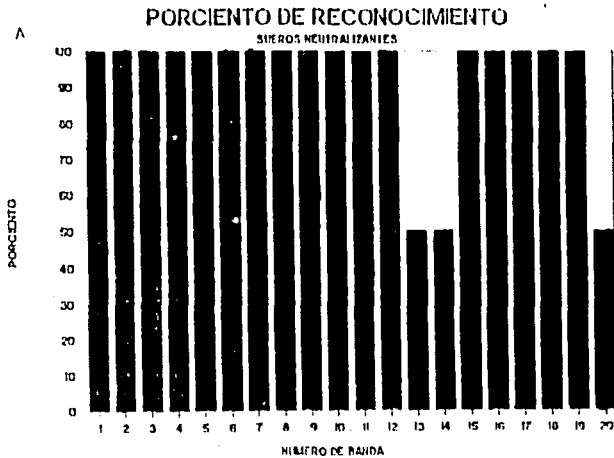
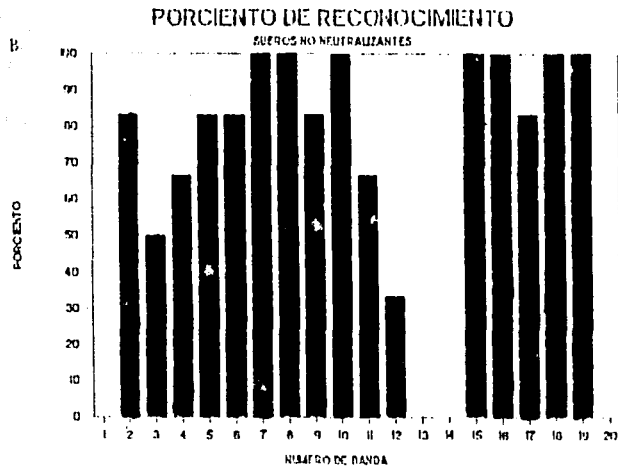
# T A B L A V I I I I

## FRECUENCIA DE RECONOCIMIENTO CON SN y SnN

Banda	SN %	SnN %
1	1.1	100
2	2.0	100
3	3.1	100
4	3.7	100
5	3.8	100
6	3.9	100
7	4.1	100
8	4.5	100
9	4.7	100
10	5.4	100
11	6.1	100
12	6.6	100
13	7.2	50
14	7.6	50
15	8.5	100
16	8.7	100
17	8.9	100
18	9.1	100
19	9.6	100
20	9.9	50

Se muestran las frecuencias de reconocimiento de cada componente del veneno de abeja por los sueros neutralizantes (SN) y los sueros no neutralizantes (SnN)

Figura 8



## DISCUSION Y CONCLUSION

El veneno de abeja es una mezcla muy compleja de sustancias farmacológica y bioquímicamente activas, las cuales pueden dividirse en dos grupos por un lado los componentes que inducen reacciones de hipersensibilidad y, por otro lado los componentes que tienen efecto neurotóxico. (7, 11)

Durante mucho tiempo las picaduras de abeja han representado un problema muy grande para los individuos hipersensibles al veneno de estos himenopteros, ésto provocó que las investigaciones se orientarán principalmente a identificar los componentes del veneno de abeja que eran los causantes de estas reacciones de hipersensibilidad, por lo que existe una extensa bibliografía al respecto. (24-29).

Los ataques masivos por la abeja africana han generado numerosas muertes en humanos por acción directa de los componentes tóxicos del veneno. Prácticamente no existen investigaciones que se hayan hecho con el objeto de aclarar qué componentes del veneno están involucrados en los mecanismos de toxicidad, la mayoría de las publicaciones están encaminadas (16, 17) al estudio de las manifestaciones clínicas, generadas por el efecto tóxico del veneno.

