

00524
80

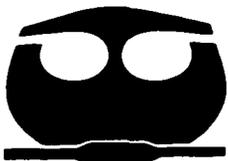


**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

***EFECTO DEL VENENO DE ABEJAS Y LA
INDOMETACINA SOBRE LA PRODUCCION DE
IL-6 E IL-1 EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA.***

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
JUAN CARLOS HUERTA CRUZ



MEXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Prof. FERNANDO GARCÍA TAMAYO
Vocal: Prof. ATONATIU EDMUNDO GOMEZ MARTINEZ
Secretario: Prof. MONICA BERENICE HERAS CHAVARRIA
1er. Suplente: Prof. MARCOS FLORES ALAMO
2do. Suplente: Prof. MARIA EVA GONZALEZ TRUJANO

El trabajo de investigación experimental de esta Tesis se desarrolló en el Laboratorio de Biología Molecular, Sección de Inmunología, del Departamento de Biología, de la Facultad de Química, UNAM, como parte de un proyecto (No. 400313-5-30915-M) que recibió apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Asesor del Tema:



Dr. Fernando García Tamayo

Supervisor Técnico:



M en C María Guadalupe Reyes García

Sustentante:



Juan Carlos Huerta Cruz

***Primeramente, doy Gracias á mi Dios, y á mi Señor Jesucristo,
por todo lo que me han dado en la vida.***

***“Porque Jehová da la sabiduría,
Y de su boca viene el conocimiento y la inteligencia”.
(Proverbios 2:6)***

Agradecimientos

- * Un agradecimiento muy especial al Dr. Fernando García Tamayo y a su esposa M. en C. María Guadalupe Reyes García por su gran amistad y cariño mostrado. Así como su confianza y ayuda brindada para la realización de esta tesis.*
- * A los Profesores Atonatiu Edmundo Gómez Martínez y Mónica Berenice Heras Chavarria por transmitirme sus experiencias y conocimientos. Así como por sus sugerencias y comentarios en la revisión del presente trabajo.*
- * A la Universidad Nacional Autónoma de México, que me cobijo en las aulas de la Facultad de Química donde me dio una excelente educación con grandes valores y me forjo como futuro profesionista.*
- * A los integrantes del Departamento de Biología y a mis Compañeros del Laboratorio de Biología Molecular, por su ayuda y amistad brindada durante mi estancia con ellos.*
- * Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por su apoyo económico para el desarrollo experimental de esta tesis.*
- * A todos los profesores que gracias a sus consejos y conocimientos contribuyeron a mi formación académica desde pequeño y que durante toda mi vida fueron ejemplos de superación y esfuerzo.*
- * A todas aquellas personas y familiares que de una u otra forma, también contribuyeron a mi formación académica.*

Dedicatorias

Dedico esta Tesis:

- * De manera muy especial al ADD Samuel Joaquín Flores, por preocuparse por inculcarme una enseñanza llena de paz y de excelentes consejos para la vida.***
- * Con profundo amor a mi Padre Rodolfo Huerta y a mi Madre Queta Cruz, por ser las personas más hermosas y especiales en mi vida y que gracias a sus sacrificios y esfuerzos logre lo que tanto ellos anhelaban para su hijo.***
- * Con cariño a mi Hermanita Eva Rebeca por estar conmigo en los buenos y malos momentos de la vida, donde lloramos y reímos juntos. Y muy amorosamente a mis pequeñas Hermanitas que ya son dos Angelitos haya en el cielo donde algún día nos hemos de ver.***
- * Con grande respeto a mi Abuela Consuelo, que siempre vio por mí desde pequeño como si se tratara de un hijo propio.***
- * A mis grandes hermanos y amigos Héctor, Maru, Javier, Juanito, Jonathan y Laura, por mostrarme que sí existe la verdadera amistad.***
- * A mi Tía Toña que al nacer me recibió en sus manos, a mi Tía Venita que me vio siempre como un hijo, a mis Tías Susana, Carmela, Juana, Maru y Consuelo por el afecto recibido. Y a todos mis familiares que por falta de espacio no se puede nombrar uno por uno pero que están presentes en mí.***
- * A todos mis compañeros de la escuela que me pasaban las tareas y también a los que no me la pasaban, pero que juntos vivimos grandes experiencias.***

**ÍNDICE**

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	ANTECEDENTES	3
	2.1 LA RESPUESTA INFLAMATORIA	3
	2.1.1 Generalidades de la Respuesta Inflamatoria	3
	2.1.1.1 Definición.....	3
	2.1.1.2 Clasificación.....	5
	2.1.1.3 Causas.....	6
	2.1.2 Elementos que Intervienen en la Respuesta Inflamatoria	6
	2.1.2.1 Factores Plasmáticos	6
	2.1.2.1.1 El Sistema del Complemento.....	6
	2.1.2.1.2 El Sistema de Coagulación.....	7
	2.1.2.1.3 El Sistema de las Cininas.....	7
	2.1.2.1.4 El Sistema Fibrinolítico.....	8
	2.1.2.2 Oxido Nítrico	9
	2.1.2.3 Histamina	9
	2.1.2.4 Mediadores Lipídicos	11
	2.1.2.4.1 El Ácido Araquidónico.....	11
	2.1.2.4.2 Las Prostaglandinas y el Tomboxano.....	12
	2.1.2.4.3 Los Leucotrienos.....	16
	2.1.2.4.4 Las Lipoxinas.....	17
	2.1.2.4.5 El Factor Activador de Plaquetas.....	18
	2.1.2.5 Proteínas de la Fase Aguda	20
	2.1.2.6 Sistema Celular de Defensa	21
	2.1.2.6.1 Leucocitos.....	21
	2.1.2.6.2 Reclutamiento Leucocitario.....	21
	2.2 LAS CITOCINAS	22
	2.2.1 Propiedades Generales de las Citocinas	22
	2.2.1.1 Definición.....	22
	2.2.1.2 Características.....	22
	2.2.1.3 Clasificación.....	23
	2.2.2 Receptores de Citocinas	24





2.2.2.1	Definición y Características.....	24
2.2.2.2	Clasificación.....	26
2.2.3	Las Citocinas en la Respuesta Inflamatoria.....	27
2.2.3.1	Función.....	27
2.2.3.2	La Interleucina 1 (IL-1).....	27
2.2.3.3	La Interleucina 6 (IL-6).....	30
2.3	LOS ANTI-INFLAMATORIOS.....	33
2.3.1	Fármacos Anti-Inflamatorios No Esteroides.....	33
2.3.1.1	Generalidades.....	33
2.3.1.2	Mecanismo de Acción.....	34
2.3.2	Corticoesteroides y Fármacos Anti-Inflamatorios Esteroides.....	36
2.3.2.1	Generalidades.....	36
2.3.2.2	Mecanismo de Acción.....	37
2.3.3	Toxicidad de los Fármacos Anti-Inflamatorios.....	39
2.3.4	La Indometacina.....	41
2.4	EL VENENO DE ABEJAS.....	44
2.4.1	Características Generales de la Abeja y su Veneno.....	44
2.4.1.1	La Abeja.....	44
2.4.1.2	El Veneno.....	44
2.4.1.2.1	Características Físicas.....	46
2.4.1.2.2	Composición Química y Obtención.....	46
2.4.2	Toxicidad del Veneno de Abejas.....	48
2.4.3	Propiedades Bioquímicas y Farmacológicas del Veneno de Abejas y sus componentes.....	49
2.4.3.1	Melitina.....	49
2.4.3.2	Péptido 401.....	50
2.4.3.3	Apamina.....	51
2.4.3.4	Adolapina.....	51
2.4.3.5	Secapina.....	52
2.4.3.6	Fosfolipasa A ₂	52
2.4.3.7	Hialuronidasa.....	53
2.4.3.8	Lisofosfolipasa.....	53
2.4.3.9	Histamina.....	53
2.4.4	Usos y aplicaciones del Veneno de Abejas.....	54





III. OBJETIVOS	55
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	55
3.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	55
IV. HIPÓTESIS	56
V. MATERIAL Y MÉTODOS	57
5.1 ANIMALES.....	57
5.2 FÁRMACOS Y SUSTANCIAS.....	57
5.3 METODOLOGÍA.....	58
5.3.1 Inducción de la Respuesta Inflamatoria.....	58
5.3.2 Tratamiento con Indometacina y Veneno de Abejas.....	58
5.3.3 Obtención de la Muestra de Sangre y Separación del Suero.....	59
5.3.4 Cuantificación de Citocinas por ELISA "Sandwich".....	59
5.3.4.1 Cuantificación de IL-6.....	59
5.3.4.2 Cuantificación de IL-1 β	61
5.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	62
5.5 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	62
VI. RESULTADOS	65
6.1 RESULTADOS PARA IL-6.....	65
6.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA IL-6.....	69
6.3 RESULTADOS PARA IL-1 β	70
6.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA IL-1 β	74
VII. DISCUSIÓN	75
VIII. CONCLUSIONES	85
IX. ÁPENDICE	86
9.1 EQUIPO.....	86
9.2 SOLUCIONES Y REACTIVOS.....	86
X. BIBLIOGRAFÍA	89
10.1 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	89
10.2 DIRECCIONES EN INTERNET.....	102





Índice de Abreviaturas

AA	Ácido araquidónico
Aa	Aminoácido
Abs	Anticuerpos
ABTS	Substrato de la peroxidasa
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
AINES	Anti-inflamatorios no esteroides
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de varianza
Arg	Arginina
C	Conservados de cisteínas
C3a	Fragmento a del tercer componente del sistema del complemento
C3b	Fragmento b 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
CBA/Ca	Cepa de ratones endógamica
CD4 ⁺	Marcador antigénico de linfocitos T _H
CD8 ⁺	Marcador antigénico de linfocitos T _C
COX-1	Ciclooxigenasa constitutiva
COX-2	Ciclooxigenasa inducible
COX-3	Tercera isoforma de la ciclooxigenasa (hipótesis)
CRF	Factor liberador de corticotropina
CRP	Proteína C reactiva
CSF	Factor estimulante de la formación de colonias
CYP2C	Citocromo de la familia 2C
CYP3A	Citocromo de la familia 3A
DMF	Dimetilsulfonamida





DO	Densidad óptica
DP	Receptor para la prostaglandina D
EP	Receptor para la prostaglandina E
Fe	Hierro
FP	Receptor para la prostaglandina F
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
Gly	Glicina
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
H ₁	Receptor uno para histamina (existen cuatro tipos)
HCl	Ácido clorhídrico
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HHA	Eje hipotalámico-hipofisiario-adrenal
HMW	Quininógeno de alto peso molecular
HPETE	Ácido hidroperoxieicosatetraenoico
ICAM	Moléculas de adhesión intercelular
IFN- α	Interferón alfa
IFN- β	Interferón beta
IFN- γ	Interferón gamma
Igs	Inmunoglobulinas
IL-	Interleucina (se han identificado 28 hasta el momento)
IL-1 α	Interleucina uno alfa
IL-1 β	Interleucina uno beta
IL-1RI	Receptor que se une mejor con IL-1 α
IL-1RII	Receptor que se une mejor con IL-1 β
IL-1Ra	Antagonista del receptor de interleucina uno
IL-6	Interleucina seis
IL-6R	Receptor de IL-6
iNOS	Oxido nítrico sintasa inducible
IP	Receptor para la prostaciclina





IP ₃	Inositol trifosfato
Jak	Tirosina cinasa de la familia Janus
KDa	Kilo Daltones
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LH	Hormona Luteinizante
LMW	Quininógeno de bajo peso molecular
LPS	Lipopolisacáridos
LT	Leucotrienos
LTA ₄	Leucotrieno A de cuatro insaturaciones
LX	Lipoxinas
LXA ₄	Lipoxina A de cuatro insaturaciones
M	Molar
M-GSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
NK	Células asesinas naturales
nNOS	Oxido nítrico sintasa neuronal
NO	Oxido nítrico
O ₂	Ión superóxido
OH ⁻	Ión hidroxilo
ONOO ⁻	Ión peroxinitrilo
PAF	Factor de activación plaquetario
PG	Prostaglandinas
PGE ₂	Prostaglandina E de dos insaturaciones
PGF _{2α}	Prostaglandina F alfa de dos insaturaciones
PGHS	Prostaglandina H sintetasa
PGI ₂	Prostaciclina de dos insaturaciones
Phe	Fenilalanina
PKC	Proteína cinasa C
PLA ₂	Fosfolipasa A2
PLC	Fosfolipasa C





Pro	Prolina
PVS	Peso del veneno seco
RANTES	Quimocina expresada y secretada por células T normales, regulada bajo activación.
ROS	Especies reactivas de oxígeno
S	Serina
SC	Subcutánea
Ser	Serina
S-HRP	Solución de estreptoavidina peroxidasa
SNC	Sistema nervioso central
s-s	Puentes disulfuro
SSI	Solución salina isotónica
STAT	Proteínas transductoras de señal y activadoras de la transcripción
T _c	Linfocitos T citotóxicos
TGF- α	Factor de crecimiento alfa
TGF- β	Factor de crecimiento beta
T _{H1}	Células T cooperadora productoras de citocinas del tipo 1
T _{H2}	Células T cooperadora productoras de citocinas del tipo 2
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TNF- β	Factor de necrosis tumoral beta
TX	Tromboxanos
TXA ₂	Tromboxano A de dos insaturaciones
UK	Uroquinasa
VA	Veneno de abejas
VCAM	Molécula de adhesión vasculares
X	Cualquier aminoácido
XIIa	Factor Hageman activado



I. INTRODUCCIÓN

Con los avances científicos y tecnológicos del último siglo, se ha logrado disminuir la incidencia de un gran número de enfermedades, que en otro tiempo fueron causa de muerte. Sin embargo como una consecuencia, se ha elevado el promedio de la vida media de la población mundial, y por supuesto, ha aumentado paralelamente la incidencia de las enfermedades crónicas y degenerativas. Casi todas ellas se acompañan de dolor y de una pérdida progresiva de funciones vitales. Por eso hoy en día se comienza a hablar cada vez más de la eutanasia e inclusive hay países que debaten la autorización legal de esta práctica, ya que para muchas personas es más importante terminar con el dolor de un paciente que evitar su muerte. En los últimos años han aumentado las investigaciones en busca de nuevos fármacos para anular el dolor y reducir las enfermedades inflamatorias crónicas, en las cuales parecen estar desordenadas las funciones de modulación del sistema inmune. En este sentido, el estudio de las citocinas pro- y anti-inflamatorias y la búsqueda de procedimientos que modifican su producción pueden ser un camino hacia estos objetivos.

Las citocinas forman un conjunto de moléculas muy diversas, agrupadas en familias, que comparten una serie de propiedades biológicas, entre ellas la de actuar como "mensajeros". De todas estas familias, las interleucinas son las más conocidas. Estas últimas son glucoproteínas de bajo peso molecular, generalmente de 8-75 KD, se encargan de mediar y regular la amplitud y duración de las respuestas inmune e inflamatoria. Los estudios emprendidos en los últimos





años han permitido reconocer que las interleucinas modulan la respuesta inmune, la hematopoyesis y la integración del sistema inmune con el sistema neuroendocrino. Además, también participan en la fisiopatología de un gran número de enfermedades entre otras el cáncer, las enfermedades autoinmunes y los procesos infecciosos. Un mejor entendimiento de los mecanismos de acción de las interleucinas permitirá su uso como potenciales agentes bioterapéuticos. Por tanto, la búsqueda y desarrollo de sustancias o moléculas agonistas o antagonistas de interleucinas es de gran interés.

Se puede mencionar que actualmente existen sustancias que, al ser administradas, pueden aumentar o disminuir la producción y la concentración sanguínea de las interleucinas más importantes. Algunas de esas sustancias han sido sintetizadas en los laboratorios y otras han sido obtenidas de fuentes naturales. El veneno de abejas (VA) es una de estas últimas. Diversos estudios han comprobado que el VA influye sobre la respuesta del sistema inmune y también actúa en el control de las reacciones inflamatorias. El objetivo del presente trabajo es conocer si el VA puede influir sobre la concentración en el suero de las interleucinas IL-6 e IL-1. La primera de ellas es una macromolécula anti-inflamatoria y la segunda es pro-inflamatoria. En el modelo que se va a utilizar se provocará una respuesta inflamatoria en las articulaciones de ratones CBA/Ca y posteriormente se medirá la concentración de esas dos interleucinas en el suero de los animales, después de haberlos inyectado con VA o con un anti-inflamatorio no esteroide (indometacina) de efectos conocidos.





II. ANTECEDENTES

2.1 La Respuesta Inflamatoria

2.1.1 Generalidades de la Respuesta Inflamatoria.

2.1.1.1 Definición: La inflamación es una respuesta vascular que ocurre alrededor de los tejidos que han sido dañados. Tiene como objetivos contener el daño tisular, ayudar a la reparación del tejido dañado, eliminar los desechos que resultaron de esta respuesta y proteger los tejidos sanos vecinos, pero cuando se pierde su control o se prolonga su duración se puede aumentar la destrucción tisular y provocar la aparición de enfermedades secundarias (Goldsby, 2000).

La respuesta inflamatoria involucra una serie de eventos complejos que consisten en la producción de numerosos mediadores químicos que provocan un aumento de la permeabilidad capilar, facilitan la salida de células desde los vasos sanguíneos, activan varios sistemas de proteínas pro-inflamatorias, al mismo tiempo activan varios mecanismos anti-inflamatorios que modulan los anteriores. Todos estos eventos restringen el área donde ocurre la inflamación. Sin embargo, muchos de los mediadores químicos que se producen en el curso de la inflamación pueden pasar a la circulación, ejerciendo sus actividades biológicas a distancia y son responsables de manifestaciones sistémicas (Goldstein, 1992).

La inflamación se caracteriza por la presencia de calor, rubor, edema, dolor y pérdida de la función celular (Figura 1). La razón por la cual se presenta calor y rubor en el área es debida a la dilatación de los vasos sanguíneos. El edema es





producido por el escape de fluidos y células al tejido extravascular. El dolor se debe principalmente a la liberación de mediadores químicos y sensibilizadores de nociceptores y a la presión ejercida en las terminales nerviosas por la acumulación de líquido extravascular. El dolor y el edema explican la pérdida de función.

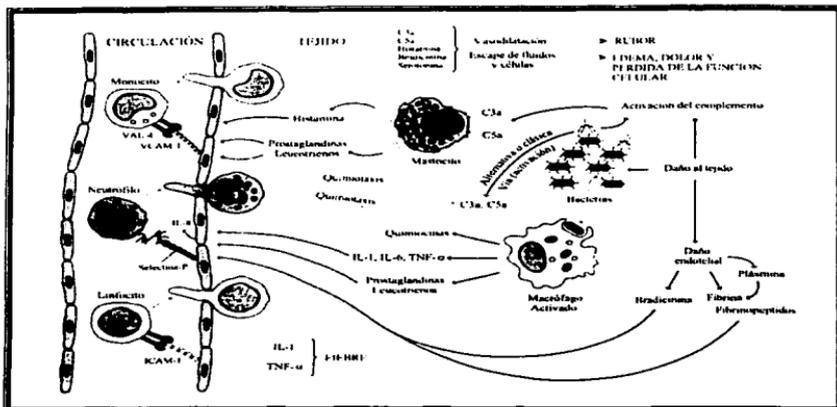


Figura 1. La respuesta inflamatoria y sus signos cardinales. El dibujo presenta varios mecanismos por los cuales, después del daño a los tejidos, ocurre la respuesta vascular (vasodilatación y aumento de la permeabilidad) que caracteriza el inicio de la reacción inflamatoria (Modificado de Goldsby, 2000).

Por lo general, la respuesta inflamatoria se puede desarrollar en tres fases distintas y sucesivas, en las cuales participan mecanismos diferentes:

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.

b) Después se pueden seguir dos vías diferentes.





b1) Si el daño es leve, ocurre una resolución rápida, con la salvedad de que se tiene que producir una regeneración de células para recuperar las funciones del tejido que fue dañado.

b2) En el segundo caso cuando ocurre un daño mayor que la anterior se tiene que producir una reparación del tejido, caracterizada primero por la eliminación de los restos de células dañadas por las células fagocíticas y posteriormente se inicia la reparación por la actividad de los fibroblastos que producen proteínas de la matriz extracelular.

c) Por último, cuando no se logra la resolución de las dos fases anteriores, la inflamación evoluciona a una fase crónica que se acompaña de fibrosis y degeneración del tejido alrededor de la lesión inicial, así como el predominio en el sitio de inflamación de monocitos, linfocitos y macrófagos. En algunos casos, la inflamación crónica provoca la formación de un granuloma. (William, 1993; Goldsby, 2000).

2.1.1.2 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 generalmente degenerativas que causan daño de tejidos, inducen la activación persistente del sistema inmunológico y por eso provocan la infiltración del tejido dañado por linfocitos, pero principalmente macrófagos, así como de fibroblastos (William, 1993).





2.1.1.3 Causas: La inflamación puede ser provocada por muchas y variadas causas. Entre las más comunes se encuentran los factores externos o internos que dañan las células del epitelio o del endotelio y las estructuras asociadas a ellos, tales como: infecciones por virus, hongos, bacterias o parásitos, los golpes y las fracturas, el calor excesivo, las heridas, las isquemias y las radiaciones ionizantes, así como el daño tisular causado por sustancias químicas o cirugías y numerosas enfermedades degenerativas o autoinmunes (Gallin, 1996)

2.1.2 Elementos que Intervienen en la Respuesta Inflamatoria

2.1.2.1 Factores Plasmáticos: El plasma contiene factores que se pueden activar y generan fragmentos pro-inflamatorios. El proceso inflamatorio se puede iniciar y propagar por la activación de los componentes del sistema del complemento, del sistema de coagulación, de las cininas y de los componentes del sistema fibrinolítico.

2.1.2.1.1 El Sistema del Complemento:

El sistema del complemento forma parte de los mecanismos que proporcionan la inmunidad innata. Está formado por un conjunto de 9 proteínas que actúan en forma de cascada y es uno de los mediadores más importantes de la inflamación (Roitt, 1997). La activación del complemento produce péptidos que median la quimiotaxis (péptido: C5a), la anafilaxia y la vasodilatación (péptidos: C3a, C4a y C5a; Abbas, 1999). Pero algunos de los componentes del sistema complemento también pueden actuar como opsoninas y/o estimulantes de la



fagocitosis (C3b e iC3b; Frank y Fries, 1991), así como también pueden estimular linfocitos y/o macrófagos e inducir la liberación de citocinas como el TNF- α e IL-1 (C5a) incrementando de esta forma la respuesta inflamatoria (Speziale, 1996).

2.1.2.1.2 El Sistema de Coagulación (Factores de Contacto).

El sistema de coagulación se encarga de bloquear los vasos eferentes del foco inflamatorio para evitar la difusión del agente nocivo, mediante una serie de proteínas, algunas de las cuales forman lo que se conoce como "el sistema de contacto", el cual se conforma fundamentalmente de cuatro proteínas: i) el factor XII (factor Hageman), ii) la pre-caliceína, iii), el factor XI, iv) y un quinínogeno de alto peso molecular (HMW) o de bajo peso molecular (LMW; Nakanishi, 1987).

