



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO

00377
16

EFFECTO DEL VENENO DE ABEJAS SOBRE EL SISTEMA INMUNE
DE RATONES CON DIFERENTES EDADES.

204412

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)
PRESENTA
Q.F.B MARIA GUADALUPE REYES GARCIA

DIRECTOR DE TESIS: DR. FERNANDO GARCIA TAMAYO



COORDINACION
POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

CD. UNIVERSITARIA, D. F., JUNIO DEL 2001



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.

JURADO ASIGNADO

- Presidente : Dr. Fernando García Tamayo
- Secretario : Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez
- Vocal : Dra. Martha Legorreta Herrera
- Suplente : Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés
- Suplente : Dr. Ricardo Lascuráin Ledesma

Este trabajo de investigación experimental se desarrolló en el Laboratorio 202, de Inmunología, del Departamento de Biología, en la Facultad de Química, U.N.A.M. como parte de proyectos que recibieron apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, proyecto 30915-M) y de la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA, proyecto IN-229799).

Tutor : Dr. Fernando García Tamayo

Sustentante : Q.F.B. María Guadalupe Reyes García.

AGRADECIMIENTOS

De manera muy especial, deseo agradecer a todas aquellas personas que participaron, apoyaron y facilitaron el desarrollo de este proyecto de investigación, entre los que se encuentran :

Dra. Martha Legorreta Herrera de la FES-Zaragoza, Dr. Fernando García Tamayo y Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés de la Facultad de Química de la UNAM que, como tutores, me proporcionaron su invaluable apoyo y sugerencias durante la elaboración, el desarrollo y la evaluación del trabajo experimental.

Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez y Dr. Ricardo Lascuráin Ledesma de la Facultad de Medicina de la UNAM, por haber contribuido a mejorar el escrito final.

Dra. Edda Sciutto Conde del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, por proporcionarnos reactivos para la realización de los cultivos celulares, durante la huelga universitaria de 1999.

MVZ Gerardo Arreguín del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y a la MC Ivonne Heuze de Icaza, de la UAM Xochimilco, por facilitarnos los animales empleados en este trabajo.

Dra. Laura Castrillón Rivera, a la MC Teresa Izquierdo Sanchez y el MC Alejandro Palma Ramos, de la UAM Xochimilco, por facilitarnos sus laboratorios e instalaciones durante la huelga.

Dr. Raúl Rodríguez, de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, por su invaluable ayuda en el análisis estadístico de los resultados.

Biol. Mayari Estrada, del Instituto de Biología de la UNAM, por su asistencia técnica en la identificación y extracción del saco del veneno de las abejas.

M en C Imelda Velázquez Montes, por su ayuda en la obtención de parte de la bibliografía más antigua y por su apoyo en la búsqueda y obtención de los artículos, vía internet.

A todos los magníficos Doctores del programa del Posgrado en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias, de la UNAM, por contribuir de manera decisiva en mi formación académica.

A los bibliotecarios de los Institutos de Fisiología Celular, Investigaciones Biomédicas, Facultades de Química y de Medicina de la UNAM, por su ayuda en la obtención de una porción de los artículos incluidos en esta tesis.

A todo el personal administrativo de la UNAM que ha participado en cada uno de los trámites que han hecho posible realizar estos estudios de posgrado.

Dedicatoria

El presente trabajo lo dedico a :

¡Dios y a la vida, por todo lo que me han regalado!

Mi queridísimo y maravilloso esposo Fernando, mi compañero y mi guía. Porque con su apoyo insustituible, su paciencia infinita, su comprensión y su inmensa calidad humana me ha enseñado a encontrar y disfrutar las cosas bellas que nos rodean . ¡Gracias por todo lo que has compartido conmigo a lo largo de nuestro de feliz matrimonio!

Mi papá Rafael Reyes Martínez (Q.E.P.D.) por haberme inducido a caminar sola.

Mi mamá Dolores García Viuda de Reyes, porque su presencia es un aliciente cada día.

Todos mis hermanos, especialmente a Manuel, quién me inculcó el amor a la música clásica y por enseñarme a superarme, así como por el apoyo que siempre le ha dado a toda la familia.

Todos mis sobrinos y sobrinos nietos, porque espero que este trabajo les enseñe y los inspire a seguir siempre hacia delante.

Todos mis buenos amigos, por brindarme su sincera amistad y enseñarme otras formas de ver la vida.

Mis compañeros de trabajo y nuestros tesisistas, por permitirme caminar juntos en el sendero del conocimiento.

ÍNDICE

| | |
|--|-----|
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. ANTECEDENTES | 4 |
| i) La respuesta inflamatoria | 4 |
| ii) Las citocinas pro-inflamatorias | 27 |
| iii) La influencia de la edad en la respuesta inflamatoria | 48 |
| iv) El veneno de las abejas | 64 |
| III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DEL TRABAJO | 76 |
| IV. MATERIAL Y MÉTODOS | |
| 1) Diseño experimental | 77 |
| 2) Animales | 78 |
| 3) Veneno de abejas | 78 |
| 4) Tratamiento | 79 |
| 5) Irritación del peritoneo | 79 |
| 6) Obtención de células | 80 |
| a) Macrófagos peritoneales | 80 |
| b) Linfocitos esplénicos | 81 |
| 7) Viabilidad y ajuste celular | 81 |
| 8) Estimulación <i>in vitro</i> de los linfocitos con mitógeno | 82 |
| 9) Estimulación <i>in vitro</i> de los macrófagos peritoneales | 83 |
| 10) Cuantificación de citocinas IL-6, IL-12 y TNF α | 83 |
| 11) Cuantificación de PGE ₂ | 84 |
| V. RESULTADOS OBTENIDOS | |
| 1) Evaluación clínica | 86 |
| 2) Linfoproliferación | 86 |
| 3) Irritación del peritoneo | 86 |
| 4) Cuantificación de IL-6 | 88 |
| 5) Cuantificación de IL-12 | 89 |
| 6) Cuantificación de TNF α y PGE ₂ | 91 |
| 7) Análisis estadístico | 92 |
| VI. DISCUSIÓN | 94 |
| VII. CONCLUSIONES | 111 |
| VIII. BIBLIOGRAFÍA | 113 |
| VIII. APÉNDICE | 126 |
| Trabajos en vías de publicación | |
| Índice de abreviaturas | |
| Soluciones y reactivos | |

I. INTRODUCCIÓN

Los descubrimientos científicos y los adelantos tecnológicos del siglo XX han influido para aumentar el promedio de la vida media de la población mundial. Numerosas enfermedades se pueden diagnosticar ahora con certeza o mucho más tempranamente que hace cien años y, además, una gran cantidad de fármacos nuevos y de intervenciones quirúrgicas seguras ofrecen actualmente muchas más posibilidades de recuperación. En poco tiempo han desaparecido numerosas infecciones que eran comunes y, en consecuencia, se han introducido cambios significativos en las listas de las enfermedades más graves y de las causas más frecuentes de mortalidad.

Sin embargo, a pesar de este panorama alentador, con el progreso de la medicina del siglo XX ha aumentado el número de personas que padecen enfermedades crónicas, que necesitan una rehabilitación prolongada o que se mantienen vivos con tratamientos de sostén muy agresivos. Para muchos pacientes lo más importante no es evitar la muerte sino la anulación del dolor, la reducción de las inflamaciones, la modulación de las funciones celulares desordenadas o comprometidas y, por supuesto, el control de la angustia o de la depresión. La búsqueda de soluciones para estos nuevos problemas ocupa actualmente el interés de numerosos investigadores.

En este sentido, se han multiplicado los estudios para encontrar fármacos nuevos y los caminos utilizados han sido diferentes. A un lado de la comercialización de grandes cantidades de medicamentos (sintetizados en los laboratorios de la industria farmacéutica, con características químicas y propiedades farmacológicas perfectamente definidas y sometidos a un control riguroso para descartar su posible toxicidad) se ha comenzado a observar el consumo cada vez más frecuente de productos naturales que no están completamente caracterizados y cuya forma de actuar se desconoce.

Por otra parte, se ha observado un interés creciente por los efectos terapéuticos que pueden tener numerosos venenos naturales y no pocas toxinas producidas por animales y vegetales. Algunas de ellas han resultado tan útiles para conservar la salud de algunos pacientes, como peligrosas cuando se introducen al cuerpo de las personas sanas (ver artículo en el apéndice). El manejo adecuado de las dosis ha permitido utilizar los venenos y las toxinas para controlar los síntomas de varias enfermedades contra las cuales no existían tratamientos efectivos.

Esta tesis tiene relación con el uso de una de esas sustancias venenosas, concretamente con el uso del veneno de las abejas.

Desde hace muchos años, y hasta la fecha, el veneno de las abejas ha sido utilizado empíricamente para el tratamiento de varias enfermedades o para controlar la aparición de síntomas molestos. La propaganda le ha atribuido numerosas propiedades curativas, no obstante que hasta hace poco se desconocían sus componentes y se ignoraban sus efectos sobre las principales el metabolismo celular. Así, el veneno de las abejas era simplemente una sustancia tóxica que, de alguna manera inexplicable, parecía mejorar algunos síntomas de varios padecimientos crónicos, principalmente las reacciones inflamatorias de la artritis. Aplicado directamente a través del piquete de las abejas o administrado tópicamente en forma de unguento, el veneno de las abejas todavía es utilizado hoy en día por una gran cantidad de personas que no han encontrado otra forma mejor de aliviar el dolor y la inflamación de sus articulaciones.

Junto al escepticismo de algunos, varios grupos de investigación se han interesado en estudiar si estos efectos tienen algún fundamento o si sólo son el producto de la sugestión. En los últimos años se han realizado muchos estudios para conocer la composición química del veneno de abejas y los mecanismos de acción de sus principales componentes. Ha sido particularmente interesante descubrir que algunos componentes del veneno de abejas pueden provocar la

desgranulación de las células cebadas, con la consiguiente liberación de numerosos factores pro-inflamatorios. Pero también ha resultado sorprendente que del mismo veneno se pueden aislar sustancias anti-inflamatorias. Asimismo han sido estimulantes los resultados obtenidos al estudiar el efecto de los diversos componentes del veneno de las abejas sobre la respuesta de los linfocitos del sistema inmune, sobre las células del sistema nervioso central y sobre la producción de cortisona por las glándulas adrenales. La evidencia experimental acumulada hasta ahora sugiere que el veneno de las abejas contiene sustancias que, al actuar sobre los sistemas inmune, nervioso y endocrino, pueden influir y/o modificar las interacciones bidireccionales que normalmente existen entre ellos.

En este trabajo se estudiaron dos aspectos interesantes pero muy poco documentados de la relación entre el veneno de las abejas y las respuestas inflamatorias. En primer lugar se estudió si la administración subcutánea de veneno de abejas en los ratones puede influir sobre la producción *in vitro* de citocinas pro-inflamatorias por sus macrófagos y la proliferación *in vitro* de sus linfocitos. En segundo lugar se estudió si los resultados anteriores se pueden modificar según la edad de los animales.

II ANTECEDENTES.

En este capítulo se presenta una revisión sobre (i) las principales características de la respuesta inflamatoria, (ii) la actividad de las principales citocinas pro-inflamatorias, (iii) la influencia de la edad sobre la inflamación y (iv) la composición química y principales actividades biológicas del veneno de las abejas. Con estos antecedentes se pretende crear un marco teórico que sirva de referencia para el trabajo experimental que estudia los efectos del veneno de abejas sobre la proliferación de los linfocitos estimulados *in vitro* y sobre la producción de citocinas pro-inflamatorias por los macrófagos, en ratones con diferentes edades.

i) LA RESPUESTA INFLAMATORIA

Antecedentes. Al revisar la historia de la literatura médica relacionada con la inflamación se pueden encontrar documentos escritos dos mil años antes de Cristo, en los cuales los egipcios describían sus características ⁽²⁾. Durante la antigüedad, la inflamación fue considerada como una enfermedad del cuerpo. Para el comienzo del siglo XIX, Rudolph Virchow observó que las manifestaciones histológicas de la inflamación se repetían en muchas enfermedades. Hacia finales de ese siglo, los trabajos de John Hunter permitieron reconocer a la respuesta inflamatoria como un mecanismo de defensa del huésped, en lugar de una enfermedad. Pocos años más tarde, Julius Cohnheim hizo las primeras descripciones macroscópicas de ella y propuso que la inflamación se explicaba por el daño de los vasos sanguíneos y por la consiguiente salida de líquidos y de células de la sangre hacia los tejidos vecinos ⁽³⁾. A principios del siglo XX, Elie Metchnikoff mostró la participación de los fagocitos en esta respuesta, mientras que Valy Menkin propuso a los polipéptidos como los mediadores solubles de la inflamación, reconociéndose así que las reacciones vasculares y las actividades fagocíticas eran parte del proceso inflamatorio ⁽⁴⁾.

Definición. Se puede decir que la inflamación es una respuesta fisiológica, a través de la cual un tejido vascularizado responde a los estímulos internos o externos que han lesionado su integridad ⁽¹⁾. Esa respuesta consiste en la producción de numerosos mediadores que provocan un aumento de la permeabilidad capilar, facilitan la salida de células desde los vasos sanguíneos y activan varios sistemas de proteínas pro-inflamatorias. Todos estos eventos restringen el área donde ocurre la inflamación, tratan de eliminar los agentes responsables de la lesión y ayudan a la reparación del tejido dañado. Como una consecuencia, en cualquier región anatómica donde ocurra una respuesta inflamatoria se expresan claramente sus cuatro manifestaciones clásicas : tumor (edema), calor, rubor y dolor.

Por lo general, una respuesta inflamatoria se puede desarrollar en tres fases distintas y sucesivas, en las cuales participan tres mecanismos diferentes ⁽¹⁾. Se pueden distinguir : a) la fase aguda transitoria, en la que hay vasodilatación local y aumento de la permeabilidad vascular que provoca la extravasación de células y de una gran cantidad de sustancias pro-inflamatorias alrededor de una lesión inicial, b) la fase subaguda que sigue a continuación y que es una reacción retardada de reparación, caracterizada por la infiltración del tejido intersticial con leucocitos y células fagocíticas y c) la fase proliferativa crónica, que sólo se presenta cuando no se logra la resolución de las dos anteriores y que se acompaña de fibrosis y degeneración del tejido alrededor de la lesión inicial.

Así, después de cada respuesta inflamatoria siempre sigue una serie de eventos que pueden provocar la reparación de los tejidos dañados, pero que en algunas ocasiones aumentan la lesión inicial. Aunque la respuesta inflamatoria es necesaria para mantener la salud y la integridad física de los organismos superiores, cuando se pierde su control o se prolonga su duración se puede aumentar la destrucción tisular y provocar la aparición de enfermedades secundarias ⁽²⁾.

Características. La naturaleza de la respuesta inflamatoria es bastante compleja porque reúne la participación de una gran cantidad de mediadores solubles y de células. Entre los primeros están diferentes conjuntos de moléculas, tales como quimocinas, proteasas, factores del sistema del complemento y del sistema de la coagulación, interleucinas, interferones, factores estimulantes de colonias, lípidos, péptidos, gases y sus correspondientes receptores específicos. Entre los segundos, intervienen varias poblaciones celulares, tales como neutrófilos, mastocitos, linfocitos, monocitos/macrófagos, plaquetas, eosinófilos, basófilos y fibroblastos, que se relacionan entre sí y con las células del endotelio de las paredes de los vasos sanguíneos, por medio de las selectinas y de las moléculas de adhesión intercelular ⁽⁴⁾.

Por lo general, los mediadores solubles son liberados rápidamente después del daño tisular inicial. Ellos proceden de las células de los tejidos dañados, pero también de las células adyacentes no lesionadas. Los mediadores solubles pertenecen a diferentes sistemas como : (i) los sistemas de zimógenos del complemento, (ii) los diferentes miembros de la familia de las quimocinas, (iii) las cininas, (iv) los factores de la coagulación y la fibrinólisis (proteasas del plasma), (v) los mediadores lipídicos (prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos y factor activador de plaquetas), (vi) los neuropéptidos como la histamina y la serotonina, la sustancia P, el péptido intestinal vasoactivo (VIP), y la somatostatina, (vii) algunos gases como el óxido nítrico (NO) y (viii) las citocinas pro-inflamatorias. Todos ellos provocan vasodilatación y aumento en el flujo de sangre en el área afectada, así como un incremento en la permeabilidad vascular. Además, promueven la activación, la migración y la acumulación de los leucocitos (desde la sangre hacia el tejido dañado) para destruir o eliminar las sustancias extrañas o dañinas que provocaron la lesión del tejido.

Como se puede notar, la respuesta inflamatoria depende de numerosos mediadores solubles y de varias poblaciones de células diferentes, del propio cuerpo. Asimismo, la forma de inicio y el pronóstico de la respuesta inflamatoria

aguda también están relacionados con la naturaleza y la puerta de entrada del agente dañino, así como el estado de salud del individuo y una serie de circunstancias particulares ^(1, 2, 3, 4).

Clasificación. Las reacciones inflamatorias se pueden dividir en agudas y crónicas. Las primeras se presentan en una forma rápida, se acompañan de acumulación de fluidos, leucocitos y proteínas del plasma y tienen una duración corta (minutos a días). En cambio, las inflamaciones crónicas tienen una duración más larga, son el resultado de enfermedades que inducen la activación persistente del sistema inmunológico y por eso provocan la infiltración del tejido dañado por linfocitos y macrófagos, así como la multiplicación de los fibroblastos.

Causas. La inflamación puede ser provocada por muchas y variadas causas. Las más comunes son todos aquellos factores externos o internos, que pueden dañar las células del epitelio o del endotelio y las estructuras asociadas a ellos, tales como : (i) las infecciones por virus, hongos, bacterias o parásitos, (ii) los golpes y las fracturas, (iii) quemaduras, (iv) las heridas, (v) las isquemias y (vi) las radiaciones UV, así como (vii) el daño tisular causado por sustancias químicas o cirugías y numerosas enfermedades degenerativas o autoinmunes.

Entre las sustancias químicas que provocan daño o irritación de los tejidos se encuentran una serie de productos que son utilizados con frecuencia en los laboratorios para inducir reacciones inflamatorias experimentales y probar la efectividad de los medicamentos anti-inflamatorios. Se pueden mencionar (i) las carrageninas derivadas de algas marinas ⁽⁵⁾, que actúan principalmente sobre las células cebadas y los neutrófilos, (ii) los aceites minerales como el Pristano ⁽⁶⁾, que estimulan principalmente linfocitos y neutrófilos y (iii) las mezclas de aceites y bacterias o productos bacterianos, como el adyuvante completo de Freund ⁽⁷⁾ que estimulan predominantemente a los fagocitos mononucleares y provocan la formación de granulomas.

Cuando un tejido es dañado por cualquiera de las causas anteriores, la respuesta inicial comienza a los pocos minutos. Rápidamente ocurre una serie de eventos que conducen a la síntesis o liberación de numerosas moléculas pro-inflamatorias solubles, responsables de la aparición de los primeros signos y los síntomas de la inflamación. Estas primeras moléculas involucradas en la inflamación por lo general actúan sobre las células del endotelio de los capilares sanguíneos.

La respuesta inicial de los vasos sanguíneos. El primer evento físico de la respuesta inflamatoria es la vasodilatación, la cual genera un incremento en el volumen de sangre que llega al área dañada y es la responsable del calor y el enrojecimiento de la zona.

El evento siguiente es el aumento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos más pequeños. Las células endoteliales de los capilares aumentan la expresión de moléculas de adhesión intercelular (ICAM, las selectinas P y E, por ejemplo) que son ligandos para los receptores de membrana de los leucocitos que van a salir de los vasos sanguíneos ⁽⁸⁾. El incremento en la permeabilidad vascular también influye para que salgan hacia el espacio intersticial el plasma de la sangre y algunas de sus proteínas, las cuales se acumulan en el tejido lesionado y causan edema y dolor.

Por otra parte, la célula endotelial también libera quimocinas que son reconocidas por los receptores localizados en la membrana de los leucocitos. Las quimocinas son las principales proteínas pro-inflamatorias que se producen en el endotelio de los vasos sanguíneos. Ellas son moléculas muy importantes que van a actuar como mediadores de la migración de los leucocitos ⁽⁹⁾, pero que también van a influir sobre la linfopoyesis y la maduración de los linfocitos. Las quimocinas forman una superfamilia de más de 50 péptidos pequeños (la mayor parte de ellos formados por 90-130 residuos de aminoácidos, de 8-10 kDa), cuya principal función es regular el tráfico de los leucocitos. Las quimocinas aumentan la

adherencia de los leucocitos a las células endoteliales de los vasos sanguíneos, facilitando su extravasación y, una vez que los leucocitos llegan al espacio intersticial, atraen su migración hacia los sitios donde las quimocinas están más concentradas. En la tabla siguiente se enlistan las quimocinas pro-inflamatorias más importantes que se han identificado hasta el momento.

Tabla I. Lista resumida de algunas de las principales Quimocinas pro-inflamatorias. Casi todas ellas comparten receptores y tienen actividades funcionales comunes ⁽¹⁰⁾ .

| |
|---|
| 1. Interleucina-8 (IL-8) |
| 2. proteína del oncogene- α relacionado con el crecimiento (GRO α) |
| 3. proteína del oncogene- β relacionado con el crecimiento (GRO- β) |
| 4. proteína del oncogene- γ relacionado con el crecimiento (GRO- γ) |
| 5. Proteína-2 activadora de neutrófilos (NAP-2) |
| 6. Proteína-78 activadora de neutrófilos derivada del epitelio (ENA-78) |
| 7. Proteína-2 quimiotáctica para granulocitos (GCP-2) |
| 8. Proteína-10 inducible por el interferón (IP-10) |
| 9. Monocina inducida por el interferon- γ (Mig) |
| 10. Quimioatrayente- α de las células T inducible por interferón (I-TAC) |
| 11. Proteína-1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1) |
| 12. Proteína-3 quimiotáctica de monocitos (MCP-3) |
| 13. Eotaxina |
| 14. Proteína-2 quimiotáctica de monocitos (MCP-2) |
| 15. Proteína-4 quimiotáctica de monocitos (MCP-4) |
| 16. Proteína-1 α inflamatoria de los macrófagos (MIP-1 α) |
| 17. Proteína-1 β inflamatoria de los macrófagos (MIP-1 β) |
| 18. Proteína regulada sobre activación, expresada y secretada en los linfocitos T normales (RANTES) |

Las quimocinas se unen a sus correspondientes receptores, los cuales se encuentran sobre la membrana de las células blancas que circulan en la sangre. Esos receptores son proteínas con forma de serpiente que atraviesan la membrana, penetrando y emergiendo de ella varias veces. Se conocen dos grandes grupos de receptores para las quimocinas : (i) los receptores CxC (CXCR) que tienen como ligandos a las quimocinas CxC y (ii) los receptores CC (CCR) que tienen como ligandos a las quimocinas CC. Cada vez que se unen a su receptor, las quimocinas activan una proteína G heterotrimérica que se disocia en sus subunidades pequeñas. Algunas de ellas son activas y participan en la formación y/o liberación de varios segundos mensajeros como el Ca^{2+} , el AMPc o la PLC β 2. Éstos últimos, a su vez, intervienen en la activación de diversas cinasas que fosforilan diferentes proteínas citoplásmicas, responsables de la polimerización y movimiento del citoesqueleto, promoviéndose así la quimiotaxis de los leucocitos⁽¹¹⁾.

Inmediatamente después de ser estimulados por cualquiera de estas quimocinas, los leucocitos de la sangre, que vienen "rodando" sobre la superficie interna de los capilares, comienzan a expresar varios cambios dramáticos en su forma, sus movimientos y su metabolismo. Por ejemplo, aumentan su adhesividad a causa de la activación de las integrinas de la superficie de la membrana, liberan el contenido de sus gránulos (proteasas, histamina) y producen una mayor cantidad de radicales libres.

Activación de los sistemas enzimáticos. Al mismo tiempo que las células endoteliales están produciendo factores, como las quimocinas, que facilitan la salida de los leucocitos fuera del vaso sanguíneo, la extravasación del plasma influye para que continúe la formación de nuevas sustancias pro-inflamatorias. Al aumentar la permeabilidad capilar y salir células y plasma de los vasos, el Factor de Hageman (factor XII de la coagulación de la sangre) entra en contacto con las proteínas de la matriz extracelular y se activa. El factor XII activado, a su vez, activa varios sistemas enzimáticos, como el de las cininas, el

del sistema complemento, el de la coagulación y el de la fibrinólisis de la sangre, cuyos productos finales (la bradicinina, los primeros fragmentos solubles del sistema complemento, la plasmina, la trombina y los péptidos fibrinolíticos) son los principales factores solubles que inician la respuesta inflamatoria fuera de los vasos sanguíneos. El plasminógeno y la plasmina tienen una participación muy importante en la inflamación, como promotores de la migración celular ⁽¹²⁾. En la Figura 1 se presenta un resumen que muestra el orden de activación de los sistemas de zimógenos que dan origen a la respuesta inflamatoria.

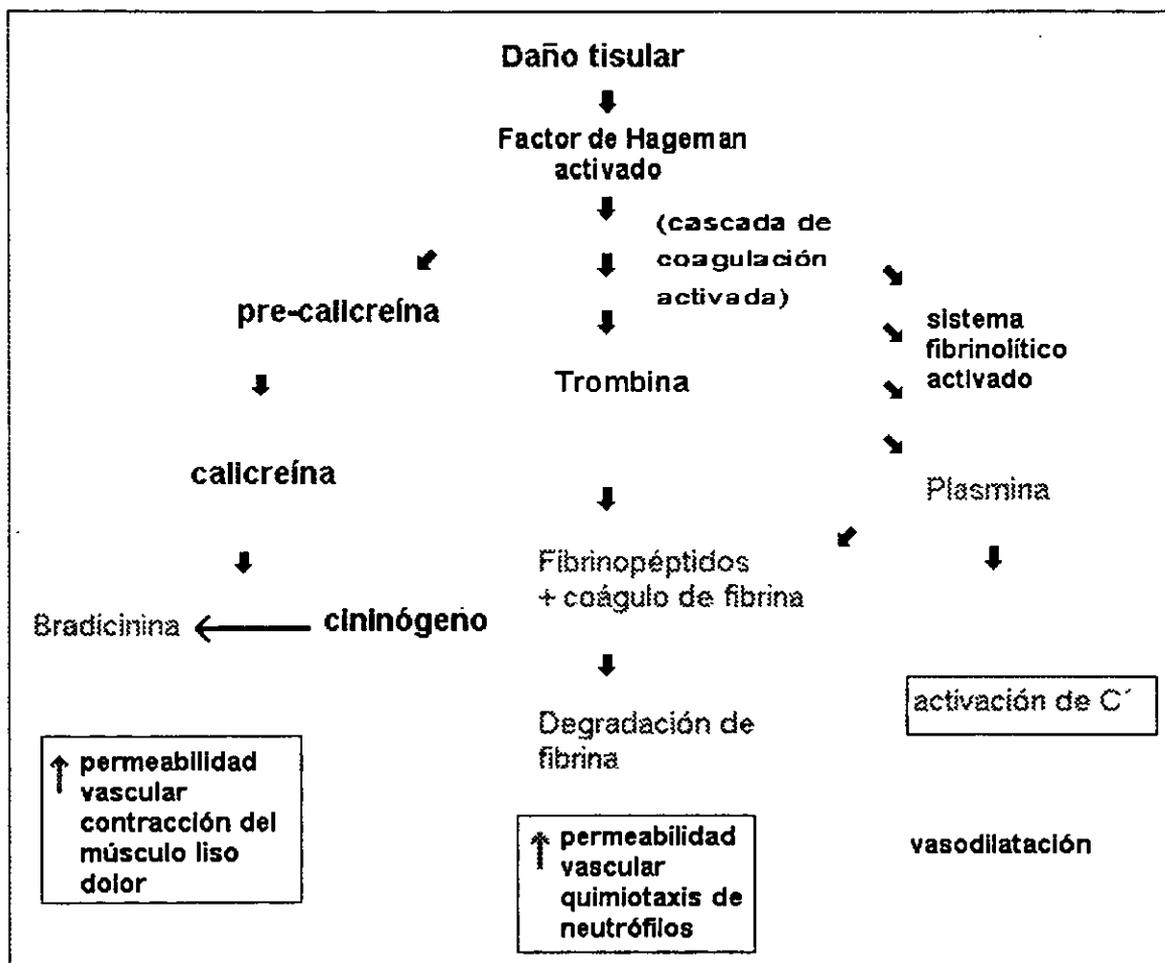


Figura 1. Activación de los mediadores solubles de la inflamación, contenidos en los vasos sanguíneos, mostrando las moléculas que generan los signos de la inflamación después del daño del endotelio o del aumento de la permeabilidad capilar ⁽²⁾.

A medida que se inicia la salida del plasma fuera de los vasos sanguíneos, comienza la activación de los principales sistemas enzimáticos. Uno de ellos es el sistema complemento. En la respuesta inflamatoria inicial participan las anafilotoxinas del complemento (los fragmentos biológicamente activos C3a, C4a y C5a), las cuales se liberan e interaccionan con sus receptores específicos que se encuentran sobre la membrana de las células cebadas, estimulando la desgranulación de las mismas y la liberación de histamina ⁽¹³⁾, que provoca vasodilatación y aumento de la permeabilidad capilar. Esta amina vasoactiva también es liberada por las plaquetas y por ciertas células neuroendócrinas del estómago.

Asimismo, los macrófagos, los monocitos, las células cebadas y los neutrófilos activan a la fosfolipasa A2 (PLA2), una enzima necesaria para la formación de los productos del ácido araquidónico o del factor de activación plaquetario (PAF), todos ellos importantes mediadores lipídicos pro-inflamatorios. Entre los primeros se encuentran las prostaglandinas (PG), las cuales se liberan al exterior y contribuyen al aumento de la permeabilidad vascular y la vasodilatación, además de que inducen fiebre y dolor. Los leucotrienos (LT) son, lo mismo que las PG, otros factores solubles que también participan en la quimiotaxis de los neutrófilos polimorfonucleares (PMN), en los cambios vasculares ya mencionados y en la contracción del músculo liso. Por otra parte, los tromboxanos (TX) inducen agregación plaquetaria y vasodilatación. Los lisofosfolípidos, también liberados por la acción de la PLA2, son los precursores del factor de activación plaquetario, que agrega plaquetas, atrae eosinófilos y activa neutrófilos.

Como se puede observar, a los escasos factores pro-inflamatorios producidos por el daño tisular inicial, rápidamente se añade un conjunto, cada vez más grande y heterogéneo, de nuevos factores solubles que proceden de la activación de proteínas plasmáticas y que tienen actividades biológicas pro-inflamatorias.

Las células de la respuesta inflamatoria. A las pocas horas de haberse iniciado el aumento de la permeabilidad capilar, comienza la extravasación de los monocitos, neutrófilos PMN y linfocitos, uno de los eventos más importantes en la inflamación aguda. Los neutrófilos PMN son las primeras células en salir de los vasos sanguíneos y también son las primeras en llegar al sitio donde se está desarrollando la reacción inflamatoria. Ellas liberan nuevos mediadores solubles que contribuyen a mantener el proceso inflamatorio y a la reparación del tejido dañado. En la siguiente figura se muestra cómo salen los leucocitos de los vasos sanguíneos.

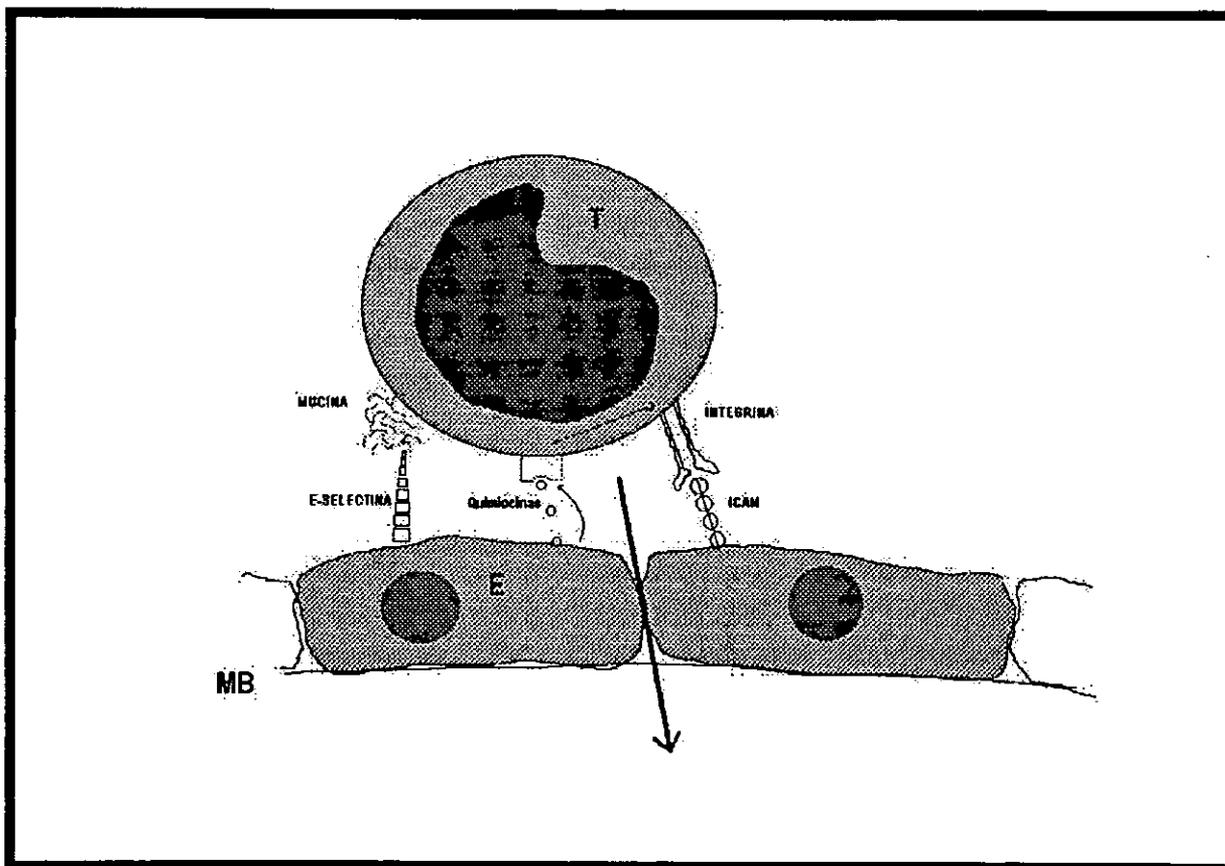


Figura 2. Extravasación de un linfocitos T a través de la membrana basal (MB) del capilar, mediante la unión de sus receptores a los ligandos que se

expresan sobre la superficie de las células del endotelio (E) (modificado de Goldsby et al ⁽²⁾).

Para que los leucocitos puedan salir fuera de los vasos sanguíneos a través del endotelio y de la membrana basal, se necesita que sus receptores interaccionen con los ligandos que se exponen en la superficie de las células endoteliales, tal como se muestra en el dibujo de la Figura 2. Las principales moléculas de adhesión intercelular de los leucocitos son : (i) las integrinas, (ii) las selectinas, (iii) una familia de proteínas parecidas a las mucinas y (iv) varias proteínas más que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Como los leucocitos vienen rodando sobre la superficie interna de los capilares, estas moléculas de adhesión quedan constantemente en contacto con los ligandos o los receptores para ellas, que se expresan sobre la membrana del endotelio de los vasos sanguíneos.

Después de utilizar sus receptores o sus ligandos para establecer una adhesión a la superficie de las células endoteliales y gracias a los movimientos de su citoesqueleto, el leucocito inicia su migración entre las células del endotelio y en dirección al exterior del vaso sanguíneo, en proceso denominado diapedesis.

Una vez que salen fuera del capilar, las células sanguíneas entran en contacto con las proteínas filamentosas de la matriz extracelular. Los leucocitos se mueven por quimiotaxis entre las proteínas del tejido intersticial y se dirigen hacia el sitio donde está localizado el proceso inflamatorio, es decir hacia donde se genera la mayor cantidad de los factores quimiotácticos ⁽⁹⁾. Al llegar al sitio del daño tisular, los leucocitos fagocitan el material extraño o los restos de las células muertas y forman los fagosomas, pequeñas vesículas citoplásmicas en las cuales queda encerrado el material que ha sido endocitado. Inmediatamente, a los fagosomas se acercan otras vesículas citoplásmicas, llamadas lisosomas, que se encuentran llenas de enzimas digestivas. Al unirse un fagosoma con varios lisosomas se forma una vesícula más grande que se conoce como fagolisosoma.

En el microambiente ácido y lleno de agentes oxidantes de los fagolisosomas van a ocurrir dos eventos. Primero, (i) la muerte de cualquier microorganismo fagocitado y después, (ii) la digestión del material biológico como los restos de bacterias o de células muertas, mediante la acción de las enzimas proteolíticas.

De este modo los neutrófilos "limpian" la zona inflamada al eliminar los restos de tejido dañado o los microorganismos potencialmente perjudiciales que han invadido el cuerpo (en el caso de que la inflamación sea una consecuencia de una infección). Además, ellos liberan al exterior varios mediadores solubles que contribuyen al reclutamiento de más células, como los macrófagos, que se activan y se aproximan al sitio de la lesión 5 ó 6 horas después de haber comenzado la inflamación aguda.

Los macrófagos representan una nueva población celular que se agrega, un poco más tardíamente, al foco inflamatorio inicial y que contribuye a aumentar la intensidad de la respuesta, ya que tanto su capacidad fagocítica, como su capacidad para liberar mediadores solubles (NO, PGs y radicales libres) y citocinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF α) es superior a la de los neutrófilos que se extravasaron antes que ellos.

