



UNIVERSIDAD ABIERTA
Y A DISTANCIA DE MÉXICO



DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA SALUD,
BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

EFFECTO ANTIINFLAMATORIO DE LA APITOXINA DE *Apis mellifera* MEXICANA Y ARGENTINA EN CÉLULAS MONONUCLEADAS *in vitro*

Fernando Enrique Heinz

Asesor interno:

Dra. Diana Elinos Calderón

Asesores externos:

Dr. Rodolfo Cisneros Almazán

Dr. Gerson Soto Peña

San Luis Potosí, S.L.P. 2019

Agradecimientos

A mi asesora y maestra **Dra. Diana Elinos Calderón** por su esfuerzo y dedicación para lograr este título, especialmente agradezco su don de gente y sus recomendaciones.

Muchas gracias doctora con cariño la recordaré.

Con mucho aprecio y respeto a mi asesor externo **Dr. Rodolfo Cisneros Almazán** que confió en este proyecto. siempre amable y muy cálido, excelente persona. Muy agradecido con usted caballero.

Especialmente agradecido con el **Dr. Gerson Soto Peña**, asesor externo que siempre tuvo paciencia y fue en todo momento mi gran **maestro**, siempre lo consideraré como un excelente profesionalista y mejor ser humano.

A mi hija la **Dra. Rapucel Tonantzin Quetzalli Heinz Castro**, a quien espere pacientemente su regreso, por su apoyo en los momentos decisivos y por los bellos momentos que nos esperan por convivir, le dedico estas líneas con todo mi amor.

Dedicatoria

A mi esposa **Lic. Olga Norma Guzmán** a quien antes de todo amo y respeto por su entrega en todo momento en este proyecto de investigación, juntos trazamos este camino y juntos llegamos a feliz término.

Por todas las incontables horas de verme estudiar y apoyarme en todo, dejando postergados otros proyectos de vida, mi máximo reconocimiento es para ti.

Por tus sacrificios y esperanza en mi carrera te dedico este trabajo de Tesis, con todo el amor posible.

INDICE

Resumen	1
Justificación	2
1.1 Conceptos básicos	4
1.1.1 Apicultura	4
1.1.2 Apiterapia	7
1.1.3 Extractor de apitoxina	12
1.1.4 Inflamación	13
1.1.4.1. Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF-α)	16
1.1.4.2. Interleucina 6 (IL-6)	17
1.1.4.3. Interleucina 1beta (IL-1 β)	17
1.1.5 Línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7	17
2. Hipótesis	19
2.1 Hipótesis nula	19
2.2 Hipótesis alterna	19
3. Objetivo General	20
4. Objetivos Particulares	20
5. Metodología	20
5.1 Cultivo de la línea celular RAW 264.7	21
5.2 Conteo de la línea celular RAW 264.7	22
5.3 Tratamientos	23
5.4 Evaluación de los tratamientos sobre la viabilidad celular	24
5.5 Evaluación de la secreción de las citocinas pro-inflamatorias	25
TNF-α, IL-1β E IL-6	
5.6 Análisis estadístico	27
6. Resultados	28
6.1 Cultivo Celular	28
6.2 Evaluación del efecto citotóxico de los tratamientos	28
6.3 Evaluación de la secreción de las citocinas pro-inflamatorias	32
TNF-α, IL-1β e IL-6	
7. Discusión	39
8. Conclusión	43
9. Recomendaciones	44
10. Bibliografía	45

RESUMEN

Dentro de las sustancias encontradas en la naturaleza que pueden ser una gran alternativa dentro de la industria farmacéutica encontramos a la apitoxina, que es un veneno producido por la abeja *Apis mellifera*. El potencial de este veneno se debe a su composición, ya que contiene péptidos y enzimas que pueden regular procesos fisiológicos en el humano.

Dentro de los efectos reportados se encuentra la actividad antiinflamatoria de la apitoxina, sin embargo, existe controversia. Por lo cual, se han realizado diferentes investigaciones con modelos experimentales, en los que se reporta es ocasionado por el incremento de cortisol plasmático, que es un corticoide natural sin contraindicaciones y desventajas en comparación con los de origen sintético.

Otro de los efectos reportados es la acción analgésica, generada por la inhibición de la síntesis de las prostaglandinas que son los mediadores químicos del organismo con gran influencia en el desarrollo del dolor. Así mismo reduce las señales de los impulsos nerviosos que conducen la información del dolor en el proceso sináptico ganglionar (Faúndez-Poblete, 2011).