El factor XII puede activarse por la unión a superficies cargadas negativamente o se induce por el factor XI, una vez activado el factor XII (XIIa) convierte a la pre-caliceína en caliceína. Existen dos tipos de caliceínas, la plasmática y la tisular (Bhoola y col., 1992). Estas proteasas actúan sobre los quinínogenos de alto peso molecular (HMW) para generar bradicinina y calidina respectivamente (Nakanishi, 1987). La importancia de este proceso radica en la formación de bradicidina la cual es un potente mediador de la inflamación.

2.1.2.1.3 El sistema de las Cininas (Bradicinina).

Factores diversos como la lesión tisular, infecciones por virus y otros trastornos inflamatorios activan una serie de reacciones que generan bradicidina (Wachtfogel y col., 1993). La bradicinina es un nonapéptido con la secuencia de aminoácidos: Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg.



Sus efectos principales dependen de la unión a sus dos receptores: B₁ y B₂ (Regoli y Barabé, 1980) pero se ha sugerido la existencia del receptor B₃ (Farmer y DeSiato, 1994). B₂ media la mayor parte de los efectos, en ausencia de inflamación, mientras que B₁ es regulado en forma aditiva por la inflamación (Regoli y Barabé, 1980). Aunque existe una mayor afinidad por los receptores B₂, ambos receptores se encuentran acoplados a proteínas G (Calixto y col, 2000).

La bradicinina se genera rápidamente y estimula receptores B₂ que a su vez activan a la proteincinasa C (PKC) y a la fosfolipasa A₂ (PLA₂), incrementando la liberación de ácido araquidónico (Raidoo y Bhoola, 1998). Pero cuando la bradicinina actúa sobre receptores B₁ en células de inflamación, como macrófagos, desencadena la producción de IL-1 y el TNF- α (Dray y Perkins, 1993). Además la bradicinina está involucrada en la liberación de otros mediadores inflamatorios como histamina y óxido nítrico. (Calixto y col, 2000),

2.1.2.1.4 El Sistema Fibrinolítico.

El sistema fibrinolítico regula la deposición de fibrina en los vasos sanguíneos y en los tejidos. Siguiendo a la formación del trombo, se inicia un período de disolución de la fibra depositada, lo cual se encarga de repermeabilizar los vasos, una vez pasado el episodio inflamatorio.

El componente clave de la vía fibrinolítica es el plasminógeno el cual es activado para convertirse en plasmina por la acción de la uroquinasa (UK). Una vez formada la plasmina tiene como sustratos a la fibrina y al fibrinógeno, iniciándose la fibrinólisis. La fibrinólisis también puede ser inducida por proteasas





liberadas por neutrófilos. El plasminógeno y la plasmina participan en la inflamación, como promotores de la migración celular (Ploplis, 2000).

2.1.2.2 Oxido Nítrico.

El óxido nítrico (NO), es un gas inestable, potencialmente tóxico, soluble tanto en medios lipídicos como acuosos, lo que le permite difundir rápidamente desde su lugar de síntesis hasta otros sitios (Marletta y col., 1998).

El NO es sintetizado durante la conversión enzimática de L-arginina a L-citrulina. En el sistema nervioso, el NO actúa como un neurotransmisor y es sintetizado por la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), una enzima localizada en neuronas del SNC y que requiere calcio para activarse, o por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) localizada en la glia y que requiere activación por citocinas pro-inflamatorias como el TNF, IL-1 y el IFN- γ . Por esta razón el NO se encuentra elevado en la reacción inflamatoria (Meller y Gebhart, 1993).

Además de actuar como un neurotransmisor, el NO puede provocar daño tisular debido a la acción de los aniones peroxinitrilo (ONOO⁻) generados por la interacción del NO con el anión superóxido (O₂⁻). El efecto fisiológico del NO como un potente vasodilatador y su capacidad de inducir la COX-2 hacen que el exceso en la producción de NO sea un factor importante en la inducción del proceso inflamatorio (Kam y Govender, 1994).

2.1.2.3 Histamina.

La histamina (Figura 2) es una amina natural sintetizada a partir de histidina por la histidina descarboxilasa y puede encontrarse libre o almacenada en





vesículas sinápticas o de las células cebadas. La histamina es liberada en el proceso de desgranulación de mastocitos por mediadores de la inflamación (Dray, 1995). Puede unirse a cuatro tipos diferentes de receptores: H_1 , H_2 , H_3 y H_4 (Liu y col., 2001).

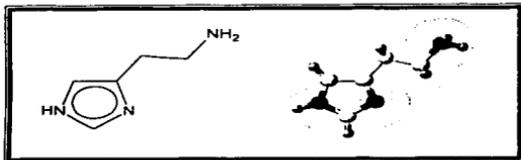


Figura 2. Estructura molecular de la histamina (Modificado de Merck Index, 1997).

Los receptores para la histamina se encuentran repartidos en las células de casi todos los tejidos del cuerpo, principalmente en las células cercanas a la piel, las mucosas y los sistemas inmune y nervioso central. Por esa razón, la liberación de histamina puede provocar manifestaciones cutáneas, digestivas, inmunes y psicológicas (Besson y Chaouch, 1987).

Los receptores de membrana H_1 y H_2 están acoplados a proteínas G. Al activar receptores H_2 se estimula la secreción de HCl gástrico, pero al activar receptores H_1 que se encuentran acoplados a la fosfolipasa C (PLC), activan dicha proteasa, provocando que se forme IP_3 , y haya liberación rápida de iones calcio, los cuales estimulan la liberación de cininas (Besson y Chaouch, 1987) y la activación de la fosfolipasa A_2 , esta última enzima se encarga de la liberación de ácido araquidónico (AA), el cual es precursor de más mediadores inflamatorios, como las prostaglandinas. Además la histamina dilata los vasos sanguíneos mas delgados e intensifica la permeabilidad capilar, esto produce el dolor y el edema característico en la respuesta inflamatoria (Merker, 1987).



2.1.2.4 Mediadores Lipídicos.

Los mediadores lipídicos como las prostaglandinas, leucotrienos, el factor activador de plaquetas, las lipoxinas y el tromboxano, son sintetizados a partir del ácido araquidónico, por diversos sistemas enzimáticos. Estas moléculas lipídicas son importantes mediadores en la respuesta inflamatoria.

2.1.2.4.1 El Ácido Araquidónico y la Producción de Eicosanoides.

El término eicosanoides es aplicado a un grupo de sustancias de carácter lipídico como prostaglandinas, leucotrienos y compuestos similares porque derivan de ácidos grasos esenciales de 20 átomos de carbono que contienen 3, 4 ó 5 dobles ligaduras (Mycek y col., 2000): ácido 8,11,14-eicosatrienoico (ácido dihomo y linoléico); ácido 5,8,11,14-eicosatetranoico (ácido araquidónico) y ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (Figura 3). En los mamíferos el ácido araquidónico es el precursor más abundante y proviene del ácido linoleico de los alimentos (ácido 9,12-octadecadienoico; Pérez y col., 1998).



Figura 3. Estructuras moleculares de los precursores de los eicosanoides (Modificado de Merck Index, 1997).

El ácido araquidónico obtenido de los alimentos se deposita en la bicapa lipídica de las membranas celulares esterificado a fosfolípidos tales como





fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol. Por tanto la etapa limitante de la síntesis de eicosanoides es la liberación del AA a partir de los fosfolípidos de la membrana celular (Smith, 1992).

Todo parece indicar que la alteración de la integridad de la membrana mediada por agentes físicos, químicos o el trauma, así como por reacciones antígeno-anticuerpo, facilita que penetre el ión calcio y se active la fosfolipasa A₂, la cual hidroliza los fosfolípidos de membrana con liberación de ácido araquidónico (Smith, 1992). Por otro lado, la fosfolipasa C desdobra el enlace fosfodiéster, con lo cual se forma 1,2-diglicérido. Posteriormente, la intervención de la lipasa de diglicérido libera el ácido araquidónico (Okazaki y col., 1981).

2.1.2.4.2 Las Prostaglandinas y el Tromboxano (Prostanoides).

Junto con los leucotrienos (LT), las prostaglandinas (PG) y el tromboxano (TX) pertenecen al grupo de los prostanoides, los cuales son sintetizados a partir del ácido araquidónico por acción de la ciclooxigenasa.

La enzima que transforma el AA en PGG₂ y posteriormente en PGH₂, es una enzima bi-funcional que produce, sobre dos sitios distintos, una actividad de dioxigenasa (formación de PGG₂) y una actividad de peroxidasa (transformación de PGG₂ a PGH₂; Hamber y Col., 1974). Es esta actividad enzimática global la que se denomina ciclooxigenasa (COX) o PGH sintetasa (PGHS). La PGH₂ formada es inestable y puede ser transformada en productos biológicamente activos, tales como PGs primarias (PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}), tromboxano A₂ (TXA₂) y prostaciclina (PGI₂; Figura 4; Kuehl y Egan, 1990).



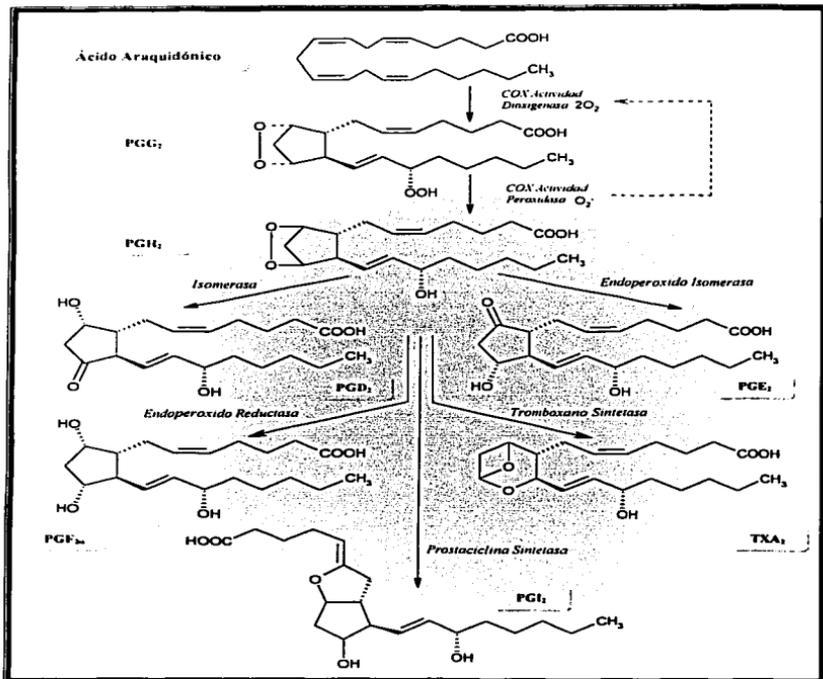


Figura 4. Biosíntesis de Prostaglandinas, Tromboxano y Prostaciclina (Modificado de Campbell y Halushka, 1996).

La respuesta inflamatoria siempre va acompañada por la liberación de diversos prostanoideos. El más frecuentemente encontrado es la PGE₂ y, en menor medida, la PGI₂. Además, durante los procesos más inmediatos de la inflamación, los mastocitos liberan PGD₂. Todos ellos son potentes vasodilatadores, lo que



provoca que las arteriolas precapilares aumenten su calibre, conduciendo al típico color rojo ("rubor") en la piel correspondiente a las áreas inflamadas. Además, potencian el efecto de la bradicinina y de la histamina sobre la permeabilidad vascular, favoreciendo la formación de edema, aunque por sí solas no causan dolor, sensibilizan los nociceptores mediante la liberación de diversos mediadores (Kuehl y Egan, 1990; Dray, 1995).

La PGE_2 tiene cierta capacidad para retroalimentar negativamente el proceso inflamatorio, porque estimula la producción de esteroides por las adrenales, la liberación de ACTH por la hipófisis y, además, porque regula negativamente la actividad de las células inflamatorias. Sin embargo, este efecto anti-inflamatorio es muy limitado (Goldyne y Stobo, 1981).

Los efectos anti y pro inflamatorios y de protección gastrointestinal de las prostaglandinas, entre otros, se encuentran relacionados al tipo de receptor activado, los cuales están acoplados a proteínas G, y se han dividido en cinco tipos: DP, EP (EP1, EP2, EP3 y EP4), FP e IP, receptores para PGD, PGE, PGF y PGI respectivamente (Narumiya y col., 1999; Vanegas y Schaible, 2001).

La Ciclooxygenasa es la enzima clave en la síntesis de prostanoides. Se trata de un homodímero (PM=144 kD). En términos bioquímicos es la ácido graso dioxigenasa. Contiene un átomo de hierro (Fe) formando parte de un grupo hemo, el cual constituye un cofactor indispensable para el funcionamiento del enzima.

Aunque se proponen tres isoformas para la COX (COX-1, COX-2 y COX-3; Willoughby y Col., 2000; Botting, 2000), solo se han estudiado ampliamente dos de ellas: COX-1 y COX-2, ambas capaces de catalizar la formación de PGH_2 a partir de AA. Como resultado del proceso catalítico, la ciclooxygenasa pierde su





actividad. Este mecanismo es empleado por la célula para evitar una síntesis excesiva de prostanoïdes. Estas isoenzimas son codificadas por genes localizados en distintos cromosomas. Su estructura es similar, siendo las secuencias idénticas en más del 60% y conservan las regiones importantes para la función enzimática (Tabla 1; Vane y Botting, 1996; Jouzeau y col., 1997).

Tabla 1. Comparación entre COX-1 y COX-2.

Características	COX 1	COX 2
Gen responsable	Cromosoma 9q32-33.3 (22 kB)	Cromosoma 1q25.2-25.3 (8,3 kB)
Tejidos donde se expresa	Constitutiva: en prácticamente en todos, pero especialmente en monocitos/macrófagos, plaquetas, estómago y riñón.	Inducida: en células endoteliales, fibroblastos, células musculares lisas del miometrio y de paredes vasculares. Constitutiva: En Sistema Nervioso Central y riñón. Posiblemente también en algunos tipos tumorales (adenocarcinoma).
Inductores	Desconocidos	Inespecíficos: Interleucina 1 α y β , Factor de Necrosis Tumoral α , Endotoxina, Factor de Crecimiento Epidérmico. Específicos: Hormona Luteinizante (LH) en células de ovario, y HDL-colesterol en células musculares lisas.
Inhibidores	Desconocidos	Corticosteroides
Peso molecular	72.000	72.000
Aminoácidos	600-602	603-605
Localización intracelular	Retículo endoplásmico	Membrana del núcleo y retículo endoplásmico.

La principal diferencia entre las dos isoenzimas está en la regulación de su actividad enzimática. Se puede considerar a la COX-1 como una enzima constitutiva, presente en la mayoría de los tejidos y que estaría involucrada en el



mantenimiento de las funciones fisiológicas, como la regulación de la secreción de ácido gástrico. Mientras que la COX-2, que está presente sólo en algunos tejidos y es inducida por estímulos mitogénicos o inflamatorios mediados por numerosos productos como citocinas (especialmente IL-1 α , IL-1 β y TNF- α ; Seibert y Masteferrer, 1994; Vane y col., 1998).

2.1.2.4.3 Los Leucotrienos.

Como vía paralela a la de la ciclooxigenasa se encuentra la vía de las lipooxigenasas, estas enzimas catalizan la oxigenación del AA hasta la formación de hidroperóxidos no cíclicos, los ácidos hidroperoxieicosatetraenoicos (HPETE; Samuelsson, 1983). La 5-lipooxigenasa sintetiza 5-HPETE, este último es el precursor de los leucotrienos: LTA₄, LTB₄, LTC₄, LTD₄, y LTE₄ (figura 5; Samuelsson y col., 1987), de los cuales se han identificado tres receptores diferentes acoplados a proteínas G: LTB₄, LTC₄, y LTD₄/LTE₄, (Halushka y Col., 1989).

Los leucotrienos en el proceso inflamatorio se tornan en un sistema de amplificación del mecanismo del dolor. Los leucotrienos C₄ y D₄ dan lugar a vasodilatación, aumento de permeabilidad vascular 1000 veces mayor que la histamina (Feuerstein, 1984; Piper, 1984), así como son potentes broncoconstrictores (Drazen y Austen, 1987). El leucotrieno B₄ induce la acumulación local, adhesión y migración transendotelial de neutrófilos (Davies y col., 1984), también es un potente agente quimiotáctico para leucocitos, eosinófilos y monocitos (otros leucotrienos no poseen dicha actividad; Piper, 1984).



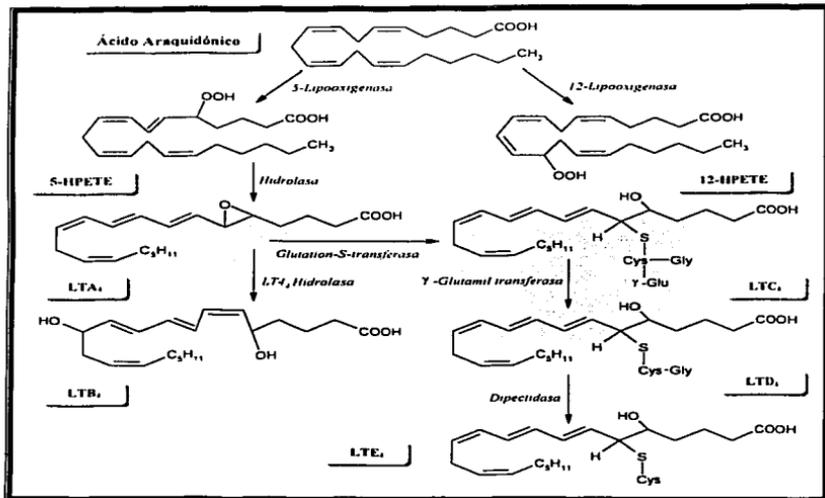


Figura 5. Biosíntesis de Leucotrienos (Modificado de Campbell y Halushka, 1996).

2.1.2.4.4 Las Lipoxinas.

Las lipoxinas forman parte de la familia de los eicosanoides, las cuales se generan a partir de la oxigenación secuencial del carbono 15 y luego del carbono 5 del ácido araquidónico, por las 15 y 5 lipoxigenasas, respectivamente. Esta oxigenación genera un intermediario epóxido, el cual es rápidamente convertido en lipoxina A₄ (LXA₄) o lipoxina B₄ (LXB₄) por epoxi-hidrolasas (Figura 6).

Entre los efectos de las lipoxinas se ha encontrado que la LXB₄ es vasoconstrictora, mientras que la LXA₄ es vasodilatadora en presencia de





prostaglandinas, pero en ausencia de éstas (mediante el uso de inhibidores) se comporta como vasoconstrictora. Además la LXA_4 inhibe la migración de los neutrófilos inducida por LTA_4 y ambas atenúan los efectos de los LTC_4 y LTD_4 , por lo que tienen un efecto anti-inflamatorio o regulador negativo de la inflamación, es por esto, que se les considera moduladores negativos endógenos de la respuesta inflamatoria (Samuelsson y col., 1987; Speziale, 1996).

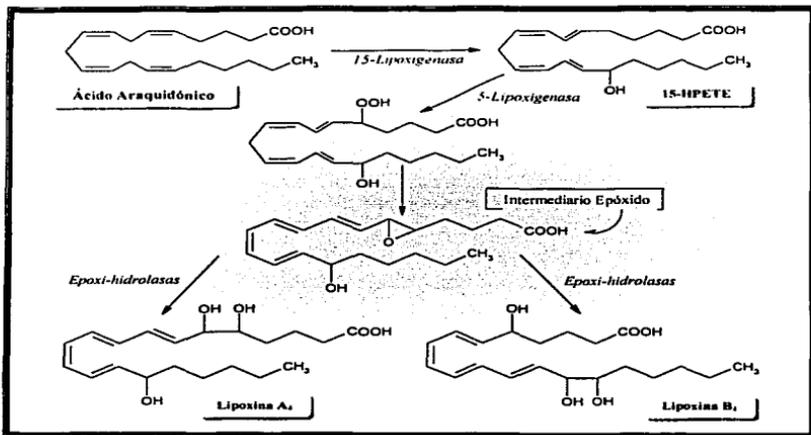


Figura 6. Biosíntesis de Lipoxinas (Modificado de Speziale, 1996).

2.1.2.4.5 El Factor Activador de Plaquetas (PAF).

De la hidrólisis de los fosfolípidos de membrana mediante la fosfolipasa A_2 se obtiene, además de ácido araquidónico, una sustancia conocida como Liso-PAF (precursor del PAF; Chilton y col., 1984), esta es acetilada por la Liso-PAF-





acetiltransferasa en presencia de acetil-CoA para generar el factor activador de plaquetas (Figura 7). El PAF puede ser sintetizado por los leucocitos, incluidos neutrófilos, eosinófilos y basófilos, macrófagos y por plaquetas.

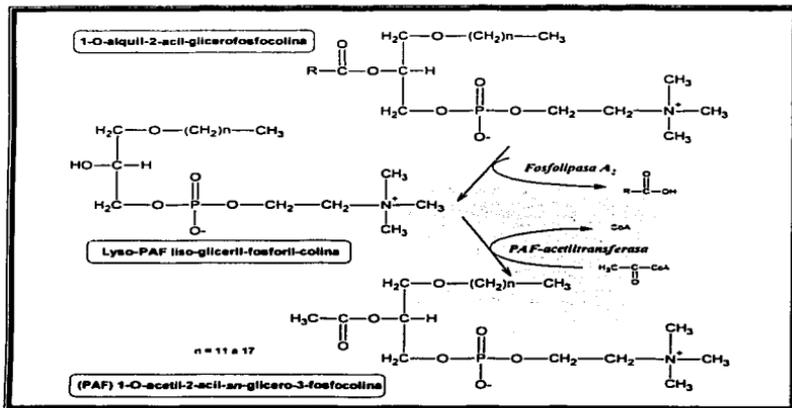


Figura 7. Biosíntesis del Factor Activador de Plaquetas (Modificado de Bhagwat y col., 1985).

Dentro de los efectos del PAF, se encuentra la activación y agregación plaquetaria, contracción bronquial. Además estimula la salida de líquido desde los vasos e intensifica la permeabilidad vascular 1,000 veces más potente que la histamina y la bradisinina (McManus y col., 1981), estimula la liberación de enzimas lisosomales, la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y leucotrienos, en eosinófilos provoca su desgranulación, al mismo tiempo es un factor quimiotáctico de eosinófilos, monocitos y neutrófilos, de estos últimos



estimula su adherencia a células del endotelio y su diapédesis (McManus y col., 1981), por lo que el PAF tiene una participación activa en el proceso inflamatorio.

2.1.2.5 Proteínas de la Fase Aguda.

Durante la respuesta de la fase aguda de la inflamación, se presentan modificaciones locales y sistémicas de la fisiología normal, con el propósito de controlar el daño, eliminar los desechos e iniciar la reparación tisular. Estas reacciones se llevan acabo mediante la alteración de síntesis de proteínas inducida por citocinas tales como: IL-1, IL-6 y TNF- α . Estas citocinas actúan sobre el hipotálamo e hígado (Figura 8) induciendo fiebre y modificando la síntesis y la degradación de proteínas. Dichas proteínas se conocen como "reactantes de la fase aguda" y tienen la función de modular las reacciones inflamatorias (Steel, 1994; Goldsby, 2000).