La citocina pro-inflamatoria IL-1 aumentan la expresión de moléculas de adhesión intercelular en la superficie de la membrana de las células del endotelio de los vasos sanguíneos, mientras que el TNF- α contribuye a incrementar la permeabilidad capilar. De este modo, aumenta el número de leucocitos, linfocitos y monocitos que pueden salir de los vasos sanguíneos y migrar hacia la matriz extracelular. Todos ellos son atraídos quimiotácticamente al sitio donde ha ocurrido el daño tisular. La extravasación de estas células y su contacto con el tejido dañado o con los antígenos extraños promueve otra clase de eventos, como la presentación de los epítopes de los antígenos, su reconocimiento por los linfocitos (que también se han salido de los vasos sanguíneos) y el inicio de una respuesta inmune que puede ser predominantemente celular o humoral.

Tabla II. Lista de las principales sustancias solubles con actividad pro-inflamatorias ⁽²⁾.

| |
|--|
| 1. Componentes y subcomponentes del sistema complemento |
| 2. Sistema de cininas |
| 3. Factores de la coagulación (XII) |
| 4. PGE2, leucotrienos, tromboxanos, PAF, |
| 5. Quimocinas |
| 6. Histamina, serotonina, péptido intestinal vasoactivo, |
| 7. Óxido nítrico, |
| 8. Especies reactivas de oxígeno |
| 9. Factores necrosantes de tumores |
| 10. Interleucinas 1, 6, 8, 12 y18 |
| 11. Interferón gamma |
| 12. Factores estimulantes de colonias |

Los mediadores solubles de la lista anterior participan en el inicio, el desarrollo y la resolución de la respuesta inflamatoria. En un capítulo siguiente se van a revisar brevemente las principales características y actividades biológicas de algunos miembros de este último conjunto de factores.

Las manifestaciones sistémicas. Aunque la respuesta inflamatoria aguda está localizada, generalmente se acompaña de una serie de manifestaciones sistémicas, provocadas por la expansión de las señales o por los mediadores que se liberan en el sitio de la lesión inicial, pasan a la sangre y actúan a distancia. Entre estas manifestaciones sistémicas se pueden mencionar las que dependen de la estimulación del sistema nervioso (inducción de fiebre, taquicardia, etc.), del tejido hematopoyético de la médula (leucocitosis) y del sistema endócrino (el aumento en la síntesis de las hormonas anti-inflamatorias ACTH e hidrocortisona),

así como los cambios que ocurren en la síntesis una variedad de proteínas en el hígado (proteínas de fase aguda).

Cada vez que alguna de las citocinas pro-inflamatorias (TNF α , IL-1 e IL-6 principalmente) estimulan el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HHA), se inicia una reacción sistémica de alarma y de reparación (anti-inflamatoria) que se conoce como respuesta de estrés ⁽¹⁴⁾. En ese momento, también entran en juego otros mecanismos de protección como (i) la movilización del zinc que se encuentra libre en la sangre hacia el citoplasma de las células ⁽¹⁵⁾ y (ii) el aumento en la síntesis de los antioxidantes ⁽¹⁶⁾ y de proteínas de choque térmico (HSP) ⁽¹⁷⁾. Algunas de estas últimas actúan como "chaperonas", facilitando el transporte intracelular de las proteínas recién sintetizadas (por la estimulación de las citocinas pro-inflamatorias) y su liberación al exterior.

La respuesta sistémica, que sigue a la reacción inflamatoria aguda, es el resultado de la actividad parácrina de las principales citocinas pro-inflamatorias que se liberan a la sangre y circulan por todo el cuerpo ⁽¹⁸⁾. Aunque en el siguiente capítulo se describen estos efectos, se puede adelantar que algunas de ellas (IL-1 e IL-6, por ejemplo) actúan sobre el hipotálamo, los vasos sanguíneos, el tejido hematopoyético de la médula, las células hepáticas y varios tejidos más ⁽²⁾. Asimismo, otras citocinas, el TNF α por ejemplo, son inductoras de apoptosis y provocan la muerte de las células que se encuentran cercanas a sus sitios de producción ⁽³²⁾.

La respuesta inflamatoria crónica. Cuando el proceso inflamatorio no cede, entonces se puede decir que la respuesta inflamatoria se ha vuelto crónica. Como su nombre lo indica, la respuesta inflamatoria crónica es la que permanece activa más allá de la duración de una respuesta inflamatoria aguda. Se produce como una consecuencia de que no se completa la destrucción o la eliminación del agente dañino o como resultado de múltiples eventos agudos que se presentan en

una forma sucesiva en el mismo sitio de la inflamación ⁽¹⁹⁾. También se la considera como un resultado de la activación constante del sistema inmunológico, causada por la presencia persistente de un antígeno que no puede ser degradado enzimáticamente o que penetra al cuerpo en una forma continua. Las alergias (a causa de una exposición permanente a un alérgeno), las enfermedades autoinmunes, la presencia de células cancerosas, los trasplantes, las infecciones por ciertos microorganismos de localización intracelular y las quemaduras entre otros factores, pueden iniciar una respuesta inflamatoria crónica.

Una de las consecuencias más frecuentes de la inflamación crónica es la formación de un absceso, que tiene un área central de células muertas (principalmente neutrófilos) alrededor de la cual se acumulan los macrófagos y los linfocitos. Si la inflamación se prolonga más aún, entonces los monocitos que inicialmente acudieron a controlar el daño tisular comienzan a presentar cambios y, paulatinamente, aumentan de tamaño, incrementan su metabolismo, su capacidad fagocítica, la producción y liberación al exterior de más citocinas proinflamatorias, así como de radicales libres ⁽²⁰⁾. A la larga, toda esta actividad puede conducir a la formación de un granuloma, que va aumentando poco a poco de tamaño a medida que otras células continúan llegando al sitio de la lesión a través de los vasos sanguíneos que mantienen su permeabilidad aumentada ^(1, 2).

Una vez formados, en el centro de los granulomas se puede observar la presencia de material caseoso, que resulta de la digestión enzimática de los restos del tejido dañado y de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) que han muerto. Alrededor se acumulan células gigantes multinucleadas (células de Lanhans), producidas por la fusión de los macrófagos con células epitelioides, según unos autores o fusión de macrófagos, según otros. A su vez, todas ellas están circundadas por una envoltura de tejido conectivo, conformado por la matriz extracelular que producen los fibroblastos que rodean el granuloma.

Tanto los linfocitos T sensibilizados como los macrófagos activados tienen una participación importante en la formación del granuloma y en su mantenimiento, particularmente a través de los mediadores solubles INF- γ y TNF- α ⁽²¹⁾. Ambas citocinas incrementan la expresión de moléculas de adhesión celular, E-selectinas, de los productos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I y de los sitios por los que los leucocitos pueden pasar hacia el exterior de los capilares. Por otra parte, la producción del factor que inhibe la migración de los macrófagos (MIF) también contribuye a retener esos fagocitos mononucleares alrededor del sitio donde los linfocitos reconocen antígenos. Existen varias condiciones que predisponen a la formación del granuloma como son las infecciones por bacterias que se localizan intracelularmente (principalmente *Mycobacterium tuberculosis* y *Listeria monocytogenes*) o la acumulación de compuestos inorgánicos (beriliosis).

Los estudios más recientes revelan que, en los procesos inflamatorios crónicos, el factor de transcripción NF- κ B tiene una participación muy importante, cuya activación está asociada con la presencia de endotoxinas, citocinas, virus y oxidantes. El aumento citoplásmico de este factor de transcripción facilita la expresión de las moléculas de adhesión como las E-selectinas y de una gran cantidad de citocinas pro-inflamatorias y quimotácticas que actúan como mediadores de las respuestas inflamatorias crónicas. Por el contrario, el aumento en la producción de glucocorticoides (GC) incrementa la síntesis del inhibidor del NF- κ B, disminuyendo las cantidades libres de este factor transcripcional, ejerciendo de este modo un efecto anti-inflamatorio⁽²²⁾.

Se puede hacer una lista muy larga con las principales enfermedades que evolucionan asociadas a reacciones inflamatorias crónicas. Las inflamaciones crónicas son responsables del daño tisular que se observa en ciertos tipos de cáncer y en numerosas enfermedades primarias de evolución prolongada, donde las enzimas hidrolíticas, las citocinas pro-inflamatorias, las especies reactivas de oxígeno y los intermediarios del nitrógeno producidos por los macrófagos

contribuyen para ir deteriorando progresivamente el cuerpo del paciente. La inflamación crónica también se presenta en el curso de algunas enfermedades invalidantes (como la artritis reumatoide), de las enfermedades degenerativas del sistema nervioso (como la enfermedad de Alzheimer) o en las enfermedades autoinmunes [como el lupus eritematoso sistémico (LES)]. En éstas últimas, los antígenos propios son los que activan permanentemente a los linfocitos Th1 y, como consecuencia de la acción de sus interleucinas, se activan los macrófagos y la respuesta inflamatoria se mantiene actuando de manera constante. No obstante sus funciones de protección, los efectos sistémicos que tienen todas estas respuestas inflamatorias que no ceden y que se prolongan, a la larga son los responsables de que se vaya deteriorando o "desgastando" progresivamente la condición física de los pacientes ⁽²³⁾.

En numerosas enfermedades inflamatorias crónicas se ha observado que alrededor de las lesiones, en los capilares, aparecen "células endoteliales plumadas", parecidas a las células endoteliales altas de las vénulas post-capilares (HEV) ⁽¹⁾. Estas células aumentan la expresión, sobre su membrana, de las moléculas de adhesión intercelular de la familia semejante a mucina GlyCAM-1, MAdCAM-1 y CD34, que poseen normalmente las HEV ⁽¹⁾. Tanto las HEV como las células endoteliales plumadas parecen tener una importancia crítica en la salida de los leucocitos fuera de los vasos sanguíneos que existen alrededor del foco inflamatorio.

Tak y colaboradores ⁽²⁴⁾ han propuesto que el estrés oxidativo causado por especies reactivas de oxígeno (ROS) o de nitrógeno (RNS), que se liberan continuamente en los tejidos inflamados, puede modificar el curso de las enfermedades, ya que ambos tipos de moléculas generan mutaciones en el gene de la proteína p53. Esta proteína es importante por su participación en el control de la apoptosis. La mutación de su gene reduce las posibilidades de que el proceso inflamatorio se resuelva mediante la apoptosis de las células que están dañadas o malignizadas. Además de los radicales libres, otra de las causas que

pueden contribuir al desarrollo de la inflamación crónica es la actividad antiapoptótica recién descubierta de $\text{INF-}\alpha$ e $\text{INF-}\beta$, lo cual puede prolongar la vida de los linfocitos de memoria, como lo han mencionado Akbar et al ⁽²⁵⁾.

La resolución de la respuesta inflamatoria. El final de la respuesta inflamatoria implica la desaparición o neutralización del agente que la provocó o el control de los mediadores liberados en el sitio de la reacción. La eliminación del agente irritante y la reparación del tejido lesionado son los principales objetivos de la respuesta inflamatoria y, por lo general, éstos se pueden lograr rápidamente a través de la acción conjunta de las células inflamatorias y de sus mediadores solubles. Una vez eliminado el agente irritante, por lo general sucede una etapa de reparación, caracterizada por la aparición de tejido nuevo y restauración de las funciones perdidas.

Todos estos eventos están coordinados por la acción de macrófagos, fibroblastos, células cebadas, queratinocitos, células endoteliales y plaquetas que producen factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de queratinocitos (CGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), así como los factores transformantes del crecimiento α y β ($\text{TGF}\alpha$ y $\text{TGF}\beta$).

El control de la respuesta inflamatoria ha sido una inquietud constante de la medicina, tanto por la frecuencia de este tipo de reacciones como por la heterogeneidad de los factores involucrados. Existe una gran variedad de sustancias anti-inflamatorias "naturales" que el cuerpo produce en el curso de la respuesta inflamatoria, para evitar el daño excesivo e innecesario del tejido que circunda al área lesionada. Entre ellos se encuentran los glucocorticoides corticosterona, cortisona, hidrocortisona, que son producidos por las glándulas suprarrenales. En los párrafos anteriores también se han mencionado los antioxidantes como la superóxido dismutasa, las metalotioneínas y, además, las proteínas de choque térmico (HSP).

Otras sustancias "naturales" que modulan la inflamación son las prostaglandinas y el TGF β 1, que inhiben la producción de citocinas pro-inflamatorias y la adhesión de los leucocitos. La IL-4 disminuye la síntesis de IL-6 y la producción del ión superóxido en los neutrófilos, la IL-10 inhibe la producción de citocinas pro-inflamatorias y la presentación de antígenos mediada por macrófagos. Finalmente, la IL-13 inhibe la activación de los macrófagos y la liberación de citocinas pro-inflamatorias⁽³²⁾.

Tratamiento de la inflamación. Cuando la inflamación no se resuelve rápidamente en una forma natural o cuando resulta dolorosa, limitante o prolongada, entonces hace falta la administración de fármacos para controlar la expresión de sus principales signos y/o reducirla. Naturalmente, el tratamiento de la inflamación implica necesariamente el tratamiento simultáneo de sus causas.

Entre las estrategias terapéuticas que se han utilizado clásicamente en la terapia anti-inflamatoria están la eliminación del agente irritante, la aplicación local de calor y la administración de diversos productos que tienen una actividad anti-inflamatoria. A continuación, se mencionan brevemente las principales características de los anti-inflamatorios de uso más común.

En primer lugar se debe colocar a la cortisona y a los corticoesteroides sintéticos como la prednisolona, la prednisona, la dexametasona, la metilprednisolona y varios más. Todos ellos han contribuido espectacularmente al tratamiento de las manifestaciones más indeseables de las reacciones inflamatorias. Los esteroides son potentes anti-inflamatorios porque disminuyen la producción de múltiples factores que son críticos en el establecimiento de la respuesta inflamatoria, tales como INF- γ , GM-CSF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-6 y TNF- α
(22)

A un lado de los esteroides están la fenilbutazona y la indometacina, que son anti-inflamatorios no esteroides, que inhiben la liberación de la

deshidrogenasa láctica (LDH) y la fosfatasa ácida en las plaquetas ⁽²⁶⁾, así como la formación de la ciclooxigenasa (COX), que participa en la síntesis de las prostaglandinas. Actualmente existen en el mercado muchos otros medicamentos anti-inflamatorios, tales como la ciclosporina o la colchicina, que tienen diferentes mecanismos de acción. Algunos de ellos se utilizan en el tratamiento de la artritis. Casi todos ellos reducen la producción de citocinas pro-inflamatorias.

Ninguno de estos productos está exento de efectos indeseables colaterales. Así por ejemplo, los esteroides anti-inflamatorios pueden inducir la lisis por apoptosis de los linfocitos más inmaduros, cambiar el patrón de su recirculación y provocar un compromiso de la inmunidad, aumentando la susceptibilidad ante las infecciones. También se sabe que disminuyen la fagocitosis y la capacidad para matar microorganismos que tienen los macrófagos y los neutrófilos. Por otra parte, ellos también reducen significativamente la expresión de las moléculas MHC clase II, necesarias para la presentación de un mayor número de moléculas antigénicas y, también deprimen la síntesis de IL-1 que hace falta para estimular los linfocitos. Otras actividades inconvenientes de los esteroides anti-inflamatorios son la reducción de la quimiotaxis y la estabilización de la membrana lisosomal, con lo que se produce una menor liberación de enzimas lisosomales en el sitio de la inflamación, además de que se reduce la fibrosis. Los glucocorticoides también inhiben la activación de los genes necesarios para la activación de la célula T al aumentar la transcripción del inhibidor del factor NF- κ B (I- κ B), cuando se une a los elementos sensibles a glucocorticoides que poseen los genes de muchas citocinas, por ejemplo (L-6) o al reducir la actividad de enzimas que destruyen las articulaciones (colagenasa y estromelisin), o cuando se unen a proteínas transcripcionales, regulatorias (Fos y Jun), componentes de la proteína activadora 1 (AP-1).

Los principios activos de los anti-inflamatorios no esteroides (NSAID) como la indometacina, que se utilizan ampliamente en el tratamiento de la inflamación crónica o aguda, tampoco están completamente exentos de complicaciones ⁽²⁷⁾.

En los últimos años, algunos autores han propuesto varias alternativas para el control de las reacciones inflamatorias. Una de ellas es ejercer un control de la apoptosis o muerte celular programada, que generalmente está inducida por el aumento en la producción del $\text{TNF}\alpha$, la IL-10, los oxidantes y los icosanoides. Sin embargo, la administración de anticuerpos monoclonales (mAb) anti $\text{TNF}\alpha$ no ha dejado los resultados que se esperaban. Un control similar de los neutrófilos PMN ha sido otra manera en la que se ha intentado regular la inflamación. Otro blanco de acción de algunos tratamientos anti-inflamatorios hoy en día es utilizar al agonista soluble del receptor para la IL-1 como un agente que reduce la actividad de la IL-1. Más recientemente se ha propuesto controlar el desarrollo de las regiones de vasculatura que tienen un endotelio parecido al HEV, donde el $\text{INF}\gamma$ y el $\text{TNF}\alpha$ participan activamente en la estimulación de estas células.

Otras opciones que se están probando para el control de la respuesta inflamatoria involucran el uso de anticuerpos que bloquean la extravasación de los leucocitos. Los anticuerpos dirigidos contra las moléculas de adhesión intercelular o sus receptores como el ICAM-1 y el LFA-1 respectivamente, han tenido algo de éxito en la prevención de la necrosis tisular asociada a quemaduras y al reducir la probabilidad de rechazo en los injertos de riñón, en modelos animales. En lo que respecta a los humanos, una combinación de ambos anticuerpos se ha usado en pruebas clínicas, en caso de trasplante de riñón. La administración de inhibidores sintéticos de las enzimas del sistema complemento también resulta de utilidad en algunas respuestas inflamatorias que no dependen de infecciones ⁽²⁾.

O'Neil y Dinarello, en el 2000 ⁽²⁸⁾ han propuesto que la respuesta inflamatoria podría controlarse si se bloquea un dominio que comparten diferentes receptores de la superfamilia del receptor para IL-1/Toll. Los miembros de esta superfamilia de proteínas activan las señales intracelulares que promueven la respuesta del huésped a la infección y al daño tisular.

Otra opción que se ha considerado para controlar la aparición o el desarrollo de las enfermedades inflamatorias es el bloqueo de la activación del factor de transcripción NF κ B/Rel. Esta familia de proteínas citoplásmicas está formada por 5 miembros : NF κ B1 (p50/P105), NF κ B2 (p52/p100), p65(RelA), RelB y c-Rel, que regulan la expresión de diversos genes involucrados en procesos apoptóticos, inflamatorios e inmunológicos ⁽²⁹⁾. Los miembros de esta familia inducen la síntesis de citocinas como IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNF α , LT α , LT β , GM-CSF, moléculas de adhesión como ELAM, proteínas de fase aguda como la proteína amiloide A del suero (SAA), enzimas inducibles como la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2), así como de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad, importantes en la presentación de antígenos y la lisis por linfocitos T citotóxicos.

Ya sea en forma de homodímeros o como heterodímeros, estas proteínas se activan de manera específica en respuesta a un estímulo particular y pueden actuar en combinación con el factor transcripcional AP-1. Debido a que el NF κ B se encuentra altamente activado en numerosas enfermedades inflamatorias crónicas (artritis, aterosclerosis, asma, etc.), se ha propuesto que su activación sea controlada mediante la inhibición de la actividad de la IKK- β , con oligonucleótidos señuelo, inhibidores del NF κ B, u oligonucleótidos antisentido para p65 ⁽³⁰⁾.

Cabe señalar que la respuesta inflamatoria es un mecanismo de protección para el organismo de los vertebrados y no es recomendable evitarla o suprimirla en casos de infecciones. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la respuesta inflamatoria de protección también puede causar daño cuando es exagerada o cuando se prolonga demasiado tiempo.

En los últimos años, la búsqueda de alternativas terapéuticas ha estimulado el uso de varios productos naturales que, en algunos países, se han venido utilizando empíricamente desde hace mucho tiempo como parte de lo que se

acostumbra llamar la "medicina tradicional". Algunas de estas sustancias, como por ejemplo la sábila contienen esteroides, mientras otras poseen sesquiterpenos, antioxidantes, alcaloides y varias sustancias más que explican, al menos, una parte de sus efectos anti-inflamatorios cuando el producto crudo o sus extractos se aplican de una manera local o se administran por vía oral. Pero, en otros casos se desconocen casi completamente los mecanismos responsables del supuesto efecto anti-inflamatorio de algunos de estos productos alternativos. Tal es el caso del veneno de abejas que, no obstante sus componentes fundamentalmente pro-inflamatorios, se utiliza empíricamente para el tratamiento de algunas enfermedades como la artritis, que están caracterizadas por evolucionar con manifestaciones inflamatorias crónicas.

Varios estudios clínicos y de laboratorio sugieren que la administración del veneno de las abejas en personas y animales puede modificar la reactividad del sistema inmune e influir sobre la expresión de las respuestas inflamatorias que provocan sus mediadores. Algunos de estos resultados ⁽³¹⁾ muestran por ejemplo como la apiterapia de las personas alérgicas puede cambiar el perfil de las citocinas predominantes en la respuesta del sistema inmune, desde una tipo-Th2, que facilita las respuestas de hipersensibilidad, a otra tipo-Th1 más relacionada con la eliminación de los antígenos que han penetrado al cuerpo.

ii). LAS CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS

Generalidades sobre las citocinas. Se denomina "citocinas" a un grupo de proteínas de bajo peso molecular que actúan como mensajeros porque comunican las células del sistema inmune con las demás células de la sangre, de los vasos sanguíneos y de los sistemas nervioso y endocrino. Estos mensajeros inter-celulares regulan la intensidad y la duración de la respuesta del sistema inmune y, además, participan activamente en la inducción y el control de las reacciones inflamatorias que dependen de las respuestas inmunes humorales y/o celulares.

Por lo general, las citocinas sólo se producen durante un corto lapso (horas o días) después de la activación de alguna célula en particular. La mayoría de ellas sólo actúa sobre células vecinas o sobre sí mismas, en una forma paracrina o autocrina. Pero algunas citocinas pasan a la circulación y pueden actuar a distancia sobre células que están alejadas. Es frecuente que una sola citocina pueda ejercer simultáneamente varias actividades biológicas, lo cual va a depender en una buena parte de las subpoblaciones de células que expresen receptores específicos para ellas.

Las citocinas se pueden clasificar en diferentes familias según sus funciones ⁽³²⁾ y de todas ellas, las más importantes son (i) las interleucinas (IL), (ii) los factores necrosantes de tumores (TNF), (iii) los interferones, (iv) las quimocinas (que ya fueron mencionadas en el capítulo anterior) y (v) los factores transformadores del crecimiento (TGF). Los miembros de estas cinco familias de citocinas participan activamente en las reacciones inflamatorias. Las citocinas más importantes las producen principalmente los macrófagos y los linfocitos TH. Estas últimas células producen una amplia variedad de interleucinas diferentes y según las clases de interleucinas que produzcan, los linfocitos TH han sido clasificados en dos grandes grupos, los TH1 y los TH2. Por esa razón, las interleucinas de uno y otro grupo han sido denominadas interleucinas de tipo-TH1

y de tipo-TH2. Las dos clases de interleucinas tienen relación con la respuesta inflamatoria.

Respuestas inmunes tipo-TH1/TH2. La interleucina IL-2 y el IFN- γ son citocinas producidas principalmente por los linfocitos TH1, cuando éstos han sido estimulados por las interleucinas IL-6, IL-12 e IL-18, que generalmente son sintetizadas por los macrófagos y las células dendríticas. En cambio, las interleucinas de tipo-TH2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13) son producidas principalmente por los linfocitos TH2, las células NK, los mastocitos, los basófilos y los eosinófilos, como una respuesta a la estimulación por la IL-4 que sintetizan las mismas células TH2. Entre esos dos conjuntos de citocinas existe un delicado balance ⁽³³⁾, tanto en condiciones normales como en el curso de las enfermedades.

Las respuestas de interleucinas del tipo-TH1 promueven la activación de células citotóxicas como los linfocitos T citotóxicos (CTL) y la fagocitosis por los macrófagos. Esta clase de respuesta resulta un mecanismo defensivo muy eficiente al comienzo de las infecciones. En cambio, las respuestas de interleucinas del tipo-TH2 promueven la estimulación de los linfocitos B, la producción de anticuerpos (Abs) y la descarga de los productos de las células cebadas y los eosinófilos, bien sea a través de las IgE unidas a sus receptores de membrana o a través de los fragmentos (C3a principalmente) que derivan de la activación del sistema complemento. Este otro tipo de respuesta puede facilitar la aparición de reacciones de hipersensibilidad y fenómenos autoinmunes. Sin embargo, tanto unas como otras interleucinas participan en las reacciones inflamatorias. En general, la IL-10 de las células TH2 reduce la producción de las interleucinas tipo-TH1, mientras el IFN- γ de las células TH1 reduce la producción de las interleucinas del tipo-TH2 ⁽²⁾.

Como se puede observar, las citocinas son muy importantes porque pueden estimular o inhibir las funciones de las principales células que participan en las

respuestas inflamatorias. En una tabla que se presenta a continuación se enumeran las principales citocinas pro-inflamatorias, denominadas así porque participan en la inducción de la respuesta inflamatoria. El sistema inmune interviene en la modulación de la respuesta inflamatoria desde el momento que, en algunos casos, la eliminación de los antígenos extraños parece estar asegurada cuando predomina la producción de las interleucinas tipo-TH1 que estimulan las células promotoras de las respuestas pro-inflamatorias, mientras que en otros casos, al prolongarse la estimulación antigénica, son las citocinas del tipo TH2 las que promueven el regreso a la homeostasis. La respuesta del sistema inmune, que a veces resulta predominantemente del tipo TH1 y en otros casos predominantemente del tipo TH2, se encuentra modulada por las mismas citocinas de una y otra población de células, aunque también los neurotransmisores del sistema nervioso y las hormonas del sistema endocrino ejercen una actividad inmunomoduladora muy importante.

Las citocinas pro-inflamatorias promueven la liberación de los mediadores que hacen falta para eliminar cualquier material extraño o para reparar las lesiones de los tejidos.

Tabla III. Principales citocinas pro-inflamatorias ^(1,2)

| |
|---|
| 1. Familia de los Factores Necrosantes de Tumores (TNF) |
| - ligandos (TNF α , LT α , FasL) |
| - receptores (TNF-RI, TNF-RII, TRAF1, TRAF2) |
| 2. Familia de las Interleucinas-1 (IL-1) |
| - IL-1 (IL-1 α , IL-1 β) |
| - antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra) |
| - receptores (IL-1RI, IL-1RII) |
| 3. Familia de las Quimocinas |
| 4. Familia de los Factores Transformadores del Crecimiento (TGFβ) |
| 5. Otras Interleucinas (IL-6, IL-12, IL-16, IL-17, IL-18, IL-23) |

Las citocinas pro-inflamatorias son moléculas vitales para la defensa del cuerpo de los vertebrados, pero cuando se producen en exceso o durante un lapso prolongado pueden causar efectos deletéreos. Todas ellas forman varias familias que tienen algunas características comunes.

A un lado de todos estos mediadores del sistema inmune, algunos autores han añadido la familia de las sustancias pro-inflamatorias derivadas del ácido araquidónico como las prostaglandinas (PGs) y los factores inhibidores de la migración de los macrófagos (MIF). Esta lista no es definitiva. El número de células y moléculas que intervienen en la respuesta inflamatoria continúa en expansión. A continuación, se describen muy brevemente las características y actividades biológicas más importantes de las principales citocinas pro-inflamatorias ^(1,2,32).

La familia de los TNF. Uno de los principales grupos de citocinas pro-inflamatorias se conoce como la familia de los factores necrosantes de tumores (TNF). Estas citocinas han sido las más estudiadas y reúnen hasta ahora aproximadamente 13 pares de unidades ligando-receptor. Algunos de esos ligandos solubles participan muy activamente en la inducción de una respuesta inflamatoria, pero también existen otros que inducen la proliferación celular y la diferenciación de los linfocitos. Según la clase de receptor al que se unan, los miembros de la familia del TNF participan en la modulación de la respuesta del sistema inmune, en el mantenimiento de la viabilidad celular o en la eliminación de células dañadas o transformadas ⁽³⁴⁾. Tres receptores de esta familia (TNF-RI, Fas/Apo1 y NGF) poseen el "dominio muerte" ("death domain" o DD) con el que se inician las señales intracitoplasmáticas para que los ligandos de ese receptor (el TNF o el L-Fas, por ejemplo) puedan inducir la apoptosis de la célula que tiene el receptor ⁽³⁵⁾.

La inducción de la apoptosis es una de las principales actividades biológicas del TNF. El DD consiste en una secuencia de 12 aminoácidos situados

en la porción citoplasmática del receptor, a la cual se pueden unir otras moléculas del citoplasma que se encargan de activar las proteasas responsables del inicio de la apoptosis.

El TNF es el miembro prototipo de esta familia de citocinas. Fue identificado inicialmente por su capacidad para matar las células tumorales *in vitro* y por causar necrosis hemorrágica en los tumores transplantados a los ratones. Los estudios siguientes demostraron que el TNF era además uno de los principales mediadores de las reacciones inflamatorias, de la caquexia y del choque endotóxico. Sin embargo, hasta ahora han sido negativos todos los intentos realizados para utilizar sus efectos en el control del cáncer, a causa de su elevada toxicidad, tanto en los animales como en las personas.

Tabla IV. Lista de las principales actividades biológicas del TNF ⁽²⁾.

| |
|--|
| 1. Induce la muerte celular programada (apoptosis) |
| 2. Induce la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio de los vasos |
| 3. Aumenta la síntesis de iNOS y la formación de óxido nítrico |
| 4. Aumenta la síntesis de los factores de la coagulación |
| 5. Estimula linfocitos T y B |
| 6. Estimula la producción de anticuerpos |
| 7. Estimula hipotálamo : fiebre, anorexia y sueño |
| 8. Aumenta la síntesis de proteínas de fase aguda |
| 9. Suprime la lipoproteína lipasa en los adipocitos y contribuye a la caquexia |
| 10. Aumenta la producción de citocinas pro-inflamatorias |

El TNF y los demás ligandos de esta familia son sintetizados como proteínas transmembranales de tipo-II. Estos ligandos son generalmente

liberados de la parte más externa de la membrana mediante la acción de la enzima convertidora del TNF (TACE) que hidroliza la proteína y deja libre al ligando. La única excepción es la linfotoxina- α que es secretada directamente fuera de la célula. Una vez que han quedado libres, los ligandos de la familia del TNF forman homo-trímeros solubles.

El TNF expresa sus múltiples actividades biológicas mediante su unión a dos clases diferentes de receptores, conocidos como TNF-RI y TNF-RII. Pero como en la familia existen varios ligandos más, actualmente se ha ampliado el número de los receptores y se conocen por lo menos 20 receptores diferentes para los distintos ligandos de la familia del TNF. Algunos de esos receptores son simples "señuelos", es decir no generan ninguna señal ni inducen ninguna actividad después de unirse a su correspondiente ligando. El TNF-RI y el Fas son los receptores más importantes porque se encuentran sobre la superficie de la membrana de casi todas las células del cuerpo, mientras que el TNF-RII se expresa solamente en las células del sistema inmune, lo cual limita hacia ellas sus actividades biológicas. El L-Fas es el ligando del receptor Fas. Este ligando sólo se encuentra sobre la membrana de los linfocitos T citotóxicos, mientras que su receptor Fas, que tiene el dominio DD en su porción citoplásmica, se encuentra presente en casi todas las células del cuerpo.

La interacción de los ligandos de la familia TNF con sus respectivos receptores se puede traducir en una larga serie de actividades biológicas. Algunas de ellas se presentaron en la Tabla IV. De todos esos efectos, los más conocidos son los que relacionan al TNF con las reacciones inflamatorias, a causa de su participación en el aumento de la permeabilidad capilar y la elevación de la producción de citocinas pro-inflamatorias, óxido nítrico y proteínas de fase aguda. La inducción de la apoptosis se puede considerar un mecanismo que atenúa las reacciones inflamatorias, las cuales serían mucho más intensas en los casos de necrosis celular. A continuación se describen brevemente las interacciones

moleculares que se requieren para que una célula active sus mecanismos de muerte programada.

Para que se inicie la apoptosis mediada por el TNF se necesita primero que algunos ligandos de esta familia se unan a sus receptores y que, a continuación, éstos interactúen con varias proteínas citoplásmicas que tienen regiones homólogas al dominio muerte (DD) que se expresa en los receptores. Una de esas proteínas citoplásmicas es el TRADD (proteína con el dominio muerte asociado al TNF-RI) que interactúa con el TNF-RI y otra es el FADD (proteína con el dominio muerte asociado al receptor Fas) que interactúa con el receptor Fas. Las proteínas intracitoplásmicas DD actúan como adaptadores después de combinarse con la región DD del receptor. El TRADD por ejemplo, recluta a su alrededor a una serie de proteínas que son estructural y funcionalmente diferentes pero que tienen regiones homólogas al DD, de modo que forman varias uniones dimericas que están relacionadas con la inducción de la apoptosis o muerte celular programada, pero también con la activación del factor de transcripción NF- κ B que es una molécula anti-apoptótica. Además, existen otras proteínas (SODD) que son silenciadores de los dominios de muerte porque se pueden unir a ellos pero para impedir que se genere la inducción de una señal a favor de la apoptosis. El NF- κ B también tiene su receptor (conocido como RANK o TRANCE) que ha sido incluido en la familia de los TNF-R.

Cuando las proteínas intracitoplasmáticas TRADD o FADD se unen a otras que tienen regiones homólogas al dominio muerte, el resultado puede ser una señal para la inducción de la apoptosis (FADD) o para la activación del factor de transcripción NF- κ B (TRADD) que tiene una actividad anti-apoptótica ⁽³⁶⁾. En el primer caso, las proteínas con el dominio DD reclutan a la caspasa-8 para que se una al complejo formado alrededor de la porción intracitoplásmica del receptor y enseguida se activan los siguientes componentes de la cascada de las caspasas hasta que se produce la apoptosis. Pero, ya se mencionó que algunas otras moléculas pueden participar como inhibidores de la apoptosis. Es posible que

existan rutas de activación de las caspasas que sean antagónicas con la ruta que induce la apoptosis porque inducen la activación del NF- κ B. Se cree que del mismo receptor pueden salir señales antagónicas que representan mecanismos de retroalimentación negativa. Recientemente, se han identificado señuelos para ambos tipos de receptores del TNF y de la proteína FADD, con lo que la transducción de señales inductoras de apoptosis pueden inhibirse.

Así como los mecanismos oxidantes están modulados por los mecanismos anti-oxidantes, las citocinas pro-inflamatorias están moduladas por las citocinas anti-inflamatorias. El mismo balance que tiende a una homeostasis también se encuentra dentro de la familia de los factores necrosantes de tumores que, simultáneamente, envían unas señales para inducir la apoptosis y otras para inhibirla.

Varios receptores más y sus correspondientes ligandos han sido incluidos en la familia del TNF. Uno de ellos es el TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado al TNF), que es una proteína DD intracitoplasmática que actúa como adaptadora, uniéndose a la porción citoplasmática de sus correspondientes receptores (llamados TRAIL-R) ⁽³⁷⁾. El TRAIL es muy importante porque, al unirse a su receptor, puede inducir la apoptosis de varias líneas celulares cancerosas, pero no de las células normales. Sin embargo, el TRAIL se expresa en casi todas las células, lo cual permite sugerir que la molécula no es tóxica para las células normales. Sus receptores tienen el dominio muerte (DD), pero uno de ellos (TRAIL-R4) sólo expresa un tercio del DD y representa por lo tanto un "señuelo", cuya sobreexpresión puede proteger la célula contra la apoptosis ^(1,44).

Apoptosis y caspasas. La apoptosis es una forma de morir que tienen las células y que se encuentra controlada genéticamente. Es decir, Por lo ocurre después de cierto número de multiplicaciones celulares o tiempo de vida. Sin embargo, la apoptosis también puede ser inducida. Así por ejemplo, cada vez que el TNF u otros ligandos de esa familia se unen a sus receptores que tienen el DD

en la porción citoplasmática, a continuación se inicia una cadena de reacciones enzimáticas que van a provocar la apoptosis. Se puede decir que, al inducir la apoptosis, esas moléculas se comportan como proteínas anti-inflamatorias porque impiden que, en el caso de una muerte por necrosis, se liberen las enzimas y otros componentes intracitoplasmáticos que pueden activar los mecanismos inflamatorios mencionados en la primera parte de este capítulo. Los glucocorticoides, potentes anti-inflamatorios, parecen ejercer esa actividad a través de su capacidad para inducir la apoptosis ⁽⁴³⁾. La mayoría de los ligandos de la familia del TNF son moléculas que pueden inducir la apoptosis y que, al mismo tiempo, han sido clasificadas como pro-inflamatorias. Estos efectos aparentemente antagónicos se observan frecuentemente al estudiar las actividades biológicas de casi todas las moléculas que participan en las reacciones inflamatorias.

A continuación se revisa brevemente el significado biológico de la apoptosis por su importancia como un mecanismo anti-inflamatorio. La muerte por apoptosis permite que los organismos vivos eliminen : (i) las células que ya no se necesitan, (ii) las células que han envejecido y tienen francamente reducidas sus actividades biológicas, (iii) las células enfermas (cáncer) o dañadas por sustancias tales como los fármacos utilizados en la quimioterapia, autoanticuerpos, agentes físicos como la luz UV, etc. y (iv) las células infectadas por virus, que deben morir para impedir la replicación de éstos y prevenir la infección de otras células, evitando así la aparición de las reacciones inflamatorias. Al eliminar todas estas células sin que ocurra el rompimiento de sus membranas y sin que se liberen sus componentes internos, la apoptosis se traduce en un control de la respuesta inflamatoria.

La apoptosis se encuentra modulada por los productos de una familia de genes. Los genes bcl-2 y bcl-X1 la inhiben, mientras que los bax, bak, cl-X5 y fas, la promueven. Si los niveles de la proteína Bcl-2 son superiores a los de la proteína Bax, la apoptosis puede ser inhibida. Algunas células cancerosas, como

las del melanoma, sobreexpresan Bcl-2 y de este modo inhiben la apoptosis para prolongar la supervivencia de las células malignizadas ⁽³⁸⁾.