Existen algunos compuestos ya caracterizados de la apitoxina, entre los que encontramos la melitina, que se reporta que tiene un efecto destructivo contra las células cancerosas, intensifica la actividad fibrinolítica de la sangre, tiene un potente efecto antiinflamatorio y aumenta la resistencia de las membranas de las células ejerciendo una gran propiedad terapéutica. Este veneno también contiene apamina, que se relaciona con un efecto antiinflamatorio potente y duradero. La apamina además estimula la secreción de la heparina, tiene una acción analgésica, actúa excitando el sistema nervioso central, mejorara el aprendizaje. Otro compuesto es la fosfolipasa A₂ (lecitinasa A) que transforma los ácidos grasos no saturados de lecitina en lisolecitina, evita la coagulación de la sangre e induce la liberación de prostaglandinas. El péptido MCD (Mast Cell Degranulation) o factor degranulador de los mastocitos, uno de los compuestos responsables de la liberación de

histamina y serotonina, es 100 veces más activo que la hidrocortisona y tiene estructura similar a la apamina, daña los mastocitos, libera histamina e incrementa la permeabilidad capilar (Grosso, *et al.*, 2018).

En la actualidad se sigue debatiendo sobre quien es el responsable del efecto antiinflamatorio, sin embargo, muchos autores mencionan a la mezcla de estos compuestos como los responsables de inhibir la inflamación. Por lo que las diferencias en concentraciones y composición del veneno podrían dar efectos diferenciales, debido al comportamiento y los hábitos de las abejas y, finalmente, con las medidas de manejo y extracción.

El objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto antiinflamatorio dosis respuesta de la apitoxina de *Apis mellifera* mexicana y argentina en células mononucleadas *in vitro*.

JUSTIFICACIÓN

Debido a que la producción de apitoxina se encuentra en una etapa de desarrollo, es escasa la información que existe con respecto a las concentraciones y composición del veneno, además que aunado a que se sabe que el comportamiento, los hábitos de las abejas y las medidas de manejo y extracción pueden influenciar en los efectos finales.

En la actualidad no existen estudios que comparen el efecto que presenta la apitoxina de la *Apis mellifera* de México con la *Apis mellifera* de Argentina, en las cuales las medidas de manejo y alimentación son muy diferenciales. Esto sumado al proceso de extracción que cada empresa apícola implementa genera incertidumbre si se mantienen sus componentes.

Se tiene el conocimiento que existe una gran variabilidad de la apitoxina por la región geográfica de donde se recolecte la muestra.

Se conoce que en Argentina el proceso de refinamiento de la apitoxina en los laboratorios presenta un alto control de calidad, esto debido a los años de experiencia realizando productos farmacéuticos como cremas, geles y soluciones inyectables con base en el veneno de abeja.

En México estos procesos de extracción no son muy claros, ya que hasta hace pocos años la terapia con este veneno se hacía por picadura directa de la abeja al paciente, por lo que, aunque entren en los estándares internacionales los efectos pueden ser diferentes, por lo tanto, es necesario tener la certeza de su funcionamiento.

Consideramos importante tener la certidumbre que la apitoxina mexicana sea de calidad, dado que la apicultura en México, en especial en las regiones tropicales, es una actividad que se practica desde hace varias centurias y en la actualidad ha adquirido gran relevancia socioeconómica, porque representa una fuente importante de empleos e ingresos en el medio rural (Magaña *et al.*, 2007).

Esta toxina es muy apreciada y bien cotizada en muchos países, sobre todo en Europa y por lo tanto también es una fuente de divisas para México (SAGARPA, 2010).

El precio actual del gramo de apitoxina en el mercado mexicano está en \$4000.00, un ingreso importante y adicional para los apicultores mexicanos.

Además de las implicaciones sociales y económicas los apicultores mexicanos tendrán la certeza que están extrayendo un veneno de calidad y con la posibilidad de ser utilizado en terapias alternativas.

1. Marco Teórico

1.1 Conceptos Básicos

1.1.1. Apicultura

La apicultura en México, en especial en las regiones tropicales, es una actividad que se practica desde hace varias centurias y en la actualidad ha adquirido gran relevancia socioeconómica, ya que representa una fuente importante de empleos e ingresos en el medio rural (Magaña *et al.*, 2007) y de divisas para el país (SAGARPA, 2010). Sin embargo, dicha actividad ha tenido que enfrentar graves problemas debido a la africanización de las colonias (Güemes *et al.*, 2002), la presencia del ácaro *Varroa destructor*, precipitaciones pluviales erráticas, el embate de los huracanes sobre la infraestructura de producción y la flora (Villanueva y Collí, 1998; Güemes *et al.*, 2002)