En éste trabajo se han logrado detectar por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS 10% por lo menos 20 componentes, sin embargo, como puede verse en la Tabla VI si consideramos los pesos moleculares reportados para la melitinina, minimina, histamina, péptido degranulador de células cebadas, dopamina y noradrenalina, se puede inferir que con la concentración utilizada en los geles, éstos componentes no logran ser separados y se encuentran juntos en la fracción 20, la cual tiene un peso molecular de 14,000 daltones aproximadamente, por lo cual el número total de componentes en el veneno de abeja aumentaría hasta 26. Esto difiere de otros estudios realizados en donde por electroforesis en disco logran detectar hasta 10 componentes. Los sueros procesados en éste trabajo mostraron un patrón de reconocimiento muy diferente, resulta muy importante destacar que los sueros neutralizantes son los únicos en reconocer 4 componentes del patrón electroforético con pesos moleculares de 123, 27, 24, 13Kd los cuales podrían ser los responsables de la producción de anticuerpos neutralizantes. Sin embargo, probablemente estos componentes no sean los únicos involucrados pues existen otros que son reconocidos a baja frecuencia 75 y 34 unidades por dichos anticuerpos.

La banda 20 es reconocida en la transferencia de la fracción III por el 50% de los sueros neutralizantes, sin embargo, en la transferencia del veneno total se observa la banda 20 con un reconocimiento del 100%, el reconocimiento del 50% es probable que se deba a una cuestión de concentración y que por ser tan poca muestra no se alcance a detectar, el reconocimiento real sería

entonces del 100%.

La identificación de los componentes del veneno de abeja importantes en la producción de anticuerpos neutralizantes puede tener 2 aplicaciones inmediatas, primero la producción de un suero dirigido contra los componentes 1, 13, 14 y 20 del patron electroforético del veneno de abeja para el tratamiento de los individuos víctimas de ataques masivos de abejas, y segundo en el futuro, la utilización de estos componentes inactivados como medida profiláctica en individuos dedicados o relacionados con la apicultura.

## B I B L I O G R A F I A

1. SARH (1985). Las abejas africanas y su control II. Orientaciones técnicas. Programa Nacional para el control de la abeja africana.
2. Batra, W.T. (1985). Polyester making bee and other. Innovative insect chemist, Weber State College. 62[2]:121-124.
3. Zozaya, R.J. Labougle, R.M. (1986). La apicultura en México. Ciencia y Desarrollo. No. 69, pp. 13-26.
4. Orley, R., Taylos, J.R. (1986). Healt problems associated with african bee. Annals of Internal Medice. 104[2]:267-268.
5. Rincón, R.H. (1986). La abeja africanizada monstruo fatal o recurso genético. ICA. Informa. Colombia. No. 113, pp. 3-14.
6. Winston, N., Katz, S.J. (1982). Foreging differences between cross forested. honey bee workers (Apis mellifera) of european and africanized races. Behv. Ecol. Sociobiol. 10:125-129.
7. Mejía, G., Arbelaez, M., Henao, J.E., Sus A. and Arango, J. C. (1986). Acute renal failure due to multiple sting by

- africanized bees. Ann. Intern. Med. 104:210-211.
8. Riches, R.C. (1982). Hypersensitivity to bee venom. Bee world. 62[1]:7-20
  9. Mitchell, H.K. Lowy, P.H. (1971). Mellitin: toxicity to Drosophila and inhibition of acetylcholinesterase. Arch. Biochem. and Biophysics. 145:344-348.
  10. Lowy, P.H. Sarmiento, L. Mitchell, H.K. (1971). Polypeptides minimine and melittin from bee venom: effects on Drosophila. Arch. Biochem. and Biophysics. 145:338,343.
  11. Haberman, E. (1972). Bee and was p venoms. Science. 177[4016]:314-322.
  12. Fredholm, B. and Hagermark, O. (1967) Histamine release from rat mast cells induced by a mast cell degranulating fraction in bee venom. Acta Physiol. Scand. 69, 304-312.
  13. Fredholm, B. and Hagermark (1967). Histamine release from rat mast cell granules induced by bee venom fractions. Acta Physiol. Scand. 71, 357-367.
  14. Fredholm, B. and Hagermark, O. (1969). Studies on the histamine releasing effect of vee venom fractions and compound 48/80 on skin and lung tissue of the rat. Acta Physiol. Scand. 76:288-298.
  15. Higginbotham, R.D. and Karnella, S. (1971). The significance of the mast cell response to vee venom. J. Immunology. 106[1]:233-240.
  16. Patrick, A. (1987). Acute renal failure due to multiple stings by africanized bees report of the first caase in

Trinidad. W.I. Med. J. 36:43.