Los inductores más conocidos de la apoptosis son los ligandos de la familia del TNF, pero la muerte programada también puede ser inducida por muchos otros factores físicos y químicos que dañan la integridad de las células. Los mediadores de esta clase de muerte celular programada son una familia de enzimas proteolíticas llamadas "caspasas", que normalmente se encuentran en el citoplasma de todas las células, en una forma inactiva, como zimógenos (pro-caspasas). Cuando las caspasas se activan se unen hasta formar tetrameros y actúan una sobre otra en forma de cascada ⁽³⁹⁾, como la del sistema del complemento.

La familia de las caspasas ("Cysteine-requiring Aspartate protease", aspartato proteasa que requiere de cisteína) ha sido dividida en tres subfamilias. La subfamilia de caspasas-1 (caspasas tipo ICE) reúnen las caspasas 1, 4, 5, 11 y 13 y 14. Se llaman del tipo-ICE porque la caspasa-1 fue inicialmente llamada la enzima convertidora de la interleucina-1 β . Todos los miembros de esta subfamilia, junto con la caspasa-12, participan mucho más activamente en las reacciones inflamatorias que en la apoptosis. La subfamilia de caspasas-2 sólo reúne las caspasas 2 y 9, mientras que la subfamilia de caspasas-3 reúne las caspasas 3, 6, 7, 8 y 10. Las caspasas de la subfamilia 2 y 3 son las que participan en la inducción de la apoptosis y se comportan por lo tanto como excelentes moléculas anti-inflamatorias. La caspasa-8 es la iniciadora de la cascada y se activa después que los ligandos de la familia del TNF se unen a sus receptores que tienen el dominio de muerte. A un lado de los factores activadores de las caspasas existen otros que son inhibidores ⁽⁴⁰⁾.

La familia de la IL-1. Esta es otra familia de citocinas que tienen mucha relación con las reacciones inflamatorias. La familia de las IL-1 reúne 3 ligandos diferentes pero que están relacionados estructuralmente : IL-1 α , IL-1 β y el

antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra). Este último compite con los dos primeros por los mismos receptores en la membrana, pero no genera ninguna señal a la célula ⁽⁴¹⁾.

Los genes para la síntesis de IL-1 α e IL-1 β son transcritos rápidamente después que la membrana de los macrófagos o de las células dendríticas recibe una estimulación con endotoxinas (LPS) o se organiza para comenzar el proceso de la fagocitosis. Los genes que codifican para la IL-1 también contienen elementos reguladores que se unen a glucocorticoides, los cuales suprimen la producción de la IL-1, sin afectar la síntesis del inhibidor. Tanto la IL-1 α como la IL-1 β son sintetizadas como moléculas precursoras de 31 kDa. Los precursores de IL-1 son hidrolizados por enzimas proteolíticas (ICE y calpaína) hasta quedar como péptidos biológicamente activos de 17 kDa. Ninguna de las dos IL-1 es secretada por medio de vesículas del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi, sino por transporte activo a través de la membrana. En cambio, el IL-1Ra sí es secretado a través de las vesículas que se forman en el aparato de Golgi ⁽⁴²⁾.

La IL-1 puede ser producida por todas las células fagocíticas mononucleares que son presentadoras de antígenos a los linfocitos TH2. Los monocitos humanos producen principalmente la IL-1 β , mientras los macrófagos de ratón producen principalmente la IL-1 α . De las dos, la principal interleucina IL-1 soluble que ha sido detectada es la beta, mientras la forma alfa se encuentra generalmente asociada a la membrana de las células. Sin embargo, en las personas normales, sanas, la cantidad de IL-1 β en el suero es tan pequeña que no puede ser detectada (>40 pg/ml), excepto en las mujeres después de la ovulación o en cualquier individuo que haya realizado un ejercicio intenso. Los fagocitos mononucleares y los queratinocitos son una de las fuentes más importantes de las moléculas que forman la familia de las IL-1, particularmente en los casos de infecciones, reacciones inflamatorias o daño celular y/o tisular. La producción de las IL-1 también puede ser estimulada por varios productos endógenos, tales como los leucotrienos, algunos componentes del sistema complemento (C5a) y el

TNF α , todos ellos relacionados con la inducción de respuestas pro-inflamatorias. En cambio, la IL-10, TGF β e IL-4 más bien disminuyen la producción de la IL-1 β mientras que, simultáneamente, aumentan la síntesis del IL-1Ra. La síntesis de la IL-1 β generalmente precede a la de la IL-1 α ; posteriormente se produce el IL-1Ra. La IL-1 es el mejor inductor de la síntesis de su antagonista.

La familia IL-1 incluye, además, dos tipos diferentes de receptores (IL-1RI e IL-1RII) que son miembros de la familia de las Igs. El receptor tipo-II es un “señuelo” porque no transmite ninguna señal después de habersele unido la IL-1. Por esa razón se le considera un inhibidor por competencia de la actividad de la IL-1 y por consiguiente, una molécula con una actividad francamente anti-inflamatoria.

Los receptores para IL-1 del tipo I se encuentran en la membrana de un conjunto de células que están repartidas por todo el cuerpo (linfocitos T, células endoteliales, hepatocitos, fibroblastos y queratinocitos). En cambio, los receptores tipo II se encuentran casi exclusivamente en los linfocitos B, los monocitos y los neutrófilos. La IL-1 α se une principalmente a los receptores tipo I, mientras que la IL-1 β lo hace principalmente a los receptores tipo II. El receptor para la IL-18 pertenece a la misma familia de receptores para IL-1. Por eso, esta otra interleucina ha sido incluida en el conjunto de las citocinas pro-inflamatorias ⁽²⁸⁾. Por otra parte, la familia de los receptores Toll, encontrados inicialmente en la mosca *Drosophila*, pero presentes en casi todos los seres vivos y hasta en las células de las plantas, tienen un dominio citoplásmico homólogo al dominio citoplásmico del receptor de la IL-1, aunque los dominios extracelulares son diferentes ⁽²⁸⁾. En ambos casos la unión de sus respectivos ligandos activa al factor de transcripción NF- κ B. Se han propuesto numerosos ligandos de los receptores parecidos a la proteína Toll de las moscas y casi todos ellos son productos de los microorganismos con los cuales convivimos.

Lo mismo que las otras citocinas pro-inflamatorias y los ligandos de los receptores Toll, cada vez que la IL-1 se une a su receptor tipo I se activa una vía de transducción de señales que conduce a la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1. El receptor para IL-1 (IL-1R) tiene su porción intracelular asociada a varias enzimas cinasas (IRAK) que se autofosforilan y forman complejos de enzimas que activan los factores de transcripción que se mencionaron. El factor nuclear NF- κ B se encuentra inicialmente en el citoplasma de las células, unido a una proteína inhibidora llamada I κ B. Cuando la célula recibe el estímulo de un factor pro-inflamatorio, el I κ B se degrada y entonces queda libre el NF- κ B, el cual se desplaza hacia el núcleo donde se une al DNA y activa la transcripción de los genes que codifican para la síntesis de citocinas pro-inflamatorias.

Muchos de los efectos biológicos (pro-inflamatorios) inducidos por la IL-1 dependen de su capacidad para, a través de NF- κ B, provocar un aumento en la síntesis de otras citocinas, tales como los factores estimulantes de colonias (CSF), el TNF, la IL-6, la IL-8, la IL-11 y otras quimocinas. La IL-1, al igual que la IL-6, puede provocar fiebre, estimular el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal para aumentar la producción del factor liberador de la corticotropina (CRF) e inducir la síntesis de las proteínas de fase aguda en el hígado. Pero la IL-1 también estimula la síntesis de moléculas de adhesión intercelular sobre la membrana de las células endoteliales y, de este modo, facilita la extravasación de los leucocitos. En el cerebro, la IL-1 producida por las células de la glía estimula los astrocitos para que aumenten la producción de la sintasa del óxido nítrico. La IL-1 es una potente citocina pro-inflamatoria, cuyas actividades biológicas son pleiotrópicas y, algunas de ellas están compartidas por otras citocinas pro-inflamatorias como la IL-6 y el TNF- α ^(1,28).

La familia de los factores transformadores del crecimiento (TGF- β).

Estos factores forman una familia de proteínas producidas por linfocitos T, macrófagos y células dendríticas, que controlan la diferenciación, proliferación y

activación de las células del sistema inmune que participan en las reacciones inflamatorias. Los trabajos más recientes señalan que los linfocitos T productores de TGF β no son ni TH1 ni TH2, sino aparentemente una nueva subpoblación (que algunos han denominado TH3) que regula las dos anteriores y que lo hace precisamente a través de la producción del factor transformador del crecimiento.

Los TGF β son unas moléculas muy importantes en las reacciones inflamatorias. La evidencia que se tiene indica que controlan las respuestas inmunes pro-inflamatorias que dependen de las citocinas producidas por los linfocitos TH1 y TH2 ⁽⁴⁴⁾. Además poseen la capacidad de suprimir la hematopoyesis e inhiben la adhesión de los leucocitos. Los efectos biológicos del TGF β dependen del tipo de célula sobre la que actúa, su estado de maduración-diferenciación y del ambiente fisiológico local. En general, sus funciones son moduladoras, ya que influyen sobre la presentación de los antígenos por los macrófagos, disminuyen la expresión de CD40 y los productos Clase I y II del MHC y reducen la producción de IL-12 y TNF, así como los niveles de la sintasa del óxido nítrico.

Los experimentos realizados en cultivos de linfocitos muestran que la exposición al factor transformador del crecimiento inhibe la producción de INF- γ por parte de los linfocitos TH1 que han sido estimulados con la IL-12. Existe una relación antagónica entre TGF β y la IL-12. En células del sistema inmune, el TGF β además inhibe la síntesis inducida por mitógeno de IL-2, IL-3, GM-CSF y TNF α . En algunos modelos de enfermedades inflamatorias, el TGF β tiene un efecto protector anti-inflamatorio.

Más interesantes aún son los efectos del TGF β sobre la producción de anticuerpos y la activación de los macrófagos. En el primer caso, el TGF β tiene la capacidad de inhibir la síntesis de inmunoglobulinas y la secreción de todas las clases y subclases de anticuerpos. Sin embargo, bajo ciertas condiciones experimentales, se ha podido observar que el mismo TGF β puede facilitar la

producción de algunas clases de anticuerpos. La misma dicotomía se ha encontrado al estudiar los efectos del TGF β sobre los macrófagos. Así por ejemplo, los monocitos separados de la sangre periférica pueden ser estimulados por el TGF β . Estas células fagocíticas periféricas aumentan su respuesta quimiotáctica, la expresión de integrinas sobre la membrana, la secreción de IL-1 y TNF, así como la actividad fagocítica. Pero, cuando los estudios se realizan sobre macrófagos que están infiltrados en los tejidos, entonces la actividad del TGF β resulta francamente supresora sobre los macrófagos y, por consiguiente, anti-inflamatoria ^(1, 46).

Interleucina-12. Esta molécula, IL-12, es otra citocina pro-inflamatoria. Es la única citocina dimérica conocida hasta ahora cuyas dos subunidades están codificadas por dos genes separados. La principal fuente de la IL-12 son las células dendríticas y los monocitos/macrófagos, aunque también la producen las células cebadas y los linfocitos B. Lo mismo que la IL-18, esta interleucina es necesaria para la activación y la multiplicación de los linfocitos TH1, cuya producción de citocinas (tipo-TH1) promueve la inflamación alrededor de los tejidos dañados y la reparación de los mismos ⁽⁴⁷⁾.

Las respuestas de citocinas tipo-TH1 son responsables de estimular las reacciones de hipersensibilidad retardada que son mediadas por los linfocitos T citotóxicos (LTC) y, además, de estimular macrófagos y células NK, que tienen una participación importante en el desarrollo de las lesiones que acompañan las reacciones inflamatorias. Así por ejemplo, la IL-12 que estimula la respuesta TH1 en los pacientes con tuberculosis es necesaria para la formación de los granulomas, en el curso de las reacciones inflamatorias crónicas, y se la encuentra elevada en el líquido de los derrames pleurales. En modelos experimentales de ratones tuberculosos, la formación de los granulomas se puede bloquear mediante la neutralización de la IL-12 con anticuerpos monoclonales anti-IL-12.

Desde hace años se conoce que la respuesta de las citocinas tipo-TH1 se encuentra aumentada en el curso de las infecciones por microorganismos que tienen una localización intracelular. Esto concuerda con la función de la IL-12, ya que son los macrófagos y las células dendríticas infectadas, y con microorganismos dentro de su citoplasma, las principales células que producen esta citocina. Una vez producida, la IL-12 puede actuar en una forma autocrina sobre los mismos macrófagos que la producen, pero también se une a los receptores específicos para ella que se encuentran sobre la membrana de los linfocitos TH0 y les estimula su transformación en células TH1.

Además de su participación importante en las reacciones inflamatorias, la IL-12 puede estimular la proliferación, la diferenciación y la migración de los precursores de las células dendríticas, en el tejido hematopoyético de la médula ósea. La IL-12 también estimula la maduración de las células NK y su conversión a células LAK, aumenta la producción de INF- γ e IL-2, e inhibe la angiogénesis. Como aumenta la expresión de receptores para TNF se la considera una citocina clave en la eliminación de las células tumorales. La estimulación de una respuesta de citocinas tipo-TH2 (a través de la IL-4, por ejemplo) tiende a disminuir la síntesis de la IL-12 y deprime la respuesta de citocinas tipo-TH1 ⁽⁴⁸⁾.

Interleucina-6. La IL-6 es un miembro de una familia de citocinas relacionadas [IL-6, IL-11, oncostatina M (OSM), factor inhibitorio de leucemia (LIF) cardiotropina-1 (CT-1), el factor ciliar neurotrófico (CNTF) y la nueva neurotropina-1 (NNT-1)] que tienen la particularidad de unirse a receptores compuestos por cadenas α específicas de citocina y una o dos unidades gp130, que transmiten la señal ^(50, 203).

La interleucina 6 es una citocina pro-inflamatoria que es producida principalmente por los macrófagos, los linfocitos TH2 y las células del estroma de la médula ósea. Sus principales inductores son los LPS, IL-1, TNF- α , forskolina, AMPc, IL-18, mientras que los GC y las hormonas sexuales la regulan de manera

inhibitoria ^(24, 124). La IL-6 es una interleucina pleiotrópica, ya que puede actuar sobre diferentes tejidos estimulando funciones distintas ⁽⁴⁹⁾.

La IL-6 fue inicialmente conocida por su capacidad de estimular la diferenciación de los linfocitos B hacia células plasmáticas. Pero poco tiempo después se fueron descubriendo sus múltiples actividades como una citocina pro-inflamatoria. La IL-6 estimula el centro termoregulador del hipotálamo y produce fiebre, estimula los hepatocitos aumentando la síntesis de las proteínas de fase aguda, promueve la síntesis de las moléculas de adhesión intercelular sobre la membrana de las células endoteliales y aumenta la permeabilidad capilar facilitando la extravasación de los leucocitos. Simultáneamente, la IL-6 ha resultado ser una excelente moduladora de la respuesta inflamatoria, ya que actúa directamente sobre el hipotálamo y la hipófisis, con el consiguiente aumento en la producción del CRF, ACTH y glucocorticoides, los cuales atenúan la reacción inflamatoria. La IL-6 también estimula los linfocitos T y B y promueve la diferenciación de las células mieloides.

La unión de la interleucina 6 a su receptor induce la dimerización de la gp130 y activa las tirosina cinasas Jak1, Jak2 y Tyk2 y, la subsecuente fosforilación y activación de los factores de transcripción Stat. En muchas células Stat3 es el factor de transcripción que activa la IL-6, aunque Stat1 se puede activar por dosis altas de la citocina en ciertas células. Stat3 tiene diferentes funciones dependiendo del tipo de célula de que se trate y del estado de activación en el que se encuentre. Puede inducir proliferación, detener el crecimiento, promover o evitar la apoptosis. En el sistema inmune, Stat3 estimula la sobrevivencia y la función de las células T, mientras que en las células B promueve la producción de Abs.

Junto con la IL-11, la IL-6 ejerce una importante actividad anti-inflamatoria a través de la inducción de la síntesis de diversos factores anti-inflamatorios como el IL-1Ra, receptores solubles del TNF, proteínas de fase aguda, IL-10, CGs,

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*. La acción final de ambas citocinas en la inflamación la determina el balance entre sus actividades pro/anti inflamatorias en los diferentes tipos celulares ⁽⁵⁰⁾.

Sus actividades biológicas como una citocina que puede estimular respuestas pro- y anti-inflamatorias, colocan a la IL-6 en el centro de la red de las citocinas, orquestando no solamente la producción de una gran variedad de ellas, sino también regulando la actividad de numerosos tejidos diferentes, tales como sistema nervioso central, útero, hígado, músculo, vasos, etc. ⁽⁵¹⁾.

El aumento en su producción no solamente representa una señal de que está ocurriendo una respuesta pro-inflamatoria, sino también de que se está intentando controlar, con glucocorticoides y otras moléculas más, los posibles riesgos de ese mecanismo defensivo ⁽⁵²⁾.

Interleucina-18. Esta citocina ya fue mencionada como un miembro de familia de la IL-1, que inicialmente se identificó como un factor inductor de la síntesis del IFN- γ . En algunas enfermedades autoinmunes, se ha observado que la IL-18 es un regulador de las respuestas inmunológicas innata y adquirida y su presencia ha sido demostrada en una gran cantidad de procesos inflamatorios crónicos ⁽⁵³⁾.

Esta interleucina pro-inflamatoria se sintetiza en forma inactiva, como una pro-IL-18, que adquiere su forma madura por acción de la caspasa 1 (ICE). Es producida por queratinocitos, células de Kupffer, monocitos/macrófagos, células dendríticas, condrocitos articulares, fibroblastos sinoviales y osteoblastos. La IL-18 reconoce un receptor heterodimérico (IL-18R) formado por una cadena α (IL-18R α) y una cadena β (AcPL) que no es de unión, expresadas sobre células T y B,

NK, dendríticas, macrófagos y condrocitos. La vía de señalización que activa involucra a proteínas como MyD88, IRAK, TRAF6 y NFκB.

En combinación con la IL-12, la IL-18 promueve las respuestas de tipo-TH1, estimulando las células NK, así como la producción de IL-2 e IFNγ, aunque por sí sola también aumenta las respuestas de tipo-TH2. La IL-18, junto con la IL-12, los LPS y otros productos bacterianos puede inducir la liberación de óxido nítrico (NO) y, además, suprime la angiogénesis y la maduración de los osteoclastos. Se ha observado que posee efectos pro-inflamatorios directos, al activar al NFκB y, por consiguiente, promover la producción de TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-8 ⁽⁵⁴⁾.

El RNAm de la interleucina 18 se ha detectado en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (RA) y osteoartritis. En los cultivos de las células de la membrana sinovial de pacientes con RA o en el fluido sinovial de las articulaciones, la adición de la IL-18 estimula la producción *in vitro* de INF-γ, GM-CSF y TNF α, cuya síntesis también se incrementa en presencia de IL-12 y/o IL-15 o se suprime al añadir al medio el TGF-β y la IL-10. La producción de la interleucina IL-18, así como la IL-15 por los sinoviocitos, puede aumentar en presencia de la IL-1β o del TNF-α ⁽⁵⁵⁾. Se considera que IL-18 ejerce un control importante en las respuestas inmunológicas celulares dirigidas contra patógenos, mediante la inducción de la síntesis del INF-γ y por sus efectos pro-inflamatorios al estimular la síntesis de TNFα, IL-1α, IL-1β e IL-6, en los ratones ⁽⁵⁶⁾.

La prostaglandina E₂ (PGE₂). En realidad, la PGE₂ no es una citocina, pero por sus efectos se la incluye en el grupo de las sustancias pro-inflamatorias más activas y por eso se describe en esta sección.

Las prostaglandinas (PGs) son un conjunto de moléculas lipídicas, intracelulares, que se sintetizan a partir del ácido araquidónico, un ácido graso presente principalmente en los fosfolípidos de las membranas celulares y los

triglicéridos del tejido adiposo ⁽⁵⁷⁾. Las PGs están compuestas por un ácido monocarboxílico de 20 átomos de carbono que tienen un anillo interno de ciclopentano y varias dobles ligaduras. También se les conoce como eicosanoides. Existen 5 tipos diferentes de ellas y se distinguen porque tienen uno o más dobles enlaces o están oxigenados en posiciones específicas.

Las PGs se llaman así porque originalmente se identificaron en el fluido seminal de la glándula prostática, aunque ahora se les ha encontrado en numerosos tejidos, a concentraciones de nanogramos. Las prostaglandinas son importantes mediadores de la comunicación celular, promueven la contracción del músculo liso, intervienen en el balance de electrolitos, en la transmisión nerviosa, la retención de agua, la presión sanguínea o la coagulación de la sangre, también participan en la transducción de señales intracelulares y en el desarrollo de la respuesta inflamatoria. Su producción y liberación son específicas del tipo celular e involucran mecanismo específicos, complejos y altamente regulados.

Las PGs se producen cuando existe daño tisular o por la unión de quimocinas o citocinas a sus respectivos receptores, en la membrana de las células que los poseen. En el último caso, la unión ligando-receptor activa a la fosfolipasa A2 (PLA-2), una enzima que libera al ácido araquidónico, el cual es utilizado inmediatamente por diversas enzimas para la síntesis de los eicosanoides, es decir las prostaglandinas, los leucotrienos (LT), los tromboxanos (TX). La PLA-2 también libera lisofosfolípidos, que son los precursores para la formación del factor activador plaquetario (PAF).

Las enzimas ciclooxigenasa 1 y 2 (COX-1 y COX-2, respectivamente) intervienen en la oxigenación del ácido araquidónico, formando las PGs y los LT. Ambas enzimas son muy similares al nivel de aminoácidos (aa), propiedades catalíticas y especificidad del sustrato. La primera se produce de manera constitutiva, mientras que la segunda se sintetiza bajo la influencia de diversos estímulos externos tales como citocinas, factores de crecimiento y promotores de

tumores. Se ha sugerido que la actividad de la COX-1 esté relacionada con la secreción de mediadores extracelulares, mientras que la actividad de la COX-2 pudiera influir en procesos de división celular, crecimiento y diferenciación.

Existen diversas variedades de PGs y todas son mediadores solubles de la inflamación, ya que participan tanto en la activación como en el control de la respuesta inflamatoria que se inicia después de cualquier daño a los tejidos, además de intervenir en la homeostasis. Estas actividades las pueden realizar debido a que todos los tejidos tienen receptores de membrana específicos para ellas. Estos receptores para las prostaglandinas tienen forma de serpiente ya que cruzan la membrana 7 veces y están acoplados a proteínas G, por lo que su acción es a través del control en la producción de segundos mensajeros como el AMPc o el GMPc.

Las citocinas influyen tanto en la síntesis como en la actividad que ejercen las prostaglandinas en las células, debido a que pueden estimular su síntesis *de novo*, inducen las enzimas que controlan su biosíntesis o su inactivación, controlan la producción de los receptores para ellas y, pueden actuar, con ellas, en forma sinérgica. Además, pueden generar respuestas estimuladoras o inhibitorias, dependiendo del tipo de citocina y prostaglandina que se encuentren presentes. Se ha observado que la IL-1, IL-6 y el TNF α incrementan la producción de la PLA-2 en una variedad de células, lo cual se correlaciona con el aumento en la producción de las prostaglandinas. Un ejemplo de esta influencia lo constituye la PGE₂, cuya síntesis se ve aumentada por efecto de la IL-1.

Por otro lado, se ha observado que los glucocorticoides suprimen tanto la producción de las PGs como de las citocinas y que la indometacina inhibe la actividad de la COX. Algunos de los eicosanoides poseen propiedades anti-inflamatorias que son necesarios para contrarrestar los efectos de los mediadores inflamatorios, en los neutrófilos y en el sitio de la lesión ⁽⁵⁸⁾.

III). LA INFLUENCIA DE LA EDAD EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA

Edad e inflamación. En este capítulo se revisa una parte de la información que se ha acumulado en los últimos años sobre la influencia de la edad en el curso y el pronóstico de las reacciones inflamatorias, así como sobre la producción de las citocinas que pueden modular este tipo de respuestas.

El proceso de envejecimiento está asociado a una disminución de la capacidad de adaptación (por la labilidad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal) y a una baja capacidad para restaurar la homeostasis alterada ^(59, 60). Como una consecuencia, a medida que aumentan su edad, las personas y los animales expresan respuestas inflamatorias que cada vez son más difíciles de modular, que se presentan más frecuentemente y que tienen algunas características diferentes a las de los individuos jóvenes ⁽⁶¹⁾. Por el otro lado, también se han publicado trabajos en los que se ha podido observar que las alteraciones en la respuesta inmunológica de las personas de edad avanzada no son tan dependientes de la edad, sino que más bien están provocadas por la mala alimentación que reciben y el estado de salud descuidado en el que se encuentran ^(62, 63, 64). De todos modos, en lo que respecta a la respuesta inflamatoria, se ha podido observar que después de una infección los niveles de citocinas pro-inflamatorias se mantienen elevados durante más tiempo en las personas mayores que en las jóvenes ⁽⁶⁵⁾.

Para poder explicar esos desórdenes inmunológicos, se han propuesto diversas teorías respecto a cómo y porqué se van acumulando los cambios bioquímicos que caracterizan el envejecimiento. La tendencia general es que en lugar de pensar que las deficiencias progresivas del sistema inmune facilitan el envejecimiento, más bien se cree que su actividad exagerada puede ser un factor de riesgo. Una parte de las teorías propone que los procesos inflamatorios crónicos (acompañados de una respuesta importante del sistema inmune) son los que van alterando el metabolismo del cuerpo de los seres vivos a medida que éstos envejecen ⁽⁶⁶⁾.

Entre las teorías más conocidas se pueden mencionar las que señalan que el envejecimiento es una consecuencia de las reacciones inflamatorias provocadas por (i) la formación de radicales libres ⁽⁶⁷⁾, (ii) el decaimiento de las funciones inmunológicas ⁽⁶⁸⁾ y (iii) un desorden en la producción de citocinas ⁽⁶⁹⁾. Otros autores sostienen que la causa del envejecimiento depende más bien de la respuesta natural anti-inflamatoria que está mediada por los glucocorticoides ⁽⁷⁰⁾. Sin embargo, ninguna de las teorías mencionadas es definitiva y todas ellas tienen numerosos defensores y detractores.

La teoría del envejecimiento por radicales libres. Hoy en día, la hipótesis más popular sostiene que el envejecimiento es una consecuencia de la sucesión paulatina de reacciones inflamatorias que se presentan como una consecuencia de un aumento progresivo en la liberación de radicales libres ⁽⁷²⁾. Estas reacciones son inevitables porque la formación de radicales libres es una consecuencia natural del metabolismo del oxígeno que respiran todos los individuos vivos. Todos ellos producen los radicales libres naturalmente en la medida que respiran el oxígeno del medio ambiente, pero simultáneamente todos ellos poseen mecanismos fisiológicos antioxidantes que ayudan a proteger el cuerpo de los efectos deletéreos de las especies reactivas de oxígeno (ROS).

Aparentemente, la edad modifica tanto la capacidad de cada individuo para producir radicales libres como la de los mecanismos para neutralizarlos. Como una consecuencia, a medida que aumenta la edad de una persona o de un animal sucede que los productos del metabolismo del oxígeno reaccionan cada vez más fácilmente con las macromoléculas biológicas de todas las células y, al unirse a ellas, las pueden dañar de una manera irreversible. Esto significa que el envejecimiento estaría asociado a un aumento progresivo en el número de las células dañadas por los radicales libres.

La teoría del envejecimiento por la acumulación de los efectos de los radicales libres propone que, a lo largo de la vida, se van acumulando las lesiones

tisulares que causan las ROS y que la reparación o la limpieza del tejido dañado provocan inevitablemente una serie progresiva de reacciones inflamatorias que tienen un efecto acumulativo. Aparentemente, a medida que aumenta la edad también aumenta la producción de radicales libres y con el tiempo, a medida que éstos dañan las células, se va provocando la pérdida progresiva e irreparable de las funciones de todos los órganos o tejidos del cuerpo ⁽⁷¹⁾. Según esta teoría, de este modo se envejece a causa de que el cuerpo se va deteriorando paulatinamente, hasta que se llega a un nivel de daño tisular que es incompatible con la vida y, entonces, ocurre la muerte. El envejecimiento sería un ejemplo del daño que, a largo plazo, puede causar la acumulación de las reacciones oxidativas ⁽⁷³⁾.

Naturalmente, el riesgo que implican las reacciones de oxidación se encuentra normalmente minimizado a través de una serie de mecanismos anti-oxidantes. La vida no es posible sin el metabolismo del oxígeno, pero tampoco lo sería sin la presencia de las reacciones anti-oxidantes que neutralizan la reactividad de los radicales que se liberan. La formación de radicales libres es particularmente importante en las mitocondrias y en los peroxisomas de todas las células del cuerpo. Su formación está catalizada por átomos de hierro y cobre.

Las reacciones oxidativas. Hasta el momento, se han identificado tres tipos de reacciones, diferentes, por los cuales se pueden generar los radicales libres. Ellas son :

- 1) Las reacciones en las que participa el oxígeno para generar los oxidantes superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) e hidroxilo (OH^\cdot), los cuales son llamados especies reactivas de oxígeno (ROS).
- 2) Las reacciones en las que participa el nitrógeno y que generan el óxido nítrico (NO), una de las especies reactivas del óxido nítrico (RNS).

- 3) Las reacciones no enzimáticas causadas por los productos finales de la glucosilación, avanzados (**Advanced Glycation End products AGE**) que se forman durante la unión de azúcares reductores a los grupos aminos de las macromoléculas.

En la primera de estas tres reacciones, las especies reactivas del oxígeno (ROS) conocidas como el ión superóxido y el peróxido de hidrógeno se producen cuando el oxígeno molecular recibe uno o dos electrones, respectivamente, durante la respiración aeróbica. Esto se puede observar cotidianamente en las células fagocíticas, cada vez que ocurre el "estallido respiratorio", pero también durante el metabolismo de los ácidos grasos en los peroxisomas (β -oxidación) o por las reacciones del citocromo P450 (una enzima hepática detoxificante). En el curso de esas reacciones, los oxidantes mencionados reciben otro electrón y forman el radical hidroxilo (OH^\cdot), altamente reactivo, que se cree es el principal responsable de la oxidación de las macromoléculas ⁽⁷⁴⁾.

Por otra parte, el radical óxido nítrico (NO^\cdot) se produce por la actividad de varias isoenzimas de la sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS). Cuando el NO interactúa con el radical O_2^\cdot genera el radical peroxinitrito (ONOO^\cdot), que resulta ser otro poderoso oxidante.

Los metales como el hierro (Fe) y el cobre (Cu) contribuyen a la formación del ión hidroxilo, uno de los radicales más reactivos, cuando se rompen moléculas de ácidos carboxílicos (ROOH). Se ha observado que existen algunas diferencias en los niveles de Fe corporal según el sexo y la edad. Por ejemplo, la edad avanzada aumenta la concentración de hierro en los tejidos y, por esa razón, algunos han atribuido a este metal el riesgo de que el daño oxidativo aumente conforme se envejece.

Los efectos biológicos de los radicales libres son un resultado de su actividad sobre el microambiente celular donde se producen, tal como lo estableció Cantoni⁽⁷⁵⁾. Sin embargo, los radicales libres también pueden ejercer un efecto sistémico y dañar las células de diferentes tejidos, provocando respuestas inflamatorias de reparación en las que participan las citocinas pro- y anti-inflamatorias. Algunas de esas citocinas (como IL-1 e IL-6) se reparten por todo el cuerpo y pueden estimular el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) con el consiguiente aumento en la liberación de catecolaminas y glucocorticoides. Esa respuesta generalizada, después que los metabolitos del oxígeno (ROS) provocan reacciones inflamatorias en las que participan citocinas que estimulan el HHA, se conoce como "estrés oxidativo".

El estrés oxidativo. El estrés oxidativo es una respuesta generalizada de alarma⁽⁷⁶⁾. Las citocinas pro-inflamatorias y los oxidantes que inducen esta clase de estrés pueden pasar a la sangre y repartirse por todo el cuerpo. De la misma manera, después de la estimulación del eje HHA, los glucocorticoides y las catecolaminas, que son parte de la respuesta de estrés, también se distribuyen por la sangre y tienen efectos sistémicos.

El estrés oxidativo provoca cambios en numerosas moléculas, particularmente de las que se encuentran en las membranas y esto puede dañar células en casi todos los tejidos del cuerpo. Pero cada vez que se inician las reacciones de estrés oxidativo aumenta la producción de los antioxidantes naturales, de modo que el metabolismo de los seres vivos tiende a un equilibrio u homeostasis. La medida de la lipoperoxidación de las membranas puede dar una idea del grado en la que ésta se mantuvo o se perdió. Las reacciones de estrés oxidativo se observan generalmente en las células que están involucradas en la defensa contra las infecciones y en todos aquellos procesos inflamatorios de evolución crónica, pero también pueden estar aumentadas a medida que una persona envejece. Sin embargo, muchas veces el envejecimiento no se

acompaña de un aumento paralelo en la producción de los anti-oxidantes y de anti-inflamatorios.

Un aspecto muy importante del daño que pueden provocar los radicales libres liberados en el curso del estrés oxidativo se relaciona con sus efectos sobre las células del sistema nervioso. Los procesos inflamatorios que generan radicales libres a nivel del sistema nervioso central (SNC) tienen una importancia particular, primero porque el daño que pueden causar a ese nivel es irreversible y segundo, porque algunos de ellos son prácticamente ineludibles a medida que aumenta la edad.

Generalmente, las lesiones de las neuronas provocan respuestas inflamatorias mediadas por las células de la glía, las cuales se activan al fagocitar los restos de células muertas del sistema nervioso central. La actividad de estas células también se caracteriza por un aumento en la producción de ROS y RNS. Las reacciones inflamatorias en el SNC pueden provocar el inicio de enfermedades neurodegenerativas, algunas de las cuales se presentan más frecuentemente a medida que avanza la edad de las personas ^(61, 77).

Como ya se mencionó anteriormente, los radicales libres se pueden formar a través de varias reacciones diferentes y todas ellas pueden observarse a nivel del SNC, donde se producen cantidades neurotóxicas no solamente de ROS sino también de las especies reactivas del nitrógeno (RNS), que son producto de la actividad de la sintasa del óxido nítrico. En el SNC, las células de la glía son las que participan más activamente en las reacciones inflamatorias, por su capacidad para producir radicales libres y citocinas pro-inflamatorias. Así por ejemplo, la sintetasa inducible del óxido nítrico (iNOS) puede aumentar su expresión después de la unión de la IL-1 β a su receptor de membrana, lo cual también puede estimular la producción del H₂O₂ en los cultivos de astrocitos. Varios trabajos experimentales demuestran que los ratones de mayor edad tienen aumentada la producción de óxido nítrico cuando son retados con endotoxinas ⁽⁷⁸⁾.

Estrés oxidativo y enfermedad del SNC. Se ha observado que, en el SNC, la producción de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno también aumenta en relación con varias enfermedades neurodegenerativas (algunas de ellas con una patogenia inmunológica), pero también en el curso del envejecimiento de las personas sanas. En el caso de los pacientes con Alzheimer, por ejemplo, ellos muestran una mayor formación de la 3-nitrosotirosina y la proteína p38 está activada en las neuronas que circundan las placas amiloides⁽⁷⁹⁾. Todos estos hallazgos han permitido establecer algunas relaciones entre el estrés oxidativo al nivel del sistema nervioso central, las reacciones pro-inflamatorias de naturaleza inmunológica que ocurren alrededor del tejido lesionado y los cambios degenerativos que se observan en algunas enfermedades que caracterizan el envejecimiento.

Ya se había mencionado en los párrafos anteriores que existe una tercera clase de reacciones que al aumentar los productos finales de la glucosilación, aumentan también la producción de radicales libres. La glucosilación de las proteínas por medios no enzimáticos, dando origen a los AGE (productos finales de glucosilación avanzada, que son azúcares reductores unidos covalentemente a los grupos amino [-NH₂] libres de las proteínas) puede contribuir a la patofisiología de las enfermedades crónicas del sistema nervioso central. Los AGE se originan en conjunción con los procesos oxidativos y se acumulan a medida que progresan varias enfermedades de evolución crónica, como la diabetes. Los AGE pueden dar inicio a reacciones inflamatorias y, en caso de la diabetes, han sido considerados como los responsables de sus complicaciones más graves. En el caso del envejecimiento también se ha podido comprobar un aumento en la formación de los AGE.

Los AGE se unen a sus receptores específicos en la superficie de la membrana de los macrófagos o en el endotelio vascular. Estos receptores pertenecen a la superfamilia de las Igs, se expresa abundantemente en las células de la microglía y es un receptor para el péptido β amiloide. La unión de AGE a su

receptor RAGE activa al factor de transcripción NF κ B, que a su vez activa una variedad de genes como los de citocinas pro-inflamatorias que pueden estimular el eje HHA, aumentar la producción de glucocorticoides y conducir a un estrés oxidativo ⁽⁸⁰⁾.

El factor de transcripción NF κ B está regulado por el potencial redox y, en los animales ancianos, su producción se activa constitutivamente en muchos tejidos y en células del sistema hematopoyético. Por esta razón, cualquier actividad oxidativa inducida por el estrés también provoca un aumento en la producción de factores de transcripción que influyen en la síntesis de algunas de las citocinas pro-inflamatorias, que contribuyen a la patología de muchas enfermedades de evolución crónica.

En algunos casos, la producción de ciertas citocinas (como el TNF α) que se unen a sus receptores (el TNFR-I) generalmente inicia una cascada de señalizaciones que pueden inducir apoptosis al inhibir la actividad de la PKC ζ (proteína cinasa C zeta) y del NF κ B ⁽⁸¹⁾. Diversos autores han estudiado los cambios en el control de la producción de algunas de estas citocinas en el curso del envejecimiento. El envejecimiento parece tener relación con la pérdida del control sobre la activación de las reacciones que provocan las citocinas pro-inflamatorias ⁽⁸²⁾.