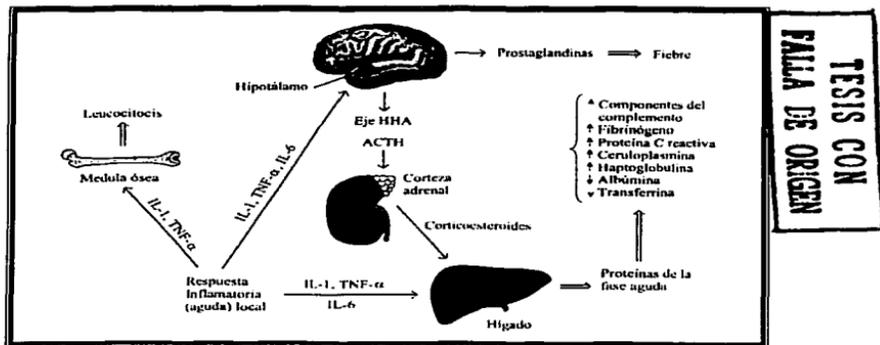


Figura 8. Activación de proteínas de la fase aguda y leucocitosis en médula ósea por citocinas (Modificado de Goldsby, 2000).





2.1.2.6 Sistema Celular de Defensa.

Este sistema está formado por los leucocitos, los cuales se forman a partir de la células madre pluripotenciales que se encuentran en la médula ósea. A medida que se van diferenciando, las células madre dan origen a los precursores de las diferentes estirpes de células que forman el tejido sanguíneo: los leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), monocitos, linfocitos, plaquetas y eritrocitos. El reclutamiento de estas células desde la circulación sistémica al área de inflamación y la leucocitosis en la medula ósea son factores críticos en la amplificación de la respuesta inflamatoria.

2.1.2.6.1 Leucocitosis

La vida media de los neutrófilos, eosinófilos y basófilos es relativamente corta. Por lo tanto, para mantener su número en el sitio de inflamación se requiere de un flujo constante de nuevas células. En respuesta a mediadores inflamatorios como la IL-1, IL-3, IL-5, IL-7 y el TNF- α , dichas células son liberadas al torrente circulatorio desde el depósito en médula ósea (Figura 8) para ejercer su función en la respuesta inflamatoria (Goldsby, 2000).

2.1.2.6.2 Reclutamiento Leucocitario

La extravasación de los leucocitos es un determinante crucial de la reacción inflamatoria. Las células endoteliales participan en el reclutamiento de leucocitos, inducido por las citocinas inflamatorias (IL-1 y el TNF- α), produciendo quimioattractantes y expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1 pero no ICAM-2; Albelda y col., 1994).



2.2 Las Citocinas

2.2.1 Propiedades Generales de las Citocinas.

2.2.1.1 Definición. Las citocinas son un conjunto heterogéneo de proteínas, generalmente glucosiladas y de bajo peso molecular, secretadas por las células del sistema inmune. Algunas de ellas tienen una función de moléculas "mensajeras" mientras otras son mediadoras de diferentes actividades biológicas. Se pueden producir en respuesta a una estimulación inmunológica o inflamatoria con el fin de mediar y regular la amplitud y duración de dichas respuestas, aunque también producen citocinas otras células no inmunes, como: células endoteliales y fibroblastos. Aún más, se conoce que una misma citocina puede estar producida por distintas células e incluso que un mismo tipo de citocina puede realizar funciones diversas (García, 1997).

2.2.1.2 Características. Las citocinas son mensajeros químicos que actúan a concentraciones muy bajas y son muy específicas gracias a la alta afinidad por sus receptores de membrana. A diferencia de los neurotransmisores, no se encuentran preformadas, sino que son sintetizadas cuando ocurre la estimulación de las células. La mayor parte de ellas son consideradas sustancias "pleiotrópicas", es decir, que actúan sobre varias células y tienen varias actividades biológicas diferentes. También son "redundantes", lo que significa que algunas de las actividades de una citocina pueden ser similares a las de otras citocinas. Además pueden ser antagónicas, es decir, que las actividades de ciertas citocinas pueden resultar completamente opuestas (Piñol, 2000).





Las citocinas suelen actuar, fundamentalmente, de forma local, tanto sobre la misma célula que las produce (actividad autocrina) como sobre las células vecinas (actividad paracrina), más que en acciones sobre células y tejidos distantes de su producción. No obstante, algunas citocinas, especialmente de efectos inflamatorios como la IL-6, IL-1 y el TNF, actúan mediante difusión a través de la sangre en células diana distantes (actividad endocrina: Piñol, 2000).

2.2.1.3 Clasificación. En los últimos años se han descubierto varias citocinas gracias al desarrollo de las técnicas moleculares que han permitido la clonación, así como su análisis y cuantificación, y cuya clasificación ha variado con el tiempo. Anteriormente, se denominaban a las citocinas en función del origen de la célula secretora. Hoy día es más común clasificarlas en familias. En la tabla 2 se enumeran los principales componentes de las familias de citocinas (García, 1997; García y Kaski, 2000).

Tabla 2. Familias o Grupos Principales de Citocinas.

Nombre del Grupo	Principales Componentes
Interleucinas (IL)	IL-1 a la IL-28
Interferones (IFN)	IFN- α , IFN- β e IFN- γ
Factores de Necrosis Tumoral (TNF)	TNF- α y TNF- β
Quimioquinas	Linfotactina, MIP-1, IL-8, RANTES
Factores Estimulantes de la Formación de Colonias (CSF)	G-CSF (para Granulocitos), M-GSF (para Macrófagos), GM-CSF (para Granulocitos y Macrófagos)
Factores de Crecimiento (TGF)	TGF- α , TGF- β (Fibroblástico, Derivado de plaquetas, derivado de monocitos).

Desde un punto de vista general las citocinas pueden actuar como:



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

Según sus funciones biológicas en el organismo, podemos dividir las citocinas en 3 grupos: inmunorreguladoras, pro-inflamatorias y anti-inflamatorias.

Ⓐ Inmunorreguladoras	Ⓑ Pro Inflamatorias	Ⓒ Anti Inflamatorias
✓ IL-2	✓ IL-1	✓ IL-1Ra
✓ IL-4	✓ IL-2	✓ IL-4
✓ IL-10	✓ IL-12	✓ IL-6
✓ TFN- α	✓ IL-18	✓ IL-10
✓ TFN- γ	✓ TNF- α	✓ IL-11
✓	✓ IFN- γ	✓ TGF- β

2.2.2 Receptores de Citocinas.

2.2.2.1 Definición y Características. Los receptores de citocinas son glucoproteínas de membrana que se caracterizan por ser específicos y de muy alta afinidad, los cuales están conformados por varias subunidades y cuya misión es la de transmitir la señal al interior de la célula y activar la transcripción.

La unión de la citocina con su receptor específico (acoplado a cinasas) induce su agrupación (Figura 9-1), lo cual proporciona una señal que activa a las cinasas de la familia Janus (Jak), induciendo la fosforilación autocatalítica de residuos de tirosina. Las Jak activadas catalizan posteriormente la fosforilación de





los residuos de tirosina en las regiones intracelulares del receptor de citocinas (Figura 9-2). A estos residuos de fosfotirosina se unen las proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción (STAT) a través de sus dominios SH2 (Figura 9-3). Posteriormente las Jak catalizan la fosforilación de residuos de tirosina de las proteínas STAT unidas, las cuales se disocian del receptor y se dimerizan para migrar al núcleo y activar la transcripción de genes que contengan secuencias específicas de unión a STAT (Figura 9-4).

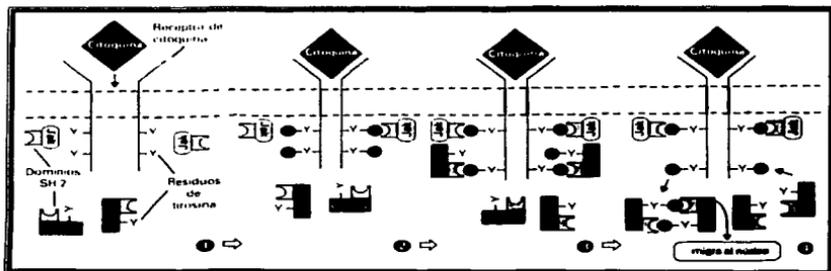


Figura 9. Mecanismo de activación de los receptores de citocinas (Modificado de Roitt, 1997).

Como consecuencia de estas reacciones en cadena, se induce la transcripción de varios genes, cuyos productos son los que median las actividades biológicas de las citocinas. Además, de los receptores de membrana, en el suero se han detectado receptores solubles para las distintas citocinas, semejantes a los de membrana. Estos receptores solubles se encuentran en grandes cantidades y probablemente tienen como misión regular la producción de las citocinas, actuando como antagonistas de los receptores de membrana. (Miyajima y col., 1992; Tan y col., 1993; Bach y col., 1996;)



2.2.2.2 Clasificación. Las distintas familias de citocinas se agrupan según el tipo de receptor, aunque debido a que los diferentes tipos de receptores están ligados a funciones distintas, la clasificación actual de los receptores es una mezcla estructural y funcional (Tabla 3; Álvarez, 1996; Goldsby, 2000).

Tabla 3. Clasificación de los Receptores de Membrana de las Citocinas.

Clasificación y Ligandos	Estructura
<p>Receptores de la Superfamilia de las Inmunoglobulinas.</p> <p>Pertenecen a esta familia: IL-1α, IL-1β, IL-16, M-CSF.</p>	
<p>Receptores de la Superfamilia de Citocinas. (Tipo I o Receptores de factores de crecimiento hematopoyético).</p> <p>Pertenecen a la familia de receptores α, β y γ. Se han reconocido en este grupo, las siguientes citocinas: IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12, GM-CSF y G-CSF.</p>	
<p>Receptores de la Superfamilia de Citocinas. (Tipo II o Receptores de Interferón, TNF).</p> <p>Tienen receptores α y β. Pertenecen a esta familia: IFN-α, IFN-β, IFN-γ.</p>	
<p>Receptores del Factor de Necrosis Tumoral (TNF).</p> <p>Pertenecen: TNF-α y TNF-β.</p>	
<p>Receptores de Quimiotocinas (receptores de siete hélices transmembrana): IL 8, RANTES, MIP-1.</p>	

Tabla 3. Clasificación de los Receptores de Membrana de las Citocinas. (Modificado de Goldsby, 2000).



2.2.3 Las Citocinas en la Respuesta Inflamatoria.

2.2.3.1 Función. La producción de citocinas, incluyendo las pro- y anti-inflamatorias, es una respuesta fisiológica a la lesión tisular. Su principal función es la coordinación de la eliminación de microorganismos invasores y la eliminación de tejidos lesionados. De esta forma se evita la estimulación excesiva del sistema inmune, que podría inducir reacciones de hipersensibilidad (García y Kaski, 2000).

Las citocinas que inician la respuesta inflamatoria son la IL-1 β y el TNF- α . Estas moléculas suelen actuar en compañía de otras citocinas como las IL-8, 10, 11, 12, 18 y el IFN- γ . Además, cuando las citocinas actúan se producen multitud de mediadores de inflamación, ya sean proteicos como el fragmento del complemento C5a, o lipídicos como el factor activador plaquetario. Estos mediadores tendrán acciones sinérgicas, induciéndose su producción entre ellos, e induciendo la producción de otras citocinas que frenarán o aumentarán las vías de autocontrol. Las citocinas también son responsables de la finalización correcta de la respuesta inflamatoria (Feldmann, 1994; García y Kaski, 2000).

2.2.3.2 La Interleucina 1 (IL-1, Citocina Pro-Inflamatoria).

Se han detectado dos genes que codifican para dos tipos de IL-1, la IL-1 α y la IL-1 β ; y un tercer gen de la familia, que codifica para el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra). La mayoría de células nucleadas producen IL-1 (Figura 10). Sin embargo, los principales productores de IL-1 en la inflamación son los macrófagos (Giri y col., 1985). La IL-1 α y la IL-1 β se unen a dos tipos diferentes de receptores, el IL1RI (que se une mejor con IL-1 α que con IL-1 β) y el IL1RII (mejor con IL-1 β ;





Dinarello y Wolf, 1993). El receptor I de IL-1 se encuentra en linfocitos T, fibroblastos, células endoteliales y hepatocitos. Por su parte, el receptor II se encuentra en linfocitos B, neutrófilos y células de la médula ósea. Sin embargo, es probable que algunas células expresen ambos tipos de receptores.

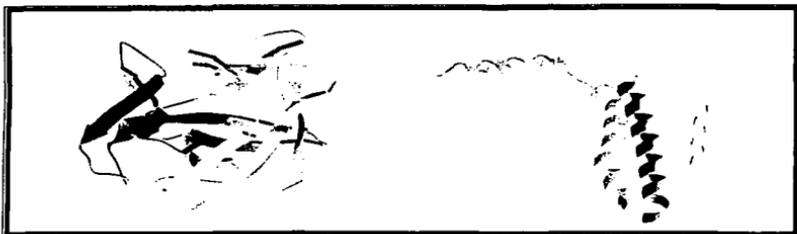


Figura 10. Estructura Macromolecular de la IL-1 β (citocina pro-inflamatoria) e IL-10 (citocina anti-inflamatoria; Modificado de www.cytokines.com)

El antagonista natural de la IL-1 es el antagonista del receptor de IL-1 (IL1Ra; Dinarello y Thompson, 1991), que compite con la IL-1 en la unión con los receptores de la superficie celular sin que desencadene las respuestas celulares típicas de la IL-1. No induce ningún cambio bioquímico ni endocrinológico cuando se inyecta por vía intravenosa en sujetos sanos (Dinarello y Thompson, 1991; Savage y col., 1989).

Las células que sintetizan citocinas, como por ejemplo, los monocitos no producen constitutivamente IL-1 sino que requieren estímulos para transcribir el gen. Diversos agentes endógenos y exógenos pueden proveer tal estímulo, por ejemplo productos microbianos como endotoxinas, exotoxinas, restos de pared celular de hongos y hemoaglutininas virales o la lesión al tejido por agentes físicos



o químicos como cristales de urato y la radiación UV. Los estímulos endógenos que inducen la producción de IL-1 incluyen; C5a (componente del complemento), otras citocinas como: TNF- α , TGF- β , la propia IL-1 y linfocinas (Speziale, 1996). También la bradicinina induce la producción de IL-1 cuando actúa sobre receptores B₁ (Dray y Perkins, 1993).

Diversos factores inhiben la producción de IL-1, como los glucocorticoides y las prostaglandinas sin afectar la transcripción, mientras que la IL-10 inhibe fuertemente la transcripción. Además la IL-4 inhibe la producción de IL-1 e induce la producción de IL-1Ra. Recientemente se ha encontrado que la IL-6 también inhibe la producción de IL-1. Además de inducir la producción de IL-1Ra y glucocorticoides (Speziale, 1996; Ahmed e Ivashkiv, 2000).

Los efectos de IL-1 son variados. Tiene un papel principal en la cascada inflamatoria, *in vitro* induce la liberación de PGE₂ por diversos tejidos, producción de proteasas y catabolismo del cartílago y del hueso, contribuyendo a la patogénesis de la inflamación crónica. Los efectos neuroendocrinos de la IL-1 incluyen acción al hipotálamo, lo que resulta en fiebre y producción del factor liberador de corticotrofina, la cual estimula la liberación de la hormona adrenocorticotrófica desde la hipófisis, que a su vez, induce la producción de glucocorticoides (Betancur y col., 1995; Turbull y River, 1999). En células como los macrófagos induce la síntesis de IL-6, IL-8, de la misma IL-1 y del TNF- α , este último está implicado en la actividad antiviral y proliferación de fibroblastos y de linfocitos T (Tartaglia y Goeddel, 1992). Además, el TNF- α es un potente inductor





de los efectos sistémicos de la inflamación como fiebre, hipotensión, taquicardia y respuesta de hormonas relacionadas con el estrés (Tracey y col., 1987).

En muchos de los efectos pro-inflamatorios se encuentran responsables juntamente con la IL-1 el TNF- α , entre estos efectos tenemos: La activación del óxido nítrico sintasa inducible, aumentando de esta forma el NO y por ende el daño tisular (Meller y Gebhart, 1993). La inducción de COX-2, aumentando la síntesis de prostaglandinas. Ambas citocina tienen un papel central en el inicio de las reacciones inflamatorias, ya que promueven la leucocitosis en la médula ósea y el reclutamiento leucocitario. Aumentan la expresión de moléculas de adhesión como la ICAM-1 y la VCAM-1 pero no ICAM-2 (Libby y col., 1988). Además son unos de los mayores inductores de la síntesis hepática de marcadores de inflamación, los reactantes de fase aguda (Gauldie y col., 1987).

2.2.3.3 Interleucina 6 (IL-6, Citocina Anti-Inflamatoria).

La IL-6 es una citocina pleitrópica, ya que puede actuar sobre diferentes tejidos estimulando funciones distintas, teniendo un papel muy importante en la respuesta inmune e inflamatoria (Reyes y García, 1993). Esta citocina se produce en multitud de tejidos diferentes. Los principales productores son los monocitos estimulados, fibroblastos y células endoteliales (Sironi y col., 1989). Los principales estímulos fisiológicos para la producción de la IL-6 en los monocitos son la IL-1 y las endotoxinas bacterianas (Bauer y col., 1988). La IL-6 actúa enlazándose con un receptor específico de alta afinidad (IL6R), que está ampliamente distribuido en las células linfoides y no linfoides (Coulie y col., 1987). El IL6R está formado por





dos glucoproteínas de membrana: gp80, que se liga a IL-6 con baja afinidad (Hirano y col., 1988), y gp130, que se liga al complejo IL-6-gp80 y transduce la señal a través de la membrana plasmática (Hibi y col. 1990). Los monocitos, hepatocitos, linfocitos B activados y linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ expresan gp80 de IL6R (Wognum y col., 1993). La IL-6 induce la diferenciación terminal de los linfocitos B (Muraguchi y col., 1988), el crecimiento y la diferenciación citotóxica de linfocitos T (Takai y col., 1988) y estimula la producción normal de células sanguíneas (Leary y col., 1988). La IL-6 es otro regulador importante de la síntesis hepática de proteínas de fase aguda (Gauldie y col., 1989).

Anteriormente se clasificaba a la IL-6 como una citocina pro-inflamatoria, porque es inducida por los estímulos inflamatorios, tal y como ocurre con la IL-1- β y el TNF- α (Ivashkiv, 1996), pero nuevas investigaciones han demostrado que está citocina, tiene un mayor efecto anti-inflamatorio, porque inhibe la expresión de citocinas pro-inflamatorias como la IL-12, TNF- α e IFN- γ e inhibe la expresión de moléculas de adhesión y proteasas ambas *in vivo* e *in vitro* (Oh y col., 1998; Ahmed e Ivashkiv, 2000). Además induce la expresión de múltiples factores anti-inflamatorios, incluidos la síntesis hepática de proteínas de fase aguda, estimulación de la hipófisis (ACTH). También aumenta la producción de glucocorticoides, de inhibidores de proteasas, estimula la producción del IL-1Ra (antagonista del receptor de IL-1), de receptores solubles de TNF e induce la expresión de la IL-10, conocida citocina anti-inflamatoria, la (Baumann y col., 1989; Tilg y col., 1994; Betancur y col., 1995; Endo, y col., 1997; Naka y col., 1997; Starr y col., 1997; Jin y col., 1998; Papanicolaou y col., 1998), está última citocina





disminuye la función de los macrófagos y es uno de los principales inhibidores de la síntesis de citocinas pro-inflamatorias (De Waal y col., 1991; Moore y col., 1993; Chomarat y col., 1993). Entre otros efectos anti-inflamatorios importantes de la IL-10 se encuentra la inhibición de la producción de NO, intermediarios de oxígeno, así como la inhibición de la adherencia de macrófagos (Moore y col., 1993).

Además, se ha observado que los macrófagos de ratones "knockout" para la IL-6, producen menos IL-10, pero además aumentan la producción de IL-12 (citocina pro-inflamatoria), en comparación con los ratones control (La Flamme y col., 2000). Muchas observaciones sugieren que la inducción de la IL-6 durante la respuesta inflamatoria, es muy similar a la inducción de la IL-10 (Ahmed e Ivashkiv, 2000). Consistentemente con todos los efectos anti-inflamatorios mencionados se ha mostrado que la IL-6 atenúa enfermedades de tipo inflamatorio como la artritis (Van de Loo y col., 1997; Xing y col., 1998). Por lo que se considera que la IL-6 tiene un gran efecto anti-inflamatorio.



2.3 Los Anti-Inflamatorios

La respuesta inflamatoria tiene una función protectora, pero cuando se inicia en algunos tejidos vitales (corazón o cerebro, por ejemplo) o cuando se vuelve crónica, se convierte en un problema clínico grave que es necesario reducir. Actualmente se cuenta con diferentes procedimientos anti-inflamatorios, pero quizá los más efectivos y más utilizados son los recursos farmacológicos. Diversos fármacos contribuyen a mejorar el proceso inflamatorio, entre los más conocidos se encuentran los anti-inflamatorios esteroides y los no esteroides.

2.3.1 Fármacos Anti-Inflamatorios No Esteroides (AINES).

2.3.1.1 Generalidades. Los anti-inflamatorios no esteroides (AINES) son un grupo de fármacos químicamente heterogéneo que suelen tener en común una actividad antipirética, analgésica y anti-inflamatoria y un perfil cualitativamente similar de efectos adversos. Son ampliamente utilizados en diferentes situaciones clínicas, de tal forma que, en dosis únicas, son analgésicos efectivos en el tratamiento del dolor leve-moderado de origen somático. A dosis anti-inflamatorias mantenidas se usan para el tratamiento sintomático del dolor e inflamación en enfermedades como la artritis reumatoide (Furst y Munster, 2001).

Los AINES son ácidos orgánicos que se absorben adecuadamente y se unen ampliamente a proteínas ($\geq 98\%$), principalmente a la albúmina. Son biotransformados por el metabolismo hepático mediante la vía CYP3A o CYP2C y son eliminados principalmente por el riñón, aunque también se excretan por la





bilis (Insel, 1996; Furst y Munster, 2001).

2.3.1.2 Mecanismo de Acción de los AINES.

La actividad anti-inflamatoria de este grupo de fármacos se debe a su capacidad de inhibir enzimas específicas, como la 5-lipooxigenasa y la ciclooxigenasa. Los AINES más empleados y comercialmente disponibles para uso clínico inhiben tanto la COX-1 como a la COX-2, y cuyo objetivo es impedir la síntesis de PG y TX, que participan decisivamente en la amplificación y desarrollo del proceso inflamatorio (Schrör, 1992). Recientemente se han desarrollado inhibidores mucho más selectivos de COX-2, prácticamente sin efecto sobre COX-1, los cuales han demostrado poseer efectos anti-inflamatorios aceptables con menor irritación de la mucosa gástrica (Chang y col., 1999). En cuanto a la inhibición de la COX se pueden establecer tres niveles de acción:

1) Inactivación irreversible de la enzima: Implica la destrucción de la actividad catalítica de la enzima. Esta actividad no podrá ser recuperada hasta que la célula sintetice nuevas moléculas de enzima. Esta es la forma en que el ácido acetilsalicílico y algunos derivados (pero no de los salicilatos no acetilados) actúan. Provocan una reacción de acilación (acetilación) de la cadena peptídica del enzima, concretamente en la serina en la posición 530 para COX-1 y 516 para la COX-2, alterando definitivamente la conformación molecular, con pérdida de la actividad ciclooxigenasa (Lecomte y col., 1994; O'Neil y col., 1994).