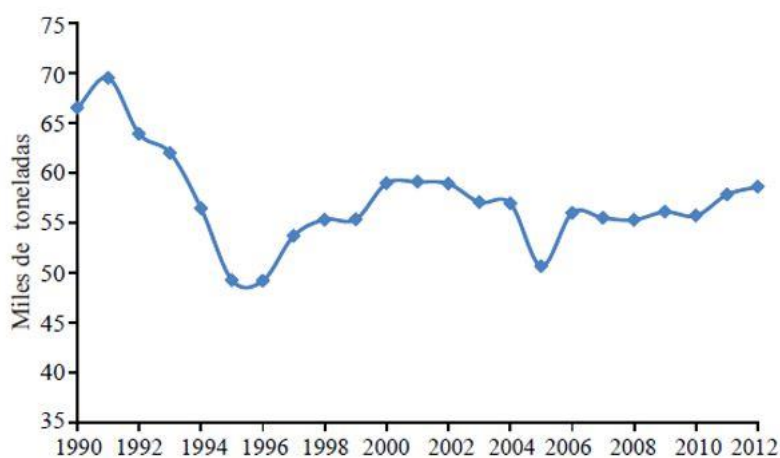
La apicultura es una actividad que se ha desarrollado desde hace muchos años en México (Vidal, 2012). En sus comienzos era una buena fuente de alimentación, aunque posteriormente se ha utilizado con diferentes propósitos, dentro de estos encontramos las terapias para diferentes enfermedades (Apiterapia). Se conoce como Apiterapia "la disciplina médica que emplea los productos de la colmena para el tratamiento y la prevención de enfermedades".

Actualmente, la producción mundial de miel es del orden de 1,1 millones de toneladas, donde seis países como China, Estados Unidos, Argentina, México, Canadá y Alemania concentran la mitad del total. Actualmente se de acuerdo con SAGARPA (2016) se dedican a la apicultura cerca de 45 mil apicultores, distribuidos en todos los estados del país (México), quienes trabajan con 1.9 millones de colmenas (Soto-Muciño *et al.*, 2017).

En México la apicultura es una actividad muy importante, pertenece a subsector pecuario, la producción tiene un volumen que la ubican en el sexto lugar en el mundo, motivo por el cual ocupa el tercer lugar en América en producción y en productividad, también lo es en exportaciones (Magaña *et al.*, 2007).

Por otra parte, el bajo consumo per cápita de miel y los elevados volúmenes de producción interna son, entre otros aspectos, condiciones que le dan al país su vocación exportadora (Güemes *et al.*, 2003)

La tendencia de la producción apícola en México. Aproximadamente 44 mil productores practican esta actividad pecuaria en todo el país y en 2012 poseían un poco más de un millón 898 mil colmenas. La producción de miel durante el período 1990 a 2012 presentó una tendencia general hacia la baja con marcados altibajos (Gráfica 1) y el volumen promedio anual fue de 57.3 mil toneladas.



Fuente: SIACON-SAGARPA.

Gráfica 1. Comportamiento de la producción de miel en México.

Los estados productores de miel en México son: Yucatán, Campeche, Jalisco, Veracruz, Guerrero, Chiapas, Puebla, Quintana Roo, Oaxaca y Michoacán. Yucatán ha tenido la mayor participación y su contribución fue de 16% en 2000-2012.

De las regiones apícolas de México, se sabe que la más importante es la Sureste o Península de Yucatán (1990-2012). En esta región están los estados con relevancia nacional como Yucatán, Campeche, Quintana Roo y Chiapas; mientras que en la región Pacífico se localizan el estado de Jalisco y Michoacán y, en la región Golfo, se ubican Veracruz, Puebla y Oaxaca.

La miel es el principal producto por peso y valor que se obtiene de las colmenas, su destino es tanto la venta como el autoconsumo de la familia. El segundo producto apícola de importancia es la cera, los otros productos con menor importancia relativa por cantidad son el polen, propóleo y la jalea real.

La capacidad de producción del apicultor es muy variable. Por ejemplo, en Jalisco la tenencia promedio es de 335 colmenas, mientras que en Chiapas es de 21. La productividad de los principales factores e insumos. El valor estimado de la productividad fue en promedio de 29.1 kg de miel por colmena al año y representa el resultado de la conjugación de varios factores, entre los que figuran la tecnología y el ambiente físico-natural.