Los blancos biológicos de los radicales libres. En vista de la importancia de las especies reactivas de oxígeno como responsables de reacciones inflamatorias y de la muerte celular, en los últimos años han aumentado los estudios que tratan de definir con precisión cuáles son sus blancos biológicos más importantes. Los resultados han mostrado que las macromoléculas (ácidos nucleicos, lípidos y proteínas) son los blancos biológicos primarios de los radicales libres. También se piensa que, como las mitocondrias

son el sitio donde se originan estas moléculas altamente reactivas, estos organelos de las células son los primeros en recibir su acción ⁽⁵⁹⁾.

Los lípidos son susceptibles de oxidarse en una cadena de reacciones de peroxidación (autooxidación) formando radicales hidroperoxilo lipídicos, que inician otra vuelta de oxidaciones sobre los lípidos, que generan, a su vez, productos como endoperóxidos cíclicos y aldehídos insaturados. Estos últimos son reactivos, mutagénicos, inactivan enzimas y forman uniones cruzadas con proteínas y ácidos nucleicos.

Al oxidarse, los ácidos nucleicos de las mitocondrias forman aductos (de bases y azúcares), uniones cruzadas con otras moléculas y sufren rupturas en una o ambas cadenas.

Las proteínas también se oxidan de forma extensiva en los grupos sulfhidrilo (SH). Sus enlaces disulfuro (S-S) se reducen, forman aductos en sitios cercanos a la unión a metales o uniones cruzadas con otras proteínas, reaccionan con aldehídos o se fragmentan. Las enzimas con sitios activos que contienen cúmulos de Fe-S (aconitasa, por ejemplo) se inactivan por el radical superóxido. Ya oxidadas, las proteínas se acumulan con la edad y contribuyen a la disfunción de los tejidos. Algunos autores sostienen que todos estos procesos oxidativos se encuentran aumentados durante la edad avanzada y que son la causa de daño cerebral, enfermedades degenerativas, lesiones cardíacas y cáncer.

Los mecanismos antioxidantes. Si los radicales libres se generan de una manera fisiológica, entonces las lesiones progresivas que ellos causan a medida que aumenta la edad pueden estar provocadas más bien por una deficiencia en los mecanismos anti-oxidantes y un consiguiente aumento de las reacciones inflamatorias.

Se conoce que todos los organismos vivos poseen varios sistemas anti-oxidantes en los que están involucradas numerosas moléculas, algunas propias y otras provenientes de la dieta ⁽⁸³⁾, tales como la glutatión peroxidasa, la catalasa, la superóxido dismutasa (SOD), glutatión (GSH), glutatión reductasa, dihidroascorbato reductasa, fosfolipasa A₂, tioredoxina reductasa, glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, α -tocoferol, β -caroteno, ácido ascórbico, uratos, flavonoides y el ubiquinol, por ejemplo. La síntesis de todos estos sistemas de defensa y reparación se encuentra estimulada cada vez que ocurre un reto oxidativo, pero ellos también son sus blancos potenciales.

Todas las moléculas antioxidantes mencionadas tienen como función disminuir los efectos adversos que causan los radicales libres sobre las estructuras celulares, ya sea al nivel de las membranas lipídicas, del DNA, la colágena, etc. Algunos autores opinan que la disminución de la eficiencia de los mecanismos anti-oxidativos durante el envejecimiento puede deberse más bien al aumento en la producción del radical superóxido O_2^- , del H_2O_2 y a la disminución de ATP en la mitocondria sometida a cualquier tipo de estrés oxidativo y no a una deficiencia en la producción de estos antioxidantes ⁽⁶⁰⁾.

En algunos animales (rata, ratón, conejo, puerco, cobayo y vaca), los niveles de antioxidantes como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa no disminuyen con la edad, mientras que los niveles del anión superóxido (O_2^-) y del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) sí se elevan ⁽⁸⁴⁾.

Sin embargo, se ha encontrado evidencia en favor de que algunos mecanismos anti-oxidantes sí pueden disminuir su producción y facilitar la instalación de reacciones inflamatorias más graves en otros animales y en las personas a medida que envejecen. Como ejemplo se pueden mencionar la disminución en la síntesis de las proteínas de choque térmico (**Heat Shock**

Proteins HSP), que son moléculas protectoras contra el estrés oxidativo, ya que inhiben la formación del ión superóxido ⁽⁸⁵⁾.

Esta aparente desventaja de algunas especies en el control de las reacciones inflamatorias durante la vejez se encuentra agravada por el aumento paralelo en la producción de algunas citocinas pro-inflamatorias. Sin embargo, esas mismas citocinas estimulan mecanismos de retroalimentación negativa y, como una consecuencia, con la edad avanzada el eje HHA se vuelve más sensible a los estímulos y se elevan los niveles de glucocorticoides en la sangre y en los tejidos.

Consecuencias inmunológicas. Se ha observado que en algunas especies de animales, las enfermedades inflamatorias crónicas representan una forma de estrés prolongado que puede afectar las células del sistema inmune y provocar un compromiso grave de la inmunidad. En estos casos se puede observar una deficiencia en el reconocimiento y la eliminación normal de los antígenos propios y extraños. Pero también una desregulación muy importante en la producción de las citocinas pro- y anti-inflamatorias.

En el curso del envejecimiento de los animales de laboratorio, se puede observar que ellos expresan un aumento en la producción de radicales libres y una facilitación en la inducción de episodios de estrés. En esos ratones son particularmente notables las consecuencias del estrés sobre la inmunidad y, asimismo, los efectos del envejecimiento sobre el sistema inmune. En ellos el envejecimiento cambia completamente el perfil de las citocinas pro-inflamatorias que producen sus linfocitos y macrófagos.

Ante estos resultados, algunos investigadores opinan que los cambios inmunológicos observados en los roedores a medida que van envejeciendo no pueden extrapolarse directamente a los humanos. Esto puede ser cierto tanto para los resultados que señalan el decaimiento de algunas funciones

inmunológicas como para los que muestran mejorías clínicas notables después de ciertos tratamientos con inmunomoduladores.

Por lo general, a medida que aumentan su edad, los roedores tienen atenuada la actividad de la médula ósea, una hipoplasia del timo y un aumento en la cantidad de linfocitos T de la memoria inmunológica (que tienen meses circulando en sus cuerpo), mientras disminuye la proporción de los linfocitos jóvenes, que han madurado recientemente. Todo esto modifica el perfil de las respuestas tipo TH1/TH2 y las clases de citocinas que predominan en el curso de la respuesta del sistema.

Edad y citocinas pro-inflamatorias. En general, cualquier respuesta inflamatoria prolongada se acompaña de un cambio en la producción de citocinas. Se pierde el balance que normalmente existe entre los perfiles de citocinas que producen los linfocitos TH1/TH2 y, paulatinamente, se va instalando una desviación de la respuesta inmune, caracterizada por un predominio en la producción de citocinas tipo-TH2 ⁽⁸⁶⁾.

Las citocinas del tipo-Th2 no las producen solamente los linfocitos TH2. Numerosas células las sintetizan y cuando ellas aumentan sus niveles, generalmente ocurre una disminución paralela en la producción de las citocinas de tipo-TH1, aunque tampoco éstas otras son un producto exclusivo de los linfocitos TH1.

Los cambios en los patrones de las citocinas predominantes que se desvían hacia un prototipo tipo-TH2 ya han sido estudiados extensamente en el curso de las enfermedades infecciosas y parasitarias, particularmente en aquellas de evolución crónica ⁽⁸⁷⁾. Pero también existen estudios sobre estas respuestas de citocinas en numerosas otras circunstancias que se acompañan de reacciones inflamatorias, como por ejemplo las alergias y numerosas enfermedades autoinmunes. El envejecimiento, que se caracteriza por un aumento en la

producción de los radicales libres, también ha sido investigado para conocer si, además, con la edad avanzada ocurren cambios en la síntesis de las citocinas pro-inflamatorias del tipo-TH2.

Se ha encontrado que, en los ratones, a medida que aumenta la edad hay una disminución gradual de IL-2 e $\text{INF}\gamma$ (citocinas conocidas como de tipo-TH1) mientras que aumentan las citocinas IL-4, IL-10, IL-1, IL-6 y $\text{TNF}\alpha$, que pueden ser calificadas como del tipo-TH2⁽⁸⁸⁾. En los humanos también está comprobada esta desviación de la respuesta de tipo TH1 hacia otra de tipo TH2⁽⁸⁹⁾. Algunos de estos cambios no están restringidos al sistema inmune. Así por ejemplo, en los ratones machos Balb/c, la síntesis de IL-6 se incrementa con la edad en el cerebelo, la corteza cerebral, el hipocampo y en los cultivos de células de la glía, que la producen espontáneamente⁽⁷⁷⁾. Estos cambios en la producción de citocinas, que se presentan de una manera más o menos constante durante la edad avanzada de los roedores, son los que a cualquier otra edad caracterizan el curso de las reacciones inflamatorias.

En el envejecimiento se observa un predominio de las reacciones inflamatorias que dependen de la activación de los macrófagos, los cuales aumentan su producción de citocinas. Paralelamente, con la edad aumenta la producción de cortisol y se modifica su ritmo circadiano. En las personas se ha comprobado que entre los 20-80 años de edad, los niveles de cortisol en la sangre aumentan 20-50%⁽⁹⁰⁾.

De todos los cambios mencionados en la producción de citocinas, resulta particularmente importante el aumento en la producción de la IL-6. Se ha observado que después de estimular los macrófagos de los animales de edad avanzada, la producción de IL-6 se mantiene elevada durante mucho más tiempo que la producción de IL-1 y $\text{TNF}\alpha$. Estas dos últimas citocinas tienen una vida media relativamente corta en la sangre. Algunos experimentos han mostrado que

la restricción calórica en la dieta así como la administración de la hormona esteroide dihidroepiandrosterona (DHEA), disminuyen la producción aumentada de IL-6 en los animales de mayor edad ⁽¹⁶⁶⁾.

Otra observación interesante ha sido que, en personas mayores, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) tienen aumentada la producción de IL-6 y del antagonista del receptor para la IL-1 (IL-1ra), aunque no hay mucha diferencia en la producción de IL-1 β y TNF α con respecto a los jóvenes. La IL-6 es la única que aumenta a causa de los procesos inflamatorios del envejecimiento. Se ha propuesto que ese aumento en la producción de la IL-6 por los macrófagos activados es la principal causa de que el balance habitual entre las respuestas de las poblaciones de linfocitos TH1/Th2 se desvíe hacia un predominio TH2, con la consiguiente disminución de las respuestas tipo-TH1 y la disminución asociada de los principales mecanismos defensivos celulares. Otros autores también han informado que existe una correlación inversa entre la producción de IL-6 y la IL-1 β o el TNF α ⁽⁹¹⁾, mientras algunos ⁽⁹²⁾ opinan que la apoptosis de los linfocitos es la causa de la deficiencia de las células T que se observa en las personas de mayor edad. Todos estos trabajos experimentales han confirmado que, en la misma forma que el TNF es un potente inductor de la producción de IL-6, esta última citocina inhibe la síntesis de la primera, en una especie de circuito de regulación que se traduce en una actividad predominantemente anti-inflamatoria ⁽⁹³⁾.

La síntesis de la IL-6 se encuentra normalmente regulada y suele incrementarse en forma temporal durante las infecciones o traumas y, como se acaba de mencionar, durante el envejecimiento. Esta es una observación constante, no obstante que la producción de cortisol se encuentra aumentada con la edad y que los glucocorticoides, así como los estrógenos y la testosterona, son sustancias que inhiben la expresión de su gene. Se ha sugerido que el incremento en la producción de la interleucina 6, asociado a la edad avanzada, pudiera ser el causante de la pérdida de la masa corporal, el incremento de proteínas inflamatorias como la proteína C reactiva (CRP) y la proteína amiloide A

del suero (SAA), la osteopenia, la disminución del colesterol y de la albúmina sérica que se observan en estas personas. Asimismo, su aumento se considera como un factor predisponente para la aparición de diversas enfermedades asociadas al envejecimiento entre las que se cuentan el Alzheimer, la osteoporosis, el mieloma múltiple o desórdenes linfoproliferativos ⁽⁵¹⁾. Aparentemente, el control de la producción de IL-6 es un proceso multifactorial, ya que su producción depende de los niveles de síntesis de varias otras sustancias, entre ellas por ejemplo, las PGE₂ ⁽⁹⁴⁾.

A medida que aumenta la edad de las personas, el cambio en el balance de la respuesta de los linfocitos y el predominio en la producción de citocinas del tipo TH2 ha sido asociado con una mayor frecuencia de reacciones inflamatorias crónicas que pueden afectar las articulaciones o provocar procesos neurodegenerativos en el cerebro. Estas situaciones implican un trabajo de reparación en el cual son importantes las células que pueden liberar radicales libres. Todos estos problemas han sido relacionados con un incremento en las respuestas inmunes del tipo TH2, probablemente a causa de una activación excesiva de las células mieloides del sistema inmune. La aparición de numerosas enfermedades o el deterioro de las funciones cerebrales durante el envejecimiento han sido relacionados con estos cambios en la producción de citocinas.

Tratamientos. En los últimos años se ha observado una tendencia a incluir en los esquemas del tratamiento de las reacciones inflamatorias de evolución crónica el uso de sustancias antioxidantes o de las que estimulan los mecanismos antioxidantes naturales ⁽⁷⁵⁾ para contrarrestar la mayor producción de radicales libres en las personas de mayor edad. De la misma manera, se ha buscado utilizar sustancias inmunomoduladoras para controlar la producción excesiva de citocinas pro-inflamatorias. En este último rubro, existe en el mercado una lista muy grande de productos que han sido propuestos como inmunomoduladores. Algunos de ellos son superantígenos administrados a dosis muy bajas, otros son hormonas como la DHEA para sustituir las que ya no se producen ⁽⁸⁷⁾ y otros son

fármacos a los que se les atribuye un efecto modulador sobre la producción de las citocinas pro-inflamatorias, particularmente sobre la IL-6.

iv). EL VENENO DE LAS ABEJAS

Generalidades. Desde hace mucho tiempo los productos obtenidos de las abejas y de sus colmenas se han utilizado de una manera empírica en el tratamiento de varias enfermedades. Por ejemplo, (i) aplicada sobre las úlceras de la piel, la miel de abeja reduce la multiplicación de microorganismos, mejora el curso de las infecciones y cutáneas y acelera la cicatrización de los tejidos; (ii) el pólen, el propolio y la jalea real pueden ser un suplemento alimenticio que estimula el apetito y mejora las condiciones generales; (iii) los alérgenos del pólen se pueden administrar por vía oral para desensibilizar personas alérgicas; (iv) la inyección intradérmica de pequeñas dosis del veneno de abejas (VA) también ayuda a desensibilizar a las personas alérgicas, principalmente las ocupacionalmente expuestas (porque trabajan en o cerca de los apiarios) y (v) los piquetes de las abejas que directamente introducen el veneno en la piel o la aplicación tópica de ungüentos que contienen extractos del veneno son utilizados empíricamente por algunos terapeutas como una medicina alternativa para disminuir la inflamación y el dolor de las personas con artritis o para reducir el progreso de las lesiones neurológicas en la esclerosis múltiple.

El interés por la administración del VA no es un hecho aislado. En los últimos años se han multiplicado los estudios sobre las toxinas de los microorganismos, los venenos de animales o diversos extractos obtenidos de las plantas venenosas, con la finalidad de conocer sus diferentes actividades biológicas, utilizarlos para desensibilizar algunos pacientes o para preparar antisueros con los cuales se neutralizan las reacciones tóxicas que ellos provocan. Esto ha permitido contrarrestar sus efectos adversos en las personas o en los animales y, en otros casos, encontrar que es posible utilizarlos como herramientas terapéuticas ⁽⁹⁵⁾.

En la literatura consultada existen referencias sobre el uso del VA para el tratamiento de algunas dolencias artríticas, desde épocas tan remotas como en el

antiguo Egipto y en la Grecia Clásica. Hipócrates lo recomendaba en sus prescripciones y lo mismo hicieron Galeno y Plinio durante el Imperio Romano. Algunos escritos permiten inferir que Carlomagno y muchos otros personajes del pasado fueron tratados con piquetes de abeja para mejorar la inflamación en sus articulaciones tiesas por el reumatismo. Ya en el siglo XX, el VA se ha continuado usando empíricamente, sobre todo en los países de Europa oriental, mientras que en América (en USA principalmente) su aplicación ha tenido mucho auge a partir de la década de los años 30.

En los últimos 50 años, numerosos trabajos científicos sobre el veneno de las abejas han estado dirigidos al estudio de su composición química y de las actividades farmacológicas de sus componentes principales. Pero también se han publicado algunos estudios clínicos realizados en animales y personas.

Los trabajos en perros ⁽⁹⁶⁾ y en ratas ⁽⁹⁷⁾ han demostrado que al inyectar estos animales con algunos componentes del veneno de abejas, como la apamina y la melitina, ellos incrementan la síntesis de cortisol que es una hormona con efectos anti-inflamatorios. Simultáneamente, en otros experimentos se ha puesto de manifiesto que la melitina tiene efectos citolíticos ⁽⁹⁸⁾, ya que es responsable de la muerte de células y de una respuesta inflamatoria localizada alrededor de su sitio de acción, mientras que en otros casos el contacto con el veneno completo puede ser peligroso para las personas alérgicas a sus componentes ⁽⁹⁹⁾. Estos dos polos de las actividades biológicas del VA (los efectos pro- y anti-inflamatorios) han sido el motivo de numerosos estudios y discusiones.

Así por ejemplo, inicialmente los trabajos sobre los efectos anti-inflamatorios del VA estuvieron dirigidos a comprobar si su introducción al cuerpo iba seguida o no de un aumento en la producción de cortisona ⁽⁹⁶⁾. Más adelante, Ziai et al ⁽¹⁰⁰⁾, informaron que un polipéptido conocido como factor desgranulador de las células cebadas (MCD) es el componente del VA responsable de esta

actividad anti-inflamatoria, mientras otros ⁽¹⁰¹⁾ atribuyeron ese efecto del MCD a la inhibición de la síntesis de algunas sustancias pro-inflamatorias conocidas, como prostaglandinas. En los últimos años se han publicado resultados experimentales que han permitido proponer nuevos mecanismos de acción, algunos de los cuales sugieren que el VA es anti-inflamatorio porque tiene una importante actividad antioxidante o porque *in vitro* se han observado que inhibe la síntesis de la IL-1 ⁽¹⁰²⁾, mientras otros ⁽¹⁰³⁾ encuentran que el VA suprime la inducción en el hígado del gene de la glucoproteína ácida- α 1.

Las abejas y su veneno. Las abejas mielíferas son insectos que pertenecen al Reino Animal, Subreino Metazoarios, División Artiozoarios, Rama Artrópodos, Clase Insectos, Orden Himenopteros, Suborden Aculados, Familia Apidos, Genero *Apis*, Especie Mellifera e incluyen 9 diferentes variedades entre las que se encuentran la *A. dorsata* o abeja africana y la *A. mellifera* o abeja europea. Esta última posee varias subespecies, entre las que se incluyen a la *A. mellifera scutellata* o abeja africanizada, la *A. cerana*, o a la *A. florea* (la más pequeña de todas) entre otras.

Como todos los insectos, las abejas tienen un cuerpo formado por 3 segmentos : cabeza, tórax y el abdomen. El primer segmento alberga a los órganos sensoriales y algunas glándulas accesorias al tubo digestivo, mientras el segundo segmento contiene los elementos de locomoción. El último segmento, el abdomen, contiene los órganos digestivos y los reproductores, las glándulas productoras del veneno y de la cera, así como algunas glándulas oloríferas. En las hembras adultas el abdomen también contiene al aguijón conectado a las glándulas productoras del veneno, lo cual las hace exclusivamente capaces de picar e inyectarlo ⁽¹⁰⁴⁾.

Producción y liberación del veneno. El veneno de las abejas se produce por las células de glándulas básicas y ácidas que estos insectos tienen en su abdomen. Estas glándulas se encuentran cerca de la porción terminal del tubo

digestivo y su secreción desemboca en una estructura llamada "saco del veneno", que está localizado en la parte posterior del abdomen de las abejas hembra. El saco del veneno se comunica con la parte más ancha del aguijón, donde las válvulas de sombrilla, en las lancetas, bombean el veneno hacia atrás, cuando no es utilizado ⁽¹⁰⁴⁾.

La síntesis de veneno aumenta progresivamente durante las 2 primeras semanas de la vida de las abejas obreras, adultas, alcanzando sus valores máximos cuando ellas defienden el panal o forrajean. En las abejas reinas, la producción del veneno disminuye conforme ellas envejecen. Aunque producen mucho más veneno que las obreras, su producción es más corta. Las abejas reinas alcanzan su producción máxima entre los 7 primeros días de vida y la detienen al llegar al mes de edad, por lo que, a la edad de 1 ó 2 años, el veneno ya se ha vuelto inactivo y ha disminuido su producción. Cada saco de las abejas obreras contiene en promedio de 0.15 a 0.30 mg de veneno y, al picar a un mamífero, el aguijón queda atrapado dentro de la piel, junto con el saco del veneno, músculos y el centro nervioso. Los dos últimos continúan inyectándolo hasta que se completa su vaciado. Al retirarse la abeja, pierde esas partes de su cuerpo y muere dentro de las siguientes 24 horas ⁽¹⁰⁵⁾.

Características físicas y químicas. En forma natural, el VA es un líquido inoloro, transparente e incoloro que, al entrar en contacto con las membranas mucosas o la conjuntiva de los ojos, causa irritación y ardor. Ya liofilizado, tiene un color amarillo y algunos preparados comerciales son de color café, por la oxidación de algunas de sus proteínas.

El veneno de las abejas contiene agua, glucosa, fructosa, fosfolípidos, enzimas, péptidos y aminos (ver la Tabla siguiente). Aunque el 88% del VA es agua, el 70% de su peso seco lo forman polipéptidos y proteínas ^(106, 107, 108) con al menos 18 compuestos farmacológicamente activos ^(109, 110). Se ha observado

que, algunos de ellos poseen actividades que influyen sobre la respuesta del sistema inmune, tanto en animales como en personas ^(111, 112).

Tabla V. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL VENENO DE UNA ABEJA OBRERA

| Molécula | Componente | % de veneno seco (a) | % de veneno seco (b) |
|---------------------------------|--|----------------------|----------------------|
| Enzimas | Fosfolipasa A2 | 10 – 12 | 10 – 12 |
| | Hialuronidasa | 1-3 | 1.5-2.0 |
| | Fosfomonoesterasa ácida | | 1 |
| | Lisofosfolipasa α glucosidasa | | 1 0.6 |
| Otras proteínas y péptidos | Melitina | 50 | 40-50 |
| | Apamina | 1-3 | 3 |
| | Péptido desgranulador de células cebadas (MCD) | 1-2 | 2 |
| | Secapina | 0.5-2.0 | 0.5 |
| | Procamina | 1-2 | 1.4 |
| | Adolapina | | 1 |
| | Inhibidor de proteasa | 0.1 | 0.8 |
| | Tertiapina ^(c) Péptidos pequeños (menos de 5 aa) | 13-15 | 0.1 |
| Aminas activas fisiológicamente | Histamina | 0.5-2.0 | 0.5-1.6 |
| | Dopamina | 0.2-1.0 | 0.13-1.0 |
| | Noradrenalina | 0.1-0.5 | 0.1-0.7 |
| Aminoácidos | ácido t aminobutírico α aminoácidos | 0.5 1 | 0.4 |
| Azúcares | glucosa y fructosa | 2 | |
| Fosfolípidos | | 5 | |
| Compuestos volátiles | | 4-8 | |

(a) (109)

(b) (114)

(c) Este péptido no se encuentra en todos los venenos

En los últimos 10 años, la mayor parte de las investigaciones realizadas sobre el veneno de abejas han estado dirigidas hacia el estudio de sus componentes responsables de las reacciones alérgicas ⁽⁹⁹⁾, que provocan sus piquetes, y a los mecanismos de su toxicidad o letalidad ^(105, 113).

En medicina se ha aceptado el uso del veneno de las abejas completo o de algunos de sus componentes purificados con la intención de prevenir los accidentes graves que algunas veces se presentan como una consecuencia de sus piquetes. En general, los problemas se presentan en las personas alérgicas o en las que accidentalmente reciben una gran cantidad de piquetes. La apiterapia, (aplicación de inyecciones de veneno de abeja, a dosis bajas, que van aumentando lentamente su concentración hasta alcanzar una dosis determinada) es uno de los procedimientos más empleados con la finalidad de inducir un estado de anergia hacia los alérgenos de este veneno, en las personas alérgicas a él ^(31, 115, 116). Un antisuero anti-veneno de abejas podría ayudar a neutralizar los componentes tóxicos en el caso de picaduras múltiples, pero hasta ahora no han tenido éxito los intentos por obtener uno efectivo y seguro ⁽¹¹⁷⁾. El resto de la literatura médica publicada sobre los efectos del VA trata de sus efectos anti-inflamatorios ^(118, 119).

Componentes principales. Cinco son los componentes más importantes del veneno de las abejas [apamina, melitina, péptido desgranulador de células cebadas (MCD), hialuronidasa y fosfolipasa A2]. Las estructuras de los precursores para cada uno de ellos ya han sido clonadas, mediante técnicas que permiten obtener el cDNA y se conocen las secuencias de aminoácidos de cada uno de ellos ^(120, 121, 122, 123).

Las dos enzimas más importantes del VA son: (i) la hialuronidasa, que está compuesta por 349 aminoácidos, 4 cisteínas y 3 sitios potenciales de N-glucosilación, ⁽¹²²⁾, y (ii) la fosfolipasa A2, una enzima básica y glucosilada en la Asn 13, compuesta por 134 aminoácidos, y que contiene 5 uniones disulfuro intramoleculares ⁽¹²⁴⁾.

Los tres péptidos más importantes que contiene este veneno son : (i) la melitina, un polipéptido de 26 aa, que forma una hélice anfipática y se inserta en

los fosfolípidos de las membranas ⁽¹²⁵⁾, (ii) la apamina, un péptido de 18 aa, neurotóxico, que posee una estructura compacta (una región de alfa hélice con 2 vueltas beta), dependiente de su enlace disulfuro S-S ^(126, 127) y (iii) el péptido desgranulador de las células cebadas que está formado por 22 aa y comparte cierto grado de similitud con la apamina, a nivel de DNA y en las secuencias de los aa ^(113, 123).

Existe una cantidad abundante de literatura sobre las características químicas de todos los componentes anteriores y sobre sus efectos sobre diversos tipos de células. Las dos enzimas actúan sobre el glucocálix y los fosfolípidos de las células, mientras que los tres polipéptidos actúan sobre los potenciales de las membranas celulares, los canales de potasio y los receptores de las células cebadas, respectivamente.

Actividades biológicas. El veneno de las abejas es una mezcla heterogénea de compuestos, que tienen diversos pesos moleculares y actividades biológicas. El principal componente del VA que tiene actividad de alérgeno es la **fosfolipasa A2**, una enzima que libera los ácidos grasos de los fosfolípidos de las membranas celulares, los cuales, a su vez, originan moléculas pro-inflamatorias como las prostaglandinas, los tromboxanos o los leucotrienos, con los cuales se genera parte de la hinchazón y el dolor en la zona donde la abeja inyecta su veneno ⁽¹²⁸⁾. Conviene recordar que en el VA se han encontrado tanto sustancias a las cuales se les atribuye un efecto inhibitor sobre la síntesis de PGE₂ (MCD) como otras que más bien estimulan la producción de estos eicosanoides (PLA2).

El componente más abundante en el veneno de las abejas es la **melitina**, un péptido pequeño que tiene la capacidad de formar agujeros en las membranas de las células sobre las que actúa, induciendo su lisis. Posee propiedades detergentes por ser un péptido con una distribución asimétrica de sus aminoácidos polares y no polares que adoptan una estructura lineal y helicoidal, anfipática ⁽¹²⁰⁾.

^{129, 131}). La melitina también es un inmunógeno porque en ciertas cepas de ratones puede inducir la síntesis de anticuerpos tipo IgG e IgE contra sus epítopes ⁽¹²⁵⁾ y es cardiopéptica en mamíferos y ranas ⁽¹³¹⁾.

Otro componente del VA es el **péptido desgranulador de las células cebadas (MCD)**, las cuales poseen receptores para este polipéptido, en la superficie de su membrana citoplásmica. A bajas concentraciones, el MCD provoca que los mastocitos liberen el contenido de sus gránulos, los cuales contienen principalmente sustancias pro-inflamatorias como la histamina y neurotransmisores como la serotonina y la misma histamina, así como también grandes cantidades de proteasas y de TNF- α e IL-6 ^(100, 132), que pueden disminuir la presión arterial, al provocar vasodilatación y aumento de la permeabilidad capilar.

Cuando ha sido inyectado directamente en el cerebro, el MCD se une a los canales de potasio dependientes de voltaje de las neuronas ^(133, 134, 135). Según la dosis inyectada intracerebralmente, el MCD puede inducir diferentes respuestas. Así, a bajas concentraciones produce solamente excitación, mientras que al ser inyectada a concentraciones elevadas puede causar convulsiones, debido a que se une a receptores de alta afinidad que están localizados en las estructuras corticales, particularmente en el hipocampo, donde genera potenciación a largo plazo ^(135, 136). Varios autores refieren que el MCD tiene una actividad neurotóxica epileptogénica ^(100, 101, 135).

Paradójicamente, al MCD también se le atribuye una actividad biológica anti-inflamatoria, la cual ha sido comprobada en animales de laboratorio a los cuales se les induce previamente artritis mediante la inyección de adyuvantes ^(119, 137).

Otro compuesto importante del VA es la **apamina**, un péptido de bajo peso molecular que es neurotóxico cuando se inyecta intracerebralmente, por vía intraventricular^(107, 138). A concentraciones de 10^{-9} M inhibe de manera específica a los canales de K^+ , dependientes de Ca^{++} . Sus receptores de alta afinidad se han identificado en el corazón de la rata, músculo liso e hígado, y en el íleon de cobayo^(126, 138, 139, 140).

La **hialuronidasa**, es otro componente importante del VA. Se trata de una enzima que rompe el ácido hialurónico de la matriz extracelular en tetra y hexasacáridos, con lo cual podría iniciarse la expansión del daño tisular que causaría la presencia del veneno de abeja en cualquier tejido⁽¹²²⁾.

La siguiente tabla muestra un resumen de las principales características de los componentes del veneno de las abejas.

TABLA VI PRINCIPALES COMPONENTES DEL VENENO DE ABEJAS

| Componente | PM (kDa) | aa | % en peso | Actividades biológicas |
|----------------------|----------|-----|-----------|---|
| Fosfolipasa A2 (116) | 14 - 16 | 134 | 12 | Alergeno principal Genera ácido araquidónico a partir de fosfolípidos |
| Melitina (129, 130) | 2.84 | 26 | 50 | Alergeno pobre Libera GABA en sinaptosomas Libera ácido araquidónico e icosanoides |
| Apamina (127) | 2.03 | 18 | 2 | Neurotoxina Inhibe canales de K^+ activados por Ca^{++} Induce síntesis de Abs (IgG e IgE y proliferación de linfocitos T |
| MCD (106, 133) | 2.5 | 22 | 2 | Desgranula células cebadas Inhibe síntesis de PGE_2 |
| Hialuronidasa (122) | 41 | 349 | 2 | Alergeno Fragmenta el ácido hialurónico en tetra y hexasacáridos |

Letalidad. Algunas de las proteínas que contiene el VA son tóxicas y otras son alérgenos que también pueden causar la muerte a través de graves

reacciones de hipersensibilidad tipo I. Las estadísticas epidemiológicas refieren que todos los años muere una cierta cantidad de personas a causa de los piquetes de las abejas ⁽¹⁰⁵⁾. La principal causa de la letalidad del veneno de abejas son sus efectos alérgicos, aunque se ha observado que algunos de sus péptidos presentan efectos pro-inflamatorios, cardiotoxicos y neurotóxicos ⁽¹⁴¹⁾ y esto podría ser causa de muerte, pero solamente en los casos de picaduras múltiples.

Los efectos colaterales que se presentan por las inyecciones del veneno de abejas son inflamación, entumecimiento y comezón, aunque también los hay muy serios como el shock anafiláctico, que en personas alérgicas puede conducir a la muerte, por lo que la apiterapia debe de hacerse bajo estricto control médico o previas pruebas de sensibilidad ⁽⁹⁹⁾. Las principales reacciones tóxicas que aparecen después de recibir un piquete de abejas son vómito, diarrea, hipotensión, coma, hemoglobinuria y mioglobinuria, que pueden progresar hacia anuria y falla renal aguda ⁽¹¹⁷⁾. Todas esas manifestaciones generalmente están asociadas a un shock anafiláctico provocado por la descarga de grandes cantidades de histamina y otros péptidos vasoactivos de las células cebadas. Los efectos anafilácticos se deben principalmente a los anticuerpos IgE específicos contra los epítopes de la PLA2, la hialuronidasa y, en menor grado, de la melitina ⁽¹⁴²⁾. La terapia existente para contrarrestar la letalidad del VA en las personas alérgicas es de soporte y sintomática. En esta clase de enfermos carece de utilidad cualquier sueroterapia anti-veneno de abeja para uso en los humanos que, por otra parte, no ha podido ser lo suficientemente efectiva ⁽¹¹⁷⁾.

Las estadísticas refieren que, proximadamente, entre el 1% y 2% de la población mundial es alérgica al veneno de las abejas. Cabe señalar que la mayoría de las muertes se deben a uno o pocos piquetes, debido a las reacciones alérgicas que provocan sofocación, falla cardíaca, hinchazón en el cuello o la boca, etc. El componente más alergénico es la fosfolipasa A2 (PLA2), mientras

que la melitina es el más letal, pero no presentan un efecto sinérgico cuando se encuentran combinadas ⁽¹¹³⁾.

Aunque la letalidad del VA obtenido de las diferentes especies de abejas estudiadas es muy similar, de todos modos se han observado pequeñas diferencias. La toxicidad del VA en la especie *A. mellifera* es la mitad de la que posee el VA en la *A. Cercana* ⁽¹¹⁰⁾. Las reinas producen una mayor cantidad de VA sólo en casos de emergencia (cuando se tiene que seleccionar una sola reina), aunque su letalidad es la mitad de la letalidad del veneno que producen las obreras ⁽¹¹³⁾.

En las personas que han sufrido múltiples picaduras y han muerto, se han realizado algunos cálculos aproximados que permiten estimar que la dosis media letal (LD₅₀) para un adulto es de 2.8 mg/Kg de peso, por lo que 600 piquetes serían ya una dosis letal, mientras que una cantidad de 90 piquetes sería letal en el caso de un niño de 10 Kg ⁽¹⁰⁵⁾. En los ratones, se han reportado 3.5 mg/kg ⁽¹¹³⁾, 6 mg/Kg ⁽¹⁴³⁾ y 7.4 mg/kg ⁽¹⁴⁴⁾ de VA como las dosis letales.

El uso del VA con fines terapéuticos o comerciales. Varios trabajos de investigación experimental, publicados en revistas arbitradas, coinciden en señalar que tanto la melitina, como el veneno completo y la PLA2 pueden actuar, inespecíficamente, sobre la competencia de las células del sistema inmune ^(31, 111, 115, 116). Además, a la apiterapia se le atribuye la mejoría de los pacientes alérgicos a este veneno y una modificación en la respuesta inmune de citocinas, que cambia del tipo-TH2 a otra predominante del tipo TH1, cuando se la ha estudiado en los linfocitos de la sangre periférica de los pacientes alérgicos a este veneno ^(31, 115, 145).

No obstante, en los bancos de datos revisados existen pocas citas de trabajos que (independientemente de las reacciones alérgicas) estudien los

efectos del veneno completo o de sus componentes sobre la competencia de los linfocitos o de los macrófagos del sistema inmune. Se han podido reunir varias observaciones muy interesantes como las de Hyre y Smith ⁽¹¹¹⁾ en las que el veneno de abejas aumenta la producción de anticuerpos IgM y la proliferación de los linfocitos del bazo. Yiangou et al, en 1993 ⁽¹⁰³⁾ solo informan que el VA disminuye la síntesis de IL-1 en los macrófagos del peritoneo de ratas con un artritis experimental. Esto último ha sido confirmado por otros estudios ^(102, 146). En las personas con enfermedades inflamatorias crónicas, algunos autores señalan que el VA puede reducir los síntomas hasta en el 84% de ellas ⁽¹⁴⁷⁾.

Igualmente, han sido muy interesantes los trabajos publicados sobre los efectos del VA en la competencia de las células del sistema inmune y sobre la evolución de las enfermedades inflamatorias crónicas. Algunos de esos trabajos ya han sido citados en los párrafos anteriores ^(119, 137, 148, 149).

De todos modos, los resultados de los trabajos experimentales han sido los que más frecuentemente han proporcionado evidencia a favor del probable efecto terapéutico del VA. La artritis inducida experimentalmente mediante la inyección del adyuvante completo de Freund es un modelo de enfermedad autoinmune que ha sido utilizado con relativa frecuencia para demostrar la actividad anti-inflamatoria del VA. Así por ejemplo, Eiseman et al, en 1982 ⁽¹³⁷⁾ han observado que la administración del VA en ratas suprime el desarrollo de la artritis experimental y los mismos resultados han sido obtenidos por Zurier et al, en 1972 ⁽¹⁵⁰⁾ y por Yiangou et al, en 1993 ⁽¹⁰³⁾. Sin embargo, sus resultados no muestran que el VA modifica la producción de interleucinas en los animales sanos.

El objetivo del presente trabajo es estudiar el efecto del veneno de abejas sobre la respuesta proliferativa de linfocitos estimulados *in vitro* y sobre la producción de algunas citocinas pro-inflamatorias por los macrófagos peritoneales de ratones sanos con diferentes edades.