2) Inhibición reversible no competitiva: Supone el bloqueo de actividades colaterales necesarias para el funcionamiento catalítico de la ciclooxigenasa, como por ejemplo la recuperación del estado oxidativo del hierro del grupo hemo.





Tabla 4. Clasificación y Estructura de algunos AINES.

INHIBIDORES DE LA CICLO OXIGENASA			
Salicilatos ➤ Ácido Acetilsalicílico (Aspirina) ➤ Difunisal	 Aspirina	Derivados del Ácido Acético ➤ Diclofenaco ➤ Ketorolac ➤ Tolmetin	 Diclofenaco
Derivados del p-aminofenol ➤ Acetaminofén (paracetamol)	 Acetaminofén	Derivados del Ácido Propiónico ➤ Naproxeno ➤ Ibuprofeno ➤ Fenoprofeno ➤ Ketoprofeno	 Naproxeno
Indoles y ácidos Indenacéticos ➤ Indometacina ➤ Etodolac	 Indometacina	Derivados del Oxican ➤ Piroxicam	 Piroxicam
Derivados del ácido N-fenilantranílico (Fenamatos) ➤ Ácido Mefenámico ➤ Meclofenamato sódico	 Ácido Mefenámico	Derivados de la Pirazolona ➤ Fenilbutazona ➤ Oxifenbutazona	 Fenilbutazona
INHIBIDORES DE LA 5 LIPOOXIGENASA		OTROS AINES	
Antagonistas de la síntesis de Leucotrienos ➤ Zileuton ➤ Piriprost ➤ Docebenona	 Zileuton	Sales de Oro ➤ Aurotioglucosa ➤ Auranofin ➤ Aurotiomalato Sódico	 Aurotioglucosa

Tabla 4. Clasificación y Estructura de algunos AINES. (Modificada de Insel, 1996).





A este mecanismo, el menos conocido de los tres, se atribuye el efecto de los salicilatos, aminofenoles, quinolonas y pirazonas, entre otros (O'Neil y col., 1994).

3) Inhibición reversible competitiva: Supone el empleo de falsos sustratos que compitan con el ácido araquidónico por su unión con la ciclooxigenasa, formando complejos mucho más estables. capaces de impedir el acceso del ácido araquidónico y su subsiguiente transformación en los correspondientes prostanoides. La mayoría de los antiinflamatorios no esteroides se encuentran en este grupo (Insel, 1996; Vane y Botting, 1996).

2.3.2 Corticoesteroides y Fármacos Anti-Inflamatorios Esteroides.

2.3.2.1 Generalidades.

➤ **Corticoesteroides.** Los corticoesteroides son sintetizados a partir del colesterol, y se secretan a nivel de la corteza de la glándula suprarrenal. Su principal clasificación depende de su efecto en el balance hidrosalino o en el metabolismo de los carbohidratos. De ahí la clasificación en mineralocorticoides (aldosterona) y glucocorticoides (cortisol) respectivamente, este último grupo de corticoesteroides son los responsables de la actividad anti-inflamatoria endógena del organismo (DeGroot y col., 1989).

➤ **Fármacos Anti-Inflamatorios Esteroides.** Estos fármacos son análogos sintéticos de los glucocorticoides endógenos. Las distintas modificaciones a su estructura química son las que dan cuenta de la distinta potencia y la distinta





actividad de los preparados sintéticos (Tabla 5). Así la prednisona tiene 4 veces más potencia anti-inflamatoria que el cortisol, mientras que la dexametaxona es 30 veces más potente. Por lo que el desarrollo de este tipo de fármacos, radica en el aumento de la actividad anti-inflamatoria, pero pese a ello, la alta toxicidad de estos fármacos también ha limitado su uso (Schimmer y Parker, 1996).

Tabla 5. Estructuras del Colesterol y de Esteroides Naturales y Sintéticos.

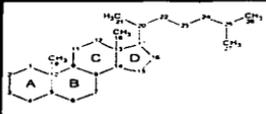
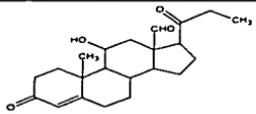
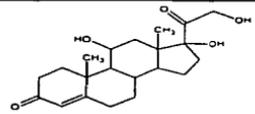
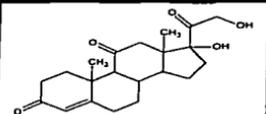
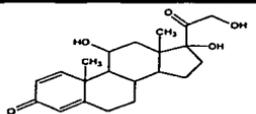
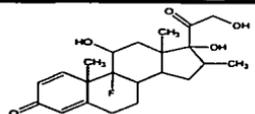
COLESTEROL	ALDOSTERONA (Natural)	CORTISOL (Natural)
		
CORTISONA (Sintético)	PREDNISONA (Sintético)	DEXAMETASONA (Sintético)
		

Tabla 5. Estructuras moleculares del precursor de corticosteroides (colesterol) y de corticosteroides naturales (aldosterona principal mineralocorticoide y cortisol principal glucoconicoide) y esteroides sintéticos (cortisona, prednisona y dexametaxona (Modificado de Insel, 1996).

2.3.2.2 Mecanismo de Acción

Los glucocorticoides y los fármacos anti-inflamatorios esteroides, como todas las hormonas esteroidales, actúan en los distintos órganos efectores mediante la incorporación al interior de la célula, porque el receptor es intracelular (actualmente se han descrito 2 tipos de receptores, uno más específico para





respuesta inflamatoria. A nivel de las células T activadas interfieren en la secreción de IL-2, inhibiendo el desarrollo de la respuesta inmune. A nivel de endotelio alteran el factor de adherencia de leucocitos, evitando la adherencia y migración de los leucocitos al foco de la inflamación. Además, estabilizan las membranas lisosomales haciéndolas más resistentes e inhiben la NO sintetasa, de esta forma protegen del daño tisular (Hall, 1993; Pelletier y col., 1993; Schimmer y Parker, 1996).

2.3.3 Toxicidad de los Fármacos Anti-Inflamatorios.

El uso terapéutico de los corticoesteroides y de fármacos esteroides en medicamentos, no se recomiendan como tratamientos de primera opción, excepto en algunos casos donde sea necesario, ya que originan dos tipos de efectos tóxicos: los que surgen por el uso continuo como: hipertensión, hiperglucemia, osteoporosis, osteonecrosis e inhibición del sistema inmunitario incrementando la sensibilidad a la infección; y los que aparecen por suspensión del tratamiento como: agravamiento de la enfermedad fundamental e insuficiencia suprarrenal aguda. Ambos efectos tóxicos ponen en gran peligro la vida del paciente (Rang y col., 1995; Schimmer y Parker, 1996).

El uso terapéutico de los AINES es más común y según cálculos aproximados unas 30 millones de personas consumen diariamente algún AINE (Gibson, 1990), pero el uso de estos fármacos en medicamentos también tienen efectos adversos, los cuales incluyen: fallo renal, hepatitis, anemia, etc., aunque los más conocidos por su frecuencia, son los gastrointestinales, de los que



destacan por su importancia las erosiones gastroduodenales, hemorragias digestivas y mayormente las úlceras (McCarthy, 1995; Lichtenstein y col., 1995).

Las úlceras aparecen como consecuencia de la inhibición sistémica de la síntesis de prostaglandinas mediante la inhibición de la enzima ciclooxigenasa. Esta enzima es responsable de muchos de los mecanismos normales de protección de la mucosa gastroduodenal (Lichtenstein y col., 1995; Polisson, 1996; Pearson y Kelberman, 1996). Uno de los pocos estudios existentes de un año de duración, señala una incidencia de úlcera del 31%, sin distinguir localización (Agrawal, 1992). Se ha descrito como término medio que más de un 20% de los pacientes en tratamiento habitual con AINE presentará alguna úlcera y que del 20% al 40% puede tener algún tipo de erosión aunque no haya clara ulceración (Singh y Ramey, 1997).

Mortalidad asociada a la gastropatía por AINE: Alrededor del 10% de los pacientes hospitalizados por hemorragia gastrointestinal alta debida a AINE mueren (Singh y col., 1996). En Estados Unidos el número de hospitalizaciones por complicaciones gastrointestinales debidas a AINE, según los datos obtenidos del estudio ARAMIS, se estima en unas 107,000 al año (Singh y Ramey, 1997). En el mismo trabajo se afirma que se producen 16,500 muertes en ese país al año debido al consumo de AINE, es decir más muertos que los producidos por asma, cáncer cervical y melanoma maligno juntos (Singh y Ramey, 1997; Singh, 1998). Los datos de la FDA son concluyentes al estimar que el consumo de AINES genera entre 100,000-200,000 hospitalizaciones al año y entre 10,000-20,000 muertes en el mismo periodo (Silverstein, 1998), lo que ha hecho que todos los





AINES en Estados Unidos llevan desde hace varios años una leyenda de aviso en el cartonaje o empaque.

2.3.4 La Indometacina.

La Indometacina (Figura 12; ácido 1-(p-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metil-3-indolacético; $C_{19}H_{16}NO_4Cl$) es un fármaco anti-inflamatorio no esteroide derivado del indol, que ejerce su efecto mediante la inhibición reversible, tanto de la COX-1 como de la COX-2 (Moskowitz, 1985), Además suprime la formación de NO, protegiendo de esta forma del daño tisular (Du y col., 1999; Berg y col., 1999). También, comparte la actividad analgésica, antipirética y de efectos adversos de este grupo de fármacos (Insel, 1996).

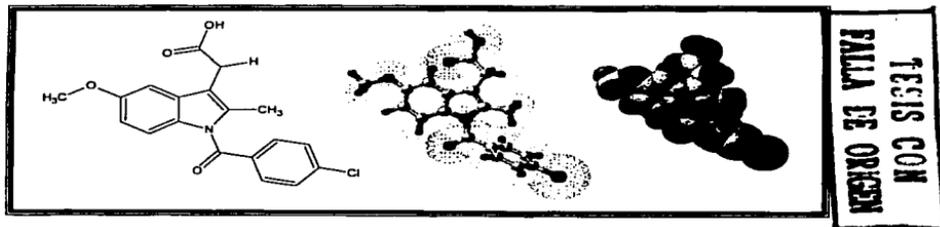


Figura 12. Estructura molecular, tridimensional y de densidad electrónica de la Indometacina (modificado de Merck Index, 1997).

Farmacocinética y Farmacodinamia en Humanos: La indometacina se absorbe rápida y casi totalmente del tracto gastrointestinal después de su ingestión oral. La concentración plasmática máxima se alcanza a las dos horas en el sujeto en ayunas, puede demorarse si la droga se ingiere después de las



comidas. La indometacina se liga en un 90% a las proteínas plasmáticas y también se une ampliamente a los tejidos. La concentración de la droga en el LCR es baja, pero su concentración en líquido sinovial es igual a la del plasma luego de cinco horas de administrada. La vida media plasmática es extremadamente variable y varía de dos a once horas (Vademécum, 2000).

La indometacina es convertida primordialmente en metabolitos inactivos, incluidos aquellos que se forman por O-desmetilación (en promedio 50%), conjugación con ácido glucurónico (en promedio 10%) y N-desacilación. Algunos de estos metabolitos son detectables en plasma, y se eliminan por orina, bilis y heces, aunque se sabe que del 10 al 20% del fármaco se excreta sin modificaciones en la orina (Insel, 1996).

La Indometacina y la Citocinas: Al igual que en otros AINES, se ha investigado el efecto de la indometacina sobre el sistema inmune y en especial sobre las citocinas que intervienen en la respuesta inflamatoria, como la IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α , etc. En este aspecto se ha reportado que los AINES afectan la concentración de citocinas de distintas maneras, pero la mayoría de este grupo de fármacos inhiben su producción (Bessler y col., 1999; Berg y col., 1999; Fiebich y col., 1999; Housby y col., 1999).

Recientes estudios han determinado el efecto de la indometacina sobre la producción de citocinas que intervienen, tanto en la respuesta inmune como en la inflamatoria. A diferencia de los fármacos anti-inflamatorios esteroides, la indometacina aumenta la producción de IL-2, aumentando de esta forma el desarrollo de la respuesta inmune (Tanaka y col., 1998), pero Inhibe la producción





de la IL-1Ra (antagonista del receptor de IL-1; Bessler y col., 2002) y de la IL-10 (citocina anti-inflamatoria), lo que sugiere que la administración de indometacina provoca un estado de mayor inflamación (Bour y col., 2000), sin embargo, la indometacina también actúa sobre otras citocinas inflamatorias.

Al revisar en la literatura, el efecto que ejerce la indometacina sobre el TNF- α , se encontraron diferencias en los resultados publicados, ya que según algunos autores, la indometacina induce un aumento en la producción de TNF- α (Murakami y col., 1999; Sirota y col., 2000), sin embargo, en otros estudios se reportó que la indometacina no tiene efecto sobre esta citocina (Caldwell y col., 1999; Du y col., 1999).

En cuanto al efecto de la indometacina sobre la producción de IL-1 e IL-6 también se encontraron discrepancias. Así, algunos investigadores han demostrado que este fármaco inhibe la producción de estas dos citocinas (Du y col., 1999; Bour y col., 2000). Mientras que en otros estudios se ha reportado que la indometacina aumenta su producción (Rainsford y col., 1997; Sironi y col., 1992). Aún más, se han publicado trabajos que informan que la indometacina no tiene efecto sobre estas citocinas (Caldwell y col., 1999).

En todos los estudios mencionados, hay al menos un experimento tanto *in vivo* como *in vitro* y/o en animales como en humanos, lo que sugiere que estas variables no intervienen o explican los diferentes resultados encontrados, posiblemente una de las variables que podría explicar las discrepancias encontradas, son las condiciones experimentales, lo que justifica en cierta forma el diseño de nuevos experimentos sobre la respuesta inflamatoria y sus tratamientos.





2.4 El Veneno de Abejas

2.4.1 Características Generales de la Abeja y su Veneno.

2.4.1.1 La Abeja: Las abejas son insectos sociales que viven en grandes colonias. La colonia está constituida por una sola reina (hembra sexualmente madura), varios miles de obreras (hembras inmaduras sexualmente) y algunos centenares de machos o zánganos (Akre, 1984).

Las abejas pertenecen al Reino Animal, Subreino Metazoarios, División Artriozoarios, Rama Artrópodos, Clase Insectos, Orden Himenopteros, Suborden Acualos, Familia Apidos, Género *Apis*, Especie *Mellifera* e incluyen 9 diferentes variedades entre las que se encuentran la *Apis dorsata* o abeja africana y la *Apis mellifera* o abeja europea. Se caracterizan por presentar el cuerpo segmentado en 3 partes (cabeza, tórax y abdomen), con 2 pares de alas y 3 de patas. Durante su desarrollo pasan por 4 estadios: huevo, larva, pupa y adulto (Morse y Hooper, 1985; Akre, 1984).

2.4.1.2 El Veneno: El veneno de la abeja es producido en las glándulas que forman parte del aparato vulnerante que se localizan entre el quinto y noveno segmento abdominal (Figura 13b). Dicho aparato consta de 2 glándulas productoras de veneno, una de las cuales produce una secreción ácida que es vertida a un conducto llamado canal del veneno, que lo lleva hasta el reservorio o saco del veneno; la otra glándula genera una secreción alcalina que es depositada directamente en la base del saco del veneno. De este saco se continúa con el aguijón a nivel del bulbo (figura 13c). El aguijón se compone de tres partes: una





corteza o estructura externa y dos lancetas dentadas (figura 13a). El aguijón posee un conducto central por el que circula el veneno proveniente del saco; este conducto se abre permitiendo la expulsión del veneno, la cual se debe a la estimulación nerviosa y al bombeo de las lancetas. El aguijón se encuentra encerrado por un par de palpos que sirven para probar la dureza de la superficie atacada y para determinar su vulnerabilidad. El aparato vulnerante se completa con un par de placas oblongas, un par de placas triangulares y un par de placas cuadradas; todas estas estructuras participan en la mecánica del aguijón (figura 13a; Mace, 1983; loirish, 1985; Morse y Hoope, 1985).

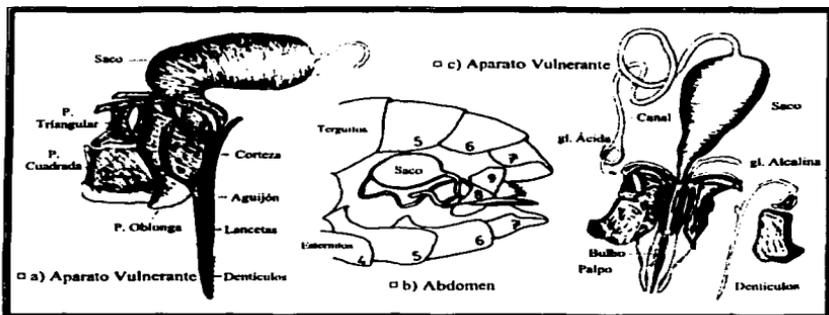


Figura 13. a y c) Aparato vulnerante de la abeja b) abdomen de la abeja (modificado de López, 1992).

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. La síntesis del veneno disminuye conforme las abejas obreras envejecen. Las abejas reinas producen



mucho más veneno que las obreras, aunque su producción es más corta. En promedio, cada saco contiene de 0.15 a 0.30 mg de veneno. Al picar la abeja, su 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 (Schumacher y col., 1996).

2.4.1.2.1 Características Físicas: El veneno producido por la abeja, recién extraído es un líquido transparente, con olor acentuado a miel, de sabor agrio y densidad aproximada de 1.1313 g/ml. Es soluble en agua y en soluciones ácidas, y casi insoluble en alcohol. Contiene del 12 al 30% de materia seca. Es de consistencia gomosa y de color amarillento, aunque a veces está oscuro debido a la fotooxidación de las aminas biogénicas histidina y triptofano (Iorish, 1985; Shipolini, 1984).

2.4.1.2.2 Composición Química y Obtención: El veneno está compuesto principalmente de péptidos, proteínas, enzimas, aminas, carbohidratos y lípidos (Tabla 6). Sin embargo, la composición del veneno varía según el método utilizado para la recolección (Akre, 1984). El método más recomendado para recolectar el veneno de muchas abejas es la estimulación eléctrica, el cual consiste en la aplicación de choques eléctricos de alta frecuencia que irritan a las abejas y provocan que piquen sobre una maya de nylon, que posteriormente se retira, se seca y se raspa el veneno que se ha depositado (Miao, 1983). La producción de veneno ha sido calculada por Schumacher en 147 μg peso seco por abeja europea (*Apis mellifera*; Schumacher y col., 1989).

**Tabla 6. Composición Química del Veneno de Abejas.**

Tipo de Molécula	Componentes	% PVS
Enzimas	✓ α Glucosidasa ✓ Fosfomonoesterasa ácida ✓ Fosfatasa Alcalina ✓ Hialuronidasa ✓ Lisofosfolipasa ✓ Fosfolipasa A ₂	✓ 0.6 % ✓ 1 % ✓ trazas ✓ 1.5-2 % ✓ 1 % ✓ 12 %
Péptidos y Proteínas	✓ Adolapina ✓ Apamina ✓ Melitina ✓ Promelitina ✓ Péptido 401 (MCD) ✓ Procamina ✓ Secapina ✓ Tertiopina	✓ 0.8 % ✓ 3 % ✓ 40-50 % ✓ 1 % ✓ 2 % ✓ 1.4 % ✓ 0.5 % ✓ 0.1 %
Aminoácidos	✓ Ácido β amino isobutírico ✓ Ácido γ aminobutírico ✓ Otros 17 aminoácidos libres	✓ 0.02 % ✓ 0.04 % ✓ Trazas
Aminas Biogénicas	✓ Histamina ✓ Serotonina ✓ Dopamina ✓ Norepinefrina	✓ 0.6-1.6 % ✓ — ✓ — ✓ —
Carbohidratos	✓ Glucosa ✓ Fructosa	✓ 0.7 % ✓ 0.9 %
Lípidos	✓ —	✓ 5 %

* % del Peso del Veneno Seco --- Sin datos

(Tabla modificada de Shipolini, 1984; Dotimas y col., 1987)

Además de los componentes mencionados deben considerarse, las sustancias volátiles que no son detectadas en el veneno (porque se volatilizan al desecarse éste), entre las que se encuentran las feromonas de alarma, que son expulsadas por el insecto cuando pica (Mace, 1983).



2.4.2 Toxicidad del Veneno de Abejas.

Algunas de las proteínas que contiene el VA son tóxicas y otras son alérgicas que también pueden causar la muerte a través de graves reacciones de hipersensibilidad de tipo I. El componente más alérgico es la fosfolipasa A2, mientras que la melitina es el más letal, pero no presentan un efecto sinérgico cuando se encuentran combinadas (Schmidt, 1995). 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 (Schumacher y col., 1996). 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, por lo que su utilización debe de hacerse bajo estricto control médico o previas pruebas de sensibilidad (Atkinson, 1995). La terapia existente para contrarrestar la letalidad del VA es de soporte y sintomática y se carece de un suero antiveneno de abeja para los humanos (Schumacher y col., 1996).

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 (DL_{50}) 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 (Schumacher y col., 1989). En los ratones, se han reportado 6 mg/Kg (Habermann, 1972) y 7.4 mg/kg (Chen y col., 1993) como las dosis letales.



2.4.3 Propiedades Bioquímicas y Farmacológicas del Veneno de Abejas.

Varios trabajos de investigación experimental publicados 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 (Hyre y Smith, 1986; jutel y col., 1995). 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-T_H2 que es característica de las personas alérgicas a otra predominante del tipo T_H1. Estos resultados se han obtenido cuando se la ha estudiado en los linfocitos de la sangre periférica de los pacientes alérgicos a este veneno (Jutel y col., 1995, Bellinghausen y col., 1997; McHaugh y col., 1995). También se ha investigado el uso completo del veneno, en enfermedades como la artritis reumatoide y los resultados sugieren que la administración del veneno produce una mejoría de los síntomas articulares (Chang y Bliven, 1979; Eiseman y col., 1982; loirish, 1985). En estudios sobre los componentes aislados del veneno de abeja se ha encontrado gran actividad farmacológica y bioquímica, como se menciona a continuación:

2.4.3.1 Melitina: Es el compuesto (polipéptido) más abundante del veneno, y representa del 40-50% del pvs, su peso molecular es de 2,840 daltones con 26 aminoácidos. Boman y col. utilizaron un híbrido de melitina y demostraron que esta tenía efectos antibacterianos, como por ejemplo, sobre el estafilococo dorado (*Staphylococcus aureus*; Boman y col. 1989). Otros investigadores encontraron que la melitina posee una actividad anticoagulante en los conejos (Lin y col.,



1983), también se reportó que estimula la secreción de la hormona luteinizante (Kiesel y col., 1987) y prolactina (Grandison, 1984), estas dos últimas en bovino. Además, tiene la capacidad de formar agujeros en las membranas de las células donde actúa, induciendo su lisis (González y col., 1997), y provocar vasodilatación al inducir la liberación de histamina por las células cebadas y de serotonina por las plaquetas (Habermann, 1972). También aumenta la fagocitosis en ratones y cuyes (Kondo, 1986; Kondo y Kanai, 1986) e incrementa los niveles de glucocorticoides en plasma sanguíneo (Dunn y Killion 1988a; Dunn y Killion 1988b), y recientemente se reportó que la melitina incrementa la expresión de los genes que codifican para el TNF- α y la COX-2 en macrófagos, aumentando la producción de eicosanoides (Ribardo y col., 2002).