17. Bousquet, J., Huchard, G. (1984). Toxic reactions induced by himenoptera venom. Annals of Allergy. 52:371.
  18. Frankland, W.A. (1976). Bee Sting Allergy. Bee world. 57[4]:145.
  19. Shipman, W.H. (1977). Studies of Brazilian Bee Venom. CUTIS. 19:802.
  20. Newman, W., Haberman, E. (1956). Paper electrophoresis separation of pharmacologically and biochemically active components of bee and snake venoms. pp. 171-174. From "Venoms". Ed. Buckley, E. and Potges, N. Washington, D.C.: American Association for the Advancement of Science.
  21. O'Connor, R. (1964). Disc electrophoresis of hymenoptera venoms science, N.Y. 115[3638]:1320-1321.
  22. Mello, M.L. (1970). A qualitative analysis of the proteins in venoms from Apis mellifera. (Including A. m. adansonii) and Bombus atratus. Journal of Apicultural Research. 9[3]:113.
- 2
- 3
- Barbosa, H., Garza, J., Mera, M.L. and Pérez de la Mora, C. (1989). Neutralization of bee venom activity by antibodies in press.
24. Hoffman, D.F. (1977). Allergens in bee venom. III. Identification of allergen B of bee venom as an acid phosphatase. J. Allergy Clin. Immunol. 59:364-366.
  25. Hoffman, D.R., Shipman, W.H., Babin, D.F. (1977). Allergens



- in bee venom. II. Two new high molecular weight allergenic specificities. *J. Allergy Clin. Immunol.* 59:147-153.
26. King, T.P., Sobotka, A.K., Kochovmian, L., Lichtenstein, L.M. (1976). Allergens of bee venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 172:661-671.
27. Hoffman, D.F. (1976). Allergen in bee venom. I. Separation and identification of the mayor allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 58:551-562.
28. Neuman, I. Ishay, J.S. and Creter, D. (1983). Hyperreactivity to bee sting. reevaluation. *Annals of Allergy.* 50:410-412.
29. Hoffman, D.R. (1987). Allergens in himenoptera venom. VIII. immunoblotting studies of venom allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 80:307-313.
30. Grabar, P. (1955). Méthode immuno-électrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques. *Biochimica et. Biophysica Acta.* 17:62
31. Ouchterlony, O. (1967). Immunodiffusion and immunoelectrophoretic handbook of experimental immunology. Oxford, England: Weir, D.M. pp. 680-685.
32. Laemmli, V.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature.* 227:680-685.
33. Heus Keshoven, J. Dernick, R., (1985). Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis.* 6:103-

34. Lowry, O.H., et. al. (1951). Protein measurements with the folin phenol. reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265.
35. Boorsma, D.M. and Kalsbeck, G.L. (1975). A comparative study of horseradish peroxidase conjugates prepared with a one-step and a two-step method. *J. Histochem. Citochem.* Vol. 23. p. 200.
36. Arvameas, S., Terninck, T., Guesdan, L. (1978). Coupling of enzymes to antibodies and antigens. *Scand. J. Immunol.* 8[7]:7-23.
37. Wilson, M.B. and Nakane, P.K. (1978). In: immunofluorescence and related staining techniques Eds. W. Knapp, K. Holubar and G. Wick, pp. 215-224. Elsevier/North Holland. Amsterdam.
38. Towbin, H., Stachelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76[9]:4350-4354.
39. Sheng, H.Z. Martenson, R.E. (1988). Electroimmunoblotting of small peptides separated on urea-dodecyl sulphate (SUDS) gels. *Journal of Immunological Methods.* 107:13-22.
40. Szewczyk, B., Kozloff, L.M. (1985). A method for the efficient blotting of strongly basic proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to nitrocellulose. *Analytical Biochemistry.* 150:403-407.

41. Swank, R.T., MunKres, K.D. (1971). Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoretic in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. Analytical Biochemistry. 39:462-477.