III. OBJETIVOS, HIPÓTESIS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Los objetivos del presente trabajo fueron conocer si

- a) la administración *in vivo* del veneno de abejas puede modificar la respuesta de las células del sistema inmune de los ratones y
- b) si estos cambios son distintos según la edad de los animales.

Para alcanzar los objetivos anteriores, se diseñó un modelo experimental basado en las siguientes hipótesis :

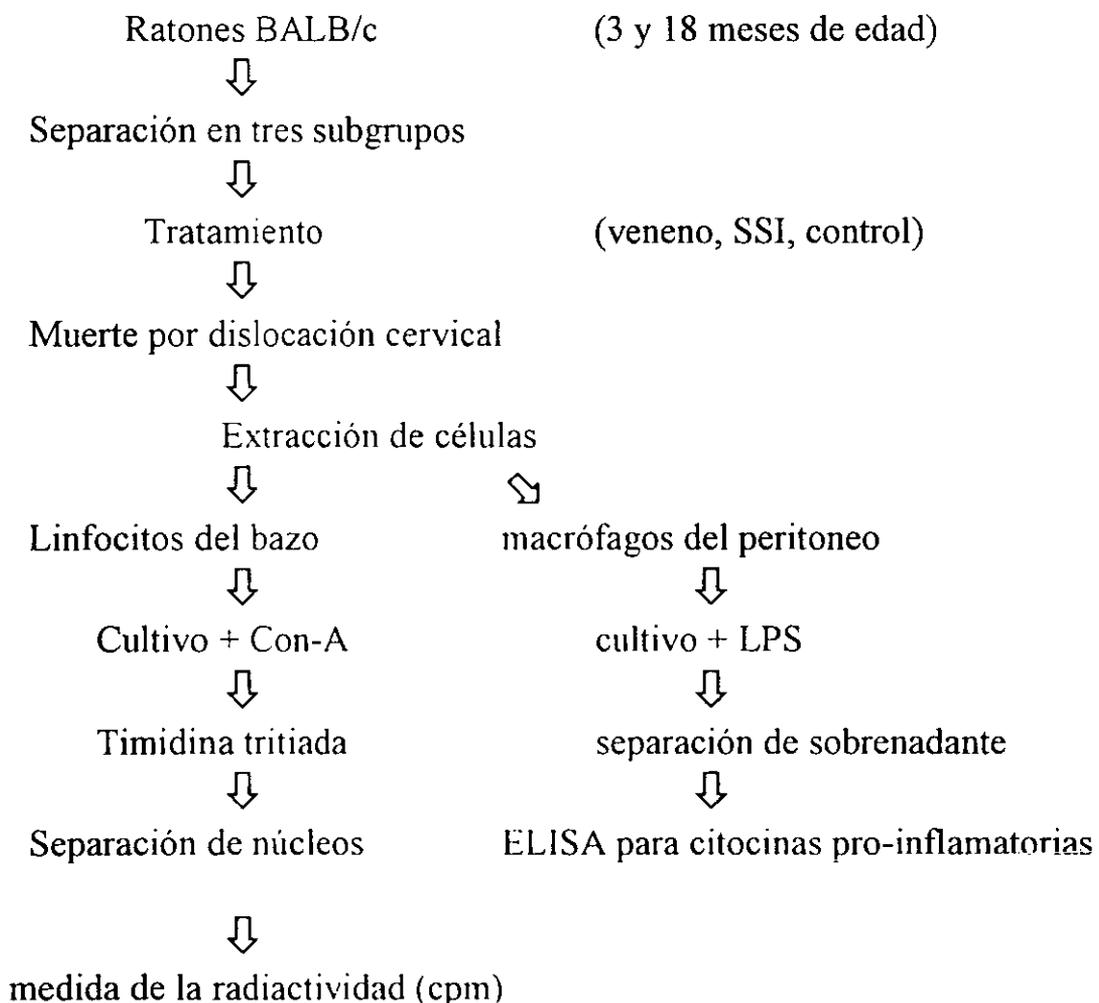
1) La administración subcutánea de veneno de abejas a los ratones, provocará un aumento en la respuesta proliferativa de sus linfocitos esplénicos cuando éstos son estimulados *in vitro* con la Concanavalina-A.

2) La administración subcutánea de veneno de abejas a los ratones, disminuirá la producción *in vitro* de citocinas pro-inflamatorias por los macrófagos peritoneales.

3) La proliferación de los linfocitos y la producción de citocinas pro-inflamatorias serán respuestas diferentes en los ratones de 3 y 18 meses de edad.

4) Después de 4 semanas de recibir inyecciones subcutáneas de veneno de abejas, se observará una tendencia a disminuir las diferencias inmunológicas entre los ratones de 3 y 18 meses de edad.

Diseño experimental. Los ratones fueron separados durante 4 semanas en varios grupos, según su edad y tratamiento. Una vez sacrificados, de cada uno de ellos se obtuvieron linfocitos y macrófagos, los cuales fueron cultivados y estimulados con Concanavalina-A y LPS, respectivamente, para estudiar *in vitro* la respuesta proliferativa de los linfocitos y la producción de varias citocinas por los macrófagos. En el primer caso se obtuvieron los núcleos de las células para medir la incorporación de timidina tritiada. En el segundo caso se colectaron los sobrenadantes después de 24 horas de cultivo para medir por ELISA la concentración de las PGE₂ y de las citocinas IL-6, IL-12 y TNF α .



IV. MATERIAL Y MÉTODOS

a) Animales.

Todos los experimentos se realizaron tres veces. En cada experimento se utilizaron animales que estaban separados en dos grandes grupos (jóvenes y viejos) según su edad. En cada experimento, el grupo I estuvo formado por quince ratones machos BALB/c de 3 meses de edad y con 20 g de peso promedio, mientras que el grupo II se formó con otros 15 animales machos, de 18 meses de edad, de la misma cepa y con un peso promedio de 30 g.

Todos los animales fueron obtenidos y mantenidos en cajas de policarbonato en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM), donde se les alimentó con Purina (Harlan) y agua *ad libitum*. Cada uno de los dos grupos fue dividido en 3 subgrupos de acuerdo a si los ratones recibían la inyección del veneno de abejas (A), si eran animales control inyectados solamente con solución salina (B) o si no recibían ninguna inyección durante todo el experimento (C).

b) Veneno de abejas.

Dos miligramos del veneno de abejas (Sigma-Aldrich) se disolvieron en 10 mL de solución salina isotónica estéril y se filtraron a través de una membrana estéril con un poro de 0.22 μm (PGC Scientifics). La solución (0.2 mg/mL) se dividió en alícuotas de 1.5 mL en viales esterilizados Eppendorf (Accesolab) y se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

c) Tratamiento.

Cinco ratones jóvenes (grupo IA) se inyectaron en el abdomen, por vía SC, cada tercer día y durante 4 semanas con 0.1 mL de la solución de veneno de abejas (0.2 mg/mL), de acuerdo a la dosis recomendada por Schmidt, 1995 ⁽¹¹³⁾. Otros 5 animales de la misma edad (grupo IB) fueron inyectados en la misma forma que el subgrupo anterior con 0.1 mL de la solución salina isotónica, estéril. Los 5 ratones restantes (grupo IC) no recibieron tratamiento alguno. Este mismo esquema de tratamiento se repitió para los 3 subgrupos (IIA, IIB y IIC) de los ratones de 18 meses de edad del grupo II. Durante todo el tratamiento también se observó su conducta y se vigiló que los animales estuvieran sanos. Cualquier ratón que mostrara algún signo de enfermedad fue descartado.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA.**

d) Irritación del peritoneo

Se realizaron varios experimentos preliminares con la finalidad de conocer si la irritación peritoneal que provocaba el medio de tioglicolato ⁽¹⁵¹⁾ influía o no en el número de células cosechadas del peritoneo y en su estado de activación. Dos ratones Balb/c machos jóvenes fueron inyectados por vía intraperitoneal (IP) con una sola dosis de 3 mL de una solución estéril del medio tioglicolato al 3%, otros dos ratones de la misma edad y sexo fueron inyectados durante tres días seguidos por la misma vía con el mismo volumen de una solución balanceada de Hanks estéril y los dos animales de un tercer grupo recibieron la misma serie de tres inyecciones IP pero ahora de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10 % de suero bovino fetal (SBF).

Al cuarto día, todos los animales se sacrificaron y las células del peritoneo se extrajeron por lavado con 5 mL de la solución de Hanks estéril, enfriada. Una vez aspiradas, las células se pasaron a tubos de centrifuga enfriados en hielo, donde se lavaron dos veces con 5 mL de solución de Hanks enfriada en hielo y

luego se resuspendieron en 1 mL de medio RPMI suplementado, sin suero bovino fetal. Inmediatamente, se contó el número de células peritoneales que había sido obtenido de cada animal y, asimismo, se midió la viabilidad celular.

El paso siguiente fue estudiar el grado de activación en el que encontraban esas células que habían sido obtenidas utilizando diferentes procedimientos de extracción peritoneal. Para ello, primero se ajustó su número a 1 millón de células/mL y cuatro alícuotas de esa suspensión (cada una de 1 mL) se repartieron en los pozos de una placa de cultivo de 24 pozos, que fue incubada por 2 horas a 37 °C, en una atmósfera de aire, con 5% de CO₂. Después de esta incubación, las células adherentes se lavaron 2 veces con medio RPMI 1640. Luego, a dos de los cuatro pozos que contenían las células adherentes (macrófagos peritoneales) se les agregó 1 mL de medio RPMI 1640, suplementado con 10 mM de glutamina (Gibco BRL), 10 % de suero bovino fetal (SBF) (Gibco BRL), previamente inactivado a 56°C, durante 30 minutos, aminoácidos no esenciales (Gibco BRL), HEPES 25 nM (Gibco BRL), 100 U/mL de penicilina (Gibco BRL) y 100 µg de estreptomycin (Gibco BRL). A los otros dos pozos se les añadió 1 mL de una solución de LPS (5 µg/mL) en este mismo medio, ya suplementado. Las placas de cultivo se volvieron a introducir en la incubadora por 24 horas, a las mismas condiciones que se utilizaron durante el periodo de adherencia ⁽¹⁵¹⁾. Al finalizar este período, los sobrenadantes de los cultivos se colectaron en viales Eppendorff de 1.5 mL y se congelaron a – 20 °C, hasta la determinación de sus niveles de IL-6, por el método de ELISA-sandwich.

e) Obtención de las células.

1) Macrófagos peritoneales. De acuerdo a los resultados del estudio preliminar, se decidió que el medio tioglicolato era el irritante peritoneal más conveniente para obtener los macrófagos, de acuerdo a los objetivos del presente trabajo y por las cantidades de células que se iban a trabajar posteriormente.

Tres días antes de su sacrificio, todos los animales de cada grupo recibieron por vía IP, 3 mL de solución estéril de tioglicolato de sodio al 3%. Cada ratón fue sacrificado en una cámara conteniendo éter etílico e inmediatamente se introdujo en una solución de alcohol etílico/agua destilada, al 70%. Ya en la campana de flujo laminar, se extrajeron los macrófagos inyectando, en el peritoneo de cada animal. 5 mL de solución salina balanceada de Hanks (Gibco BRL), estéril, enfriada en hielo. Después de un breve masaje abdominal, las células peritoneales se extrajeron por aspiración de la solución de Hanks. Inmediatamente, las células se pasaron a tubos de centrifuga enfriados en hielo. Fueron lavadas 2 veces con HBSS y resuspendidas en 1 mL de medio RPMI 1640 (Gibco BRL) suplementado. Esta suspensión celular se mantuvo sobre hielo hasta el sembrado de las células en la placa de cultivo, después de haberse cuantificado su viabilidad y ajustado su número ⁽¹⁵¹⁾.

2) Linfocitos esplénicos. Después de extraer los macrófagos peritoneales, se abrió el abdomen y se extrajo el bazo, que fue colocado en 5 mL de solución HBSS enfriada en hielo, en una caja Petri estéril. Este órgano linfoide se perforó por un extremo y por el otro se perfundió con 5 mL de HBSS, con lo que los linfocitos quedaron en suspensión. Las células se recolectaron y se pasaron a tubos de centrifuga enfriados en hielo, en los que se lavaron 2 veces con HBSS. Luego, se les agregó 1 mL de solución hemolizante, dejándose reposar durante 5 minutos y se lavaron dos veces más, con HBSS fría. Finalmente, el botón celular se resuspendió en 1 mL de medio RPMI 1640, suplementado. Cada suspensión celular se mantuvo sobre hielo hasta ser sembradas en las microplacas de cultivo, previa cuantificación de su viabilidad y ajuste a las cantidades necesarias ⁽¹⁵²⁾.

f) **Viabilidad y ajuste celular.**

Un volumen de 20 μ L de la suspensión de células en medio suplementado se mezcló con otro volumen igual de solución de azul tripán al 4% (Research

Organics) en un vial Eppendorff y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Luego, 20 μL de la mezcla se colocaron sobre una cámara de Neubauer, que se puso sobre un microscopio invertido de luz (Olimpus). Usando el objetivo 40X y el ocular 10X, se contaron en 5 cuadros tanto las células que excluyeron el colorante como las que lo incorporaron. Inmediatamente, el número de células se ajustó a 1×10^6 células/mL para el caso de los macrófagos y a 3×10^6 células/mL para los linfocitos esplénicos⁽¹⁵³⁾. Este procedimiento se repitió para cada ratón.

g) **Estimulación *in vitro* de los linfocitos con un mitógeno.**

De la suspensión ajustada de linfocitos del bazo se tomó una alícuota de 300,000 células/0.1 mL, que se depositó por sextuplicado en una placa de cultivo (NUNC) de 96 pozos. A los 3 primeros pozos se les agregaron 20 μL de medio RPMI suplementado y a los 3 pozos restantes se les estimuló con 20 μL de una solución conteniendo (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) del mitógeno Con-A (Sigma-Aldrich). La placa se tapó y se incubó por 72 horas a 37 °C, en una atmósfera humificada de aire, con 5% de CO_2 . A las 54 horas de iniciado el cultivo, todos los pozos recibieron 20 μL de una solución de timidina tritiada 0.5 μCi [^3H]TdR (6.7 Ci/mM, New England Corporation,) solubilizada en medio RPMI 1640, suplementado. Al finalizar el cultivo, las células fueron lisadas y lavadas copiosamente con agua destilada en un cosechador de células, donde los núcleos fueron atrapados en papel fibra de vidrio, al que después se le agregaron 10 mL de solución de líquido de centelleo (Gibco BRL). La incorporación de timidina tritiada en los núcleos de los linfocitos se cuantificó mediante la lectura de la estimulación de las moléculas del líquido de centelleo, en un lector beta (TRI-CARB 300, Packard)⁽¹⁵²⁾.

h) Estimulación *in vitro* de los macrófagos peritoneales con LPS.

Un mililitro de cada suspensión de células mononucleares en medio de cultivo suplementado y ajustada a 1×10^6 células/mL, se agregó por cuadruplicado a una placa de cultivo de 24 pozos (Nunc), dejándose incubar por 2 horas para su adhesión, en una atmósfera de aire con 5% de CO₂, a 37°C. Luego, las células se lavaron 2 veces con medio RPMI 1640, entibado. Inmediatamente, a dos de los pozos se les agregó 1 mL de medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SBF y a los otros dos pozos se les adicionaron 1 mL de una solución de LPS (5 µg/mL) (Sigma-Aldrich), disueltos en medio RPMI 1640, suplementado. La placa se incubó por 24 horas en las mismas condiciones, después de lo cual se recolectaron individualmente los sobrenadantes de los cultivos y se guardaron a -20°C hasta su uso ⁽¹⁵¹⁾.

i) Cuantificación de citocinas.

La cantidad de citocinas proinflamatorias IL-6, IL-12 y TNF- α producidas por los macrófagos peritoneales, estimulados *in vitro* con LPS, se determinó empleando la técnica de ELISA-sandwich ⁽¹⁵⁴⁾. En ella, los anticuerpos de captura (anticuerpos monoclonales, específicos para cada citocina) se solubilizaron en un amortiguador de NaHCO₃ (J.T. Baker) 0.1M, pH 8.2. Alícuotas de 50 µL de esta suspensión se agregaron a cada pozo y se dejó que se adherieran a una microplaca de EIA (Costar) toda la noche, a 4°C. Después de tres lavados con una solución de PBS/Tween-20 al 0.5%, todos los pozos recibieron 100 µL de una solución de PBS/BSA al 3% para bloquear el ligado no específico, y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. La placa fue lavada otras 4 veces con PBS/Tween; a unos pozos se les agregaron, por duplicado, 100 µL de diluciones seriadas de la citocina recombinante. En los pozos restantes se añadieron 50 µL de PBS/BSA al 1%, y enseguida se pusieron 50 µL de los sobrenadantes de cultivos de los macrófagos peritoneales dejándose incubar, otra vez toda la noche,

a 4°C. Al día siguiente, se lavaron nuevamente 4 veces las placas y se añadieron a cada pozo 100 μ L del segundo anticuerpo monoclonal, biotinilado, específico para cada citocina, solubilizado en PBS/BSA al 1%, dejando incubar la reacción 1 hora, a temperatura ambiente. Luego de 6 lavados, se añadieron 100 μ L de una solución de estreptoavidina peroxidasa (S-HRP) disuelta 1:4000 en PBS/BSA al 1%, incubándose por 45 minutos, a temperatura ambiente. Al finalizar esta incubación, las placas fueron lavadas 8 veces como se indicó anteriormente y 100 μ L de una solución del sustrato ABTS se puso en todos los pozos de la microplaca; que inmediatamente se tapó de la luz y se incubó de 15 a 20 minutos. Al detectarse el desarrollo del color de la reacción, ésta se detuvo con 50 μ L de una solución al 50% de DMF/agua destilada. La lectura de la absorbancia de la reacción se hizo a 405 nm, en un lector de placas (Dynex). La cuantificación de cada citocina se hizo interpolando los valores de las absorbencias registradas para cada muestra en la curva patrón correspondiente.

j) Cuantificación de PGE₂

La determinación de la prostaglandina E₂ se realizó mediante la técnica de ELISA por competencia ⁽¹⁵⁴⁾ con un kit comercial (R&D Systems). En ella, la PGE₂ presente en cada muestra y un conjugado de PGE₂ de concentración conocida y marcado con fosfatasa alcalina, compiten por los sitios activos de un anticuerpo monoclonal anti-PGE₂ de ratón. Durante la incubación, éstos complejos se unen a un segundo anticuerpo policlonal de cabra, que se encuentra adsorbido en el fondo de la microplaca, y que está dirigido contra el primer anticuerpo. Luego, la reacción inmunológica de competencia se revela al adicionar el sustrato de la enzima, cuya absorbancia es inversamente proporcional a la concentración de PGE₂ presente en la muestra.

Para la determinación de la cantidad de PGE₂ en los sobrenadantes de los cultivos de los macrófagos peritoneales, se agregan 100 μ L del amortiguador de

ensayo en los pozos de los controles negativos y los de pegado no específico. Luego, se adicionan, por duplicado, 100 μL de las soluciones seriadas del estándar de PGE_2 para la curva patrón. Se dejan vacíos los pozos correspondientes al control positivo y los del blanco de sustrato y se les ponen, a los pozos restantes, 100 μL de las muestras; enseguida, 50 μL del conjugado de PGE_2 marcado con la enzima y luego 50 μL de la solución del anticuerpo de ratón anti PGE_2 . La reacción se deja incubar dos horas a temperatura ambiente, con agitación suave, para favorecer la competencia entre la prostaglandina E_2 no marcada y la marcada. A continuación, la microplaca se lava 6 veces con el amortiguador de lavado, para eliminar el exceso de los reactivos que no reaccionaron. Posteriormente, se adiciona el control positivo en los pozos respectivos y, después, se agregan 200 μL del sustrato para-nitrofenilfosfato (PNP) a todos los pozos de la microplaca, para detectar la reacción, dejando incubar por 1 hora a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación, la reacción se detiene con 50 μL de una solución de fosfato trisódico (TSP). La absorbancia de las muestras se determina inmediatamente en un lector de placas (Dynex) a 405 nm.

V. RESULTADOS OBTENIDOS

1) Evaluación clínica.

Todos los ratones que recibieron inyecciones SC de veneno de abejas por 4 semanas no mostraron efectos macroscópicos adversos en la piel. Sólo se observó un comportamiento de enterramiento y un poco de irritabilidad al momento de inyectarlos.

2) El tratamiento *in vivo* de los ratones con veneno de abejas no modifica los índices de proliferación *in vitro* de los linfocitos del bazo.

La administración SC de VA durante 4 semanas no modificó la tasa de proliferación de los linfocitos esplénicos. Tanto en los animales jóvenes como en los viejos, con y sin tratamiento, la captación de timidina tritiada mostró muy pocas diferencias al ser estimulados *in vitro* con Con-A, por lo que los índices de linfoproliferación son muy parecidos. Las varianzas no fueron homogéneas y la prueba de Tukey mostró que las pequeñas diferencias entre los grupos no eran estadísticamente significativas ($p > 0.05$). Los valores promedio correspondientes a los índices linfoproliferativos de cada grupo de ratones se encontraron entre 25 y 26 unidades, calculados de acuerdo a la siguiente fórmula :

$$\text{Indice linfoproliferativo} = \frac{\text{cpm en los núcleos de las células no estimuladas con Con-A}}{\text{cpm en los núcleos de las células estimuladas con Con-A}} \times 100$$

3) El tipo de irritante utilizado en el peritoneo modifica el número de células obtenidas y su actividad.

La extracción de las células del peritoneo por medio de tioglicolato de sodio, usado como irritante, sí influyó en el número de células obtenidas y en la cantidad

de IL-6 que ellas producen. El efecto que produce del medio de tioglicolato sobre el número de macrófagos que se obtienen del peritoneo y su actividad, se comparó con el que produce la solución de Hanks o el medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SBF. El número de células promedio más bajo obtenido (1.3×10^6 células/mL) correspondió a los animales que recibieron la solución salina balanceada. El medio RPMI 1640 proporcionó 1.3×10^6 células/mL y el tioglicolato dió el mayor promedio con 7.7×10^6 células/mL. La actividad de cada grupo de células se determinó midiendo la cantidad de interleucina 6 que liberaron al ser cultivadas por 24 horas, en presencia o ausencia de LPS. Los valores más altos de interleucina 6 encontrados en los sobrenadantes correspondieron a los macrófagos provenientes de los animales que recibieron el medio RPMI 1640 (4.7 ± 1.5 ng/mL). Los animales que recibieron el medio de tioglicolato produjeron 2.6 ± 0.8 ng/mL de IL-6, mientras que los animales inyectados con solución de Hanks fueron los que liberaron la menor cantidad de esta citocina (1.3 ± 0.3 ng/mL). Así, los macrófagos obtenidos con medio de tioglicolato presentan tanto un aumento en la cantidad de células extraídas como en la producción de la IL-6, al ser estimulados *in vitro* con LPS, tal como se muestra en la Tabla VII y Figura 3, respectivamente.

TABLA VII

Cantidad de células obtenidas del peritoneo, de acuerdo al irritante utilizado

| Tratamiento | Células x 10^6 /mL (promedio) |
|------------------------|------------------------------------|
| RPMI 1640 suplementado | 1.3 |
| Hanks | 1.7 |
| Tioglicolato | 7.7 |

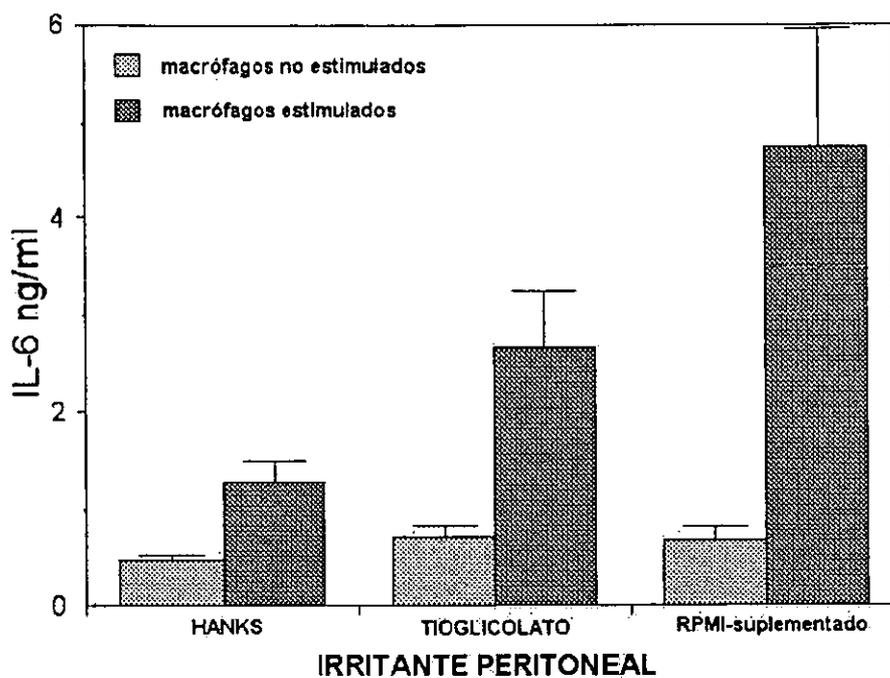


Figura 3. Diferente activación de los macrófagos según el irritante utilizado para extraerlos del peritoneo. La altura de las barras señala las diferencias en la producción *in vitro* de IL-6 por los macrófagos de ratones sanos y sin tratamiento, según el irritante peritoneal utilizado haya sido la solución de Hanks, el tioglicolato o el medio de cultivo RPMI 1640 suplementado.

4) La edad y el tratamiento con veneno de abejas aumentó la síntesis de IL-6.

En condiciones basales, la producción de la interleucina 6 por los macrófagos peritoneales fue mucho más baja y no se encontraron diferencias según la edad de los animales o según si habían recibido o no el tratamiento con VA. En contraste, al ser estimulados *in vitro* con LPS, la síntesis de IL-6 se incrementó notablemente, más en los ratones viejos que en los jóvenes, mostrando

diferencias significativas entre los 2 grupos. Las células peritoneales provenientes de animales no tratados, jóvenes, produjeron una cantidad media de IL-6 de 1782 ± 384 pg/mL, mientras que las de los animales ancianos alcanzaron 4304 ± 924 pg/mL. Después del tratamiento con VA, la síntesis promedio de esta citocina alcanzó 3326 ± 759 pg/mL, en los sobrenadantes de los cultivos de los macrófagos de los ratones jóvenes, y 8384 ± 1936 pg/mL, en el caso de los ratones envejecidos y, las diferencias en los valores de IL-6 entre los 2 grupos fueron significativas ($p < 0.05$). (Figura 4).

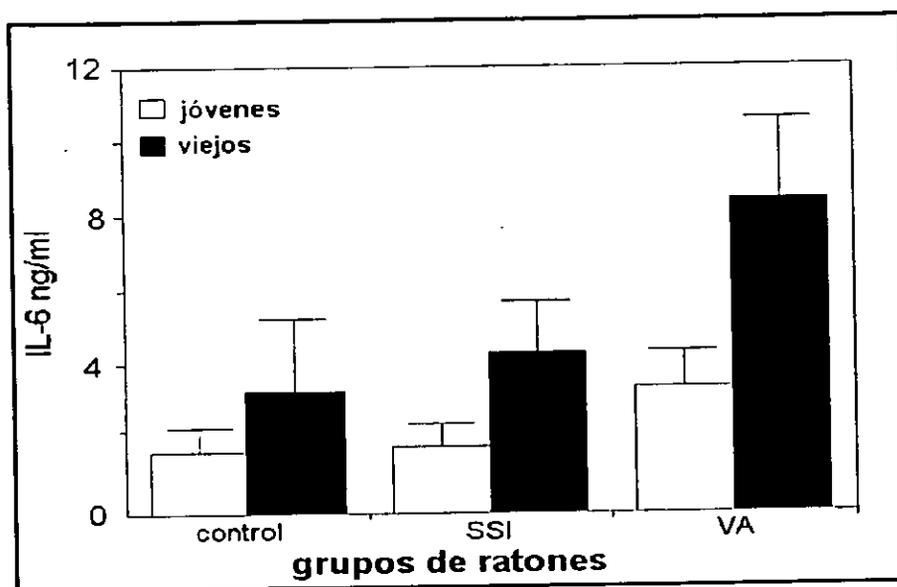


Figura 4. Cantidad de IL-6 en los sobrenadantes de los cultivos de los macrófagos peritoneales (estimulados con LPS) de los animales de 3 y 18 meses de edad, tratados o no con veneno de abejas o con solución salina. La altura de las barras señala el valor promedio \pm 1 desviación estándar.

- 5) El tratamiento *in vivo* con VA influye sobre la síntesis *in vitro* de IL-12, en los animales jóvenes.

Las cantidades de IL-12 producidas por los macrófagos de los ratones que recibieron el tratamiento con veneno de las abejas sólo mostraron un incremento estadísticamente significativo cuando los valores en los diferentes grupos se compararon contra los obtenidos en los ratones jóvenes sanos y sin tratamiento.

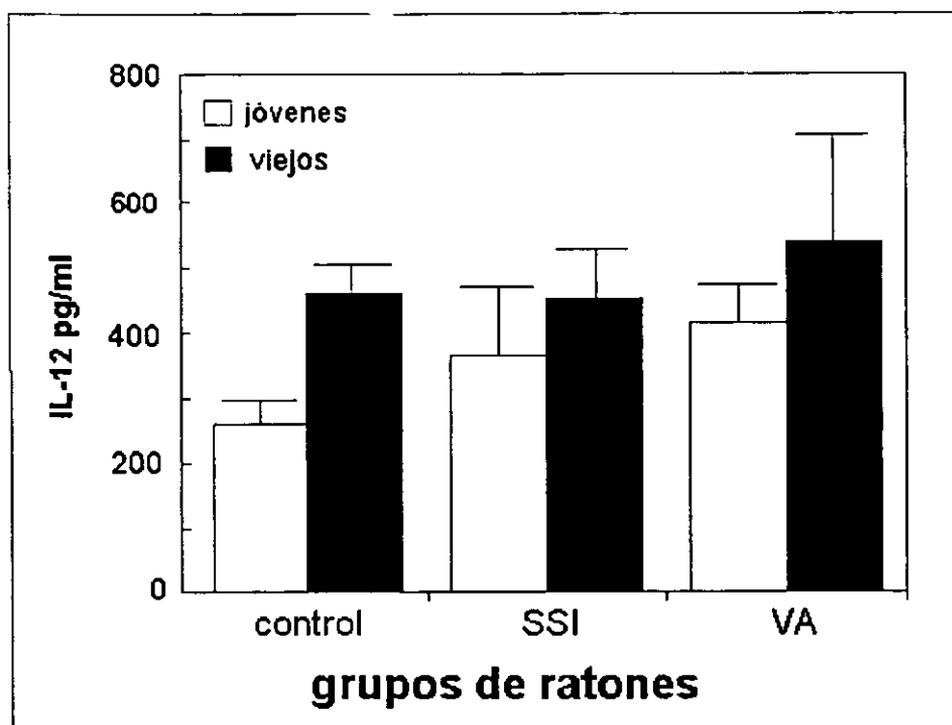


Figura 5. Concentración de IL-12 en los sobrenadantes de los cultivos de los macrófagos peritoneales (estimulados con LPS) de los animales jóvenes y viejos, tratados o no con VA. Las barras señalan los valores promedio de cada grupo \pm 1 desviación estándar.

Los ratones viejos, no tratados y los ratones jóvenes con tratamiento (VA) mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la producción de la citocina cuando sus resultados fueron comparados con los del grupo control de ratones jóvenes. Las células adherentes del peritoneo de los animales de 18 meses de edad que estaban sanos y sin tratamiento liberaron al medio una mayor cantidad

promedio de IL-12 (542 ± 163 pg/ml), mientras que los animales jóvenes produjeron 265 ± 37 pg/ml (Figura 5).

6) La síntesis de PGE₂ y TNF α no cambió con el envejecimiento o por el tratamiento con veneno de abejas.

La producción de la prostaglandina E₂ y del factor necrosante de tumores a (TNF- α) no presentó cambios significativos después del tratamiento SC con VA o por la edad, como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla VIII.

Producción *in vitro* de TNF α y PGE₂ por los macrófagos de los ratones de 3 y 18 meses de edad.

| GRUPOS | | N | JÓVENES | VIEJOS | |
|-----------------------|-----------------|---|-----------------|-----------------|----|
| Concentración (ng/mL) | | | | | |
| TNF α | sin tratamiento | 5 | 6.56 ± 1.35 | 6.13 ± 0.55 | NS |
| | control | 5 | 6.67 ± 0.62 | 5.69 ± 0.54 | NS |
| | VA | 5 | 5.64 ± 0.91 | 5.69 ± 0.65 | NS |
| PGE ₂ | sin tratamiento | 5 | 3.76 ± 0.40 | 3.80 ± 0.79 | NS |
| | control | 5 | 4.19 ± 0.93 | 3.20 ± 1.27 | NS |
| | VA | 5 | 3.76 ± 0.46 | 4.16 ± 0.34 | NS |

NS = no significativo

7) Análisis estadístico.

Las diferencias entre los 6 grupos fueron analizadas por la prueba F de Tukey después que la prueba de la X^2 de Bartlett mostró que las varianzas no eran homogéneas. Se encontró una diferencia significativa ($p < 0.05$) al comparar los valores promedio de IL-6 para animales sanos viejos y jóvenes. Aunque los macrófagos de los animales jóvenes aumentaron su producción de IL-6 después del tratamiento con VA, esas diferencias no fueron significativas. En cambio, al comparar todos los valores de IL-6 en los sobrenadantes de los macrófagos de los ratones viejos, el valor de F fue 15.00 con una $p = 0.0008$. Los contrastes según la prueba de Dunnett mostraron que las diferencias eran significativas ($P < 0.05$) al comparar los valores de IL-6 en los animales sanos y en los que recibieron el tratamiento con VA (Tabla IX). En los ratones tratados con SSI o sin tratamiento no se encontraron diferencias en ambos grupos.

TABLA IX

Prueba F de Tukey aplicada a los valores de IL-6 en los sobrenadantes de los macrófagos obtenidos en los tres grupos de 3 meses y de un año y medio de edad.

| Fuente de Varianza | Σ de cuadrados | Grados de libertad | Cuadrados medios | F |
|--------------------|-----------------------|--------------------|------------------|-------|
| entre grupos | 64.53 | 2 | 3.26 | |
| dentro de grupos | 25.80 | 12 | 2.15 | 15.00 |
| Totales | 90.33 | 14 | | * |

* $p = 0.0008$

Como la prueba de Bartlett mostró que las varianzas eran homogéneas y no existían diferencias entre ellas ($X^2 = 9.54$), se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de Fisher a los valores de todos los grupos (24 grados de libertad) y posteriormente se calcularon los contrastes por la prueba de Dunnett. En este caso, las cantidades de IL-12 en los sobrenadantes de los macrófagos de los tres grupos de ratones viejos fueron superiores ($P < 0.05$) al promedio de IL-12 en los ratones jóvenes sanos. No hubo diferencias ($p > 0.05$) entre las cantidades de IL-12 producidas en los ratones jóvenes que eran controles inyectados con solución salina o sin tratamiento. Tampoco se encontraron diferencias significativas (F de Fisher = 1.0, con una $p = 0.4$) cuando los valores de IL-12 en los tres grupos de ratones viejos se compararon entre sí. Pero la IL-12 aumentó significativamente ($p < 0.05$) cuando los ratones jóvenes fueron inyectados con el VA, en relación al grupo de ratones jóvenes sanos. Las diferencias se pueden observar en la Tabla X. Nuevamente, lo mismo que en el caso de la IL-6, las cantidades más altas de IL-12 las produjeron los macrófagos de los ratones viejos (Figura 5).

TABLA X

Prueba ANOVA de Fisher aplicada a los valores de IL-12 en los sobrenadantes de los macrófagos obtenidos en los seis grupos de ratones, jóvenes y viejos.

| Fuente de Varianza | Σ de cuadrados | Grados de libertad | Cuadrados medios | F |
|--------------------|-----------------------|--------------------|------------------|--------|
| entre grupos | 249633.5 | 05 | 49926.7 | |
| dentro de grupos | 197704.4 | 24 | 8237.7 | 6.06 * |
| Totales | 447337.9 | 29 | | |

* $p = 0.0012$

VI DISCUSIÓN

A pesar de que provocaron aumentos significativos en la producción de IL-6 e IL-12 por los macrófagos del peritoneo, las inyecciones subcutáneas de veneno de abejas (1 mg/Kg, cada tercer día, durante 4 semanas) no modificaron la captación de timidina tritiada por las células mononucleares del bazo cuando éstas fueron estimulados *in vitro* con la Con-A (5 µg/mL).

Estos últimos resultados son distintos a los observados por Hyre y Smith, en 1986 ⁽¹¹¹⁾, quienes refieren que la administración *in vivo* del VA aumenta significativamente la proliferación de los linfocitos del bazo. Sin embargo, es conveniente aclarar que ellos emplearon una dosis mucho más alta (30 mg/Kg) del veneno aunque sólo administraron 4 inyecciones subcutáneas. En el presente trabajo se decidió emplear una dosis de VA mucho más baja, tomando en cuenta la toxicidad que había sido reportada por Chen et al, 1993 ⁽¹⁴⁴⁾ y Schmidt, 1995 ⁽¹¹³⁾ y sus recomendaciones para utilizar 1 mg/Kg, es decir aproximadamente 20 µg/dosis/animal, como una dosis segura y efectiva en los ratones. Al utilizar esta cantidad de VA no se observaron muertes ni otras manifestaciones de enfermedad en los animales que recibieron el tratamiento.