2.4.3.2 Péptido 401 (MCD; Péptido Degranulador de Células Cebadas):

Consiste en 22 residuos de aminoácidos. Representa el 2% del pvs, pero es 100 veces más activo que la melitina, aunque ésta constituye aproximadamente el 50% del veneno de abeja. A bajas concentraciones, el MCD provoca que los mastocitos liberen el contenido de sus gránulos, los cuales contienen principalmente sustancias proinflamatorias como la histamina y neurotransmisores como la serotonina y la misma histamina, así como también grandes cantidades de proteasas y de TNF- α (Leal-Berumen y col., 1996, Ziai y col, 1990), que pueden disminuir la presión arterial, al provocar vasodilatación y aumento de la permeabilidad capilar. Paradójicamente, al MCD también se le atribuye una alta actividad biológica anti-inflamatoria en lesiones edematosas (Banks, 1990; Harter





y Martin, 1981), la cual ha sido comprobada en animales de laboratorio a los cuales se les induce previamente artritis mediante la inyección de adyuvantes (Chang y Bliven, 1979, Eiseman y col., 1982). Sin embargo, no se conoce el mecanismo por el cual el MCD ejerce su actividad anti-inflamatoria.

2.4.3.3 Apamina: Representa el 3% del pvs y está formado por 18 residuos de aminoácidos. En la actualidad se dispone de compuestos sintéticos llamados isoapaminas (Gmachi y Kreil, 1995). Su actividad biológica en el veneno es la de una neurotoxina, estimula las neuronas del SNC y puede provocar crisis de epilepsia (Habermann y Fischer, 1979). Además, tiene efectos inhibitorios en la estimulación nerviosa del músculo liso, al inhibir a los canales de K^{1+} , dependientes de Ca^{2+} (Habermann y Horváth, 1980 Marquéze y col., 1987). Sus receptores de alta afinidad se han identificado en el corazón de la rata, músculo liso e hígado, y en el ileon de cobayo (Habermann y Fischer, 1979, Hugues y col., 1982, Marquéze y col., 1987).

2.4.3.4 Adolapina: Polipéptido que consiste en 103 aminoácidos (excepto treonina, metionina e histidina); representa el 0.8% del pvs. Su actividad muestra un amplio espectro en la inhibición de las enzimas proteolíticas de diferentes fuentes; pero no tiene efecto sobre la pepsina. La actividad sobre la tripsina y quimotripsina es del 50%. Recientemente se han aislado 2 compuestos, el H1 y H2 cuya composición de aminoácidos es muy semejante a la del inhibidor de proteasa. Es posible que el efecto del inhibidor de proteasa sea secundario a su actividad biológica real. No es tóxico en mamíferos (Shipolini, 1984). Otros





estudios han revelado su potente actividad analgésica en el ratón, así como inhibidor de la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa, ambas enzimas se encuentran involucradas en la síntesis de eicosanoides (Shkenderov y Koburova, 1982). Este componente posee efectos farmacológicos como anti-inflamatorio y antipirético comprobados en pruebas con animales de laboratorio (Koburova y col., 1984; Koburova y col., 1985).

2.4.3.5 Secapina: Péptido menos importante, que se encuentra en concentraciones menores de 1% este componente se considera prácticamente no tóxico, produce hipotermia y sedación, su presencia en el veneno puede estar asociada con la actividad en el sistema nervioso central que se observa después de la picadura (Shipolini, 1984).

2.4.3.6 Fosfolipasa A₂: Representa aproximadamente el 12% del pvs y su peso es de 15,800 daltones con 134 aminoácidos. Es un poderoso alergeno (Shipolini, 1984). Libera los ácidos grasos (AA) de los fosfolípidos de las membranas celulares, los cuales, a su vez dan origen a moléculas como prostaglandinas, Tromboxano y Leucotrienos. Conforme algunos investigadores, incrementa la permeabilidad capilar, disminuye la presión sanguínea, causa la contracción de la musculatura lisa y puede causar toxicidad en tejidos (Piek, 1984). También estimula la liberación de prolactina y hormona luteinizante en bovinos (Grandison, 1984; Kiesel y col., 1987).





2.4.3.7 Hialuronidasa: Su peso es de 35,000 a 40,000 daltones; representa del 1.5 al 2% del pvs y contiene 7.5% de carbohidratos. Alcanza su máxima concentración en el saco del veneno a los pocos días de haber emergido (5-7 días), y puede permanecer así durante toda su vida (Shipolini, 1984; Kemeny y col., 1984). 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 (Gmachi y Kreil, 1993).

2.4.3.8 Lisofosfolipasa: Representa el 1% del pvs; su peso es de 22,000 Daltones. Su actividad óptima es a un pH de 9. Contiene 2.6% de azúcares. Esta enzima tiene efecto inhibitorio en la actividad de fosfolipasa A₂ (Shipolini, 1984).

2.4.3.9 Histamina: Es la amina biogénica más frecuente en el veneno, con un peso molecular de 11,000 daltones. Ausente en la abeja recién emergida, se va incrementando con la edad llegando a alcanzar su máxima concentración entre los 35-45 días. Representa del 0.6-1.6% del pvs. Su toxicidad en mamíferos varía un poco, según el individuo. La toxicidad de la histamina en invertebrados sólo se ha reportado en abejas obreras (30 ng). La histamina se considera como un agente activo muy poderoso que causa un rápido descenso en la presión sanguínea, produce dilatación y aumento en la permeabilidad capilar, así como la sensación de dolor, se considera que su presencia en el veneno puede tener un papel importante en la liberación de catecolaminas del organismo (Shipolini, 1984).



2.4.4 Usos y Aplicaciones del Veneno de Abejas

Al igual que otros productos de las abejas, el veneno ha sido utilizado en la medicina tradicional de Europa, Asia y África desde épocas remotas, de una manera empírica en el tratamiento de varias enfermedades. Sin embargo, no es sino hasta finales del siglo XIX y principios del XX cuando comenzaron a difundirse más ampliamente las observaciones clínicas realizadas con pacientes. Por ejemplo, la miel de abeja, aplicada sobre las úlceras de la piel, parece mejorar las infecciones y acelera la cicatrización de los tejidos, la inyección de pequeñas dosis del veneno de abejas ayuda a desensibilizar a las personas alérgicas, principalmente las ocupacionalmente expuestas, la aplicación tópica de ungüentos que contienen extractos del veneno son utilizados 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. En la actualidad se ha corroborado científicamente que el uso del veneno completo y sus componentes aislados son benéficos en el tratamiento de algunos padecimientos de humanos como la artritis. El trabajo clínico ha sido respaldado con experimentos de laboratorio, los cuales validan, en buena medida, su uso (Chang y Oliver, 1979; Harter y Martin, 1981; Eiseman y col., 1982; Shkenderov y Koburova, 1982; loirish, 1985; Koburova y col., 1985; Banks, 1990). loirish reporta muchas de las prácticas terapéuticas que se han llevado a cabo en clínicas de la Unión Soviética, y menciona que se han tenido resultados alentadores en problemas como iritis (loirish, 1985); sin embargo en el presente los trabajos sobre estos usos son muy escasos.





III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General.

- Estudiar el efecto que tiene el veneno de abejas sobre la producción de citocinas pro- y anti-inflamatorias.

3.2 Objetivos Particulares.

- Conocer el efecto de la inyección intra-articular de lipopolisacárido (LPS) sobre la producción de las citocinas IL-6 e IL-1 en el suero de ratones.
- Conocer el efecto del tratamiento con veneno de abejas sobre la concentración de la IL-6 e IL-1 en el suero de ratones.
- Conocer el efecto de la administración oral de una dosis de indometacina sobre la concentración de la IL-6 y de la IL-1 en el suero de ratones.





IV. HIPÓTESIS

Se ha comprobado experimentalmente que el veneno de abeja ha tenido buenos resultados en el tratamiento de enfermedades de tipo inflamatorias como es el caso de la artritis reumatoide, por lo que se espera que el Veneno de Abejas administrado por vía subcutánea en ratones a los que previamente se les indujo una respuesta inflamatoria con LPS, tenga efecto sobre la producción de citocinas de la siguiente manera:

- La administración subcutánea de veneno de abejas, debe aumentar la concentración de las citocinas anti-inflamatorias, como es el caso de la IL-6, al mismo tiempo que va a disminuir la concentración de las citocinas pro-inflamatorias, como es el caso de la IL-1, en el suero de ratones.

Por lo que respecta a la administración de la indometacina los antecedentes teóricos no nos permiten hacer una mejor predicción, pero tratándose de un anti-inflamatorio no esteroide esperamos que:

- La administración de indometacina, debe disminuir la concentración de IL-1 (citocina pro-inflamatoria), pero debe aumentar la concentración de la IL-6 (citocina anti-inflamatoria), en el suero de ratones.





V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Animales.

Se utilizaron 45 ratones machos CBA/Ca de 4 meses de edad con un peso corporal promedio de 25 g, provenientes del bioterio de la FES-Zaragoza de la UNAM. Se mantuvieron en cajas de policarbonato con rejillas de acero inoxidable, en un cuarto con filtración de aire y ciclos de 12 horas de luz/oscuridad, comenzando a las 6 de la mañana. A todos los animales se les permitió el libre acceso a comida (Harlam) y agua. Para el empleo y manejo de los ratones se tuvo en cuenta los procedimientos recomendados en las Guías de Consulta para el Cuidado y el Uso de Animales de Experimentación (Zimmermann, 1983).

5.2 Fármacos y Sustancias.

➤ **Lipopolisacáridos.** Solución estéril de LPS de *Escherichia coli* (Sigma), administrados intra-articularmente en las rodillas de los ratones (50 ng en *clu*).

➤ **Veneno de abejas.** Una solución estéril de VA (Sigma) en SSI, administrados vía SC, a una dosis de 1.0 mg/Kg de peso corporal.

➤ **Indometacina.** Una solución estéril de indometacina (Sigma) en SSI/Tween-20, administrados vía oral, a una dosis de 3 mg/Kg de peso corporal.

Nota: ver en el apéndice soluciones y reactivos.





5.3 Metodología.

5.3.1 *Inducción de la Respuesta Inflamatoria.*

Para estudiar el efecto del veneno de abejas y la indometacina sobre la producción de IL-6 e IL-1, se ocuparon 45 ratones machos CBA/Ca de 4 meses de edad, los cuales fueron divididos en tres grupos de 15 animales cada uno. Al primer grupo (LPS) se le provocó una respuesta inflamatoria, aguda, en las articulaciones de las rodillas mediante la inyección de una sola dosis (50 ng en cada articulación, en un volumen de 5 μ l) de lipopolisacáridos (LPS) bacterianos, el primer día de experimentación. El segundo grupo (SSI) recibió una dosis diaria (5 μ l) de una solución salina isotónica (SSI) estéril, durante dos días seguidos en cada rodilla. El tercer grupo (NADA) estuvo formado por ratones que no reciben inyección alguna. Estos dos últimos grupos constituyeron los grupos control del experimento.

5.3.2 *Tratamiento con Veneno de Abejas e Indometacina.*

Cada uno de los tres grupos formados anteriormente se dividió en 3 subgrupos de 5 ratones cada uno, según el agente anti-inflamatorio recibido. Así, el primer tratamiento consistió en la inyección de dos dosis de una solución de veneno de abejas (1 mg/Kg de peso/dosis) por vía subcutánea, a todos los ratones de los subgrupos I LPS, I SSI y I NADA. En el segundo tratamiento se administraron dos dosis de indometacina (INDO) por vía oral (3 mg/Kg/dosis), a





todos los animales de los subgrupos II LPS, II SSI y II NADA. El tercer subgrupo de ratones (III LPS, III SSI y III NADA) no se les dio tratamiento adicional alguno.

5.3.3 Obtención de la Muestra de Sangre y Separación del Suero.

Después de 24 horas de la inyección intra-articular se anestesió a los ratones con éter y se obtuvo sangre por el seno orbital, después de lo cual se sacrificó cada ratón por dislocación cervical. La sangre obtenida de cada ratón se dejó coagular una hora a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 1000 rpm en una centrifuga clinica, durante 10 minutos. Después se separó el suero y se guardó en viales (Eppendorf) que fueron guardados en un ultracongelador (REVCO) a -72°C , hasta que se cuantificó en cada uno de ellos la concentración de las interleucinas 1 y 6 por el método de ELISA-sandwich.

5.3.4 Cuantificación de Citocinas por ELISA "Sandwich".

5.3.4.1 Cuantificación de IL-6. La cantidad de IL-6 en suero de ratón se determinó empleando la técnica de ELISA-sandwich (Crowther, 1995), la cual consistió en:

1.- Adición del primer anticuerpo o anticuerpo de captura. El primer anticuerpo monoclonal (mAb) anti IL-6 murina se diluyó a $2\ \mu\text{g/ml}$ en el buffer de NaHCO_3 (J.T. Baker) 0.1M , a pH de 8.2, tapándose la microplaca EIA (Costar) y





dejándose que se adhirieran los anticuerpos a la microplaca, incubando a 4°C durante toda la noche.

2.- Bloqueo. Al día siguiente se lavó la placa 3 veces con PBS/Tween-20 y se bloqueó con 100 μ l de albúmina sérica bovina al 3% (para bloquear el ligando no específico), por dos horas.

3.- Estándar y muestras. Al término de este tiempo se volvió a lavar la placa 4 veces con la solución de lavado y luego se agregaron en los pozos correspondientes 100 μ l del estándar de IL-6 recombinante, murina, por duplicado a diluciones 2X (para la curva patón) y luego, en los respectivos pozos se añade cada muestra de suero (50 μ l); éstas últimas diluidas 1:2 en PBS/BSA al 1%, incubándose la placa de nuevo toda la noche a 4°C.

4.- Segundo anticuerpo monoclonal, biotinilado. La placa se lavó 6 veces con la solución de PBS/Tween-20 y en seguida se adicionaron 100 μ l del mAb anti IL-6, murina, biotinilado, diluido a 1 μ g/ml en PBS/BSA. La placa se cubrió y se dejó incubar a temperatura ambiente por una hora.

5.-Solución de estreptoavidina peroxidasa (S-HRP). Después de lavar 6 veces la placa con la solución de lavado, se agregó a cada pozo 100 μ l de esta enzima (diluida 1:4,000) y dejando a temperatura ambiente por 45 minutos.

6.- Añadir el sustrato de la peroxidasa (ABTS). La placa se lavó 8 veces más y luego se adicionaron 100 μ l sustrato de la enzima, tapando la reacción de la luz. La placa se incubó por 15 minutos más, después de los cuales la reacción se detuvo con dimetilformamida en agua, al 50%.





7.- Lectura de la DO. La densidad óptica de las diluciones del estándar y de las muestras problema se leyó a una longitud de onda de 405 nm, en el lector de placas para ELISA (Dynex). La cuantificación de la interleucina 6 en suero se calculó interpolando los valores de las absorbancias registradas para cada muestra en su curva patrón correspondiente.

5.3.4.2 Cuantificación de IL-1 β . Para determinar la cantidad de IL-1 en el suero de los ratones de este experimento se utilizó también la técnica de ELISA-sandwich, con un kit comercial (R&D Systems) en el que el anticuerpo de captura ya se encontraba adherido a la superficie de los pozos de la placa. Sólo se agregaron el estándar diluido (desde 500 hasta 15 pg/ml, en diluciones seriadas 2X) y las muestras de suero, diluidas 1:2, como en el caso anterior, incubándose por dos horas. Después, la placa se lavó 5 veces con la solución de lavado y luego se agregó el segundo anticuerpo biotinilado, marcado con fosfatasa alcalina, dejándose incubar durante una hora. Al finalizar este periodo de tiempo, la placa se lavó 10 veces más y se le agregó el sustrato de la enzima (Reactivo color; R&D Systems) a cada uno de los pozos. Después de incubar por 20 minutos, la reacción se paró con ácido clorhídrico diluido (R&D Systems) y se hizo la lectura de la D.O. a 450 nm en el mismo lector de ELISA (Dynex). La cantidad de IL-1 en los sueros problema se obtuvo mediante la interpolación de los valores de la D.O. de cada muestra en la curva patrón.

Nota: ver en el apéndice soluciones y reactivos.





5.4 Análisis Estadístico.

Los resultados obtenidos se expresan como el promedio \pm el error estándar de la media aritmética de al menos 5 ratones por cada grupo. Con los datos obtenidos se hicieron gráficas mediante el programa Prism 3.0, que muestran la relación del efecto del veneno de abejas y la indometacina sobre la producción de IL-6 e IL-1, donde las concentraciones de dichas citocinas se expresan en pg/ml.

Finalmente se realizó un análisis estadístico de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Tukey con el programa SigmaStat 2.03, para determinar si las diferencias entre los distintos tratamientos son significativas o no, una $p < 0.05$ se considero significativa.

5.5 Diseño Experimental.

Para estudiar el efecto del veneno de abejas y de la indometacina sobre la producción de IL-6 e IL-1 en suero se indujo una respuesta inflamatoria aguda en las articulaciones de la rodilla de un grupo de ratones, mediante la inyección de una sola dosis de LPS. Cuarenta y cinco ratones machos CBA/Ca de 4 meses de edad se dividieron en 3 grupos de 15 animales cada uno, según el tipo de inyección intra-articular que se les aplicó. El grupo I recibió una sola dosis de LPS el segundo día del experimento, al grupo II se le inyectó SSI estéril (una dosis durante el 1er y 2o día de experimentación) y el grupo III no recibió inyección alguna. Estos tres grupos fueron divididos a su vez en 3 subgrupos de 5 animales





cada uno, de acuerdo al tratamiento anti-inflamatorio administrado. El grupo VA recibió 2 inyecciones subcutáneas de veneno de abejas, al grupo INDO se le administró una solución de indometacina, por vía oral, durante dos días seguidos y el grupo NADA no recibió tratamiento. Al tercer día de iniciado el experimento se sacrifica cada ratón y se obtiene su sangre, se separa el suero y se guarda en REVCO a -72°C . Por último, se cuantifica la concentración de las Interleucinas 1 y 6 en suero por ELISA-sandwich y con los valores obtenidos de cada experimento se realizó un análisis estadístico para determinar si existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos aplicados.



Diagrama del Diseño Experimental:

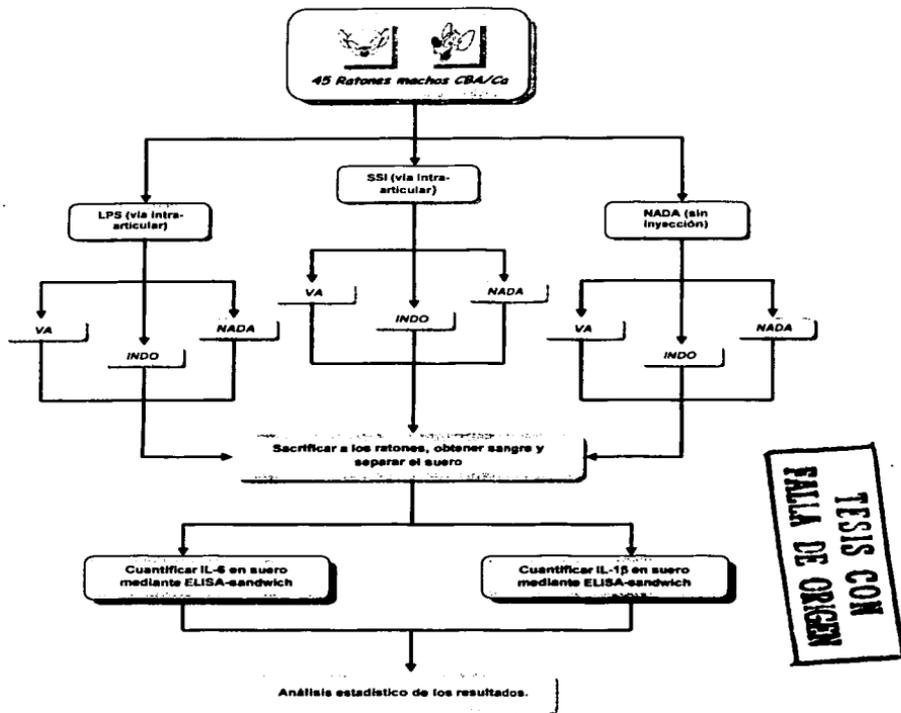


Figura 14. Diagrama del diseño experimental: VA = administración de veneno de abeja por vía subcutánea
INDO = administración de indometacina por vía oral; NADA = sin administración o tratamiento.





VI. RESULTADOS.

6.1 Resultados para IL-6

> Efecto de la administración de Lipopolisacáridos.

La administración intra-articular de LPS en los ratones produjo una disminución significativa ($p < 0.05$) en la concentración de IL-6 en suero de los ratones, tanto en los animales sin tratamiento como en los que habían recibido veneno de abejas o indometacina, como se puede observar en las primeras columnas de las gráficas 4, 5 y 6.

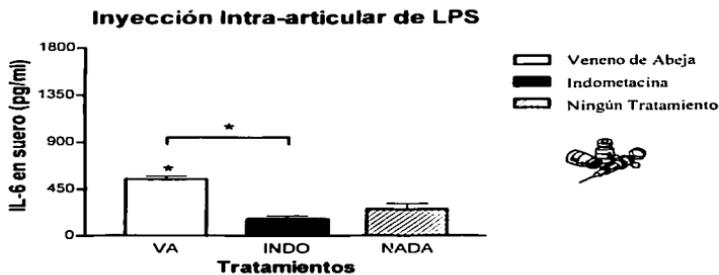
> Efecto de la administración de Indometacina.

La administración de dos dosis de indometacina por vía oral, después de haber estimulado una respuesta inflamatoria en las rodillas de los ratones, y después de la administración de SSI y también en los ratones control, redujo muy significativamente ($p < 0.001$, 0.01, 0.001 respectivamente) la concentración de la IL-6 en el suero. Este efecto se hace evidente en las gráficas 1, 2 y 3.

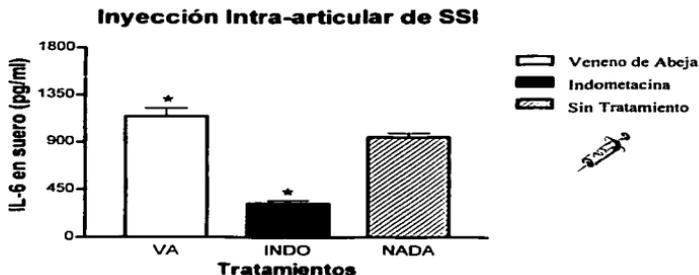
> Efecto de la administración de Veneno de Abejas.

La concentración de IL-6 en el suero de ratón, se vio aumentada significativamente ($p < 0.05$) por la administración del VA, pero solo cuando se estimuló una respuesta inflamatoria, como fue el caso de la inyección intra-articular de LPS y SSI (gráficas 1 y 2). Pero la concentración de IL-6 no se modificó en los ratones tratados con VA que no recibieron alguna inyección intra-articular y que por lo tanto no desarrollaron una respuesta inflamatoria (gráfica 3).





Gráfica 1. Gráfica que muestra el efecto de los tres diferentes tratamientos: veneno de abeja, Indometacina y sin tratamiento, sobre la concentración de IL-6 en pg/ml, en suero de ratón, previa inducción de una respuesta inflamatoria mediante una inyección de lipopolisacáridos vía intra-articular en las rodillas de los ratones.

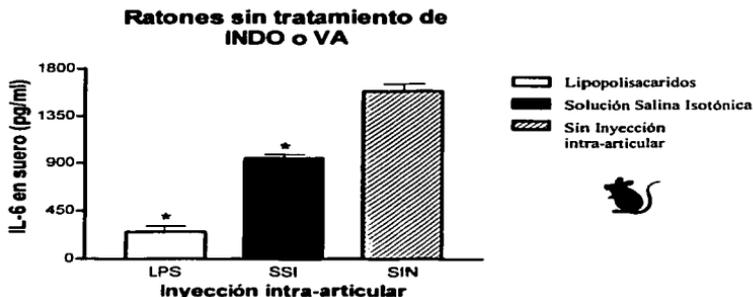


Gráfica 2. Gráfica que muestra el efecto de los tres diferentes tratamientos (veneno de abeja, Indometacina y sin tratamiento) sobre la concentración de IL-6 en pg/ml en suero de ratón, previa administración de solución salina isotónica (SSI) por vía intra-articular.

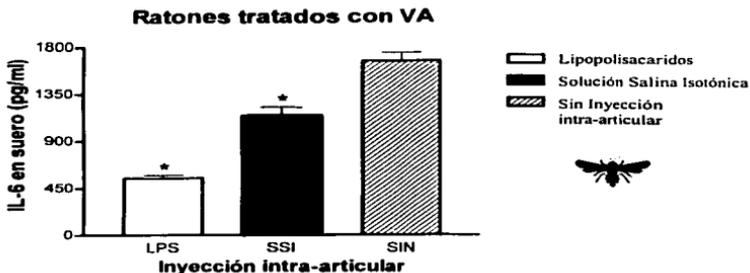




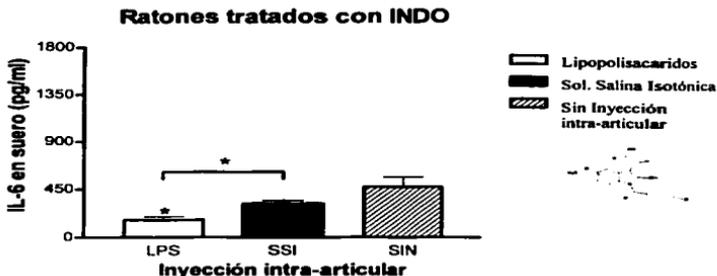
Gráfica 3. Gráfica que muestra el efecto de la administración de veneno de abeja (VA) por vía subcutánea, indometacina (INDO) por vía oral y sin administración de tratamiento (NADA) sobre la concentración de IL-6 en suero de ratón, sin haber provocado una respuesta inflamatoria (sin inyección intra-articular).



Gráfica 4. Gráfica que muestra el efecto de la administración de lipopolisacáridos (LPS) por vía intra-articular, solución salina isotónica (SSI) por vía intra-articular y sin administración (NADA) sobre la concentración de IL-6 en pg/ml en suero de ratones que no recibieron tratamiento de veneno de abeja ni de indometacina.



Gráfica 5. Gráfica que muestra el efecto de la administración de veneno de Abeja (VA) por vía subcutánea, sobre la concentración de IL-6 en pg/ml en suero de ratón, previa administración de lipopolisacáridos (LPS) por vía intra-articular, solución salina isotónica por vía intra-articular (SSI) y sin inyección o administración (SIN).



Gráfica 6. Gráfica que muestra el efecto de la administración de indometacina (INDO) por vía oral, sobre la concentración de IL-6 en pg/ml en suero de ratón, previa administración de lipopolisacáridos (LPS) y de solución salina isotónica, ambas por vía intra-articular (SSI) y sin inyección o administración (SIN).



6.2 Análisis Estadístico para IL-6

Tabla 7. Resultados Estadísticos para IL-6.

Investación Intra-Articular	Tratamiento	H. Geométrico (p. mediana)	Prueba Estadística (p. valor)
LPS (Lipopolisacáridos)	VA	545.0 ± 28.7	VA vs INDO p < 0.001
	INDO	161.8 ± 28.1	INDO vs NADA p > 0.05
	NADA	254.7 ± 53.7	NADA vs VA p < 0.01
SSI (solución Salina Isotónica)	VA	1142 ± 77.5	VA vs INDO p < 0.001
	INDO	314.3 ± 26.6	INDO vs NADA p < 0.001
	NADA	943.0 ± 37.7	NADA vs VA p < 0.05
SIN (Sin Inyección Intra-Articular)	VA	1665 ± 82.3	VA vs INDO p < 0.001
	INDO	470.3 ± 92.1	INDO vs NADA p < 0.001
	NADA	1585 ± 69.1	NADA vs VA p > 0.05
Tratamiento	Investación Intra-Articular	H. Geométrico (p. mediana)	Prueba Estadística (p. valor)
VA (Veneno de Abeja Vía Subcutánea)	LPS	545.0 ± 28.7	LPS vs SSI p < 0.001
	SSI	1142 ± 77.5	SSI vs SIN p < 0.001
	SIN	1165 ± 82.3	SIN vs LPS p < 0.01
INDO (Indometacina Vía Oral)	LPS	161.8 ± 28.1	LPS vs SSI p > 0.05
	SSI	314.3 ± 26.6	SSI vs SIN p > 0.05
	SIN	470.3 ± 92.1	SIN vs LPS p < 0.05
NADA (Ningún Tratamiento)	LPS	254.7 ± 53.7	LPS vs SSI p < 0.001
	SSI	943 ± 37.7	SSI vs SIN p < 0.001
	SIN	1585 ± 69.1	SIN vs LPS p < 0.001

TEJES CON
PALA DE ORIGEN



6.3 Resultados para IL-1 β

➤ **Efecto de la administración de Indometacina.**

La administración de dos dosis de Indometacina por vía oral, redujo significativamente ($p < 0.05$) la concentración en suero de IL-1 β , pero únicamente cuando se estimuló una respuesta inflamatoria, este efecto se puede observar en las graficas 7 y 12, pero la administración de Indometacina no tuvo efecto cuando se administró previamente SSI y cuando no recibieron inyección alguna los ratones control (graficas 8 y 9 respectivamente).

➤ **Efecto de la administración de Veneno de Abejas.**

Las dos dosis de veneno de abeja en los ratones por vía subcutánea no afectaron en ningún tratamiento la concentración de IL-1 β en el suero del ratón, esta observación se hace evidente en las graficas 7, 8 y 9.

➤ **Análisis Estadístico de los resultados.**

Todos los resultados obtenidos tanto de IL-1 β como de IL-6 fueron analizados estadísticamente para comprobar si las diferencias encontradas eran o no significativas mediante un análisis de varianza (ANOVA), seguida de otra prueba estadística complementaria a ANOVA (prueba de Tukey) que compara cada uno de los tratamientos, una $p < 0.05$ se considero significativa. Los resultados estadísticos se muestran en las tablas 7 y 8.





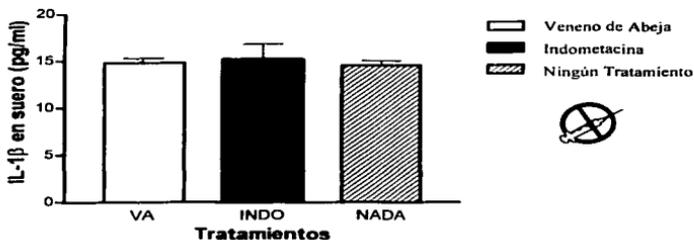
Gráfica 7. Gráfica que muestra el efecto de los tres diferentes tratamientos: veneno de abeja, indometacina y sin tratamiento, sobre la concentración de IL-1 β en suero de ratón, previa inducción de una respuesta inflamatoria mediante una inyección de lipopolisacáridos vía intra-articular en las rodillas de los ratones.



Gráfica 8. Gráfica que muestra el efecto de los tres diferentes tratamientos (veneno de abeja, indometacina y sin tratamiento) sobre la concentración de IL-1 β en suero de ratón, previa administración de solución salina isotónica (SSI) por vía intra-articular.

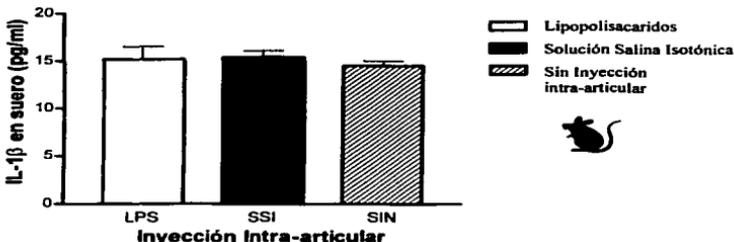


Sin Inyección Intra-articular de LPS o SSI

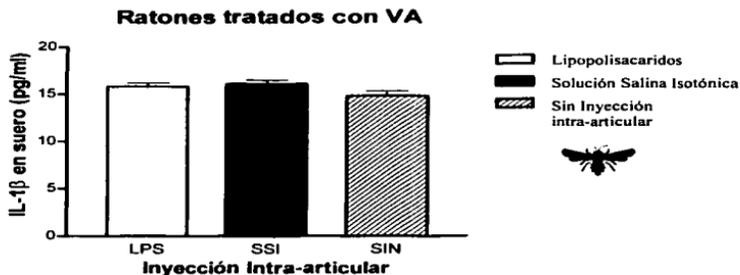


Gráfica 9. Gráfica que muestra el efecto de la administración de veneno de abeja (VA) por vía subcutánea, indometacina (INDO) por vía oral y sin administración de tratamiento (NADA) sobre la concentración de IL-1 β en suero de ratón, sin haber provocado una respuesta inflamatoria (sin inyección intra-articular).

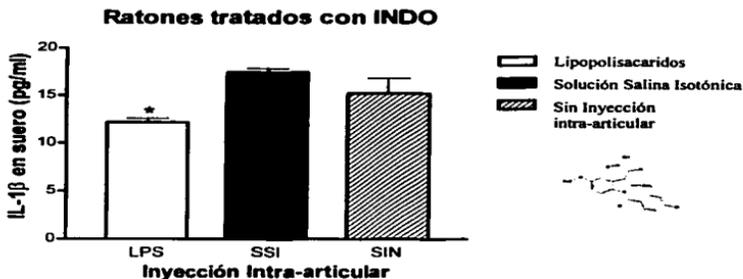
Ratones sin tratamiento de INDO o VA



Gráfica 10. Gráfica que muestra el efecto de la administración de lipopolisacáridos (LPS) por vía intra-articular, solución salina isotónica (SSI) por vía intra-articular y sin administración (NADA) sobre la concentración de IL-1 β en suero de ratones que no recibieron tratamiento de veneno de abeja ni de indometacina.



Gráfica 11. Gráfica que muestra el efecto de la administración de veneno de Abeja (VA) por vía subcutánea, sobre la producción de IL-1 β en pg/ml en suero de ratón, previa administración de lipopolisacáridos (LPS) por vía intra-articular, solución salina isotónica por vía intra-articular (SSI) y sin inyección o administración (SIN).



Gráfica 12. Gráfica que muestra el efecto de la administración de indometacina (INDO) por vía oral, sobre la producción de IL-1 β en suero de ratón, previa administración de lipopolisacáridos (LPS) y de solución salina isotónica, ambas por vía intra-articular (SSI) y sin inyección o administración (SIN).



6.4 Análisis Estadístico para IL-1 β

Tabla 8. Resultados Estadísticos para IL-1 β .

Inyección Intra-Articular	Tratamiento	IL-1 β (pg/ml) promedio \pm error	Prueba Estadística (p-valor)
LPS (Lipopolisacáridos)	VA	15.8 \pm 0.37	VA vs INDO p < 0.05
	INDO	12.2 \pm 0.37	INDO vs NADA p < 0.05
	NADA	15.2 \pm 0.32	NADA vs VA p > 0.05
SSI (solución Salina Isotónica)	VA	16.0 \pm 0.44	VA vs INDO p > 0.05
	INDO	17.4 \pm 0.40	INDO vs NADA p > 0.05
	NADA	15.4 \pm 0.67	NADA vs VA p > 0.05
SIN (Sin Inyección Intra-Articular)	VA	14.8 \pm 0.48	VA vs INDO p > 0.05
	INDO	15.2 \pm 1.59	INDO vs NADA p > 0.05
	NADA	14.5 \pm 0.50	NADA vs VA p > 0.05
VA (Veneno de Abeja Via Subcutánea)	LPS	15.8 \pm 0.37	LPS vs SSI p > 0.05
	SSI	16.0 \pm 0.44	SSI vs SIN p > 0.05
	SIN	14.8 \pm 1.48	SIN vs LPS p > 0.05
INDO (Indometacina Via Oral)	LPS	12.2 \pm 0.37	LPS vs SSI p < 0.01
	SSI	17.4 \pm 0.40	SSI vs SIN p > 0.05
	SIN	15.2 \pm 1.59	SIN vs LPS p < 0.05
NADA (Ningún Tratamiento)	LPS	15.2 \pm 1.32	LPS vs SSI p > 0.05
	SSI	15.4 \pm 0.67	SSI vs SIN p > 0.05
	SIN	14.4 \pm 0.50	SIN vs LPS p > 0.05



VII. DISCUSIÓN

El proceso inflamatorio es extremadamente complejo, pero sabemos que su activación es beneficiosa al menos que se pierda su control o se prolongue su duración. En estos casos, la respuesta inflamatoria puede aumentar la destrucción tisular inicial y provocar la aparición de enfermedades secundarias. Además, algunos autores (Sánchez y Mateos, 1999) han calculado que en casi dos tercios de la totalidad de las enfermedades intervienen mecanismos patogénicos propios de la respuesta inflamatoria. Es por esto que las enfermedades asociadas a reacciones inflamatorias son un problema de salud pública muy común hoy en día.

Una vez que la respuesta inflamatoria se ha vuelto crónica, se convierte en un problema clínico grave que es necesario reducir. Actualmente se cuenta con diferentes procedimientos anti-inflamatorios, pero la administración de AINES es el recurso más utilizado. Desafortunadamente el uso de medicamentos que contienen dichos fármacos tiene efectos colaterales graves. Según los datos obtenidos del estudio ARAMIS, se estima que el consumo de AINES en los Estados Unidos genera entre 100,000-200,000 hospitalizaciones al año y entre 10,000-20,000 muertes en el mismo periodo (Singh y Ramey, 1997; Silverstein, 1998), es decir más muertos que los producidos por asma, cáncer cervical y melanoma maligno juntos (Singh y Ramey, 1997; Singh, 1998). Como una consecuencia, las autoridades de salud han exigido que todos los AINES en ese país lleven una leyenda de aviso en el cartónaje.

Actualmente, una cantidad muy grande de personas enfermas con artritis recurren regularmente a las inyecciones intradérmicas de veneno de abejas como





una alternativa empírica para disminuir la inflamación y el dolor. Aparentemente, de estas medidas terapéuticas empíricas se han obtenido resultados que algunos autores consideran alentadores (Chang y Oliver, 1979; Eiseman y col., 1982; Thomsen y col., 1983; Iorish, 1985; Yiangou y col., 1993). Sin embargo no se conocen exactamente los mecanismos a través de los cuales el VA puede inducir una mejoría en enfermedades de tipo inflamatorio. Esta situación fue contemplada por nosotros en el momento de proponer el presente trabajo de tesis.

De acuerdo a la bibliografía revisada, existen trabajos (Vick y Shipman, 1972; Couch y Benton, 1972) en donde los efectos anti-inflamatorios del VA se atribuyeron a su capacidad para estimular la producción y aumentar la concentración sanguínea de cortisol. Como esta hormona tiene efectos anti-inflamatorios, se ha propuesto que la actividad biológica del VA se ejerce a través del cortisol. Posteriormente, otros autores (Banks, 1990; Billingham, 1973; Harter y Martin, 1981) observaron que un polipéptido conocido como factor desgranulador de las células cebadas (MCD) es el componente del VA responsable de esta actividad anti-inflamatoria. Algunos resultados sugieren que sus efectos anti-inflamatorios se deben a la inhibición de la síntesis de algunas moléculas pro-inflamatorias conocidas, como las prostaglandinas, pero esto aun no ha sido confirmado. Paradójicamente, el factor MCD tiene un claro efecto pro-inflamatorio desde el momento que induce la desgranulación de los mastocitos, liberando el contenido de sus gránulos, los cuales contienen principalmente sustancias pro-inflamatorias como la histamina (Leal-Berumen y col., 1996, Ziai y col, 1990). En los últimos años se han publicado resultados experimentales que han permitido proponer varios mecanismos que tratan de explicar los efectos anti-





inflamatorios del VA. Algunos autores (Rekka y Kourounakis, 1990) sugieren que el VA es anti-inflamatorio porque *in vitro* se han observado que inhibe la síntesis de la IL-1, conocida citocina pro-inflamatoria. Pero en general se han publicado muy pocos trabajos que investigan los mecanismos por los cuales el VA puede influir sobre el sistema inmune y más concretamente, sobre la producción de las citocinas pro- y anti-inflamatorias.

En el presente estudio se trató de conocer el efecto de la administración *in vivo* del veneno de abeja sobre la producción de algunas citocinas que participan en la respuesta inflamatoria. Las citocinas estudiadas fueron la IL-6 (interleucina anti-inflamatoria) y la IL-1 β (interleucina pro-inflamatoria). La concentración de estas dos citocinas se estudió en el suero de ratones, después de haber estimulado una respuesta inflamatoria en las rodillas de los ratones mediante una inyección intra-articular de una sola dosis de lipopolisacáridos de *E. coli*. Como un medicamento control de efectos anti-inflamatorios conocidos, se utilizó la indometacina, la cual fue administrada por vía oral en otro grupo de animales control, a los mismos tiempos que los ratones sujetos del experimento recibían la administración de Veneno de Abeja.

Los resultados obtenidos bajo las condiciones de este experimento, muestran que la administración de dos dosis de INDO por vía oral, disminuyen la concentración de IL-6 en suero de ratón, independientemente de que éstos hayan sido o no inyectados intra-articularmente con LPS. Este primer resultado es evidente en las gráficas 1, 2 y 3. Sin embargo, en la Gráfica 6 se puede observar que ese efecto de la INDO es más evidente en los ratones que habían sido



inyectados con el LPS, posiblemente debido a un sinergismo entre estas dos sustancias. La observación de que la INDO disminuye la producción de IL-6 no es algo nuevo, ya otros autores habían referido que la INDO reduce la producción de IL-6 e IL-10, las cuales son dos citocinas anti-inflamatorias (Bour y col., 2000), mientras otros autores han encontrado que la INDO reduce también los niveles de la IL-1Ra (antagonista del receptor de IL-1; Bessler y col., 2002). Estos dos resultados publicados recientemente se pueden considerar como paradójicos o contradictorios, ya que sugieren que los efectos de la INDO son pro-inflamatorios y por tanto inducen más a la inflamación. Sin embargo, esta impresión inicial queda borrada por los resultados de trabajos que probaron, como la administración de INDO también disminuye la producción de otras moléculas que tienen un claro efecto pro-inflamatorio, como la IL-1 y las prostaglandinas. En la Gráfica 7, se muestra como nuestros resultados coinciden en que la INDO disminuye la producción de IL-1, pero este efecto solo se dio en animales que habían sido inyectados intra-articularmente con LPS y que consiguientemente habían desarrollado una respuesta inflamatoria en las rodillas, ya que nuestros ratones sanos no modificaron sus niveles de IL-1 en suero después de haber recibido indometacina (Gráficas 7, 8, 9 y particularmente la gráfica 12).

Estos resultados coinciden con los obtenidos por los investigadores Bour (Bour y col., 2000), Du (Du y col., 1999), Tanaka (Tanaka y col., 1998) y Murakami (Murakami y col., 1999) pero contradicen a los obtenidos por Rainsford y Sirota (Rainsford y col., 1997; Sirota y col., 2000). Sin embargo, es muy difícil establecer comparaciones entre los valores obtenidos por nosotros y los que se encuentran en los trabajos mencionados, porque en todos los casos se trabajó sobre modelos





experimentales diferentes. Aun más, en los mismos trabajos de investigación antes mencionados, no se puede establecer una correlación que explique las diferencias en dichas publicaciones, ya que en todos los estudios, hay al menos un experimento tanto *in vivo* como *in vitro* y/o en animales como en humanos, lo que sugiere que estas variables no intervienen o explican los diferentes resultados encontrados, posiblemente una de las variables que podría explicar las discrepancias encontradas, son las condiciones experimentales, lo que justifica en cierta forma el diseño de nuevos experimentos sobre la respuesta inflamatoria y sus tratamientos, para explorar la producción de citocinas que intervienen en el proceso inflamatorio, como se hace en el presente trabajo de tesis.

Ahora bien, independientemente de que nuestros resultados coincidan o no exactamente con los de otros autores que también han observado el efecto de la indometacina sobre la producción de la IL-1 e IL-6, resulta interesante destacar que solamente dos dosis de este anti-inflamatorio (3 mg/Kg/dosis), reducen muy significativamente la producción de la IL-6, este resultado es importante porque la IL-6 se encuentra implicada en otros procesos fisiológicos importantes, como por ejemplo: el estimular la producción normal de células sanguíneas (Leary y col., 1988), por lo que se considera que una marcada disminución de la citocina IL-6, es desfavorable para el organismo.

Por otra parte se observó que la administración de solamente dos dosis de VA (1mg/Kg/dosis) por vía subcutánea, aumenta la producción de IL-6, lo cual es un efecto completamente contrario al causado por la indometacina. Estos resultados se presentan en las Graficas 1 y 2. Pero conviene aclarar que este efecto del VA solamente se observó siempre y cuando el ratón haya recibido una





estimulación inflamatoria como es el caso de la inyección intra-articular de LPS y también la inyección intra-articular del control de SSI. Fue notable observar que las dos dosis de VA administradas no tuvieron efecto significativo en los animales que no recibieron inyecciones intra-articulares y que consiguientemente no desarrollaron reacciones inflamatorias, bien sea por el LPS o por el efecto traumático de la inyección de SSI. Estos resultados se presentan en la Grafica 3. Creemos que la inyección intra-articular de SSI provocó una reacción inflamatoria localizada porque redujo significativamente la concentración de la IL-6 en el suero de los ratones (Grafica 4). Ese efecto inmediato sobre la concentración de la IL-6 no se puede atribuir a la SSI (a menos que estuviera contaminada con LPS) sino al traumatismo tisular provocado por la inyección intra-articular.

Como ya se menciona el aumento en la concentración de IL-6 inducido por las dos inyecciones subcutáneas de VA decreció en los ratones que recibieron las inyecciones intra-articulares de SSI y LPS respectivamente (Grafica 5) y no en los ratones sanos control. Nosotros creemos que el efecto anterior se debe a que la inyección intra-articular de una sola dosis de LPS (5 mg/Kg) y el traumatismo provocado por la inyección de la SSI provocan una respuesta inmediata de citocinas pro-inflamatorias que coincide con una disminución en la producción de las citocinas anti-inflamatorias como la IL-6 (Grafica 4). Posiblemente, superada la etapa inicial del trauma o irritación inflamatoria en las rodillas, parece natural que ocurra un aumento en la producción de las citocinas anti-inflamatorias y que disminuyan las citocinas pro-inflamatorias. Sin embargo, este trabajo no fue diseñado para estudiar el efecto antes mencionado. Otro aspecto a considerar es el de la dosis, ya que en este caso solamente se administraron dos inyecciones





(1mg/Kg/dosis), mientras en algunos experimentos previos, los ratones habían recibido inyecciones interdiarias durante 4 semanas y los efectos de este tratamiento (un aumento considerable en la producción de la IL-6) fue medido *in vitro* mediante el cultivo por 24 horas de una cantidad constante de macrófagos peritoneales (Reyes, 2001). De todas formas, en el presente modelo experimental, las dos dosis del VA fueron suficientes para incrementar significativamente la concentración de la IL-6 en el suero de los ratones.