En los últimos años, diferentes autores ^(118,119,145) han encontrado evidencia experimental de que el veneno de abejas puede modular las reacciones inmunológicas de las personas. Sin embargo, sus proposiciones no se apoyan en resultados homogéneos. Las diferencias de esos trabajos entre sí o con el nuestro pueden deberse a diversos factores. Se pueden mencionar, por ejemplo, las variaciones que existen en las dosis de VA administradas o en el tipo de componente del veneno utilizado, en las poblaciones celulares empleadas, en las técnicas de extracción de las células, y/o el tiempo de tratamiento que se les dió a los animales. Al discutir los resultados del presente trabajo, se tuvieron en cuenta todas estas variables experimentales que existen en la literatura publicada hasta

ahora sobre los efectos del veneno de abejas. Además, en el caso concreto de la proliferación de los linfocitos, se debe considerar que, después de 4 semanas de tratamiento, aún con una dosis mucho menor a la utilizada por Hyre y Smith ⁽¹¹¹⁾ es posible que el suero de los animales inyectados contenga cantidades elevadas de glucocorticoides (GC) y que estos esteroides inhiban algunas de las actividades de los linfocitos o los monocitos/macrófagos, tal y como lo han reportado Kizaki *et al*, en 1998 ⁽¹⁵⁵⁾.

Por otra parte, Hadjipetrou-Kournounakis y Yiangou ⁽¹⁴⁶⁾, en 1988, han observado que las inyecciones de VA en ratas normales, vivas, provocan una disminución en la producción de IL-1 e IL-2 por los linfocitos y en la respuesta mitogénica de las células del bazo que han sido estimuladas *in vitro*. La adición de estas interleucinas al medio de cultivo restablece los índices proliferativos hasta los valores de los animales control. Con estos resultados, ellos sugieren que el VA, a una dosis de 0.5 mg/Kg, también debe afectar directamente la producción de IL-1 por los macrófagos.

Al revisar la literatura no se encontraron trabajos publicados en los que se estudió directamente el efecto de la administración *in vivo* del VA sobre la producción de citocinas pro-inflamatorias por los macrófagos de roedores. Pero de todos modos, el aumento observado en la síntesis de IL-6 y la de IL-12 por los macrófagos de los animales que recibieron un tratamiento de 4 semanas con VA coincide con los que han presentado otros autores al estudiar los efectos de ese mismo veneno sobre los perfiles de algunas otras citocinas producidas principalmente por células mononucleares de sangre periférica de personas alérgicas ^(118, 119,145) y linfocitos del bazo de animales de laboratorio ⁽¹¹¹⁾. Todos estos resultados están a favor de que el veneno de las abejas contiene sustancias que, directa o indirectamente, actúan *in vivo*, sobre la producción de algunas citocinas por las células del sistema inmune.

En el caso de la IL-6, los resultados del presente trabajo mostraron que su aumento fue independiente de la edad, ya que tanto los macrófagos de los animales jóvenes como los de los viejos elevaron su producción después de ser estimulados *in vitro* con LPS, mientras en el caso de la IL-12, su producción sólo aumentó significativamente en los animales jóvenes.

Estos dos resultados están parcialmente en concordancia con lo que otros investigadores ^(31,118,119,145) han encontrado en relación al efecto del VA sobre los monocitos de sangre periférica, en las personas alérgicas, en las cuales la apiterapia cambia el patrón de citocinas que producen. Sin embargo, cabe señalar que la concordancia respecto a los cambios en la producción de citocinas es relativa, ya que en nuestro experimento no se midió la concentración de las mismas citocinas, tampoco se administró el VA *in vitro*, ni se utilizó el mismo tipo de células que en los trabajos mencionados. En general, existe acuerdo respecto a que el VA influye sobre la producción de citocinas.

Hace dos años, en el momento de proponer las hipótesis del presente trabajo, y de acuerdo a la literatura consultada ^(156, 159,160,161), se supuso que sin recibir las inyecciones del VA, los ratones sanos de un año y medio de edad debían tener modificada la producción de alguna de las citocinas que se iban a estudiar, en relación a los animales de sólo 3 meses de edad. La literatura consultada refiere que los animales o las personas de edad avanzada tienen deficiencias inmunológicas por un desbalance en la producción de citocinas que regulan las respuestas inmunológicas tipo Th1 ó Th2 ^(157,158,159).

A pesar de que es muy grande la cantidad de observaciones respecto a los cambios inmunológicos asociados al envejecimiento, en este momento sólo se destaca, a manera de resumen, que a medida que aumenta la edad, parece existir un desorden en la regulación de la producción de citocinas ⁽¹⁶⁰⁾, acompañado de una disminución en (a) el estallido respiratorio y la capacidad fagocítica ^(159;161),

con un predominio de las respuestas tipo Th2 ⁽¹⁵⁹⁾, (b) la producción de radicales libres o especies reactivas de oxígeno ROS ⁽¹⁶²⁾ y (c) la actividad de enzimas antioxidantes como la catalasa, superóxido dismutasa, glutatión-peroxidasa que tienen como cofactores átomos de Cu, Zn, Se o Mn, ⁽¹⁶³⁾. Estos tres cambios por lo general están asociados a un aumento en la producción de glucocorticoides ⁽¹⁶⁴⁾ que comprometen algunas de las funciones de las principales células del sistema inmune.

Se ha sugerido que la deficiencia en la producción de IL-2 (respuesta tipo-TH1) en las personas mayores reduce la generación de células CD4, efectoras, en relación a las células no estimuladas ⁽¹⁶⁵⁾, pero también se ha sugerido que el aumento en la expresión constitutiva los receptores TNFRII y de las moléculas adaptadoras TRADD en el citoplasma de los linfocitos T de humanos ancianos facilitan la apoptosis de estas células y la disminución de su número en la sangre ⁽⁹²⁾. Sin embargo, también se han publicado otros trabajos en favor de que los ancianos sanos no tienen comprometida su inmunocompetencia ⁽⁶⁴⁾ y de que muchas veces los desórdenes inmunológicos del envejecimiento se deben a una mala alimentación y otros factores que, cuando se corrigen, permiten normalizar la competencia inmunológica del individuo de mayor edad ⁽⁶³⁾.

Los ratones del presente experimento no tuvieron restricciones alimenticias, ni estrés, ni infecciones evidentes. Cabe señalar que, en nuestro estudio, los animales de mayor edad no fueron sometidos a análisis químicos, clínicos o biológicos previos a la administración del VA para demostrar que se encontraban o no inmunocomprometidos. Tampoco se les sometió a retos antigénicos que mostraran el aumento de su respuesta humoral o celular después del tratamiento con el VA porque estos no fueron los objetivos del trabajo. El presente estudio solo estuvo dirigido a medir el efecto del VA sobre la producción de algunas citocinas pro-inflamatorias por los macrófagos peritoneales y observar si los resultados eran o no diferentes según la edad de los animales.

El estudio de la influencia de la edad en la modulación de las citocinas pro-inflamatorias se puede justificar por la gran cantidad de observaciones y publicaciones sobre el tema. Está ampliamente estudiado que las personas de edad avanzada padecen enfermedades inflamatorias crónicas con mayor frecuencia que las jóvenes⁽⁸²⁾. Asimismo, los adultos mayores tienen aumentada la síntesis de sustancias pro-inflamatorias tales como (a) la IL-6^(161, 168), tanto en el cerebro⁽⁷⁷⁾ como en el suero⁽¹⁵⁸⁾, (b) la IL-12⁽¹⁶⁰⁾, (c) el TNF α ⁽¹⁶⁷⁾ y (d) las prostaglandinas⁽¹⁶⁸⁾. La asociación entre las respuestas inflamatorias y los cambios en la producción de citocinas también están apoyadas por numerosos experimentos. Hinson et al, en 1996⁽¹⁶⁹⁾, por ejemplo, han confirmado estos hallazgos en un modelo animal de respuesta inflamatoria, utilizando ratones a los que se les inyecta aceite mineral (pristano) dentro de la cavidad peritoneal. Los ratones desarrollan una inflamación crónica, en la que la producción de IL-6 y la PGE₂ se encuentran aumentadas.

El bloqueo de las citocinas pro-inflamatorias mediante la inyección intraperitoneal de anticuerpos monoclonales anti-TNF α y anti-IL-1 en ratones con artritis les reduce la gravedad de las lesiones óseas y de los síntomas de la enfermedad⁽¹⁷⁰⁾. El TNF y la IL-1 son dos de las principales citocinas pro-inflamatorias que activan la expresión de moléculas de adhesión intercelular, quimocinas y citocinas pro-inflamatorias, de modo que su bloqueo se traduce naturalmente en una reducción de la inflamación. Sin embargo, conviene tener presente que algunas otras citocinas pro-inflamatorias, particularmente la IL-6 y la IL-11, son al mismo tiempo potentes inductores de respuestas anti-inflamatorias que aseguran una eficiente modulación endógena de la inflamación⁽⁵⁰⁾. Por consiguiente, ellas no necesitan ser bloqueadas.

La IL-6 y la IL-11, por ejemplo, estimulan la expresión de numerosos factores que tienen una franca actividad anti-inflamatoria, tales como el antagonista del IL-1R, los TNFR solubles, la IL-10, las proteínas de fase aguda,

varios inhibidores de proteasas, supresores de proteínas de señalización de citocina y los glucocorticoides. Ahmed e Ivashkiv, 2000 ⁽⁵⁰⁾ han sugerido que la estimulación de la producción de la IL-6 en el curso de una enfermedad inflamatoria puede contribuir a que se active un sistema de retroalimentación negativa que atenúa el proceso inflamatorio. Muy probablemente, de acuerdo a nuestros resultados que muestran un aumento de la producción de IL-6 después del tratamiento con el VA, éste puede ser uno de los mecanismos de acción por los cuales la apiterapia introduce una mejoría en el cuadro clínico de algunas artritis. El aumento en la síntesis de IL-6 inducido por el VA debe de acompañarse de un incremento en la síntesis de glucocorticoides. Sin embargo, en este momento, se desconoce el efecto que pudiera tener un aumento adicional en la producción de glucocorticoides en las personas de edad avanzada que recibieran veneno de abejas u otros agentes inductores de estrés, que aumentan la síntesis de IL-6. Aunque algunos autores señalan una relación entre el aumento en la producción de IL-6 y algunas enfermedades (particularmente las que aparecen en individuos de edad avanzada) ⁽⁵²⁾, otros opinan que esta interleucina tiene una actividad anti-inflamatoria que resulta favorable en el curso de las enfermedades crónicas ⁽⁵⁰⁾.

Hoy en día, existe un gran interés por atenuar las reacciones inflamatorias asociadas al proceso de envejecimiento, con la finalidad de mejorar la calidad de vida en este grupo de personas. Las estrategias empleadas se basan en dietas, farmacos o productos naturales, que incluyen la administración de antioxidantes ⁽¹⁶³⁾, hormonas esteroides ⁽¹⁶⁶⁾, vitaminas ⁽¹⁶⁸⁾, citocinas ⁽¹⁵⁶⁾, extractos de plantas o animales ⁽¹⁵⁸⁾, que han mostrado la capacidad de modular algunas de las funciones de los linfocitos T y los macrófagos, que están supuestamente alteradas con la edad. Sin embargo, los mecanismos exactos de los desórdenes inmunológicos relacionados con el envejecimiento no están claros todavía y la acción precisa de los tratamientos profilácticos anti-inflamatorios tampoco se conoce aún con exactitud.

Por otra parte, los resultados de la utilización empírica del veneno de las abejas continúan llamando la atención de diversos grupos de investigadores. Aunque hasta ahora son pocos los trabajos realizados en modelos animales, se ha reportado la eficacia de este producto natural, tanto en la prevención de la aparición ⁽⁹⁶⁾ y en el control del desarrollo de la artritis inducida por adyuvantes, ⁽¹³⁷⁾ así como en el tratamiento de la sintomatología ⁽¹⁴⁸⁾. Algunos opinan que estos resultados son una consecuencia de la capacidad del VA para estimular el eje HHA y elevar la síntesis de glucocorticoides ^(96, 97, 171).

Otros autores también han informado sobre la intensa actividad anti-inflamatoria del veneno de abejas, tanto en ratas ⁽¹⁷²⁾, perros ^(96,149), monos ⁽¹⁷¹⁾ y caballos ⁽¹⁴⁸⁾ a los que se les había inducido una artritis experimental, e inclusive, mencionan casos en los que la recuperación fue total, después del tratamiento ⁽¹⁴⁸⁾. Rekka y Kourounakis, en 1990 ⁽¹⁰²⁾, han atribuido esta actividad anti-inflamatoria del veneno de abejas a su capacidad de inhibir la peroxidación no enzimática de lípidos, a través de la depuración del radical hidroxilo, mientras que Hadjipetrou-Kourounakis, 1988 ⁽¹⁴⁶⁾ la atribuyen a la supresión de la síntesis de IL-1, *in vitro*.

En el presente trabajo, se encontró un aumento de la IL-6 después de administrar el VA, lo que apoya las proposiciones de Ahmed e Ivashkiv en el 2000 ⁽⁵⁰⁾ para sugerir que es el aumento de esta citocina pleiotrópica uno de los factores anti-inflamatorios de la apiterapia). Asimismo, se debe tener en cuenta que uno de los efectos observados al aumentar la producción de la IL-6 es una disminución en la síntesis del TNF α , una citocina pro-inflamatoria muy importante ^(93,173).

Es posible que los niveles elevados de IL-6 observados en el presente trabajo se deban exclusivamente al tratamiento con el veneno de las abejas, ya que Simpson et al, 1997 ⁽¹⁷⁴⁾, encontraron por RT-PCR, que los macrófagos peritoneales extraídos con tioglicolato no expresan ni el RNAm para esta citocina y

tampoco detectaron la presencia de IL-6 hasta que las células fueron estimuladas con LPS.

En relación a la IL-12, esta es una citocina muy importante en la estimulación de la respuesta tipo Th1, que activa macrófagos y linfocitos NK o que promueve la diferenciación de las células Th0 a Th1 ^(175,176). En nuestro trabajo, la IL-12 se encontró elevada en los sobrenadantes de cultivos de fagocitos mononucleares en los 3 subgrupos de animales viejos (control, SSI y VA) pero, esta concentración sólo se modificó significativamente por el tratamiento con el veneno de abejas en los animales jóvenes. Estos resultados son congruentes con lo reportado por Rea et al, en el 2000 ⁽¹⁷⁷⁾, quienes encontraron valores elevados del homodímero p40 de la IL-12 y a la IL-12 total en el suero de personas mayores, pero no coinciden con los observados por Lio et al, en 1998 ⁽¹⁷⁸⁾, quienes han encontrado disminuida esta citocina, en linfocitos de sangre periférica en las personas mayores.

La variación en los valores obtenidos de IL-12 entre nuestros experimentos y los de estos últimos autores se pueden entender si se considera que Lio y colaboradores usaron linfocitos de sangre periférica humana estimulados *in vitro* con LPS, PHA o anticuerpos anti-CD3, para evaluar la síntesis de la interleucina 12, mientras que nosotros medimos la producción de esta citocina en los sobrenadantes de cultivos de macrófagos peritoneales que habían recibido un tratamiento *in vivo* con VA, durante 4 semanas, en ratones viejos y jóvenes. Sin embargo, estas diferencias son interesantes, puesto que en la literatura consultada se encontraron referencias a favor de que los animales viejos y las personas de edad avanzada tienen disminuida la capacidad citolítica de sus linfocitos T y que ésta se puede mejorar al adicionar la IL-12 en los cultivos ⁽¹⁷⁹⁾.

Los resultados obtenidos al estudiar la IL-12 merecen otros comentarios. Se ha reportado que los LPS pueden estimular la síntesis de IL-12 en monocitos

humanos ⁽¹⁸⁰⁾. Sin embargo, Lienenlücke et al, 2000 ⁽¹⁸¹⁾, han mostrado que, en estas mismas células, la liberación basal de las formas p40 y p70 de esta citocina es nula o muy baja y que los LPS inducen poco su síntesis. Monteleone et al, 1999 ⁽¹⁸²⁾ han presentado resultados parecidos sobre los monocitos y macrófagos de la lámina propia intestinal y en sangre periférica de personas. Ellos describieron que la IL-12 no se expresa en los sobrenadantes de los cultivos de células de la lámina propia, en presencia o ausencia de LPS bacterianos. Ellos encontraron que el INF γ estimula la síntesis de IL-12, mientras que la PGE₂ la inhibe dependiendo de la dosis, y que la adición de indometacina a los cultivos promueve la producción de la IL-12, aunque a cantidades mucho menores (100 pg/ml) que los encontrados en nuestro experimento (500 pg/ml). Tomando en cuenta lo anterior, es posible que los valores de IL-12 que encontramos puedan deberse al efecto indirecto que el VA esté ejerciendo *in vivo* sobre los macrófagos peritoneales, a través de la estimulación de los linfocitos Th1.

A pesar de que no fue significativo el incremento observado por nosotros en la síntesis de la interleucina 12 en los ratones envejecidos, ya que solo hubo una tendencia a elevarse en los que recibieron las inyecciones del veneno de abejas, el aumento moderado en la producción de esta interleucina por los macrófagos de los animales ancianos, sin tratamiento, pudiera ser un hallazgo sugestivo de que, a mayor edad se inician mecanismos moduladores que permiten compensar la deficiencia en la respuesta tipo Th1 que otros autores han reportado.

Aunque los resultados obtenidos probaron que, la administración *in vivo* del veneno de abejas puede influir en la capacidad de los macrófagos para aumentar su producción de algunas citocinas inflamatorias, hemos encontrado que, de acuerdo a las actividades atribuidas en su uso experimental o empírico, el VA no redujo la concentración de las citocinas pro-inflamatorias cuantificadas por nosotros, tal y como se esperaba. Por el contrario, al término de 1 mes de inyecciones de una solución de veneno de abejas, los macrófagos peritoneales

incrementaron significativamente la producción de IL-6, una de las citocinas pro-inflamatorias más pleiotrópicas. tanto en los ratones viejos como en los jóvenes.

Estos últimos resultados fueron observados por nosotros con especial interés, ya que la IL-6 es muy importante, tanto en las reacciones pro-inflamatorias así como en su control, al estimular el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal e inducir la síntesis de glucocorticoides. Además, debido a que en el envejecimiento se elevan los niveles de ellos ⁽¹⁶⁴⁾, esperábamos que un mecanismo de retroalimentación negativa estuviera controlando el aumento en la síntesis de IL-6 en los ratones de mayor edad. Sin embargo, en nuestro experimento esta interleucina subió sus niveles, especialmente en los animales envejecidos. Por otro lado, puesto que en el peritoneo residen células cebadas que sintetizan IL-6 ⁽¹³²⁾ y que el veneno de abejas contiene un péptido que produce la desgranulación de estas células ⁽¹⁰⁹⁾ pensamos que, *in vivo*, la producción de la interleucina 6 debió ser mayor que la que se cuantificó en los cultivos de los macrófagos peritoneales, aunque nuestro trabajo no estuvo dirigido a comprobar esta suposición.

También nos llamó la atención que, en el diseño experimental utilizado para el presente trabajo, el tratamiento con VA no modifica la producción de TNF α , ya que por lo general, los monocitos estimulados *in vitro* con melitina aumentan la producción de TNF α ⁽¹³⁰⁾. Una vez liberado, el factor necrosante de tumores es una citocina que estimula la producción de la IL-1 y de la IL-6, las cuales a su vez actúan sobre el hipotálamo, induciendo la liberación de ACTH, en la hipófisis. Esta hormona llega a las glándulas suprarrenales y estimula la síntesis de los glucocorticoides, potentes anti-inflamatorios naturales, con los cuales se cierra el ciclo de retroalimentación negativa que controla la producción de las citocinas pro-inflamatorias ⁽²⁾. En nuestro experimento, en animales que recibieron las inyecciones de VA durante 4 semanas, la producción de TNF- α por los macrófagos no presentó cambio alguno en relación al grupo control no tratado, de

modo que el incremento observado en los niveles de la IL-6 no lo podemos atribuir a esa primera citocina inductora.

En contraste con lo anterior, Bomalaski et al, 1995 ⁽¹³⁰⁾ han reportado que la producción del TNF- α está aumentada en las células mononucleares de la sangre periférica de humanos. cuando éstas son cultivadas en presencia de melitina (1 μ g/mL). Ellos observaron que la síntesis máxima de TNF- α se presenta a las 8 horas de iniciado el cultivo de estas células, en presencia de 5 μ g/mL de LPS, 1 μ g/mL de melitina ó 1 ng/mL del PLAP. Nuestro diseño experimental fue completamente diferente. Nosotros inyectamos veneno de abejas completo durante 4 semanas en los ratones y posteriormente medimos la concentración de esta citocina en el sobrenadante, a las 24 horas de haber iniciado el cultivo de los macrófagos peritoneales.

De todos modos, a pesar que en nuestro trabajo no se encontraron diferencias entre la producción de TNF- α por los macrófagos de animales jóvenes y viejos, tratados o no con el veneno, conviene mencionar que existe literatura ⁽¹⁸³⁾ en favor de una mayor sensibilidad de los animales de mayor edad a las inyecciones intraperitoneales de LPS, lo cual por lo general se acompaña de un aumento en los niveles de TNF- α , IL-1 e IL-6 en el plasma, en relación a los valores encontrados en los animales jóvenes que han recibido las mismas dosis de la endotoxina.

Nuestros resultados no mostraron la tendencia ascendente en los niveles de TNF- α que ha sido observada, ya sea por la edad o por la presencia de melitina, que reportan los autores mencionados ^(130,183). Pero es probable que, nuevamente, las diferencias dependan del diseño experimental, de que fueron distintas las poblaciones de células, la especie, así como las sustancias utilizadas para estimularlas, la dosis empleada, el tiempo de exposición y la ruta de administración. Además, tomando en cuenta que el VA aumenta la producción de

IL-6, conviene recordar que esta citocina influye negativamente sobre la síntesis del TNF- α ^(93, 173).

Por otra parte, también es conveniente tener en cuenta que algunos autores ^(184, 185) han informado que los cultivos de macrófagos peritoneales, extraídos con tioglicolato y sin estimularse con LPS carecen del RNAm para el TNF- α y de su citocina correspondiente, mientras que cuando se les adicionan los LPS, se induce un aumento significativo, tanto en el RNAm para el TNF- α (a las 6 horas), como en las cantidades del factor necrosante de tumores, producido a las 24 horas de haber añadido los lipopolisacáridos al cultivo. En 1997, Simpson et al ⁽¹⁷⁴⁾ han encontrado que los macrófagos peritoneales extraídos con tioglicolato no producen el RNAm para la IL-6, sin ser estimulados con los LPS, mientras que los RNAm para las citocinas IL-12, IL-1 α e IL-1 β , IL-10 y el TNF- α se pueden expresar constitutivamente en presencia o ausencia de los lipopolisacáridos.

En el presente trabajo se decidió utilizar una solución de tioglicolato para la extracción de las células fagocíticas del peritoneo, porque es el procedimiento que, a pesar de sus desventajas, ha sido más recomendado para obtener una buena cantidad de células inflamatorias, que permitan hacer los cultivos con sus respectivos duplicados ⁽¹⁵¹⁾. Asimismo, las pruebas preliminares efectuadas por nosotros para seleccionar la forma de obtención de los macrófagos peritoneales mostraron que la mayor cantidad de macrófagos se obtiene con medio de tioglicolato, seguido del medio suplementado y, los que menores cuentas rindieron fueron los lavados peritoneales con la solución balanceada de fosfatos. Además, estas pruebas preliminares demostraron que los macrófagos peritoneales se activan y aumentan su producción de citocinas mucho menos cuando se obtienen con tioglicolato que cuando las soluciones para cosecharlos están suplementadas con suero.

Stein y Gordon, en 1991 ⁽¹⁸⁶⁾, han mostrado que la producción de TNF α en macrófagos peritoneales residentes o extraídos con diversas sustancias, varía según la sustancia que se haya utilizado para cosecharlos, así como del estímulo inespecífico o inmunológico que se les añadió al cultivo, después de su extracción. Asimismo, en este momento es conveniente señalar que los componentes aislados del veneno de las abejas tienen efectos más intensos que la mezcla de ellos, tal y como lo han observado Chen et al, 1993 ⁽¹⁴⁴⁾.

En el momento de discutir el proyecto de este trabajo, se esperaba que la edad y el tratamiento con VA influyeran significativamente en la síntesis de PGE₂, debido a que ella tiene una función muy importante en el control de la respuesta pro- y anti-inflamatoria, con una actividad doble. Por una parte (a) la PGE₂ actúa como un inductor directo de las reacciones inflamatorias ⁽¹⁸⁷⁾ y por la otra (b) disminuye la producción de citocinas pro-inflamatorias en los macrófagos activados ^(188, 189), y estimula la producción de TGF- β ⁽¹⁹⁰⁾ que es una citocina anti-inflamatoria. Además, existían antecedentes de que uno de los componentes del VA (la melitina) estimula la liberación de ácido araquidónico y la formación de icosanoides cuando es añadido en los cultivos de leucocitos humanos ⁽¹⁹¹⁾ y que otro de los componentes del VA (el MCDF) tiene tanto una actividad inflamatoria como una actividad anti-inflamatoria, porque inhibe la síntesis de PGE₂ ⁽¹⁹²⁾.

El procedimiento utilizado para cosechar los macrófagos peritoneales, mediante inyecciones de tioglicolato, también fue tomado en cuenta por nosotros en el momento de interpretar los resultados, ya que en los últimos años se ha acumulado literatura que señala cómo el método de extracción de las células puede afectar sus funciones, ya sea aumentándolas o disminuyéndolas. Así, por ejemplo, Watanabe et al, en 1994 y 1998 ^(193,194) han informado que los macrófagos peritoneales extraídos con tioglicolato no liberan araquidonato de manera eficiente, tienen niveles bajos de ciclooxigenasa 1 y una inducción más baja de la síntesis de COX-2, por lo que su capacidad de producción de PGE₂ está

disminuida en relación a los macrófagos residentes. También Carrick et al, 1995⁽¹⁹⁵⁾ han encontrado que los macrófagos extraídos mediante tioglicolato producen menos prostaglandina E₂ que los macrófagos residentes. Así que es posible que, en nuestro experimento, el método de extracción de los macrófagos peritoneales con tioglicolato haya influido para que al estudiar los sobrenadantes del cultivo no se hayan encontrado aumentados los valores de la PGE₂. Sin embargo, existen otros factores, entre ellos el tiempo del cultivo, que también pueden influir sobre los resultados.

Hay que tener en cuenta que las probables interrelaciones entre las diferentes moléculas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias depende de muchos factores, tales como el estímulo *in vitro*, la dosis utilizada, el micromedioambiente, la cantidad y la clase de células cultivadas, el origen de las mismas y las soluciones utilizadas para cosecharlas, tal como lo han señalado Ghezzi et al 2000⁽¹⁹⁶⁾ y Stein y Gordon, 1991⁽¹⁸⁶⁾. De este modo, los valores de PGE₂ obtenidos en nuestro trabajo con macrófagos provenientes de un peritoneo irritado por el tioglicolato no son comparables con los que otros autores han obtenido al extraer los macrófagos directamente de la sangre periférica o por un lavado del árbol bronquial/alveolar o del peritoneo⁽¹⁹⁷⁾.

Estas diferencias no solo pueden modificar los valores de la sustancia que disminuye o aumenta, sino que indirectamente influye sobre varias otras más. Por ejemplo, de acuerdo a varios trabajos publicados^(187, 198, 199, 200), el aumento que a veces se observa en la cantidades de PGE₂ parece influir sobre la síntesis de otras citocinas, ya que generalmente se acompaña de una disminución en la síntesis del TNF- α e IL-12 al mismo tiempo que incrementa la producción de IL-6^(188, 169). Por lo tanto, si el uso de tioglicolato para extraer los macrófagos los afecta y disminuye la producción de prostaglandina E₂, se puede suponer que el tioglicolato también pudo haber influido sobre la síntesis *in vitro* de las 3 citocinas que fueron estudiadas en nuestro experimento. Sin embargo, una vez más

conviene tener en cuenta que algunas veces la literatura reúne resultados contradictorios y que éste es uno de esos casos. Así por ejemplo, Ghezzi et al, 2000 ⁽¹⁹⁶⁾, han informado que el uso del tioglicolato no interfiere con la producción de TNF- α , IL-6 y PGE₂ en los macrófagos peritoneales de ratones CD1 y que, aparentemente, la PGE₂ no participa significativamente en la síntesis de la IL-6, ya que un inhibidor de la COX aumentó la producción de la citocina, en presencia de anticuerpos anti TNF- α . Todos estos resultados contradictorios no facilitan la discusión de nuestros resultados y crean lagunas en el momento de sugerir los probables mecanismos de acción del VA.

Otro aspecto interesante de este trabajo y que es necesario tener en cuenta en el momento de discutir los resultados es que el veneno de abejas contiene diferentes sustancias que presentan actividades biológicas distintas, algunas de ellas antagónicas y otras nocivas ^(96,98,122,126,129,130,136,138,139,171,191). Esto significa que no se obtienen los mismos resultados al inyectar el VA completo que cuando se inyecta solamente uno de sus componentes (la melitina, por ejemplo).

Parece evidente que los efectos logrados al inyectar el VA completo son los más espectaculares y menos peligrosos. Como en una forma aislada las dos enzimas y los tres péptidos más importantes que contiene el VA actúan sobre membranas celulares, modifican la composición del glicocálix o de los fosfolípidos, cambian la entrada de iones, liberan neurotransmisores, resultan neurotóxicos y provocan reacciones inflamatorias extensas ^(96,98,122,126,129,130,136,138,139,171,191), entonces llama la atención que la administración del VA completo durante 4 semanas a los ratones no se tradujo en un aumento en la síntesis de TNF- α y PGE₂, ni elevó las respuestas proliferativas de los linfocitos y las reacciones inflamatorias en estos animales. Tampoco se observaron alteraciones importantes en la condición física de los ratones que recibieron este coctail de moléculas. Asimismo, también llama la atención que, administrada en pequeñas cantidades, una mezcla de compuestos tóxicos, citolíticos y pro-inflamatorios como los que contiene el VA pueden modular *in vivo* la respuesta inmune hacia un perfil de

citocinas que eleva principalmente la producción de la IL-6. Ésta es una de las interleucinas más pleiotrópicas que se conocen hoy en día. Posee una actividad defensiva extensa, ejerce un efecto anti-inflamatorio muy importante al mismo tiempo que reduce la expresión de las citocinas tipo-TH1 ⁽⁵⁰⁾. Los resultados de este trabajo sugieren que la IL-6 puede ser la responsable de los efectos benéficos que pudiera tener la administración del VA completo en las personas con alguna enfermedad crónica de naturaleza inflamatoria.

Es posible que los macrófagos de los animales tratados con VA hayan tenido un aumento en la síntesis de la interleucina 23, descubierta recientemente, y cuyo estudio no formó parte del presente trabajo. La IL-23, un heterodímero formado por la p40 de la IL-12 y la p19, es un miembro de la subfamilia de citocinas helicoidales, entre las que se encuentran la p35 de la IL-12 y el G-CSF, que son semejantes a la IL-6. La IL-23 la producen las células dendríticas activadas, se une al receptor $\beta 1$ de la IL-12, induce la proliferación de las células de memoria murinas ($CD4^+CD45Rb^{low}$), y estimula la producción de $INF-\gamma$ y la proliferación en PHA de los blastos de células T ⁽²⁰¹⁾.

La búsqueda del mecanismo de inducción de la IL-6 se escapa de los resultados del presente trabajo. Sin embargo, se puede sugerir que, muy probablemente, no debe ser el $TNF-\alpha$ el inductor del aumento de la producción de la IL-6 en los macrófagos del peritoneo. Como la IL-1 es el otro agente inductor de la IL-6 ⁽²⁰²⁾, se podría suponer que ésta otra citocina puede participar en la inducción de la síntesis de la IL-6 por los macrófagos peritoneales, pero esta posibilidad tampoco es atractiva después que los trabajos de Rekka y Kourounakis ⁽¹⁰²⁾, en 1990, y Hadjipetrou-Kourounakis y Yiangou ⁽¹⁴⁶⁾, en 1988, quienes demostraron que el tratamiento con el VA disminuye los niveles de IL-1.

En los dos últimos años se ha ido acumulando poco a poco literatura acerca de las actividades pro-inflamatorias de la interleucina 18, tanto en las células

humanas ^(55,203) como en las murinas ⁽⁵⁶⁾. La IL-18 es una de las interleucinas que forma parte de un conjunto de proteínas con actividades biológicas pro-inflamatorias. Esta citocina puede estimular significativamente la producción de IL-6, pero también la del TNF- α , IL-1 α e IL-1 β en los macrófagos peritoneales de ratones C57BL/6J. De todos modos, su cuantificación, así como la de varios otros mediadores de la inmunidad deben ser estudios importantes que, más adelante aumentarán el conocimiento sobre los mecanismos por los cuales el VA modifica los perfiles de las citocinas que se producen en el cuerpo.

VII. CONCLUSIONES

1. Los macrófagos peritoneales de los ratones sanos de 18 meses de edad producen más IL-6 e IL-12 que los macrófagos peritoneales de los ratones sanos de 3 meses de edad.
2. Los macrófagos peritoneales de los ratones sanos, de 3 meses de edad, aumentan significativamente su producción *in vitro* de IL-6 e IL-12 después que los animales son inyectados subcutáneamente con veneno de abejas, a una dosis de 1 mg/Kg peso, cada tercer día, durante 4 semanas.
3. En cambio, los macrófagos peritoneales de los ratones sanos de 18 meses de edad solo aumentan significativamente su producción *in vitro* de IL-6 y no la de IL-12, después que los animales son inyectados subcutáneamente con veneno de abejas, a la misma dosis mencionada.
4. La administración subcutánea de veneno de abejas en ratones de 3 Y 18 meses de edad, durante 4 semanas, a una dosis de 1 mg/Kg peso, no modifica la respuesta proliferativa *in vitro* de los linfocitos esplénicos estimulados con la Con-A,
5. La administración subcutánea de veneno de abejas en los ratones de 3 y 18 meses de edad, tampoco modifica la producción de PGE2 y TNF α por los macrófagos peritoneales.
6. La producción *in vitro* de IL-6 por los macrófagos peritoneales de ratón se modifica según el procedimiento utilizado para obtener las células.

7. La producción *in vitro* de IL-6 es más elevada cuando los macrófagos de los ratones se obtienen mediante la inyección intraperitoneal de medio de cultivo suplementado con suero bovino fetal, que cuando se obtienen mediante la inyección intraperitoneal de tioglicolato o de una solución amortiguadora de Hank.

VIII. BIBLIOGRAFÍA :

- 1 Rosenberg, HF, Gallin JJ. Inflammation, In : Paul, WE. *Fundamental Immunology*. 4th Lippincott Williams & Wilkins 1996. chap. 32. (CD-ROM).
- 2 Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. *Kuby Immunology*. 4th. W.H. Freeman and Co. USA. 2000. p 371.
- 3 Ryan GB, Majno G. *Inflammation*. A scope publication. The Upjohn Co. USA. 1977. p 6.
- 4 McLeod AG. *Scope monograph on Aspects of Acute Inflammation*. The Upjohn Co. USA. 1975. p 30.
- 5 Vinegar R, Truax JF, Selph JL, Johnston PR, Venable AL, McKenzie KK. Pathway to carrageenin-induced inflammation in the hind limb of the rat. *Fed Proc*. 1987. 46 : 118.
- 6 Vigar ND, Cabrera WHK, Araujo LMM, Ribeiro OG, Ogata TRP, Siqueira M, Ibañez M, De Franco M. Pristane-induced arthritis in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory reaction. *Eur J Immunol*. 2000. 30 : 431.
- 7 Freund J. The mode of action of immunologic adjuvants. *Adv Tuberc Res*. 1956. 7 : 130.
- 8 Baggiolini M, Loetscher P. Chemoquines in inflammation and immunity. *Immunol Today*. 2000. 21 : 418.
- 9 Lloyd AR, Oppenheim JJ, Kelvin DJ, Taub DD. Chemoquines regulate T cell adherence to recombinant adhesion molecules and extracellular matrix proteins. *J Immunol*. 1996. 156 : 932.
- 10 Terán LM. CCL Chemoquines and asthma. *Immunol Today*. 2000. 21 : 235.
- 11 Hughes AI, Yeager M. Coevolution of the mammalian chemoquines and their receptors. *Immunogenetics*. 1999. 49 : 115.
- 12 Ploplis VA, Castellino FJ. Non-fibrinolytic functions of plasminogen. *Methods*. 2000. 21 : 103.
- 13 Schwartz LB. Mast cells and basophils and their mediators. In : Lachmann PJ, Peters DK, Rosen FS y Walport MJ. *Clinical Aspects of Immunology*. Blackwell Scientific Publications. Boston. 1993. Vol. I : 549.
- 14 Strausbaugh HJ, Dallman MF, Levine JD. Repeated, but not acute stress suppresses Inflammatory plasma extravasation. *Proc Natl Acad Sci*. 1999. 96 : 14629.
- 15 Rofe AM, Philcox JC, Coyle P. Trace metal, acute phase and metabolic response to endotoxin in methallothionein-null mice. *Biochem J*. 1996. 314 : 793.
- 16 Schwartz E, Samuni A, Friedman I, Hempelmann E, Golenser J. The role of superoxide dismutation in malaria parasites. *Inflammation*. 1999. 23 : 361.
- 17 Ragno S, Winrow VR, Mascagni P, Lucietto P, Di Pierro F, Morris CJ, Blake DR. A synthetic 10-KDa heat shock protein (hsp10) from *Mycobacterium tuberculosis* modulates adjuvant arthritis. *Clin Exp Immunol*. 1996. 103 : 384.

- 18 Henderson B, Poole S, Wilson M. Microbial/host interactions in health and disease : who controls the cytokine network?. *Immunopharmacology*. 1996. 35 : 1.
- 19 Isomäki P, Punnonen J. Pro- and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Ann Med*. 1997. 29 : 499.
- 20 Mola PW, Farah IO, Kariuki TM, Nyindo M, Blanton RE, King CL. Cytokine control of the Granulomatous response in *Schistosoma mansoni*-infected baboons = role of exposure and treatment. *Infect Immun*. 1999. 67 : 6565.
- 21 Mielke ME, Peters C, Hahn H. Cytokines in the induction and expression of T-cell-mediated granuloma formation and protection in the murine model of listeriosis. *Immunol Rev*. 1997. 158 : 79.
- 22 Marx J. How the glucocorticoids suppress immunity. *Science*. 1995. 270 : 232.
- 23 Moldawer LL, Sattler FR. Human immunodeficiency virus-associated wasting and mechanisms of cachexia associated with inflammation. *Semin Oncol*. 1998. 25 (Supl. 1) : 73.
- 24 Tak PP, Zvaifler J, Green DR, Firestein GS. Rheumatoid arthritis and p53 : how oxidative stress might alter the course of inflammatory diseases. *Immunol Today*. 2000. 21: 78.
- 25 Akbar AN, Lord JM, Salmon M. $\text{INF } \alpha$ and $\text{INF } \beta$: a link between immune memory and chronic inflammation. *Immunol Today*. 2000. 21 : 337.
- 26 Insel PA. Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In : Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9th The McGraw-Hill Co. 1996. Section IV. (CD-ROM).
- 27 Schimmer BP and Parker KL. Adrenocorticotrophic hormone; adrenocortical steroids and other syntetic inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormones. In : Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9th The McGraw-Hill Co. 1996. Section XIII. (CD-ROM).
- 28 O'Neill AJ and Dinarello CA. The IL1 receptor/Toll-like receptor superfamily : crucial receptors for inflammation and host defense. *Immunol Today*. 2000. 21 : 206.
- 29 Zhang G and Ghosh S. Toll-like receptor-mediated NF- κ B activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest*. 2001. 107 : 13.
- 30 Tak PP and Firestein GS. NF- κ B: a role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*. 2001. 107 : 7.
- 31 Jutel M, Pichler WJ, Skrbic D, Urwyler A, Dahinden C, Muller UR. Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5, and increase of IFN- γ secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures. *J Immunol*. 1995. 154 : 4187.
- 32 García Tamayo F. *Fundamentos de Inmunobiología. Textos Universitarios*. UNAM. México. 1997. p 349.
- 33 Infante-Duarte C, Kamradt T. Th1/Th2 balance in infection. *Springer Sem Immunopathol*. 1999. 21 : 317.
- 34 Baxter GT, Kuo RC, Jupp OJ, Vandenabeele P, Mac Ewan DJ. Tumor necrosis factor-alpha

- mediates both apoptotic cell death and cell proliferation in a human hematopoietic cell line dependent on mitotic activity and receptor subtype expression. *J Biol Chem.* 1999. 274 : 9539.
- 35 Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Ann Rev Immunol.* 1999. 17 : 331.
 - 36 Wu WH, Johnson H, Shu HB. Activation of NF- κ B by FADD, Casper, and caspase-8. *J Biol Chem.* 2000. 275 : 10838.
 - 37 Sprick MR, Weigand MA, Reiser E, Rauch CT, Juo P, Blenis J, Krammer PH, Walczak H. FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity.* 2000. 12 : 599.
 - 38 Bairey O, Zimra Y, Shaklai M, Okon E, Rabizadeh E. Bcl-2, Bcl-x, Bax, and Bak expression in short- and long-lived patients with diffuse large B-cell lymphomas. *Clin Cancer Res.* 1999. 10 : 2860.
 - 39 Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases : structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 1999. 68 : 383.
 - 40 Deveraux QI, Stennicke HR, Salvesen GS, Reed JC. Endogenous inhibitors of caspases. *J Clin Immunol.* 1999. 19 : 388.
 - 41 Dinarello CA. Interleukin-1, interleukin-1 receptors, and interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol.* 1998. 16 : 457.
 - 42 Alheim K, Bartfai T. The interleukin-1 system : receptors, ligands, and ICE in the brain and their involvement in the fever response. *Ann NY Acad Sci.* 1998. 840 : 51.
 - 43 Schmidt M, Pauels HG, Lugering N, Lugering A, Domschke W, Kucharzik T. Glucocorticoids induce apoptosis in human monocytes : potential role of IL-1 β . *J Immunol.* 1999. 163 : 3484.
 - 44 Heath VL, Murphy EE, Crain C, Tomlinson MG, O'Garra A. TGF- β 1 down-regulates TH2 development and results in decreased IL-4-induced STAT6 activation and GATA-3 expression. *Eur J Immunol.* 2000. 30 : 2639.
 - 45 Thompson CB. Apoptosis. In : Paul, WE. *Fundamental Immunology.* 4th Lippincott Williams & Wilkins. 1996. chap. 23. (CD-ROM).
 - 46 Ruscetti F, Varesio L, Ochoa A, and Ortaldo J. Pleiotropic effects of transforming growth factor- β on cells of the immune system. *Ann NY Acad Sci.* 1993. 685 : 488.
 - 47 Tominaga K, Yoshimoto T, Torigoe K, Kurimoto M, Matsui K, Hada T, Okamura H, Nabanishi K. IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1-beta for IFN-gamma production from human T cells. *Int Immunol.* 2000. 12 : 151.
 - 48 Naume B, Johnsen AC, Espevik T, Sundan A. Gene expression and secretion of cytokines and cytokine receptors from highly purified CD56⁺ natural killer cells stimulated with interleukin-2, interleukin-7 and interleukin-12. *Eur J Immunol.* 1993. 23 : 1831.
 - 49 Reyes García MG, García Tamayo F. La importancia de IL-6 como mediador de las interacciones neuroendocrino-inmunológicas. *Acta Bioquim Clin Latinoamer.* 1993, 27: 333.

- 50 Ahmed, ST and Ivashkiv LB. Inhibition of IL-6 and IL-10 Signaling and Stat Activation by Inflammatory and Stress Pathways. *J Immunol.* 2000. 165 : 5227.
- 51 Hirano T and Kishimoto T. Interleukins 4, 5 and 6. In : *Clinical Aspects of Immunology.* Lachmann PJ, Sir Peters K, Rosen FS, Walport MJ Eds. USA. 1993. Vol. I. p 303.
- 52 Ershler WB and Keller ET. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. *Annu Rev Med.* 2000. 51 : 245.
- 53 Dinarello CA. Interleukin-18. *Methods.* 1999. 19 : 121.
- 54 Dinarello CA. IL-18 : A Th1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J Allergy Clin Immunol.* 1999. 183 : 11.
- 55 McInnes IB, Gracie JA, Leung BP, Wei XQ, Liew FY. Interleukin 18 : a pleiotropic participant in chronic inflammation. *Immunol Today.* 2000. 21 : 312.
- 56 Netea MG, Kullberg BJ, Verschueren I, Van der Meer JWM. Interleukin-18 induces production of pro-inflammatory cytokines in mice : no intermediate role for the cytokines of the tumor necrosis factor family and interleukin-1 β . *Eur J Immunol.* 2000. 30 : 3057.
- 57 Serhan CN, Haeggstrom JZ, Leslie CC. Lipid mediator networks in cell signaling: update and impact of cytokines. *FASEB J.* 1996. 10 : 1147.
- 58 Henderson B, Pettipher ER, Higgs GA, Moncada S. Fatty Acid Mediators. In : *Clinical Aspects of Immunology.* Lachmann PJ, Sir Peters K, Rosen FS, Walport MJ Ed. USA.. 1993. Vol. I. p 395.
- 59 de Kloet ER. Corticosteroids, stress and aging. *Ann NY Acad Sci.* 1992. 663: 357.
- 60 Smith CD, Carney JM, Tatsumo T, Stadman ER, Floyd RA, Markesbery WR. Protein oxidation in aging brain. *Ann NY Acad Sci.* 1992. 663 : 110.
- 61 Kushner BSP. Chronic inflammation in older people : recognition, consequences, and potential intervention. *Clin Geriatr Med.* 1997. 4 : 653.
- 62 Mysliwska J, Bryl E, Foerster J, Mysliwski A. Increase of interleukin 6 and decrease of interleukin 2 production during the ageing process are influenced by the health status. *Mech Ageing Dev.* 1998. 100 : 313.
- 63 Krause D, Mastro AM, Handte G, Smiciklas-Wright H, Miles MP, Ahluwalia N. Immune function did not decline with aging in apparently healthy, well nourished women. *Mech Ageing Dev.* 1999. 112 : 43.
- 64 Franceschi C, Monti D, Sansoni P, Cossarizza A. The immunology of exceptional individuals. The lesson of centenarians. *Immunol Today.* 1995. 16 : 12.
- 65 Bruunsgaard H, Skinhoj P, Qvist J, Pedersen BK. Elderly humans show prolonged in vivo inflammatory activity during pneumococcal infections. *J Infect Dis.* 1999. 180 : 551.
- 66 Ballou SP, Kushner I. Chronic inflammation in older people : recognition, consequences, and potential intervention. *Clin Geriatr Med.* 1997. 13 : 653.
- 67 McCann SM, Licinio J, Wong ML, Yu WH, Karanth S, Rettori V. The nitric oxide hypothesis of aging. *Exp Gerontol.* 1998. 33 : 813.

- 68 Albright JW, Albright JF. Impaired natural killer cell function as a consequence of aging. *Exp Gerontol.* 1998. 33 : 13.
- 69 Frasca D, Pucci S, Goso C, Barattini P, Barile S, Pioli C, Doria G. Regulation of cytokine production in aging : use of recombinant cytokines to up regulate mitogen-stimulated spleen cells. *Mech Ageing Dev.* 1997. 93 : 157.
- 70 Masoro EJ. Glucocorticoids and aging. *Aging.* 1995. 7 : 407.
- 71 Harman D. Free-radical theory of aging : Increasing the life span. *Ann NY Acad Sci.* 1994. 717 : 1.
- 72 Beckman KB and Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev.* 1998. 78 : 547.
- 73 Ames BN and Shigenaga MK. Oxidants are a major contributor to aging. *Ann NY Acad Sci.* 1992. 663 : 85.
- 74 Slater TF. Free Radicals : formation, detection, reactivity and cytotoxicity. In : Lachmann PJ, Peters DK, Rosen FS y Walport MJ. *Clinical Aspects of Immunology*, Blackwell Scientific Publications, Boston. 1993. Vol. I. p 377.
- 75 Cantoni O. Intra and extracellular modifiers of the cytotoxic response to oxidative stress. *Ann NY Acad Sci.* 1992. 663 : 71.
- 76 Haffner SM. Clinical relevance of the oxidative stress concept. *Metabolism.* 2000. 49 (Supl 1) : 30.
- 77 Ye SM, Johnson RW. Increased interleukin-6 expression by microglia from brain of aged mice. *J Neuroimmunol.* 1999. 93 :139.
- 78 Chorinchatb BB, Kong LY, Mao L, McCallum RE. Age-associated differences in TNF-alpha and nitric oxide production in endotoxic mice. *J Immunol.* 1996. 156 : 1525.
- 79 Floyd RA. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999. 222 : 236.
- 80 Nawroth PP, Bierhaus A, Vogel GE, Hofman MA, Zumbach M, Wahl P, Ziegler R. Non-enzymatic glycation and oxidative stress in chronic illnesses and diabetes mellitus. *Med Klin.* 1999. 94 : 29.
- 81 MacDonald NJ, Perez-Polo JR, Bennett AD, Tagliatela G. NGF-resistant PC12 cell death induced by arachidonic acid is accompanied by a decrease of active PKC zeta and nuclear factor kappa B. *J Neurosci Res.* 1999. 57 : 219.
- 82 Poynter ME, and Daynes RA. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation modulates cellular redox estatus, represses nuclear factor-kappa B signaling, and reduces inflammatory cytokine production in aging. *J Biol Chem.* 1998. 273 : 32833.
- 83 Uhring RK, Picard MA, Beyreuther K, Wiessler M. Synthesis of antioxidative and anti-inflammatory drugs glucoconjugates. *Carbohydrate Res.* 2000. 325 : 72.
- 84 Sohal RS and Orr WC. Relationship between antioxidants, prooxidants and the aging process. *Ann NY Acad Sci.* 1992. 663 : 74.

- 85 Healey AM, Mariethoz E, Puzurki L, Polla B. Heat shock proteins in cellular defense mechanisms and immunity. *Ann NY Acad Sci.* 1992. 663: 319.
- 86 Castle S, Uyemura K, Wong W, Modlin R, Effros R. Evidence of enhanced type-Th2 immune response and impaired upregulation of a type-Th1 response in frail elderly nursing home residents. *Mech Ageing Dev.* 1997. 94 : 7.
- 87 Price RM. Cytokines as Indicators of Immune System Aging. In : Mobbs CV, Hof PR (Eds): *Functional Endocrinology of Aging. Interdiscipl Top Gerontol.* Basel, Karger. 1998. 29 : 204.
- 88 Dayan M, Segal R, Globerson A, Habut B, Shearer GM, Mozes E. Effect of aging in cytokine production in normal and experimental systemic lupus erythematosus-afflicted mice. *Exp Gerontol.* 2000. 35 : 225.
- 89 Kutza J, Murasko DM. Age-associated decline in IL-2 and IL-12 induction of LAK cell activity of human PBMC samples. *Mech Ageing Dev.* 1996. 90 : 209.
- 90 Van Cauter E, Leproult R, Kupfer DJ. Effects of gender and age on the levels and circadian rhythmicity of plasma cortisol. *J Clin Endocrinol Metabol.* 1996. 81 : 2468.
- 91 Roubenoff R, Harris TB, Abad LW, Wilson PW, Dallal GE, Dinarello CA. Monocyte cytokine production in an elderly population : effect of age and inflammation. *J Gerontol.* 1998. 53 : M20-6.
- 92 Aggarwal S, Gollapudi S, Gupta S. Increased TNF-alpha-induced apoptosis in lymphocytes from aged humans : changes in TNF-alpha receptor expression and activation of caspases. *J Immunol.* 1999. 162 : 2154.
- 93 Aderka D, Le J, Vilcek J. IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice. *J Immunol.* 1989. 143 : 3517.
- 94 Hinson RM, Williams JA, Shacter E. Elevated interleukin-6 is induced by prostaglandin E2 in a murine model of inflammation : possible role of cyclooxygenase-2. *Proc Natl Acad Sci.* 1996. 93 : 4885.
- 95 Reyes, GMG y García TF. Venenos para matar y curar. Aceptado para su publicación en la revista *Ciencia y Desarrollo del CONACYT.* 2001. (ver apéndice de la Tesis).
- 96 Vick JA, and Shipman WH. Effects of whole bee venom and its fractions (apamin and mellitin) on plasma cortisol levels in the dog. *Toxicon.* 1972. 10 : 377.
- 97 Couch TL, Benton AW. The effect of the venom of the honey bee, *Apis mellifera L.*, on the adrenocortical response of the adult male rat. *Toxicon.* 1972. 10 : 55.
- 98 Portlock SH, Clague MJ, Cherry RJ. Leakage of internal markers from erythrocytes and lipid vesicles induced by mellitin, gramicidin S and alamethicin : a comparative study. *Biochim Biophys Acta.* 1990. 1030 : 1
- 99 Atkinson BA. The incidence and nature of adverse reactions to injection immunotherapy in bee and wasp venom allergy. *Exp Allergy.* 1995. 25 : 159.
- 100 Ziai MR, Russek S, Wang HC, Beer B, Blume AJ. Mast cell degranulating peptide : a multifunctional neurotoxin. *J Pharm Pharmacol.* 1990. 42 : 457.

- 101 Billingham MEJ, Morley J, Janson JM, Shipolini RA, Vernon CA. An anti-inflammatory peptide from bee venom. *Nature*. 1973. 245 : 163.
- 102 Rekka E, Kourounakis L, Kourounakis P. Antioxidant activity of and interleukin production affected by honey bee venom. *Arzneimittelforschung*. 1990. 40 : 912.
- 103 Yiangou M, Konidaris C, Victoratos P, Hadjipetou-Kourounakis L. 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*. 1993. 94 : 156.
- 104 Morse R. and Hooper T. *The Illustrated Encyclopedia of Beekeeping*. Edit. E.P. Dutton. USA. 1985. p 157, 362.
- 105 Schumacher MJ, Schmidt JO, Egen NB. Lethality of "killer" bee stings. *Nature*. 1989. 337 : 413.
- 106 King, TP, Sobotka AK, Kochoumian L, Lichtenstein LM. Allergens of honey bee venom. *Arch Biochem Biophys*. 1976. 172 : 661.
- 107 Habermann E. Chemistry, pharmacology, and toxicology of bee, wasp, and hornet venoms. In *Venomous Animals and their Venoms*. (Bücherl, W and Buckley, E.E. Eds). London. Academic Press. 1971. Vol. III : 61.
- 108 Gauldie J, Hanson JM, Rumjanek FD, Shipolini RA, Vernon CA. The peptide components of bee venom. *Eur J Biochem*. 1976. 61 : 369.
- 109 Dotimas EM, Hamid KR, Hider RC, Ragnarsson U. Isolation and structure analysis of bee venom mast cell degranulating peptide. *Biochim Biophys Acta*. 1987. 911 : 285.
- 110 Banks BEC and Shipolini RA. Chemistry and pharmacology of honey bee venom. In *Venoms of the Hymenoptera*. 1986. Ed. Piek, T. London. Academic Press. p 329.
- 111 Hyre HM and Smith RA. Immunological effects of honey bee (*Apis mellifera*) venom using Balb/c mice. *Toxicon*. 1986. 24 : 435.
- 112 Mraz, C. A personal account of the effectiveness of bee venom. *Proc N Am Apiother Soc*. 1978. 1 : 5.
- 113 Schmidt JO. Toxinology of venoms from the honeybee genus *Apis*. *Toxicon*. 1995. 33 : 917.
- 114 Shipolini RA. Biochemistry of bee venom. In : *Handbook of Natural Toxins, Vol. 2, Insect Poisons, Allergens, and Others Invertebrate Venoms*. Ed. Tu A. NY : Marcel Dekker. 1984. p 49.
- 115 Bellinghausen I, Metz G, Enk AH, Chritsmann S, Knop J, Saloga J. Insect venom immunotherapy induces interleukin-10 production and a Th2-to-Th1 shift, and changes surface marker expression in venom-allergic subjects. *Eur J Immunol*. 1997. 27 : 1131.
- 116 Akdis C.A, Blesken T, Akdis M, Wüthrich B, Blaser K. Role of Interleukin 10 in cspecific Immunotherapy. *J Clin Invest*. 1998. 102 : 98.
- 117 Schumacher M.J, Egen N.B, Tanner D. Neutralization of bee venom lethality by immune serum antibodies. *Am J Trop Med Hyg USA*. 1996. 55 : 197.

- 118 Beck BF. Bee Venom Therapy : Bee Venom, its Nature and its Effects on Arthritic and Rheumatoid Conditions. (Appleton-Century, Croft, New York, 1935. 171.
- 119 Chang YH and Bliven ML. Anti-arthritic effect of bee venom. Agents Actions. 1979. 9 : 205.
- 120 Vlasak R, Unger-Ullmann C, Kreil G, Frischauf AM. Nucleotide sequence of cloned cDNA coding for honeybee pre-promellitin. Eur J Biochem. 1983. 135 : 123.
- 121 Kuchler K, Gmachi M, Sipl MJ, Kreil G. Analysis of the cDNA for phospholipase A2 from honey bee venom glands. The deduced amino acid sequence reveals homology to the corresponding vertebrate enzymes. Eur J Biochem. 1989. 184 : 249.
- 122 Gmachi M, and Kreil G. Bee venom hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm. Proc Natl Acad Sci USA. 1993. 90 : 3569.
- 123 Gmachi M and Kreil G. The Precursors of the Bee Venom Constituents Apamin and MCD Peptide Are Encoded by Two Genes in Tandem Which Share the Same 3-Exon. J Biol Chem. 1995. 270 : 12704.
- 124 Annand RR, Kontoyianni M, Penzotti JE, Dudler T, Lybrand TP, Gelb MH. Active site of bee venom phospholipase A2 : the role of histidine-34, aspartate-64 and tyrosine-87. Biochemistry. 1996. 35 : 4591.
- 125 King TP, Wade D, Coscia MR, Mitchell S, Kochoumian L, Merrifield B. Structure-immunogenicity relationship of melittin, its transposed analogues, and D-melittin. J Immunol. 1994. 153 : 1124.
- 126 Habermann E, and Fischer K. Bee venom neurotoxin (apamin). Eur J Biochem. 1979. 94 : 355.
- 127 Defendini ML, El-Ayeb M, Regnier-Vigouroux A, Granier G, Pierres M. H-2^a-linked control of T cell and antibody response to apamin. Immunogenetics. 1988. 28 : 139.
- 128 Nicolas JP, Lin Y, Lambeau G, Ghomaschchi F, Lazdunski M, Gelb MH. Localization of Structural Elements of Bee Venom Phospholipase A2 Involved in N-type Receptor Binding and Neurotoxicity. J Biol Chem. 1997. 272 : 7173.
- 129 González L, Nekrassov V, Castell A, and Sitges M. Characterization of Mellitin Effects in Synaptosomes. Neurochemical Research. 1997. 22 : 189.
- 130 Bomalaski JS, Ford T, Hudson AP, Clark MA. Phospholipase A2-activating protein induces the synthesis of IL-1 and TNF in human monocytes. J Immunol. 1995. 154 : 4027.
- 131 Neumann W, Habermann E. Beitrage zur Charakterisierung der Wirkstoffe des Bienengiftes . Naunyn-Schmiedebergs. Arch Pharmak. 1954. 222 : 367.
- 132 Leal-Berumen I, Snider DP, Barajas-Lopez C, Marshall JS. Cholera toxin increases IL-6 synthesis and decreases TNF-alpha production by rat peritoneal mast cells. J Immunol. 1996. 156 : 316.
- 133 Taylor JW, Bidard JN, Lazdunski M. The characterization of high-affinity binding sites in rat brain for the mast cell-degranulating peptide from bee venom using the purified monoiodinated peptide. J Biol Chem. 1984. 259 : 13957.
- 134 Rehm H; Bidard JN, Schweitz H, Lazdunski M. The receptor site for the bee venom mast cell degranulating peptide. Affinity labeling and evidence for a common molecular target for mast

- cell degranulating peptide and dendrotoxin I, a snake toxin active on K⁺ channels. *Biochemistry*. 1988. 27 : 1827.
- 135 Cherubini E, Ben Ari Y, Gho M, Bidard JN, Lazdunski M. Long-term potentiation of synaptic transmission in the hippocampus induced by a bee venom peptide. *Nature*. 1987. 328 : 70.
 - 136 Banks BE, Garman AJ, Habermann E. Structure-activity studies on apamin and mast cell peptide (MCDP)-401 [proceedings]. *J Physiol*. 1978. 284 : 160.
 - 137 Eiseman JL, von Bredow J, Alvares AP. Effect of honey bee (*Apis mellifera*) venom on the course of adjuvant-induced arthritis and depression of drug metabolism in the rat. *Biochem Pharmacol*. 1982. 31 : 1139.
 - 138 Banks BE, Brown C, Burgess GM, Burnstock G, Claret M, Cocks TM, Jenkinson DH. Apamin blocks certain neurotransmitter-induced increases in potassium permeability. *Nature*. 1979. 282 : 415.
 - 139 Hugues M, Romey G, Duval D, Vincent JP, Lazdunski M. Apamin, as a selective blocker of the calcium-dependent potassium channel in neuroblastoma cells: voltage-clamp and biochemical characterization of the toxin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982. 79 : 1308.
 - 140 Marquèze B, Deagar MJ, Couraud F. Photoaffinity labeling of the K⁺-channel-associated apamin-binding molecule in smooth muscle, liver and heart membranes. *Eur J Biochem*. 1987. 169 : 295.
 - 141 Kaplinski E, Ishay J, Ben-Schachar D, Gitter S. Effects of bee venom on the electrocardiogram and blood pressure. *Toxicol*. 1977. 15 : 251.
 - 142 Kemeny DM, Harries MG, Youlten LJF, Mackenzie-Mills M, Lessof MH. Antibodies to purified venom proteins and peptides. I. Development of a highly specific RAST for bee venom antigens and its application to bee sting allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 1983. 71 : 505.
 - 143 Haberman E. Bee and wasp venoms. *Science*. 1972. 177 : 314.
 - 144 Chen CY, Chen WX, Sun X. Comparison of anti-inflammatory, analgesic activities, anaphylactogenicity and acute toxicity between bee venom and its peptides. *Chung Kuo Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*. 1993. 13 : 226.
 - 145 McHugh SM, Deighton J, Stewart AG, Lachmann PJ, Ewan PW. Bee venom immunotherapy induces a shift in cytokine responses from a Th2 to a Th1 dominant pattern : comparison of rush and conventional immunotherapy. *Clin Exp Allergy*. 1995. 25 : 828.
 - 146 Hadjipetrou-Kourounakis L and Yiangou M. Bee venom adjuvant induced disease and interleukin production. *J Rheumatol*. 1988. 15 : 1126.
 - 147 Steigerwaldt F, Mathies H, and Damrau F. Standardized bee venom (SVB) therapy of arthritis. A controlled study of 50 cases with 84% benefit. *Ind Med Surg*. 1966. 35 : 1045.
 - 148 Von Bredow J, Bradford C, Froelich H, Vick JA. Treatment of equine arthritis with bee venom. *Proc N Am Apiother Soc*. 1978. 1 : 141.
 - 149 Short TR and Jackson R. Treatment of canine arthritis with bee venom. *Proc N Am Apiother Soc*. 1978. 1 : 86.
 - 150 Zurier RB, Mitnick H, Bloomgarden D, Weissmann G. Effect of bee venom on experimental arthritis. *Ann Rheum Dis* 1972. 32 : 466.

- 151 Kruisbeek AM. Isolation of murine macrophages. In : Current Protocols in Immunology, Coligan J, Kruisbeek AM, Margulies D, Shevach E, Strober W (Eds). John Wiley and Sons, New York. 1995. Vol. III. Unit 14.1.1.
- 152 Kirkpatrick CH. Lymphocyte transformation test. In : Encyclopedia of Immunology, Roitt IM, Delves PJ (Eds). Academic Press. San Diego, CA. 1992. p. 1005.
- 153 Winchester RJ, Ross G. Methods for enumerating lymphocytes populations. In : Manual of Clinical Immunology, Rose NR, and Friedman H (Eds). American Society of Microbiology, Washington, DC 1976. p. 64.
- 154 Crowther J.R. ELISA, theory and practice. In : Methods in Molecular Biology, vol. 42. Walker JM (Ed). Humana Press, Totowa, NJ. 1995. p. 63.
- 155 Kizaki T, Ookawara T, Oh-Ishi S, Itoh Y, Iwabuchi K, Onoe K, Day NK, Good RA, Ohno H. An increase in basal glucocorticoid concentration with age induces suppressor macrophages with high-density Fc gamma RII/III. *Immunology*. 1998. 93 : 409.
- 156 Frasca D, Doria G. Recombinant cytokines as an approach to immune reconstitution in aging. *Dev Comp Immunol*. 1997. 21 : 525.
- 157 Rink L, Cakman I, Kirchner H. Altered cytokine production in the elderly. *Mech Ageing Dev*. 1998. 102 : 199.
- 158 Gorczynski RM, Beesler WG, Chung S, Cinader B, Hoffmann P, Modolell M, Ramakrishna V, Reischel ET, Waelli T, Westphal O. A fetal sheep liver extract reverse age-related increments in spontaneous and induced cytokine production by indirect environmental effects. *Immunol Lett*. 1998. 60 : 157.
- 159 Ginaldi L, De Martinis M, D'Ostilio A, Marini L, Loreto MF, Quaglino D. The immune system in the elderly : III. Innate immunity. *Immunol Res*. 1999. 20 : 117.
- 160 Spencer NF, Daynes RA. IL-12 directly stimulates expression of IL-10 by CD5+ B cells and IL-6 by both CD5+ and CD5- B cells : possible involvement in age-associated cytokine dysregulation. *Int Immunol*. 1997. 9 : 745.
- 161 Castle S, Uyemura K, Wong W, Modlin R, Effros R. Evidence of enhanced type 2 immune response and impaired upregulation of a type 1 response in frail elderly nursing home residents. *Mech Ageing Dev*. 1997. 94 : 7.
- 162 Koike E, Kobayashi T, Mochitake K, Murakami M. Effect of aging on nitric oxide production by rat alveolar macrophages. *Exp Gerontol*. 1999. 34 : 889.
- 163 Brown-Borg HM, Bode AM, Bartke A. Antioxidative mechanisms and plasma growth hormone levels : potential relationship in the aging process. *Endocrine*. 1999. 11 : 41.
- 164 Wang PS, Lo MJ, Kau MM. Glucocorticoids and aging. *J Formos Med Assoc*. 1997. 96 : 792.
- 165 Haynes L, Linton PJ, Eaton SM, Tonkonogy SL, Swain SL. Interleukin-2, but not other common γ chain-binding cytokines, can reverse the defect in generation of CD4 effector T cells from naive T cells of aged mice. *J Exp Med*. 1999. 190 : 1013.
- 166 Young DG, Skibinski G, Manson JI, James K. The influence of age and gender on serum dehydroepiandrosterone sulphate (DHEA-S), IL-6, IL-6 soluble receptor (IL-6sR) and

- transforming growth factor beta 1 (TGF-beta1) levels in normal healthy blood donors. *Clin Exp Immunol.* 1999. 117 : 476.
- 167 Shimada Y, Ito H. Heterogeneous aging of macrophage-lineage cells in the capacity for TNF production and self renewal in C57BL/6 mice. *Mech Ageing Dev.* 1996. 87 : 183.
- 168 Wu D, Mura C, Beharka AA, Han SN, Paulson KE, Hwang D, Meydani SN. Age-associated increase in PGE₂ synthesis and COX activity in murine macrophages is reversed by vitamin E. *Am J Physiol.* 1998. 275 : C661.
- 169 Hinson RM, Williams JA, Shacter E. Elevated interleukin-6 is induced by prostaglandin E2 in a murine model of inflammation : possible role of cyclooxygenase-2. *Proc Natl Acad Sci.* 1996. 93 : 4885.
- 170 Williams RO, Marinova-Mutafchieva L, Feldmann M, Maini RN. Evaluation of TNF- α and IL-1 blockade in collagen-induced arthritis and comparison with combined anti-TNF- α /anti-CD4 therapy. *J Immunol.* 2000. 165 : 7240.
- 171 Vick JA, Mehlman B, Brooks R, Phillips SJ, Shipman WH. Effect of the bee venom and mellitin on plasma cortisol in the unanesthetized monkey. *Toxicon.* 1972. 10 : 581.
- 172 Lorenzetti OJ, Fortenberry B, Busby E. Influence of bee venom in the adjuvant-induced arthritic rat model. *Res Commun Chem Path Pharmac.* 1972. 4 : 339.
- 173 Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark SC, Dinarello CA. Correlations and interactions in the production of interleukin 6 (IL-6), IL-1 and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells : IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood.* 1990. 75 : 40.
- 174 Simpson AE, Tomkins PT, Cooper KL. An investigation of the temporal induction of cytokine mRNAs in LPS-challenged thioglycollate-elicited murine peritoneal macrophages using the reverse transcription polymerase chain reaction. *Inflamm Res.* 1997. 46 : 65.
- 175 Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinni MP, Maggi E, Trinchieri G, Romagnani S. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med.* 1993. 177 : 1199.
- 176 Hsieh CS, Macatonia SE, Timp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science.* 1993. 260 : 547.
- 177 Rea MI, McNerlan SE, Alexander HD. Total serum IL-12 and IL-12p40, but not IL-12p70, are increased in the serum of older subjects; relationship to CD3⁺ and NK subsets. *Cytokine.* 2000. 12 : 156.
- 178 Lio D, D'Anna C, Gervasi F, Scola L, Potestio M, Di Lorenzo G, Listi F, Colombo , Candore G, Caruso C. Interleukin-12 release by mitogen-stimulated mononuclear cells in the elderly. *Mech Ageing Dev.* 1998. 102 : 211.
- 179 Bloom ET, Thompson WC, Horvath-Arcidiacono JA, Burd PR. Differential effects of interleukin-12 treatment on gene expression by allostimulated T cells from young and aged mice. *Mech Ageing Dev.* 1995. 85 : 109.
- 180 Snijders A, Hilkens CMU, van der Pouw K, TCTM, Engel M, Aarden LA, Kapsenberg LM. Regulation of bioactive IL-12 production in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes is determined by the expression of the p35 subunit. *J Immunol.* 1996. 56 : 1207.

- 181 Lienenlücke B, Germann T, Kroczeck RA, Hecker M. CD154 stimulation of interleukin-12 synthesis in human endothelial cells. *Eur J Immunol.* 2000. 30 : 2864.
- 182 Monteleone G, Parrello T, Monteleone I, Tammaro S, Luzzza F, Pallone F. Interferon-gamma (INF γ) and prostaglandin E₂ (PGE₂) regulate differently IL-12 production in human intestinal lamina propria mononuclear cells (LPMC). *Clin Exp Immunol.* 1999. 117 : 469.
- 183 Chorinchat BB, Kong LY, Mao L, McCallum RE. Age-associated differences in TNF-alpha and nitric oxide production in endotoxic mice. *J Immunol.* 1996. 156 : 1525.
- 184 Zunic M, Bahr GM, Mudde GC, Meingassner JG, Lam C. MDP (Lysyl) GDP a non toxic muramyl dipeptide derivative, inhibits cytokine production by activated macrophages and protects mice from phorbol ester- and oxazolone-induced inflammation. *J Invest Dermatol.* 1998. 111 : 77.
- 185 Frolov I, Hourri-Hadad Y, Soskolne A, Shapira L. *In vivo* exposure to *Porphyromonas gingivalis* up-regulates nitric oxide but suppresses tumour necrosis factor- α production by cultures macrophages. *Immunology.* 1999. 93 : 323.
- 186 Stein M and Gordon S. Regulation of tumor necrosis factor (TNF) release by murine peritoneal macrophages : role of cell stimulation and specific phagocytic plasma membrane receptors. *Eur J Immunol.* 1991. 21 : 431.
- 187 Demeure CE, Yang LP, Desjardins C, Raynaud P, Delespesse G. Prostaglandin E₂ primes naive T cells for the production of anti-inflammatory cytokines. *Eur J Immunol.* 1997. 27 : 3526.
- 188 Blaine TA, Pollice PF, Rosier RN, Reynolds PR, Puzas JE, O'Keefe RJ. Modulation of the production of cytokines in titanium-stimulated human peripheral blood monocytes by pharmacological agents. The role of cAMP-mediated signaling mechanisms. *J Bone Joint Surg Am.* 1997. 79 : 1519.
- 189 Strassman G, Patil-Koota V, Finkelman F, Fong M, Kambayashi T. Evidence for involvement of interleukin 10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophages by prostaglandin E₂. *J Exp Med.* 1994. 180 : 2365.
- 190 Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit pro-inflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE₂, and PAF. *J Clin Invest.* 1998. 101 : 890.
- 191 Salari HP, Braquet P, Borgeat P. Stimulation of lipoxygenase product synthesis in human leukocytes and platelets by mellitin. *Mol Pharmacol.* 1985. 28 : 546.
- 192 Banks BEC, Rumjanek FD, Sinclair NM, and Vernos CA. Possible therapeutic use of a peptide from bee venom. *Bull Inst Pasteur.* 1976. 74 : 137.
- 193 Watanabe S, Kobayashi T, Okuyama H. Regulation of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production by endogenous prostaglandin E₂ in rat resident and thioglycollate-elicited macrophages. *J Lipid Mediat Cell Signal.* 1994. 10 : 284.
- 194 Watanabe S, Kobayashi T, Okuyama H. Absence of relation between the expression of cyclooxygenase isoforms and the synthesis of prostaglandin E₂ in resident and thioglycollate-elicited macrophages in rats. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 1998. 56 : 7.

- 195 Carrick JB, Moore JN, Chapkin RS, Schnellmann RG. Increased phospholipid mass with decreased arachidonyl molecular species is associated with decreased eicosanoid synthesis and increased tumor necrosis factor synthesis by thioglycollate-elicited rat peritoneal macrophages. *Shock*. 1995. 4 : 284.
- 196 Ghezzi P, Sacco S, Agnello D, Marullo A, Caselli G, Bertini R. LPS induces IL-6 in the brain and in serum largely through TNF production. *Cytokine*. 2000. 12 : 1205.
- 197 Zhao K, Kirman I, Tschepen I, Schwab R, Werksler ME. Peritoneal lavage reduces lipopolysaccharide-induced elevation of serum TNF-alpha and IL-6 mortality in mice. *Inflammation*. 1997. 21 : 379.
- 198 Borges MM, Kloetzel JK, Andrade HF, Tadokoro CE, Pinge-Filho P, Abrahamsohn I. Prostaglandin and nitric oxide regulate TNF-alpha production during *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol Lett*. 1998. 63 :1.
- 199 Wanner GA, Muller P, Ertel W, Busch CJ, Menger MD, Messmer K. Differential effect of cyclooxygenase metabolites on pro-inflammatory cytokine release by Kupffer cells after liver ischemia and reperfusion. *Am J Surg*. 1998. 175 : 146.
- 200 Seldon PM, Barnes PJ, Giembycz MA. Interleukin-10 does not mediate the inhibitory effect of PDE-4 inhibitors and other cAMP-elevating drugs on lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha generation from human peripheral blood monocytes. *Cell Biochem Biophys*. 1998. 29 : 179.
- 201 Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Churakova T, Liu M, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu YJ, Abrams JS, Moore KW, Rennick D, Waal-Malefyt R, Hannum C, Bazan JF and Kastelein RA. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*. 2000. 13 : 715.
- 202 Van Damme J, Opdenakker G, Simpson RJ, Rubira MR, Cayphas S, Vink A, Billiau A, Van Snick J. Identification of the human 26 kDa protein, interferon b2 (IFN β 2), as a B cell hybridoma/plasmacytoma growth factor induced by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med*. 1987. 165 : 914.
- 203 Olee T, Hashimoto S, Quach J and Lotz M. IL-18 is produced by articular chondrocytes and induces pro-inflammatory and catabolic responses. *J Immunol*. 1999. 162 : 1096.