En cuanto a la concentración en suero de IL-1, los resultados del presente trabajo muestran que las dosis de VA que fueron administradas no afectan su producción (Graficas 7, 8 y 9). Estos resultados contradicen los obtenidos por Rekka y Kourounakis (Rekka y Kourounakis, 1990), ya que estos investigadores encontraron que el VA inhibe la síntesis de la IL-1. Esta discrepancia de resultados, probablemente se debe a las condiciones experimentales diferentes, ya que ellos obtuvieron resultados mediante un experimento *in vitro* mientras que el presente experimento fue realizado *in vivo*. Estas diferencias entre los estudios *in vivo* e *in vitro*, también se ha observado mucho al estudiar compuestos mutagénicos y carcinogénicos (Crebelli, 2000; Henderson y col., 2000), dichas diferencias se explican porque en un estudio *in vivo* hay muchas más variables en el organismo que pueden interactuar con la molécula o sustancia en estudio, que en un experimento donde se aísla un sistema (estudio *in vitro*).

La búsqueda del mecanismo por el cual el VA induce un aumento en la producción de la IL-6 se escapa de los objetivos del presente trabajo. Algo similar puede decirse cuando se estudia los mecanismos por los cuales la administración de VA induce una mejoría en los individuos con artritis, ya que este efecto resulta





paradójico, porque cuando son introducidos al cuerpo de forma aislada, los principales componentes del VA (pero no el veneno completo) provocan la muerte de células y causan una respuesta inflamatoria localizada (Portlock y col., 1990), mientras que otros de sus componentes tienen un efecto anti-inflamatorio completamente opuesto (Banks, 1990; Hartter y Martin, 1981). Sin embargo se puede sugerir que estos dos polos de sus actividades biológicas (los efectos pro- y anti-inflamatorios) del VA no son equitativas, es decir, que es mayor su actividad anti-inflamatoria que pro-inflamatoria, como ocurre con la IL-6 y varias citocinas similares. En el caso de la IL-1, también se pueden observar los dos efectos, pero ocurre lo opuesto a lo que sucede con la IL-6, es decir, tiene un mayor efecto pro-inflamatorio (activa la óxido nítrico sintasa inducible, induce la COX-2, etc.) que anti-inflamatorio (induce la producción de glucocorticoides). Esto ocurre no solo en muchas otras sustancias endógenas, sino también en varios mecanismos del organismo, como es el caso de la misma respuesta inflamatoria, la cual activa la producción de prostaglandinas y leucotrienos las cuales son moléculas pro-inflamatorias pero al mismo tiempo produce moléculas anti-inflamatorias como las lipoxinas que sorprendentemente también son eicosanoides derivados del ácido araquidónico.

Estos mecanismos de actividad pro- y anti-inflamatoria no equitativos son importantes como reguladores pero no son inhibidores, tal y como ocurre con los AINES los cuales inhiben la producción de prostaglandinas, y de ahí sus consecuencias desfavorables. Posiblemente la efectividad del veneno de abejas se debe a su actividad pro- y anti- inflamatoria desproporcionada, la cual regula pero no inhibe la producción de moléculas importantes para otra actividad



biológica. También es posible que el veneno de abeja estimule el eje HHA e influir en las interacciones bidireccionales entre los sistemas inmune y neuroendocrino en los ratones, afectando la producción de esteroides y de citocinas.

Cabe señalar que el aumento de la IL-6 por administración del VA por el momento no es una prueba contundente de la mejoría que induce la administración de este veneno en personas con artritis, pero nuestros resultados son importantes porque representan una prueba de que este producto natural tiene una actividad biológica evidente sobre la síntesis de las citocinas anti-inflamatorias. Estos resultados solo sugieren que algunas de las mejorías observadas después de administrar VA en algunas personas, pueden ser una consecuencia de este cambio en la producción de IL-6 (manifestado en un aumento), ya que algunos investigadores (Ahmed e Ivashkiv, 2000) sugieren que la estimulación de la producción de 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.

Por otra parte, es importante mencionar que en las últimas décadas se han publicado algunas investigaciones sobre el VA, en revistas internacionales provenientes de naciones como Alemania, Bulgaria, Rumania, Inglaterra y Japón, en las cuales se han preocupado por el veneno de abeja y sus componentes, y se ha realizado una amplia investigación en campos como la bioquímica, la farmacología y la inmunología. En México, el uso del veneno de abeja o apitoxina es una práctica muy difundida, pero generalmente se lleva a cabo de una manera empírica. Muchas personas ven con desagrado esta práctica y la consideran como un recurso peligroso al que solamente pueden acudir personas sin educación.





Nosotros no pretendemos apoyar el uso de esa práctica empírica. Pero nuestros resultados señalan que es conveniente tratar de purificar y caracterizar los componentes activos e intentar su administración (oral o percutánea, por ejemplo) a través de procedimientos en los cuales se puedan controlar tanto la dosis de los componentes activos anti-inflamatorios y reducir los efectos de los componentes ciertamente venenosos y peligrosos. Otro aspecto importante en la posibilidad de sintetizar en el laboratorio sustancias análogas a las del veneno de abejas que tengan reducida su toxicidad y aumentadas sus actividades biológicas favorables. En vista de estos resultados y por las potenciales ventajas terapéuticas y económicas del veneno de abejas, es importante continuar estudiando sus actividades biológicas.

Por último, cabe mencionar que las investigaciones sobre los efectos del veneno de abejas son escasas pero se comienza a vislumbrar una importante actividad sobre la producción de citocinas, Este efecto del VA es importante porque las citocinas intervienen no solo en la modulación de la respuesta inmune e inflamatoria, sino, también participan en la fisiopatología de un gran número de enfermedades entre otras el cáncer, las enfermedades autoinmunes, procesos infecciosos, etc. Un mejor entendimiento de los mecanismos de acción del VA sobre la IL-6 (que fue estudiada en el presente trabajo) así como sobre otras citocinas, pueda permitir que, en una forma controlada se generalice su uso en el futuro como potencial agente bioterapéutico.





VIII. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones de este experimento se concluyo que:

- La inyección intra-articular de LPS redujo significativamente la concentración de IL-6 en el suero de los ratones.
- La administración de Indometacina por via oral, disminuye la producción de IL-6 en suero de ratón.
- La disminución en la producción de IL-6, por la administración de Indometacina es más acentuada en los ratones inyectados con LPS que en los controles.
- La administración de Indometacina disminuye la producción de la IL-1 β , solo después de la inyección de LPS.
- La administración de VA por vía subcutánea, aumenta la producción de IL-6, pero solo en los ratones que fueron inyectados intra-articularmente.
- El aumento en la producción de IL-6 provocado por el Veneno de abeja es menor en los animales inyectados con LPS que en los inyectados con SSI.
- La administración de Veneno de abeja no afecta la concentración de IL-1 β en el suero de los ratones, con y sin respuesta inflamatoria.

Por tanto, estos resultados señalan que es conveniente tratar de purificar y caracterizar los componentes activos e intentar su administración través de procedimientos en los cuales se puedan controlar tanto la dosis de los componentes activos anti-inflamatorios, así como, reducir los efectos de los componentes ciertamente tóxicos y peligrosos.





IX. APÉNDICE

9.1 Equipo.

- Lector de placas ELISA (DYNEX TECHNOLOGIES).
- Lavador de placas para ELISA (LABSYSTEM).
- Campana de flujo laminar (VECO).
- Centrifuga Clínica (SOL-BAT).
- Microcentrifuga (SORVAL).
- Ultracongelador (REVCO).
- Incubadora (THERMOLINE).
- Balanza Analítica (SARTORIUS)
- Potenciómetro (ORION).
- Placas de ELISA de 96 pozos estériles de alto pegado (CONSTAR).
- Micropipetas automáticas (DRUMMOND).
- Micropipetas multicanal (BIOHIT).
- Puntas de micropipeta estériles (AXIGEN).
- Viales Eppendorff (AXIGEN).

9.2 Soluciones y Reactivos.

➤ **Veneno de Abeja (VA).**

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

Esta solución se filtró a través de una membrana de nylon, estéril, con poro de 0.22 μ m la cual se recolecto en alícuotas de 1.5 mL. A -20°C en viales estériles y se guardo en congelación hasta su uso.





➤ **Indometacina (INDO).**

Indometacina (Sigma).....	3 mg
H ₂ O/Tween 1%.....	3 mL

Es recomendable preparar la indometacina el día de su uso.

➤ **Lipopolisacáridos (LPS).**

LPS Bacterianos de <i>Escherichia coli</i> (serotipo O26:B6; Sigma).....	5 µg
Medio RPMI 1640 suplementado estéril (Gibco BRL).....	1 mL

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

➤ **Solución amortiguadora de fosatos (PBS)**

Na ₂ HPO ₄	2.169 g
NaH ₂ PO ₄	0.264 g
NaCl.....	9.000 g
H ₂ O destilada.....	1.0 L

Agustar pH a 7.2 – 7.4, esterilizar por filtración con membrana de 0.22 µm y guardar en refrigeración de 2-8 °C.

➤ **Solución de PBS/BSA al 3%**

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

Preparar el día de su uso.

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

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

Preparar el día de su uso.



**➤ Solución Salina Isotónica.**

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

Filtrar con membrana de 0.22µm y guardar a temperatura ambiente.

➤ Reactivo color.

Reactivo Color A (peróxido de hidrogeno)..... (Part 895161; R&D Systems)	3.0 mL
Reactivo Color B (tetrametilbenzidina)..... (Part 895174; R&D Systems)	3.0 mL

Los reactivos color A y B deben mezclarse juntos en volúmenes iguales dentro de 0 a 15 minutos para su uso.

➤ Citocinas Recombinantes y Anticuerpos Monoclonales.**☑ Para IL-6:**

La IL-6 fue detectada y cuantificada usando como anticuerpo de captura, 2 µg/mL del mAb de rata IgG1 (MP5-20F3, PharMingen®, San Diego, CA), como anticuerpo de detección 1 µg/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 utilizada para obtener la curva estándar, en diluciones seriadas 2X, desde 2000 hasta 15 µg/mL.

☑ Para IL-1β:

La IL-1β se determinó mediante un kit comercial Quantikine® Murine (MLB00, R&D Systems) que contenía el anticuerpo de captura ya adherido a la superficie de los pozos de la placa (Part 890407), y el anticuerpo de detección 1 µg/mL biotinilado marcado con fosfatasa alcalina (Part 890000), ambos dirigidos contra la IL-1β de ratón.

La IL-1β recombinante de ratón (Part 890400; R&D Systems) fue utilizada para obtener la curva estándar, en diluciones seriadas 2X, desde 500 hasta 15 µg/mL.



XI. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. El sistema del complemento en: *Inmunología Celular y Molecular*. Editorial McGraw-Hill/Interamericana. Madrid, España, 1999:331-375.
- Agrawal NM. Making sense of NSAID gastropathy and considering the therapeutic options. *Scan J Rheumatol* 1992; Suppl 92:13-19.
- Ahmed ST. and Ivashkiv LB. inhibition of IL-6 and IL-10 signaling and Stat Activation by inflammatory and stress pathways. *J. Immunol.* 2000; 165:5227-5237.
- Akre, RD. *Biology and distribution of hymenoptera social, Insect, poisons, allergens, and other invertebrate venoms.* Edited by: Anthony T. Marcel Dekker Inc. London, 1984; 3-17.
- Albelda SM, Smith CW, Ward PA. Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J* 1994; 8:504-512.
- Álvarez E. *Citocinas en: Margni RA. Inmunología e Inmunoquímica. Quinta edición. E. Medica Panamericana. Buenos Aires, Argentina, 1996:435-472.*
- Atkinson BA. The incidence and nature of adverse reactions to injection immunotherapy in bee and wasp venom allergy. *Exp. Allergy.* 1995; 25:159.
- Bach EA, Aguet M and Schreiber RD. The IFN- γ receptor: a parading for cytokine receptor signaling. *Ann. Rev. Immunol.* 1998; 266:1375-1377.
- Banks BE. Anti-inflammatory activity of bee venom peptide 401 (mast cell degranulating peptide) and compound 46/80 *Brit. Jour. of Pharm.* 1990; 99:350-354.
- Bauer J, Ganter U, Geiger T, Jacobshagen U, Hirano T, Matsuda T et al. Regulation of interleukin-6 expression in cultured human blood monocytes and monocyte derived macrophages. *Blood* 1988;72:1.134-1.140.
- Baumann H, Prowse KR, Marinkovic S, Won KA and Jahreis GP. Stimulation of hepatic acute phase response by cytokines and glucocorticoids. *Ann. NY Acad. Sci.* 1989; 557:280.
- Bellinghausen I, Metz G, Enk AH, Christsmann S, Knop J and 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.
- Berg J, Fellier H, Christoph T, Grarup J and Stimmeder D. The Analgesic NSAID lornoxicam inhibits cyclooxygenase (COX)-1/-2, inducible nitric oxide synthase (iNOS), and the formation of interleukin (IL)-6 in vitro. *Inflamm. Res.* 1999; Jul;48(7):369-379.
- Bessler H, Mendel C, Straussberg R, Gurary N, Aloni D and Sirota L. Effects of dexamethasone on IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha production by mononuclear cells of newborns and adults. *Biol. Neonate.* 1999; 75(4):225-233.





- Bessler H, Ziyada S, Bergman M, Punsky J and Sirota L. Indomethacin and Ibuprofen effect on IL-1ra production by mononuclear cell of preterm newborns and adults. *Biol. Neonate.* 2002; 82(2):73-77.
- Besson JM and Chaouch A. Descending Neurotransmitters and pain control. In: *Pain Headache.* Ed. H. Akil, JW Lewis. 1987; 9:64-100.
- Betancur C, Borrel J and Guaza C. Cytokine regulation of corticosteroid receptors in the rat hippocampus: Effects of interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor and lipopolysaccharide. *Neuroendocrinology.* 1995; 62:47-54.
- Bhagwat SS, Hamann PR, Still WC, Bunting S and Fitzpatrick FA. Synthesis and structure of the platelet aggregation factor thromboxane A2. *Nature.* 1985; 315:511-513.
- Bhoola KD, Figueroa CD and Worthy K. Bioregulation of Kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol. Rev.*, 1992; 44:1-80.
- Billingham ME, Morley J, Janson JM, Shipolini RA and Vernon CA. An anti-inflammatory peptide from bee venom. *Nature.* 1973; 245:163.
- Boman HG. Antibacterial and antimalarial properties of peptides that are cecropin-melittin hybrids. *FEBS-Letter.* 1989; 259:103-106.
- Botting RM. Mechanism of action of Acetaminophen: Is there a Cyclooxygenase 3?. *Clin. Inf. Diseases* 2000; 31:S202-S210.
- Bour AM, Westendorp RG, Laterveer JC, Bollen EL and Remarque EJ. Interaction of indomethacin with cytokine production in whole blood. Potential mechanism for a brain-protective effect. *Exp. Gerontol.* 2000; Oct;35(8):1017-1024.
- Caldwell FT Jr, Graves DB and Wallace BH. The effect of indomethacin on the cytokine cascade and body temperature following burn injury in rats. *Burns* 1999; Jun;25(4):283-294.
- Calixto JB, Cabrini DA, Ferreira J, Campos MM. Kinins in pain and inflammation. *Pain* 2000; 87:1-5.
- Campbell WB and Halushka PV. Lipid-derived autacoids eicosanoids and platelet-activating factor. In: Harman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman AG (Eds.), *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics.* McGraw-Hill, 1996; 601-616.
- Capetola R.J., Rosentale M.E., Dubinsky B. and Mc Guire J.L. Peripheral analgesics: a review. *J. Clin. Pharmacol.* 1983; 23:545-556.
- Chang CC, Boyce S, Brideau C, Charleson S, Cromlisg W, Ethier D, Evans J, Ford-Hutchinson AW, Forrest MJ, Gauthier JY, Gordon R et al. Rofecoxib (Voix, MK-0966; 4-(4-methylsulfonylphenyl)-3-phenyl-2-(5H)-furanone): a potent and orally active cyclooxygenase-2 inhibitor. *Pharmacological and biochemical Profiles. J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999; 290(2):551-560.
- Chang YH and Bliven ML. Anti-arthritis affect of venom. *Agents Action.* 1979; 9:205.





- 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 Chieh Ho Tsa Chih.* 1993; 13:226.
- Chilton FH, Ellis JM, Olson SC and Wykle RL. 1-0-alkyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine. *J. Biol. Chem.*, 1984; 259:12014-12019.
- Chomarat P, Rissoan MC, Banchereau J, Miossec P. Interferon gamma inhibits interleukin 10 production by monocytes. *J Exp Med* 1993; 177:523-527.
- Couch TL and Benton AW. The effects of the venom of the honey bee, *Apis mellifera.*, on the adrenocortical response of the adult male rat. *Toxicom.* 1972; 10.55.
- Coulie PG, Vanhecke A, Van Damme J, Cayphas S, Poupart P, De Wit L et al. High-affinity sites for human 26kDa protein (interleukin 6, B cell stimulatory factor-2, interferon β 2) different from those of the α 1 interferon (alpha, beta) on lymphoblastoid cells. *Eur. J. Immunol.* 1987; 17:1,435-1,440.
- Crebelli C. Threshold-mediated mechanisms in mutagenesis: implications in the classification and regulation of chemical mutagens. *Mutation Research.* 2000; 464:129-135.
- Crowther JR. ELISA, theory and practice. In: *Methods in Molecular Biology.* Ed. Walker J.M Humana Press. Totowa, N.J. 1995; 42:63.
- Davies P, Bailey PJ, Goldenberg MM and Ford-Hutchinson AW. The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. *Annu. Rev. Immunol.*, 1984; 2:335-357.
- DeGroot LJ. (Ed.): *Endocrinology.* Second Edition. Philadelphia WB Saunders Co., 1989.
- De Waal Malegyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, De Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991; 146:3.444-3.451.
- Dinarello CA, Thompson RC. Blocking IL-1: interleukin 1 receptor antagonist in vivo and in vitro. *Immunol Today* 1991; 12:404-410.
- Dinarello CA, Wolff SM. The role of interleukin-1 in disease. *N Engl J Med* 1993; 328:106-113.
- Dotimas EM, Hamid KR, Hider RC and Ragnersson U. Isolation and structure analysis of bee venom mast cell degranulating peptide. *Biochem. Biophys. Acta.* 1987; 911:285.
- Dray A. Inflammatory mediators of pain. *Br. J. Anaesth.* 1995; 75(2):125-131.
- Dray A and Perkins M. Bradykinin and Inflammatory pain. *Trends Neurosci.*, 1993; 16:99-104.
- Drazen JM and Austen KF. Leukotrienes and airway responses. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1987; 136:985-998.





- Du ZY and Li XY. Inhibitory effects of indomethacin on interleukin-1 and nitric oxide production in rat microglia in vitro. *Int. J. Immunopharmacol.* 1999; Mar;21(3):219-225.
- Dunn JD and Killion JJ. Effect of melittin on pituitary-adrenal responsiveness to stress. *Acta Endocrin.* 1988a; 119:339-344.
- Dunn JD and Killion JJ. Melittin-evoked increase in plasma corticosterone levels. *Life Sci.* 1988b; 43:335-343.
- Durum SK and Oppenheim J. Proinflammatory Cytokines and Immunity. *Fundamental Immunology*. Third Edition, 1993.
- Eiseman JL, Bredow JV and Alvarez AP. Effect of honey bee (*Apis mellifera*) venom on the course of adjuvant-induced arthritis and depression of drug metabolism in the rat. *Bioch. Pharmac.* 1982; 32:1139-1146.
- Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K, Matsumoto A, Tanimura S, Ohtsubo M, Misawa H et al. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature.* 1997; 387:921.
- Farmer SG and DeSiato MA. Effects of a novel nonpeptide bradikinin B₂ receptor antagonist on intestinal and airway smooth muscle: further evidence for the tracheal B₃ Receptor. *Br. J. Pharmacol.*, 1994;112:461-464.
- Feldmann M. Cooperación celular en la respuesta de anticuerpos. En: Roitt I. *Inmunología*. Londres: Salvat, 1994; 7:1-16.
- Feuerstein G. Leukotrienes and the cardiovascular system. *Prostaglandins*, 1984, 27:781-802.
- Fiebich BL, Hofer TJ, Lieb K, Huell M, Butcher RD, Schumann G, Schulze-Osthoff K, Bauer J. The non-steroidal anti-inflammatory drug tepoxalin inhibits interleukin-6 and alpha1-antichymotrypsin synthesis in astrocytes by preventing degradation of IkappaB-alpha. *Neuropharmacology*, 1999 Sep, 38(9):1325-33.
- Flower RJ. Lipocortin. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 1990, 349:11-25.
- Frank MM and Fries LF. The role of complement in inflammation and phagocytosis *Immunol Today* 1991;12:322-326.
- Furst DE and Munster T. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs, Disease-Modifying Antirheumatic Drugs, Nonopioid Analgesics, & Drugs Used in Gout. In: *Basic & Clinical Pharmacology*. Bertram G. Katzung, 8th ed. Mc Graw-Hill. 2001; 36:596-623.
- Gallin JJ and Rosenberg HF. Inflammation. In: Paul WE. *Fundamental Immunology*. Fourth edition. Lippincott Williams & Wilkins. 1996:chap.32. CD-ROM.
- García MX y Kaski JC. Cardiopatía isquémica: marcadores de inflamación y riesgo cardiovascular. *Rev. Cubana Med.* 2000; 39(2):120-40.