VENENOS PARA MORIR Y PARA CURAR.

Reyes García MG (1), García Tamayo F (1).

(1) Laboratorio de Biología Molecular,
Departamento de Biología,
Facultad de Química, UNAM,
04510, México, DF.

Este trabajo presenta una parte de los resultados que han sido obtenidos gracias al apoyo proporcionado por la DGAPA de la UNAM (proyecto No. IN229799) y por el CONACYT de la SEP (proyecto No. 30915-M).

La producción de venenos naturales

Un veneno es cualquier sustancia que al ser introducida al cuerpo ocasiona una serie de trastornos graves y algunas veces la muerte. Paradójicamente, esas características letales las tienen algunas proteínas producidas de una manera natural en el interior del cuerpo de muchos seres vivos. No obstante, por lo general los venenos no le hacen daño a quienes los sintetizan. Pero de todos modos, excretarlos al exterior es una ventaja biológica que utilizan algunos animales para atacar o para defenderse de sus agresores.

Numerosas bacterias, plantas e insectos, así como varias familias de animales más evolucionados pueden producir naturalmente varios venenos más o menos potentes. Tal es caso de los alacranes y algunos sapos, caracoles y serpientes. Existen sapos de las regiones tropicales, por ejemplo, que necesitan los venenos para limpiar su piel, que está constantemente húmeda y cubierta por numerosas bacterias potencialmente peligrosas. Los sapos evitan las infecciones cutáneas porque tienen glándulas que secretan venenos sobre la piel. Generalmente se trata de antibióticos o defensinas que dañan las membranas de los microorganismos y los matan antes de que invadan sus cuerpos y se multipliquen en sus tejidos. La supervivencia de estos anfibios, como la de muchos otros animales, parece depender de su capacidad para producir sustancias que pueden causar la muerte de los otros seres vivos que los amenazan.

La producción de esta clase de sustancias tóxicas es un mecanismo defensivo muy importante. Los venenos generalmente se forman en glándulas de secreción externa y son excretados como una especie de *cocktail* formado por la mezcla de varias proteínas que tienen diferentes actividades biológicas, casi todas ellas muy peligrosas. Una parte de los venenos solo alcanza a llegar hasta la piel o las membranas de las víctimas para las que está destinado y apenas sirve para asustarlas y hacerlas huir porque les provoca una irritación local. Pero en otros casos los venenos pueden pasar al interior del cuerpo y es entonces cuando resultan más peligrosos. A lo largo de muchos millones de años, los animales productores de venenos han desarrollado diversas estrategias para poder inyectarlos a través de espinas, aguijones, etc. Por otra parte, también el tiempo ha permitido que algunas moléculas venenosas hayan variado su conformación adquiriendo aminoácidos que les permiten tener dobles enlaces que hacen más difícil su inactivación. En estos casos, una vez que los venenos inyectados pasan a la circulación y se diseminan, las consecuencias pueden ser la inhibición de algunas reacciones enzimáticas o la estimulación exagerada de otras. Como una consecuencia, provocan dolor o anestesia y pueden alterar varias funciones que son vitales, como la respiración, la vista, el equilibrio, la coagulación de la sangre o los movimientos.

El fabricante de los venenos artificiales

Los seres humanos no producen naturalmente sustancias tóxicas como los que se acaban de mencionar. Por lo general ellos solamente comparten (con los insectos y otros animales pequeños) la capacidad de sintetizar pequeñas cantidades de algunas moléculas reactivas pro-inflamatorias, como la histamina, los leucotrienos y varios factores quimiotácticos. Estas sustancias generalmente forman parte de los cocteles venenosos que producen los animales más pequeños. Pero las personas generalmente solo utilizan estas sustancias para detener la invasividad de los microorganismos o para facilitar la degradación enzimática de sustancias extrañas que han penetrado en sus cuerpos.

Tener la capacidad de producir esas sustancias dentro del propio cuerpo puede parecer una clara desventaja del hombre ante los miembros de las otras especies que, al inyectar mayores cantidades de esos mismos "venenos", pueden provocar en otros seres vivos una amplificación de esas mismas reacciones. Pero esta aparente ventaja evolutiva de los animales más pequeños sobre el género humano parece estar destinada a ser superada como una consecuencia del progreso tecnológico de los últimos años.

En el último siglo, los científicos de los países más desarrollados han logrado sintetizar una enorme cantidad de productos químicos venenosos que han sido comercializados y vendidos. La mayor parte de esos venenos no necesitan ser inyectados. Generalmente ellos pueden ser efectivos cuando se inhalan o cuando se absorben a través de la piel. Gracias a esta ventaja, los venenos producidos en los laboratorios han servido para eliminar grandes cantidades de parásitos o microorganismos que infectan y provocan enfermedades en las personas, así como en sus ganados y en sus cosechas. De veneno a veneno, los del hombre se han vuelto de repente mucho más efectivos que, por ejemplo, los que utilizan las arañas y otros animales pequeños para sobrevivir.

Las ventajas y los problemas de los venenos

El uso de los venenos artificiales ha sido una ayuda considerable para proteger la salud de muchos seres humanos. En algunos países se ha reducido considerablemente la prevalencia de algunas plagas como el paludismo. En otros casos se han eliminado los vectores o los reservorios de los agentes responsables de varias otras enfermedades tanto o más graves. Sin embargo, el uso de los venenos recién descubiertos también ha causado varios problemas igualmente graves.

El DDT, por ejemplo, ha sido muy efectivo para reducir o hacer desaparecer varias plagas, pero al ser rociado sin control sobre la tierra ha terminado por contaminar los alimentos del hombre. Su toxicidad se ha extendido más allá de los insectos y, a través de las legumbres y las frutas, ha llegado al intestino de casi todas las personas. Una gran cantidad de seres vivos tiene DDT en las células de sus cuerpos. Algunos expertos opinan que esta contaminación es peligrosa porque su acumulación permanente puede provocar cáncer y varios problemas más.

Otro caso igualmente problemático es el de las sustancias químicas relacionadas con la limpieza como los jabones y los productos que sirven para quitar la suciedad y los malos olores. Los detergentes contaminan las aguas de los ríos y los mares a donde son desechados por sus fabricantes o consumidores, provocando muerte o mutaciones en la fauna y la flora de esos medios.

Al producir grandes cantidades de sustancias artificiales para atacar las plagas que causan algunos seres vivos inferiores y al desarrollar antídotos para neutralizar los venenos naturales de estos últimos, nuestra sociedad parece haber iniciado planes para declarar una guerra sin sentido contra las otras formas de vida con quienes comparte numerosos sistemas ecológicos. Los resultados no se han hecho esperar. Los venenos sintéticos han modificado el medio ambiente natural de numerosas especies animales, provocando su muerte o su desplazamiento. Los daños no han sido tan graves como se pudiera pensar porque una parte de los miembros de esas especies han desarrollado mecanismos de evasión y de resistencia o tolerancia. No obstante, muchos de los participantes en un coloquio reciente sobre el futuro de la evolución de la vida sobre la tierra (organizado por la Academia Nacional de Ciencias, USA) manifestaron que actualmente existen muchas evidencias en favor de que se está aproximando el comienzo de una nueva (sería la sexta) extinción en masa de seres vivos sobre el planeta. Esta catástrofe no sería "natural" sino provocada por el mismo hombre.

Estamos comenzando a preocuparnos

En los últimos años muchos científicos han presentado pruebas de que al aplicar sin control los venenos producidos por el hombre se ha alterado el equilibrio de la vida sobre el planeta. Una gran cantidad de sustancias sintetizadas en los últimos años por las industrias han funcionado muy bien como pesticidas, pero también han resultado perjudiciales para el mismo ser humano que las aplica y para numerosos espectadores inocentes. Esta situación contrasta con los efectos que tienen los venenos naturales (de las plantas y de los animales más pequeños) que por tener millones de años de existencia ya no interfieren con los ecosistemas conocidos.

Por esta razón, al observar las consecuencias desagradables y peligrosas que tiene el uso de sus venenos sintéticos, el hombre ha iniciado una búsqueda, cada vez más afanosa, por encontrar, caracterizar y aprender a aprovechar la estructura química de diferentes sustancias naturales que las plantas y los animales inferiores utilizan para envenenar a sus presas. Esa búsqueda no ha sido infructuosa.

Actualmente numerosas enfermedades infecciosas se combaten administrando antibióticos que originalmente eran producidos por solo por los hongos, como venenos naturales para mantener alejadas algunas bacterias. Varios carbohidratos de las plantas y de los microorganismos han resultado ser excelentes venenos para matar las células cancerosas, como una alternativa más amigable que la simple quimioterapia. Uno de los avances más extraordinarios, que parece el resultado de un arduo trabajo de "espionaje" biológico sobre las arañas australianas, ha conducido al aislamiento de una sustancia venenosa que una familia de arañas contiene en sus colmillos y que solamente resulta tóxica para los insectos que ella persigue como alimento. En los insectos, el veneno daña rápidamente las células del sistema nervioso. Pero si la araña llega a morder a una persona, las consecuencias no van más allá de una ligera molestia y no sucede nada en las neuronas. La síntesis comercial de esta clase de productos que tienen un efecto selectivo sobre algunas especies ayudaría a controlar varias plagas de insectos sin causar riesgos graves para la población humana que llegase a estar en contacto con ellos.

El lado amigable de las armas biológicas modernas

Para evitar los peligros de la contaminación, los científicos han ideado algunas estrategias que limitan la diseminación de las sustancias tóxicas. Uno de los avances más elaborado en esta nueva serie de estrategias "moleculares" es el aislamiento de genes transportadores de claves venenosas y, luego de su clonación, su implante por ingeniería genética en las semillas utilizadas para las cosechas. De este modo el veneno solo queda "sembrado" en la planta que se quiere proteger. Algunos insectos (como el gusano que da origen a la mariposa monarca) que se alimentan de esas hojas "mejoradas" genéticamente caen fulminados cuando ingieren esos venenos "genéticos" injertados en las plantas. Como una consecuencia, los agricultores han aumentado sus cosechas y sus ganancias, las personas ya no se envenenan con los pesticidas químicos que sistemáticamente traen los alimentos y las mariposas monarca tienden a desaparecer y ya no encantan tanto la vista de sus admiradores.

Pero con el paso del tiempo se ha extendido la preparación de esos vegetales transgénicos que contienen los genes de sustancias tóxicas. Ahora abundan los vegetales que poseen esos genes de venenos. Esto ha creado algunos problemas en la conciencia de varios sectores de la

población. Afirman los críticos que actualmente una gran cantidad de personas se está alimentando con cereales y frutas que contienen genes potencialmente "venenosos" y que, teóricamente, éstos podrían llegar a ser adquiridos por las bacterias comensales del tubo digestivo. Esta posibilidad parece desagradable. Al adquirir los genes que vienen en los alimentos "mejorados" artificialmente, las bacterias del intestino podrían "aprender" a sintetizar grandes cantidades de venenos que secretarían en el tubo digestivo de los consumidores de alimentos transgénicos. Actualmente, por ejemplo, existen bacterias que producen histamina y que provocan intoxicaciones que simulan una alergia. Los venenos (fabricados por los humanos) se podrían comenzar a producir en grandes cantidades en los intestinos y después serían absorbidos a través de la mucosa. Su paso a la sangre podría causar efectos difíciles de prever actualmente. .

Pero la misma moneda tiene otra cara más amigable. A pesar de que muchos venenos naturales contienen péptidos que pueden provocar la muerte, sin embargo ellos también pueden ofrecer algunas soluciones cuando se utilizan como medicamentos que ayudan a devolver la salud a los enfermos graves.

Algunos venenos de las serpientes, por ejemplo, son peligrosos porque disminuyen la presión arterial hasta causar un estado de shock, otros disminuyen la coagulación de la sangre provocando hemorragias, mientras varios más actúan como neurotransmisores que pueden provocar parálisis o convulsiones. Sin embargo, esas mismas sustancias que son tóxicas para las víctimas de una mordedura de las víboras, han sido utilizadas por sus efectos favorables en el tratamiento de varias enfermedades. Así por ejemplo, los hipotensores contenidos en el veneno de la víbora sudamericana *Bothrops jararaca*, que impiden la conversión de la angiotensina I en angiotensina II, han servido para preparar medicamentos que reducen la presión arterial de los hipertensos. De los anticoagulantes del veneno que utiliza la serpiente *Sistrurus miliarius barbouri* para matar a los ratones antes de comerlos, se han obtenido sustancias que ayudan a prevenir la coagulación de la sangre en las personas que tienen el riesgo de formar trombos dentro de los vasos sanguíneos. De las toxinas muscarínicas de la *Dendroaspis angusticeps* se ha aislado un agonista del receptor de la acetilcolina que, inyectado en el hipocampo dorsal de los animales de laboratorio, puede mejorar la consolidación de la memoria, particularmente en los pacientes con Alzheimer.

Otro caso es el aprovechamiento de la peligrosa toxina del *Clostridium botulinum* que, después de un envenenamiento alimenticio, se absorbe a través del intestino y produce casos graves de parálisis por la flacidez de los músculos (a los cuales no llegan los impulsos nerviosos, por un bloqueo en la liberación de la acetilcolina). Esta misma toxina ha sido utilizada con éxito para el tratamiento de numerosos casos en los cuales las personas tienen contracciones musculares involuntarias por una liberación excesiva o inapropiada de acetilcolina en las

terminaciones de los nervios motores. En estos casos generalmente se tiene una actividad muscular involuntaria que puede causar desórdenes como tics, espasmos, disfonía y varios problemas más, en los cuales esta toxina ha probado ser efectiva ya que provoca un relajamiento muscular.

Se pueden mencionar además los resultados favorables obtenidos con el uso de venenos que tienen la propiedad de bloquear los canales iónicos, que son como poros situados en las membranas de las células y que se utilizan para mover hacia dentro o afuera del citoplasma los iones de calcio, sodio, potasio, etc. Estas sustancias bloqueadoras se han convertidos últimamente en agentes terapéuticos muy importantes para el tratamiento de casos de la epilepsia, las trombosis o hemorragias cerebrales y las arritmias cardíacas, además de que algunos de ellos han resultado excelentes inmunomoduladores que, a ciertas dosis, pueden suprimir la competencia de las células del sistema inmune. La *charybdotoxina* y la *margatoxina* de los alacranes son dos de las sustancias más conocidas que actúan como bloqueadoras de canales iónicos y comprometen la respuesta del sistema inmune.

De todos modos, parece difícil que algún día se pueda llegar a utilizar el DDT y otros pesticidas fabricados en los laboratorios para el tratamiento de alguna enfermedad humana.

El veneno de las abejas

En los últimos años ha ocurrido un incremento muy importante en los estudios sobre los venenos de los animales inferiores. En realidad, ha ocurrido un cambio notable. Los investigadores han decidido no limitarse únicamente a eliminar los animales venenosos, sino más bien estudiar si las sustancias tóxicas que ellos producen pudiesen tener algunos efectos favorables y ser aprovechadas. Algunos de los estudios más interesantes en este sentido se han realizado con el veneno de las abejas.

Desde hace mucho tiempo (quizás desde la época de los faraones, antes del reinado de Cleopatra) los productos de las abejas se administran para el cuidado de la salud o el tratamiento de algunas enfermedades. Hoy en día, todavía el veneno de las abejas continúa siendo utilizado empíricamente como tratamiento alternativo para la esclerosis múltiple y la artritis reumatoide, así como para retrasar el envejecimiento. Lamentablemente, la efectividad de esta sustancia ha sido exagerada por la propaganda y los intereses comerciales, de modo que su espectro de acción ha sido magnificado sin tener las pruebas necesarias. Además, todavía no se tiene un conocimiento completo sobre los mecanismos por los cuales los componentes del veneno de las abejas podrían ser efectivos cuando se inyectan dentro del cuerpo de una persona enferma. Conviene recordar

que, en algunas personas, un piquete de abeja puede ser mortal. Cada año aproximadamente 50,000 personas mueren en todo el mundo como resultado de su contacto con venenos de origen animal. Los piquetes de las abejas y las avispas son las responsables de un porcentaje elevado de ese gran total de muertes.

Las abejas como un recurso terapéutico

En la literatura existe una gran cantidad de trabajos que han sido realizados con la finalidad de aislar y caracterizar los componentes del veneno de las abejas. La mayor parte de los estudios tratan sobre la alergia al veneno, porque éste es un problema muy frecuente y una picadura de abeja puede provocar reacciones anafilácticas graves en las personas sensibilizadas. En otros casos, como en el de un grupo de investigadores australianos, el componente más tóxico del veneno de las abejas (la melitina, que actúa sobre la membrana de las células formando agujeros que les causan la muerte) ha sido conjugado a moléculas de anticuerpos que están dirigidos selectivamente contra células cancerosas. De este modo, la molécula resultante (una quimera) queda convertida en una inmuno-toxina que se puede utilizar en el tratamiento del cáncer. Así por el estilo, varios otros grupos de investigadores han estudiado los posibles efectos favorables del veneno de las abejas, pero muy pocos de esos trabajos tienen relación con las células de sistema inmune y del sistema nervioso. Sin embargo, esta otra clase de estudios también hace falta y es muy importante porque el sistema inmune está relacionado con la aparición de varias enfermedades (algunas de ellas neurológicas) que, se dice, pueden mejorar después de las picaduras del insecto.

El análisis de los componentes del veneno de las abejas ha mostrado que este producto biológico contiene un conjunto heterogéneo de sustancias, algunas tóxicas como la melitina ya mencionada y otras con actividad de enzimas, como la fosfolipasa-A, que pueden actuar sobre la membrana de las células, modificando la liberación de hormonas en el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal, la desgranulación de las células cebadas, la liberación de citocinas por los linfocitos y los macrófagos, la evolución de las reacciones inflamatorias, la actividad del sistema nervioso central, etc.

Nosotros hemos inyectado experimentalmente pequeñas cantidades del veneno de abejas (dosis que no comprometen la salud) por vía subcutánea a varios grupos de ratones de laboratorio y hemos podido demostrar que, después de un breve "tratamiento" de 4 semanas, los animales modifican significativamente la actividad de sus macrófagos, que son unas células muy importantes en la aparición de numerosas reacciones inflamatorias de evolución aguda o crónica. Los resultados de otros grupos de trabajo han mostrado que el veneno de abejas también modifica la

clase de citocinas que producen los linfocitos T, cambiando las respuestas conocidas como tipo Th2 por otras diferentes de tipo Th1. Estos resultados también han sido vistos con interés, porque existen varias enfermedades o situaciones fisiológicas que se caracterizan por un predominio de las respuestas inmunológicas de tipo Th2 ante una respuesta deficiente tipo Th1.

Todo esto, por supuesto, solo sugiere que algunos componentes del veneno de las abejas (como los de los otros venenos que hemos mencionado anteriormente), pueden resultar efectivos para el tratamiento de algunas enfermedades humanas, particularmente de las que comprometen la inmunidad o de las que están causadas por un desvío de su respuesta inflamatoria. Algunos de los resultados obtenidos hasta ahora sugieren que, en algunos casos muy particulares, cuando el veneno de las abejas se aplica a la dosis correcta puede influir favorablemente sobre algunas funciones corporales que están alteradas. Al menos en los ratones.

De este modo las abejas se pueden sumar a la lista de los animales productores de venenos que se pueden aprovechar para el tratamiento de algunas enfermedades humanas.

Bibliografía

Adem A, Karlson E. Muscarinic receptor subtype selective toxins. *Life Sci.*, 1997, 60 : 1069.

Czarnetzki BM, Thiele T, Rosenbach T. Evidence for leukotrienes in animal venoms. *J Allergy Clin Immunol*, 1990, 85 : 505.

Gaede KI, Baumeister E, Heesemann J. Decomplementation by cobra venom factor suppresses Yersinia-induced arthritis in rats. *Infect Immun*, 1995, 63 : 3697.

Jolkkonen M, Adem A, Hellman U, Wernstedt C, Karl E. A snake toxin against muscarinic acetylcholine receptors : aminoacid sequence, subtype specificity and effect on guinea-pig ileum. *Toxicon*, 1995, 33 : 399.

Ludlow CL. Treatment of speech and voice disorders with botulinum toxin. *JAMA*, 1990, 264 ; 2671.

Miljanich GP, Ramachandran J. Antagonist of neuronal calcium channels : structure, function, and therapeutic implications. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1995, 35 : 707

Olivera BM, McIntosh JM, Clark C, Middlemas D, Gray WR, Cruz LJ. A sleep-inducing peptide from *Conus geographus* venom. *Toxicon*, 1985, 23 : 277. .

Rozek T, Waugh RJ, Steinborner ST, Bowie JH, Tyler MJ, Wallace JC. The maculatin peptides from the skin glands of the tree frog *Litoria genimaculata*: a comparison of the structures and antibacterial activities of maculatin 1.1 and caerin 1.1. *J Pept Sci*, 1998, 4 : 111.

Scott AB. Botulinum toxin injection into extraocular muscles as an alternative to strabismus surgery. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*, 1980, 17 : 21.

Direcciones en Internet

<http://www.psa-rising.com/medicalpike/beetoxin.htm>

Se propone utilizar un componente modificado del veneno de abeja (la melitina) para unirlo a un anticuerpo anti-célula cancerosa y así preparar una inmunotoxina.

http://whyfiles.news.wisc.edu/shorties/brain_cancer.html

Se describe el uso de un componente del veneno de los escorpiones (la clorotoxina) para el tratamiento de los tumores cerebrales llamados gliomas. Esta toxina tiene la propiedad de unirse a los canales que permiten el paso de iones a través de la membrana de las células tumorales, más no se une a las mismas estructuras de las células normales.

<http://ci.mond.org/9522/952214.html>

Se presenta un resumen de las principales actividades biológicas que tienen las toxinas obtenidas de algunos animales.

<http://www.worldwatch.org/other/pest.pdf>

Un análisis de los riesgos que tiene el aumento de la resistencia a los pesticidas.

<http://www.biomednet.com/hmsbeagle/77/notes/meeting>

Comentarios al coloquio sobre el futuro de la evolución del hombre y a la posible reducción de la diversidad biológica sobre la tierra a causa de la contaminación del medio ambiente.

Abreviaturas

| | |
|--------------------------|--|
| aa | aminoácido |
| Abs | Anticuerpos = inmunoglobulinas (existen 5 tipos diferentes) |
| ABTS | Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbencetiazolin-6 sulfónico) sustrato para la peroxidasa |
| ACTH | Hormona adrenocorticotrópica |
| AGE | Productos finales de glucosilación avanzados (advanced glycation end products) |
| AMPc | Adenosín monofosfato cíclico |
| AP-1 | Complejo transcripcional formado por las proteínas Fos y Jun |
| Apo3/DR3/ WSL-1/TRAMP | Receptor para Apo3L, perteneciente a la familia del TNF e inductor de apoptosis |
| ATP | Adenosín trifosfato |
| Bak | Proteína de la familia Bcl2, inductora de apoptosis |
| Bax | Proteína de la familia Bcl2, inductora de apoptosis |
| Bcl-2 | Proteína de la familia Bcl2, inhibidora de la apoptosis |
| Bcl-X1 | Proteína de la familia Bcl2, inhibidora de la apoptosis |
| Bcl-X5 | Proteína de la familia Bcl2, inductora de apoptosis |
| C | Sistema del complemento |
| C3a | fragmento a del tercer componente del sistema del complemento |
| C4a | fragmento a del cuarto componente del sistema del complemento |
| C5a | fragmento a del quinto componente del sistema del complemento |
| Ca 2+ | Ión calcio |
| Ca++ | Ión calcio |
| CAR1 | Receptor perteneciente a la familia del TNF (se desconoce su ligando) |
| Caspasas | Cisteína proteasas que rompen el enlace peptídico después del ácido aspártico y son responsables de iniciar la apoptosis |
| CD30 | Receptor para CD30L, perteneciente a la familia del TNF |
| CD30L | Ligando de CD30 (proteína perteneciente a la familia del TNF) |
| CD40 | Receptor para CD40L, perteneciente a la familia del TNF |
| CD40L | Ligando de CD40 (proteína perteneciente a la familia del TNF) |
| CGF | Factor de crecimiento de queratinocitos |
| CNTF | Factor neurotrófico ciliar, citocina perteneciente a la subfamilia de citocinas helicoidales, relacionadas con la IL-6. |
| Con-A | Concanavalina A |
| COX-1 | Ciclooxigenasa constitutiva |
| COX-2 | Ciclooxigenasa inducible |
| cpm | Cuentas por minuto |
| CRF | Factor liberador de corticotropina |
| CRP | Proteína C reactiva |
| CSF | Factor estimulante de colonias |
| CT-1 | Cardiotropina 1, citocina perteneciente a la subfamilia de citocinas helicoidales, relacionadas con la IL-6. |
| CTL | Linfocitos T citotóxicos |
| Cu | Cobre |
| DD | Dominio de muerte |
| DHEA | Dihidroepiandrosterona |
| DMF/H ₂ O | Dimetilformamida al 50% en agua destilada |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DR4 | Receptor para TRAIL/Apo-2L, perteneciente a la familia del TNF e inductor de apoptosis |
| EGF | Factor de crecimiento epidérmico |
| ENA-78 | Proteína 78 activadora de neutrófilos derivada del epitelio |
| E-selectina | Selectina del endotelio |

| | |
|-------------------------------|---|
| FADD | Proteína con dominio de muerte que se asocia al receptor Fas |
| Fas/Apo-1 | Fas (receptor perteneciente a la familia del TNF, inductor de apoptosis, elimina células T autorreactivas.) |
| FasL | Ligando del receptor Fas |
| Fe | Hierro |
| Fe-S | Complejo protéico conteniendo hierro y azufre |
| FGF | Factor de crecimiento de fibroblastos |
| Fos | Factor de transcripción de la familia Fos/Jun |
| G-6-P | Glucosa-6-fosfato |
| GC | Glucocorticoides |
| GCP- | Proteína quimotáctica para granulocitos |
| G-CSF | Factor estimulante de colonias de granulocitos |
| GM-CSF | Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos |
| GMPc | Guanosín monofosfato cíclico |
| GPX | Glutación peroxidasa |
| GRO | Proteína del oncogene relacionado con el crecimiento |
| GSH | Glutación |
| GTP | Guanosín trifosfato |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrógeno |
| HEPES | Ácido N-2-hidroxietil piperina N-2-etanosulfónico |
| HEV | Células endoteliales altas de las vénulas postcapilares |
| HHA | Eje hipotalámico-hipofisario-adrenal |
| HSP | Proteínas de shock térmico |
| HBSS | Solución salina balanceada de Hanks |
| ICAM | Moléculas de adhesión intercelular |
| ICE | Enzima convertidora de la IL-1 (caspasa-1) |
| Igs | Inmunoglobulinas (existen 5 tipos M,G,A,E y D) |
| I-κB | Inhibidor del factor nuclear de transcripción kappa B |
| IKKβ | Cinasa que fosforila al inhibidor del NFκB (IκB) |
| IL- | Interleucina (se han identificado 18 hasta el momento) |
| IL-1 ra | Antagonista del receptor de la IL-1 |
| IL-1R | Receptor para la IL-1 |
| INF-γ | Interferón gamma |
| iNOS | Óxido nítrico sintasa, inducible |
| IP-10 | Proteína 10 inducible por el interferón |
| IRAK | Cinasa asociada al receptor de IL-1 |
| I-TAC | Quimioatrayente α de las células T, inducible por el interferón |
| IκB | Inhibidor del factor de transcripción NFκB |
| Jak | Tirosina cinasas de la familia Janus |
| Jun | Factor de transcripción de la familia Fos/Jun |
| K+ | Ión potasio |
| kDa | Kilo Daltones |
| LDH | Deshidrogenasa láctica |
| LES | Lupus eritematoso sistémico |
| LFA-1 | Integrina de leucocitos que median su adhesión a las células endoteliales |
| LPS | Lipopolisacáridos |
| LT α | Linfotoxina alpha |
| LTβR | Receptor para el complejo de la linfotoxina α/β perteneciente a la familia del TNF, inductor de apoptosis |
| LTβαβ | Complejo αβ de la linfotoxina |
| M | Molar |
| MCP | Proteína quimotáctica de monocitos |

| | |
|------------------|--|
| MHC | Complejo principal de histocompatibilidad |
| MIF | Factor inhibidor de la migración de los macrófagos |
| Mig | Monocina inducida por el interferón gamma |
| MIP | Proteína inflamatoria de los macrófagos |
| Mn | Manganeso |
| mTNF | TNF unido a la membrana |
| MyD88 | Proteína 88 de diferenciación mieloide |
| NAP-2 | Proteína 2 activadora de neutrófilos |
| NF-κB | Factor nuclear de transcripción kappa B |
| NGF-R | Receptor para el factor de crecimiento nervioso, perteneciente a la familia del TNF e inductor de apoptosis |
| -NH2 | Grupo amino terminal |
| NK | Células asesinas naturales |
| NNT-1 | Neurotropina 1, citocina perteneciente a la subfamilia de citocinas helicoidales, relacionadas con la IL-6. |
| NO | Óxido nítrico |
| NOS | Sintasa del óxido nítrico |
| NSAID | Anti-inflamatorios no esteroides |
| O ₂ - | Ión superóxido |
| OA | Osteoartritis |
| OH - | Ión hidroxilo |
| OSM | Oncostatina M (citocina producida por macrófagos y células T, induce síntesis de proteínas de fase aguda e inhibe células tumorales. |
| ONOO- p38 | Ión peroxinitrito superfamilia de proteínas cinasas activadas por estrés, inhibe la síntesis de IL-6 en macrófagos |
| P65 | Factor de transcripción RelA |
| P 450 | Citocromo P 450 (enzima detoxificante del hígado) |
| PAF | Factor de activación plaquetario |
| PDGF | Factor de crecimiento derivado de plaquetas |
| PGs | Prostaglandinas |
| PGE ₂ | Prostaglandina E2 |
| PHA | Fitohemaglutinina |
| PKC | Proteína cinasa C |
| PLA2 | Fosfolipasa A2 |
| PLAP | Proteína activadora de la PLA2 |
| PLCβ2 | Fosfolipasa Cβ2 |
| PMN | Leucocitos polimorfonucleares |
| PNP | Para-nitrofenilfosfato, sustrato para la fosfatasa alcalina |
| proteína G | Proteína de unión a GTP |
| RA | Artritis reumatoide |
| RAGE | Receptor para los RAGE |
| RANK | Receptor del factor de transcripción NF-κB |
| RANTES | Quimocina expresada y secretada por células T normales, regulada bajo activación (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted) |
| RNS | Especies reactivas del nitrógeno |
| ROOH | Ácido carboxílico |
| ROS | Especies reactivas del oxígeno |
| SAA | Proteína amiloide A del suero |
| SBF | Suero bovino fetal |
| Se | Selenio |
| sFas/Apo1L | Ligando soluble de Fas/Apo-1 (proteína perteneciente a la familia del TNF) |

| | |
|---------------|---|
| -SH | Grupo sulfhidrilo |
| SOCS | Proteínas supresoras de la señalización de citocina |
| SNC | Sistema Nervioso Central |
| SOD | Superóxido dismutasa |
| SODD | Silenciador del dominio de muerte |
| S-S | Enlace disulfuro |
| STAT | Proteínas transductoras de señal y activadoras de la transcripción que son sustratos de las cinasas Jak |
| sTNF | Factor necrosante de tumores, soluble |
| TACE | Metaloproteínasa convertidora del TNF |
| TGF- | Factor transformador del crecimiento (α y β) |
| TH | Células T cooperadoras |
| TH0 | Células T inmaduras |
| TH1 | Células T cooperadoras productoras de citocinas del tipo 1 (IL-2 y INF- γ) |
| TH2 | Células T cooperadoras productoras de citocinas del tipo 2 (IL-4, IL-10, IL-13) |
| TNF | Factor Necrosante de Tumores |
| TNF-R | Receptor para el Factor de Necrosis Tumoral |
| TNF-RI (p55) | Receptor tipo I para el TNF, inductor de apoptosis |
| TNF-RII (p75) | Receptor tipo II para el TNF |
| Toll/IL-1 | Familia de receptores acoplados a las vías de transducción de señales, vía NF κ B, relacionados con la respuesta inmune innata en los mamíferos y la <i>Drosophila</i> |
| TRADD | Proteína con dominio de muerte que se asocia al TNF-R1 |
| TRAF | Factor asociado al receptor del TNF |
| TRAF6 | Factor 6 asociado al receptor de TNF |
| TRAIL/Apo2L | Ligando del receptor DR4 (proteína perteneciente a la familia del TNF) |
| TRAMP | Receptor perteneciente a la familia del TNF e inductor de apoptosis (se desconoce su ligando) |
| TRANCE | Proteína relacionada con el TNF que regula la diferenciación y la activación de los osteoclastos, receptor para el NF κ B |
| TSP | Fosfato trisódico |
| VA | Veneno de abejas |
| VIP | Péptido intestinal vasoactivo |
| Zn | Zinc |

SOLUCIONES Y REACTIVOS

| | |
|---|---------------|
| Medio de cultivo suplementado | 100 mL |
| Medio de cultivo RPMI 1640 con rojo de fenol y glutamina(Gibco) | 87.5 mL |
| Suero bovino, fetal (Gibco) (inactivado a 56°C, durante 30 minutos) | 10.0 mL |
| Amortiguador HEPES (Gibco) | 0.5 mL |
| Aminoácidos no esenciales (Gibco) | 1.0 mL |
| Antibióticos (Gibco) (penicilina G sódica 10,000 U/mL sulfato de 10,000 µg/mL y anfotericina B 25 µg/mL) | 1.0 mL |

Solución de veneno de abejas

| | |
|--|-------|
| Veneno de abejas liofilizado (Sigma-Aldrich) | 2 mg |
| Solución salina isotónica, estéril (NaCl 0.85%) | 10 mL |

Esta solución se filtró a través de una membrana de nylon, estéril, con poro de 0.22 µ y se guardó en alícuotas de 1.5 mL a -20 °C en viales estériles hasta su uso.

Medio de tioglicolato al 3%

| | |
|-----------------------|--------|
| Tioglicolato de sodio | 3g |
| Agua destilada | 100 mL |

Calentar en baño María hasta su disolución completa y después esterilizar por vapor en autoclave a 121°C, por 15 minutos.
Guardar a temperatura ambiente.

Solución hemolizante

Solución A :

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

Solución B

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

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

Ajustar pH a 7.2 – 7.4.

Esterilizar por filtración.

Guardar a 2-8 °C hasta su uso.

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 10X

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

Ajustar pH a 7.2 – 7.4

Esterilizar por filtración con membrana de 0.22 µm.

Guardar en refrigeración 2-8 °C.

Solución de PBS/BSA al 3%

| | |
|----------------------------|--------|
| Albúmina sérica bovina | 3g |
| PBS estéril pH = 7.2 - 7.4 | 100 mL |

Preparar el día de su uso.

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

| | |
|--|--------|
| Albúmina sérica bovina | 1g |
| Tween-20 (0.5%) | 0.5 mL |
| Solución de PBS estéril pH = 7.2 - 7.4 | 100 mL |

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

Solución salina isotónica

| | |
|----------------------------|--------|
| NaCl (Baker) | 0.85 g |
| H ₂ O destilada | 100 mL |

Esterilizar por filtración en membrana de 0.22 µm.
Guardar a temperatura ambiente

Solución de lipopolisacáridos (LPS) bacterianos

| | |
|--|------|
| LPS (<i>Escherichia coli</i> serotipo O26:B6) (Sigma) | 5 µg |
| Medio RPMI 1640 suplementado, estéril | 1 mL |

Solubilizar y filtrar con membrana de 0.22 µm.
Guardar en congelador a - 20 °C.

Solución del mitógeno Con-A

| | |
|---|------|
| Concanavalina A (<i>Canavalia ensiformis</i>) | 5 mg |
| Medio RPMI 1640 suplementado, estéril | 5 mL |

Esterilizar con membrana de 0.22 μm .
Vaciar a viales Eppendorff estériles, en alícuotas de 0.5 mL.
Guardar en congelación a -20°C .

Citocinas recombinantes y anticuerpos monoclonales para el ELISA

La citocina IL-6 fue medida usando, como anticuerpo de captura, 2 $\mu\text{g/mL}$ del mAb de rata IgG1 (MP5-20F3, PharMingen, San Diego, CA) y, como anticuerpo de detección, 1 $\mu\text{g/mL}$ del mAb IgG2a, de rata, biotinilado (MP5-32C11, PharMingen, San Diego, CA), ambos dirigidos contra la IL-6 de ratón. La IL-6 recombinante, de ratón, 19252V (PharMingen, San Diego, CA) fue usada para obtener la curva estándar, en diluciones seriadas 2X, desde 2000 hasta 15 pg/mL.

La interleucina 12 fue determinada usando 12 $\mu\text{g/mL}$ de un coctel de anticuerpos de hámster IgG e IgG2a de rata (Red-T G297-289, PharMingen, San Diego, CA), como anticuerpos de captura, y 1 $\mu\text{g/mL}$ del mAb, biotinilado (C17.8, PharMingen, San Diego, CA) como anticuerpo de detección. Ambos dirigidos contra la IL-12p40/p70 de ratón. La IL-12 recombinante, de ratón, 19361V (PharMingen, San Diego, CA), se usó para obtener la curva estándar, haciendo diluciones seriadas 2X, desde 4000 hasta 30 pg/mL.

La citocina TNF- α se midió usando 4 $\mu\text{g/mL}$ del mAb de rata IgG1 (MP6-XT22, PharMingen, San Diego, CA), para cubrir la placa, y 1 $\mu\text{g/mL}$ de mAb, biotinilado, de rata IgG1 (MP6-XT3, PharMingen, San Diego, CA) para la detección. El TNF- α recombinante, de ratón, 19321T (PharMingen, San Diego, CA) fue utilizado para obtener la curva estándar, mediante diluciones seriadas 2X, a partir de 2000 pg/mL y hasta 15 pg/mL.