- ▼ García Tamayo F. Fundamentos de Inmunología. Textos Universitarios. UNAM. México, 1997: 349-391.
- ▼ Gauldie J, Richards C, Harnish D. Interferon beta/B cell stimulating factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc Natl Acad Sci* 1987;84:7.251-7.261.
- ▼ Gauldie J, Richards C, Northemann W, Fey G, Baumann H. IFNb2/BSF2/IL-6 is the monocyte-derived HSF that regulates receptor-specific acute phase gene regulation in hepatocytes. *Ann NY Acad Sci* 1989;557:46-57.
- ▼ Gibson T. Nonsteroidal-antiinflammatory drugs. Another look. *J Rheumatol* 1990; 27: 87- 90.
- ▼ Giri JG, Lomedico PT, Mizel SB. Studies on the synthesis and secretion of interleukin-1. I. A 33,000 molecular weight precursor for interleukin-1. *J Immunol* 1985;134:343-349.
- ▼ 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.
- ▼ Gmachi M and Kreil G. The precursor 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.
- ▼ Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby Immunology. Fourth edition. Edited by W.H. Freeman and Company. USA. 2000:371-372.
- Goldstein M. In *Inflammation: Basic principles and clinical correlates*. Second edition. Edited by Gallin JI, Goldstein IM, and Snyderman R. New York, Raven Press, 1992:1-9.
- Goldyne ME and Stobo JD. Immunoregulatory role of prostaglandins and related lipids. *CRC Crit. Rev. Immunol.*, 1981, 1:189-223.
- González L, Nekrassov V, Castell A and Sitges M. Characterization of mellitin effects in synaptosomes. *Neurochemical Research.* 1997; 22:189.
- Grandison L. Stimulation of anterior pituitary prolactin release by mellitin, and activator of phospholipase A2. *Endocrinology.* 1984; 114:1-7.
- Habermann E. Bee and was p venoms. *Science* 1972; 177(4016):314-322.
- Habermann E and Fischer K. Bee venom neurotoxin (apamin): iodine labeling and characterization of binding sites. *Eur. jour. of Bioch.* 1979; 94: 355-364.
- Habermann E and Horváth E. Localization and effects of apamin after application to the central nervous system. *Toxicom.* 1980; 18:549-560.
- Hall ED. Neuroprotective actions of glucocorticoid and nonglucocorticoid steroids in acute neuronal injury. *Cell. Mol. Neurobiol.* 1993. 13:415-432.





- Halushka PV, Mais DE, Mayeux PR and Morinelli TA. Thromboxane, prostaglandin and leukotriene receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1989, 29:213-219.
- Hamberg M, Svensson J, Wakabayashi T and Samuelsson B. Isolation and structure of two prostaglandin endoperoxides that cause platelet aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1974; 71:345-349.
- Hartter P and Martin W. Anti-inflammatory properties of derivatives and sequence fragments of the MCD-peptide from bee venom, Structure and activity of natural peptides. Edited by Voelter W. and Weitzel G. Walter de Gruyter. 1981; 497-504.
- Henderson L, Albertini S and Aardema M. Thresholds in genotoxicity responses. *Mutation Research*. 2000; 464:123-128.
- Hibi M, Murakami M, Saito M, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp 130. *Cell* 1990; 63:1.149-1.157.
- Hirano T, Taga T, Yamasaki K. A multifunctional cytokine, IL-6/BSF-2 and its receptor In: *Proceedings of the 17th Symposium of the Collegium Internationale «Allergy and Inflammation» 1988: From Gene Cloning to Clinical Practice.*
- Housby JN, Cahill CM, Chu B, Prevelige R, Bickford K, Stevenson MA, Calderwood SK. Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit the expression of cytokines and induce HSP70 in human monocytes. *Cytokine*, 1999 May, 11(5):347-58.
- Hugues M, Romey G, Duval D, Vincent JP and 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.
- Hyre MH and Smith RA. Immunological effects of honey bee (*Apis mellifera*) venom using Balb/c mice. *Toxicom*. 1986; 24:435.
- Insel PA. Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: Harman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman AG (Eds.), Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill, New York, 1996; 617-634.
- Ioirish I. Las abejas, farmacéuticas aladas. Mir. Moscú, 1985.
- Ivashkiv LB. Cytokine expression and cell activation in inflammatory arthritis. *Adv. Immunol*. 1996; 63:337.
- Jin F, Nathan CF, Radzioch D and Ding A. Lipopolysacchariderelated stimuli induce expression of the secretory leukocyte protease inhibitor, a macrophage-derived lipopolysaccharide inhibitor. *Infect. Immun*. 1998; 66:2447.
- Jouzeau JY, Terlain B, Abid A, Nedelec E and Netter P. Ciclo-oxygenase isoenzymes. *Drugs*, 1997 53(4):563-582.





- Jutel M, Pichler WJ, Skrbic D, Urwyler A, Dahinden C and Muller UR. Bee venom immunotherapy result 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.
- Kam PC and Govender G. Nitric Oxide: Basic science and clinical application. *Anesthesia.* 1994;49:515-521.
- Kemeny DM, Dalton N, Laurence AJ, Pearce FL and Vernon CA. The purification and characterization of hyaluronidase from the venom of the honey bee, *Apis mellifera*. *Eur. Jour. of Bioch.* 1984; 139: 217-223.
- Kiesel L, Rabe T, Hauser G, Przylipek A, Jadali F and Renebaum B. Stimulation of luteinizing hormone release by melittin and phospholipase A2, in rat pituitary cells. *Moll. and cell. Endocrin.* 1987; 20:1-6.
- Koburova KL, Mikhailova S and Skenderov SV. Antipyretic effect of a polypeptide, adolapin, obtained from honeybee venom. *Eksperimentalna Meditsina i Morfologiya.* 1984; 23:143-148.
- Koburova KL, Mikhailova S and Skenderov SV. Further investigation on the anti-inflammatory properties of the adolapin, bee venom polypeptide. *Acta Physiol. et Pharm. Bulgarica.* 1985; 11: 50-55.
- Kondo E and Kanai K. Bactericidal activity of the membrane fraction isolated from phagocytes of guinea pigs. *Jap. Jour. of Med. Sci. and Biol.* 1986; 39:9-20.
- Kondo E. Melittin-stimulated antimycobacterial activity of the membrane fraction isolated from phagocytes of guinea pigs. *Jap. Jour. of Med. Sci. and Biol.* 1986; 39:21-24.
- Kuehl FA and Egan RW. Prostaglandins, arachidonic acid and inflammation *Science*, 1990; 210:978-984.
- La Flamme AC, MacDonald AS and Pearce EJ. Role of IL-6 in directing the initial immune response to schistosome eggs. *J. Immunol.* 2000; 164:2419.
- Leal-Berumen I, Snider DP, Barajas-Lopez C. Cholera toxin increase IL-6 synthesis and decreases TNF-alpha production by rat peritoneal mast cell, *J. Immunol.* 1996; 156:316.
- Leary AG, Ikebuchi K, Hirai Y, Wong GG, Yang Y-C, Clark SC et al. Synergism between interleukin-6 and interleukin-3 in supporting proliferation of human hematopoietic stem cells: comparison with interleukin-1 α . *Blood* 1988; 71:1.759-1.763.
- Lecomte M, Laneuville O, Ji C, DeWitt DL and Smith WL. Acetylation of human prostaglandin endoperoxide synthase-2 (cyclooxygenase-2) by aspirin. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269:13207-13215.
- Libby P, Warner SJC, Friedman GB. Interleukin-1: a mitogen for human vascular smooth muscle cells that induces the release of growth factor inhibitory prostanooids. *J Clin Invest* 1988; 88:487-498.



- Lichtenstein DR, Syngal S and Wolfe MM. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the gastrointestinal tract. *The double-edged sword*. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 5-18.
- Lin SC, Huang TF and Ouyang D. Characterization of the purified anticoagulant principles from *Apis mellifera* (honey bee) venom. *Jour. of the Formosan Med. Assoc.* 1983; 82:629-639.
- Liu C, Ma X, Jiang X, Wilson SJ, Hofstra CL, Blevitt J, Pyati J, Li X, Chai W, Carruthers N and Lovenberg TW. Cloning and pharmacological characterization of a fourth histamine receptor (H(4)) expressed in bone marrow. *Mol Pharmacol.* 2001 Mar;59(3):420-6.
- Lopez VH. Uso potencial del veneno de abejas en la terapéutica medica. Tesis para obtener el título de medico veterinario. México D.F., 1992; 1-26.
- Mace H. Manual completo de apicultura. CECSA, México, 1983.
- Marletta MA, Hurshman AR and Rusche KM. Catalisis by nitric oxide synthase. *Curr Opin Chem Biol.* 1998;2(5):656-663.
- Marquéze B, Deagar MJ and 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.
- Masferrer JL, Reddy ST, Zweifel BS, Seibert K, Needleman P, Gilbert RS and Herschman HR. In vivo glucocorticoids regulate cyclooxygenase-2 but not cyclooxygenase-1 in peritoneal macrophages. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1994, 270:1340-1344.
- McCarthy DM. Mechanisms of mucosal injury and healing: the role of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Scand J Gastroenterol* 1995; 208(Suppl): 24-29.
- McHaugh S, Deighton J, Stewart AG, Lachmann PJ and 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; 25:1126.
- McManus LM, Pinckard RN, Fitzpatrick FA, O'Rourke RA, Crawford MH and Hanahan DJ. Acetyl glyceryl ether phosphorylcholine: intravascular alterations following intravenous infusion into the baboon. *Lab. Invest.*, 1981, 45:303-307.
- Meller ST, Gebhart GF. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain.* 1993;52:127-136.
- Merck Index on CD-ROM. The indomethacin. by Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ. USA. 1996; Version 12:1.
- Merker Phipip C. Inflammation-Histamine and 5-Hydroxytryptamine. *British Medical Bulletin*, 1987;43:256-269.
- Miao XQ. Investigation on the collection of honey bee venom using an electrical shock apparatus. *Jour. Of Fujian Agric. Coll.* 1983; 12:323-326.





- Miyajima A, Kitamura N, Harada T, Yokata K and Arai K. Cytokine receptors and signal transduction. Annual Review of immunology. 1992; 10:295-331
- Moore KW, O'Garra A, De Waal Malefyt-R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. Annu. Rev. Immunol. 1993; 11:165-190.
- Morse R and Hooper T. The Illustrated Encyclopedia of Beekeeping. Edit. E.P. Dutton. USA. 1985; p157,362.
- Moskowitz RW. Sustained-release indomethacin in the comprehensive management of osteoarthritis. Am J. Med. 1985; 25;79(4C):13-23.
- Muraguchi A, Hirano T, Tang B, Matsuda T, Horii Y, Nakajima K et al. The essential role of B-cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B-cells. J Exp Med 1988; 67:332-344.
- Murakami N, Aihara S, Iwata K, Saito T, Naruse T. Effect of a novel non-steroidal anti-inflammatory drug (M-5011) on cytokine levels in rats with monosodium urate crystal-induced pleurisy. Journal of pharmacology, 1999 Apr, 79(4):439-46.
- Mycek MJ, Harvey RA, Champe PC. Anti-inflammatory Drugs and Autacoids. In: Lippincott's Illustrated Review: Pharmacology. Second Edition. Lippincott Williams & Wilkins. 2000; 39:401-403.
- Naka T, Narazaki M, Hirata M, Matsumoto T, Minamoto S, Aono A, Nishimoto N, Kajita T, Taga T, Yoshizaki K et al. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. Nature. 1997; 387:924.
- Nakanishi S. Substance P precursor and kininogen: their structures, gene organizations, and regulations. Physiol. Rev., 1987;67:1117-1142.
- Narumiya S, Sugimoto Y and Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties and functions. Physiol. Rev. 1999; 79:1193-1226.
- Oh J W, Van Wagoner NJ, Rose-John S and Benveniste EN. Role of IL-6 and the soluble IL-6 receptor in inhibition of VCAM-1 gene expression. J. Immunol. 1998; 161:4992.
- Okazaki T, Sagawa N, Okita JR, Bleasdale JE, MacDonald PC and Johnston JM. Diacylglycerol metabolism and arachidonic acid release in human fetal membranes and decidua vera. J. Biol. Chem., 1981; 256:7316-7321.
- O'Neill GP, Mancini JA, Kargman S, Yergey J, Kwan MY, Falgoutyret JP, Abramovitz M, Kennedy BP, Ouellet M, Cromlish W, Culp S, Evans JF, Ford-Hutchinson AW and Vickers PJ. Overexpression of human prostaglandin G/H synthase-1 and -2 by recombinant vaccine virus: inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and biosynthesis of 15-hydroxyicosatetraenoic acid. Mol. Pharmacol., 1994; 45:245-254.
- Papanicolaou DA, Wilder RL, Manolagas SC and Chrousos GP. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. Ann. Intern. Med. 1998; 128:127.





- Pearce D and Yamamoto KR. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor activities distinguished by nonreceptor factors at a composite response element. *Science*, 1993, 259:1161-1165.
- Pearson SP and Kelberman Y. Gastrointestinal effects of NSAIDs. Difficulties in detection and management. *Postgrad Med* 1996; 100: 131-143.
- Pelletier JP, Cloutier JM and Martel-Pelletier J. In vitro effects of NSAIDs and Corticosteroids on the synthesis and secretion of interleukin 1 by human osteoarthritic synovial membranes. *Agents Actions Suppl.* 1993; 39:181-193.
- Pérez RA, Cartaya PL, Valencia FV, Sanjurjo GV, Iliásstigui OT. Biosíntesis de los productos del ácido araquidónico y su repercusión sobre la inflamación. *Rev. Cub. Estomatol.* 1998; 35(2):56-61.
- Piek. Pharmacology of the himenoptera venoms. Insect poisons, allergens, and other invertebrate venoms. Edited by: Anthony T. Marcel Dekker Inc. New York. 1984; 145-167.
- Piñol JF, Paniagua EM. Citocinas, gastritis crónica y *Helicobacter Pylori*. *Rev. Cubana Hematol. Inmunol. Hemoter.* 2000;16(3):184-89.
- Piper PJ. Formation and actions of leukotrienes. *Physiol. Rev.*, 1984, 64:744-761.
- Ploplis VA, Castelino FJ. Non-fibrinolytic functions of plasminogen. *Methods.* 2000; 21:103.
- Polisson R. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: practical and theoretical considerations in their selection. *Am J Med* 1996; 100(Suppl 2A): 31S-36S.
- Portlock SH, ClagueMJ and Cherry RJ. Leakage of internal markers from erythrocytes and lipid vesicles induced by melittin, gramicidin S and alamethicin: a comparative study. *Biochem. Biophys. Acta.* 1990; 1030:1.
- Raidoo DM and Bhoola KD. Pathophysiology of the kallikrein-kinin system in mammalian nervous tissue. *Pharmacol Ther*, 1998; 79(2):105-127.
- Rainsford KD, Ying C and Smith FC. Effects of meloxicam, compared with other NSAIDs, on cartilage proteoglycan metabolism, synovial prostaglandin E2, and production of interleukins 1, 6 and 8, in human and porcine explants in organ culture. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 1997 Oct, 49(10):991-8.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM and Gardner P. Anti-inflammatory and immunosuppressant drugs. In: *Pharmacology*, 1st edition, Churchill Livingstone. 1995; 146-261.
- Regoli D and Barabé J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Rev.*, 1980; 32:1-46.
- Rekká E, Kourounakis L and Kourounakis P. Antioxidant activity of and interleukin production affected by honey bee venom. *Arzneimittelforschung.* 1990; 40:912.





- Reyes García MG. Efecto del veneno de abejas sobre el sistema inmune de ratones con diferentes edades. Tesis para obtener el grado en maestra en ciencias biológicas. F.Q., UNAM., Mexico, D.F., 2001; 94-111.
- Reyes García MG. y García Tamayo F. La importancia de IL-6 como mediador de las interacciones neuroendocrino-inmunológicas. *Acta Bioquim. Clin. Latinoamer.* 1993; 27:333.
- Ribardo AD, Kuhl RK, Peterson WJ and Chopra KA. Role of melittin-like region within phospholipase A₂-activating protein in biological function. *Toxicol* 2002; 40: 519-526.
- Roitt I. El complemento en: *Inmunología*. Cuarta Edición. Editado por Harcourt Brace. España, 1997;13.1-13.16
- Saatcioglu F, Claret F and Karin M. Negative transcriptional regulation by nuclear receptors. *Semin. Cancer Biol.*, 1994, 5:347-359.
- Samuelsson B, Dahlen SE, Lindgren JA, Rouzer CA and Serhan CN. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science*, 1987, 237:1171-1176.
- Samuelsson B, Granstrom E, Green K, Hamberg M and Hammarstrom S. Prostaglandins. *Annu. Rev. Biochem.*, 1975, 44:669-695.
- Samuelsson B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science*, 1983, 220: 568-575.
- Sánchez CA y Mateos JJ. Principios biológicos de la inflamación. Pagina Web: http://www.Web/inflaReacción1_text.htm.
- Savage N, Puren AJ, Orencole SF, Ikejima T, Clark BD, Dinarello CA. Studies on IL-1 receptors on D10S T-helper cell: demonstration of two molecularly and antigenically distinct IL-1 binding proteins. *Cytokine* 1989;1:23-35.
- Schmidt JO. Toxicology of venom from the honeybee genus *Apis*. *Toxicom.* 1995; 33:917.
- Schimmer BP and Parker KL. Hormona Suprarrenocorticotropica; esteroides suprarrenocorticales y sus análogos sintéticos: inhibidores de la síntesis y los efectos de las hormonas suprarrenocorticales. In: Harman JG., Limbird LE., Molinoff PB., Ruddon RW., Gilman AG (Eds.), Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill, New York, 1996; 1551-1578.
- Schrör K. Role of prostaglandins in the cardiovascular effects of bradykinin and angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1992, 20 suppl. 9: S68-S73.
- Schumacher MJ, Egen NB and Tanner D. Neutralization of bee venom lethality by immune serum antibodies. *Am J Trop Med Hyg USA.* 1996; 55:197.
- Schumacher MJ, Schmith JO and Egen NB. Lethality of "killer" bee sting. *Nature*, 1989; 337: 433.





- Seibert K and Masteferrer J. Role of inducible Cyclooxygenase (COX-2) in inflammation. *Receptor*. 1994; 4:17-23.
- Shipolini RA. *Biochemistry of bee venom. Insect poisons, allergens, and other invertebrate venoms.* Edited by: Anthony T.Tu. Marcel Dekker Inc. 1984; 45-86.
- Shkenderov S and Koburova K. Adolapin. A Newly isolated analgetic and anti-inflammatory polipeptides from bee venom. *Toxicom*. 1982; 20(1):317-321.
- Silverstein FE. Improving the gastrointestinal safety of NSAIDs. The development of misoprostol-from hypothesis to clinical practice. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 447-458.
- Singh G, Ramey DR, Morfeld D, Shi H, Hatoum HT, Fries JF. Gastrointestinal tract complications of nonsteroidal anti-inflammatory drug treatment in rheumatoid arthritis. A prospective observational cohort study. *Arch Intern Med* 1996; 156: 1530-1536.
- Singh G and Ramey DR. NSAID induced gastrointestinal complications: the ARAMIS perspective-1997. *J Rheumatol* 1998; 25 (Suppl 51): 8-16.
- Singh G. Recent considerations in nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Am J Med* 1998;105(1B): 31S-38S.
- Sironi M, Breviario F, Prozerpio P. IL-1 stimulates IL-6 production in endothelial cells. *J Immunol* 1989;142:549-555.
- Sironi M, Gadina M, Kankova M, Riganti F, Mantovani A, Zandalasini M and Ghezzi P. Differential sensitivity of in vivo TNF and IL-6 production to modulation by anti-inflammatory drugs in mice. *Int. J. Immunopharmacol.* 1992; Aug; 14(6):1045-1050.
- Sirota L, Punsky I and Bessler H. Effect of indomethacin on IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha production by mononuclear cell of preterm newborns and adults. *Acta Paediatr.* 2000 Mar;89(3):331-335.
- Smith WL. Prostanoid biosynthesis and mechanism of action. *Am. J. Physiol.* 1992; 268:F181-F191.
- Speziale N. *Inflamación en: Margni RA. Inmunología e Inmunológica. Quinta edición. E. Medica Panamericana. Buenos Aires, Argentina, 1996:435-472.*
- Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA et al. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature.* 1997; 387:917.
- Steel DM and Whitehead WA. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol. Today* 1994;15:81.
- Takai Y, Wong GG, Clark SC, Burakoff SJ, Hermann SH. B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1988; 140:508-511.





- Tan LR, Waxman K, Scannell G, Loli G, Granger GA. Trauma causes early release of soluble receptors for tumor necrosis factor. *J Trauma* 1993; 34(5):634-8.
- Tanaka K, Tanaka H, Kanemoto Y, Tsuboi I. The effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on immune functions of human peripheral blood mononuclear cells. *Immunopharmacology*, 1998 Nov, 40(3):209-217.
- Tartaglia LA, Goeddel DV. Two TNF receptors. *Immunol Today* 1992; 13:151-153.
- Thomsen, P., Bjursten, L. M., Ahlstedt, S., Bagge, U. and Bjorksten, B. Inhibitory effect of honey bee venom on immune complex mediated leukocyte migration into rabbit knee-joints. *Agents and Actions*. 1984; 14: 662-666.
- Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA and Mier JW. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* 1994; 83:113.
- Tracey KJ, Lowry SF, Fahey TJ III, Albert JD, Fong Y, Hesse D et al. Cachectin/tumour necrosis factor induces lethal shock and stress hormone response in the dog. *Surg Gynecol Obstet* 1987;164:415-422.
- Turbull AV and River CL. Regulation of the Hypothalamic-Pituitary- Adrenal-Axis by Cytokines: Actions and mechanism of action. *Physiological Rev.* 1999; 79:1-71.
- Vademécum Farmacéutico en CD-ROM. Fármaco o principio activo indometacina. IPE y Reza Editores. 9ª Edición, 2000
- Van de Loo FA, Kuiper S, Van Enckevort FH, Arntz OJ and Van den Berg WB. Interleukin-6 reduces cartilage destruction during experimental arthritis: a study in interleukin-6-deficient mice. *Am. J. Pathol.* 1997; 151:177.
- Vane JR, Bakhle YS and Botting RM. Cyclooxygenase 1 and 2. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1998; 38:97-120.
- Vane JR and Botting RM. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Scand J. Rheumatol*, 1996; 25(102):9-21.
- Vanegas H and Schaible HG. Prostaglandin and cyclooxygenases in the spinal cord. *Progress in Neurobiology.* 2001;64:327-363.
- Vick JA and Shipman WH. Effects of whole bee venom and its fractions (apamin and mellitin) on plasma cortisol levels in the dog. *Toxicom.* 1972; 10:55.
- Wachtfogel YT, DeLa Cadena RA and Colman RW. Structural biology, cellular interactions and pathophysiology of the contact system. *Thrombosis Res.*, 1993;72:1-21.
- William EP. Inflammation, in: *Fundamental Immunology*. Third edition. Edited by Raven Press. New York. 1993:1015-1030.





- Willoughby DA, More AR and Colville-Naash PR. COX-1, COX-2 and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *Lance*. 2000; 355:646-648.
- Wognum AW, Van Gils FCJM, Wagemaker G. Flow cytometric detection of receptors for interleukin-6 on bone marrow and peripheral blood cells of humans and Rhesus monkeys. *Blood* 1993; 81:2.036-2.043.
- Xing Z, Gaudie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF and Achong MK. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J. Clin. Invest.* 1998;101:311.
- 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.
- Zhai MR, Russek S, Wang HC, Beer B and Blume AJ. Mast cell degranulating peptide: a multifunctional neurotoxin. *J. Pharm. Pharmacol.* 1990; 42:457.
- Zimmermann M. Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 1983; 16:109-110.

11.2 Direcciones en Internet

- Cytokines Online Pathfinder Encyclopedia (COPE)
<http://www.copewithcytokines.de/>
- Growth Factors and Cytokines
<http://indstate.edu/thcme/mwking/growth-factors.html>
- Non Steroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDS)
<http://www.arthritis.co.za/nsaids.html>
- Principios biológicos de la inflamación.
http://www.Web/inflaReacción1_text.htm.
- The Cytokines Web
http://cmbi.bjmu.edu.cn/cmbidata/cgff/CGF_Database/cytweb/
- The Cytokine WebFacts
<http://www.cytokinewebfacts.com/>