Por otra parte, la apicultura argentina es la más importante y desarrollada de todo el hemisferio sur y una de las más grandes a nivel mundial. Alrededor de 4.000.000 de colmenas y 35.000 productores registrados forman parte de esta cadena que aporta más del 20% de las exportaciones mundiales. Entre los países productores de miel, la Argentina se ha posicionado en el tercer lugar a nivel mundial, después de China y Estados Unidos, lo que representa el 70% de la miel producida en el hemisferio sur del continente americano, a la vez que concentra el 25% de la producción de todo el continente, y el 6% del total producido en el mundo. La producción argentina a mediados de la década del 90 experimentó una notable expansión, un incremento del 40% en apenas 5 años. En promedio, ronda las 80.000 toneladas anuales, y llega a superar las 100.000 toneladas en la temporada 2005, año en que se dio el valor máximo de producción. Gran parte del territorio argentino es apto para el desarrollo de la actividad, y presenta distintos potenciales productivos tanto para la miel como para otros productos de la colmena. El rendimiento promedio de miel, a nivel país, es de alrededor de 25 kilogramos por colmena y por año. Estos niveles de productividad presentan una alta variabilidad a lo largo del territorio, por un lado, debido a la distinta oferta regional de néctar y, por otra parte, debido a la existencia de una brecha tecnológica entre los distintos productores (Ferrari *et al.*, 2011).

1.1.2 Apiterapia

Terapia con abejas o apiterapia

La apiterapia se ocupa del mantenimiento y/o restablecimiento de la salud mediante el uso de los productos de la colmena, los cuales tienen aplicaciones múltiples, pero específicas. Seis son los productos que nos provee la colmena: apitoxina o veneno de abejas, cera, jalea real, miel, polen y propóleos (Bentancourt, *et al.*, 2015).

Tal vez el producto de la colmena más exótico es el veneno de abeja. El uso terapéutico principalmente de la apitoxina se ha utilizado en muchas culturas durante siglos. Los países orientales, han utilizado la capacidad curativa de veneno de abeja, clínicas dedicadas exclusivamente a la Apiterapia son comunes en Asia, su popularidad se está extendiendo a Europa y en América. Es un ejemplo clásico del principio homeopático, que dice que una sustancia que produce los síntomas de una enfermedad es una cura para dicha enfermedad. Enfermedades reumáticas producen hinchazón, dolor e inflamación. La picadura de abeja produce los mismos síntomas. La picadura estimula el sistema inmune para aliviar la inflamación causada por el veneno de abeja, mientras que alivia los síntomas de la enfermedad reumática al mismo tiempo. La apiterapia estimula el sistema inmune a través del hipotálamo, la hipófisis y las glándulas suprarrenales. Este efecto terapéutico estimula el sistema inmune en lugar de suprimirlo, contrario a los efectos de muchas drogas (Mraz, 2009).

El veneno de abeja es secretado por dos tipos de glándulas: una glándula ácida y otra básica que se encuentran en el abdomen del insecto. La glándula principal es la ácida, está estructurada por un par de tubos largos y finos, situados en la parte posterior de la cavidad abdominal. Estos tubos se unen formando un conducto común que se abre en el saco de veneno, un órgano de reserva de la sustancia segregada hasta el momento de ser utilizada por la abeja en el acto de picar. Este saco se une a la base del aguijón por un tubo similar al resto de la glándula (Lema, 2013).

Las glándulas del veneno tienen una formación asincrónica es decir hay células en todos los estados, unas más nuevas y otras más viejas, esto permite que la abeja produzca veneno hasta los 20 a 15 días de edad que es cuando tiene el saco lleno, si en este tiempo la abeja aguijonea a algún insecto y gasta alguna cantidad del veneno puede ser repuesto, cuando las abejas ya están muy viejas las células se mueren y no hay producción de veneno (Roldan, 2014). El aguijón de una abeja está formado por dos estiletes encerrados en un estuche que se comunican con la glándula encargada de elaborar el veneno; una vez elaborado, se acumula en la base del aguijón hasta su exteriorización, siendo las hembras las que tienen el aparato picador y glándula de veneno, y dentro de éstas, las más eficientes desde el punto de vista del veneno son las pecoreadoras, abejas obreras que trabajan fuera de la colmena (Lema, 2013).

De acuerdo con Feldman (2001), existen cuatro componentes principales en la composición de la apitoxina. Dos son péptidos de bajo peso molecular y los dos restantes tienen acción enzimática; es decir que, los péptidos son de menor peso molecular que las enzimas. En el veneno de abejas el principal péptido es la melitina, que es también el principal componente biológicamente activo. La melitina integra cerca del 50 – 55% peso seco del veneno de abejas, este péptido se encarga de activar la membrana de las células, disminuyendo la tensión superficial, en dosis muy pequeñas es un poderoso antiinflamatorio, estimula los músculos lisos, aumenta la permeabilidad capilar y con ello incrementa la circulación sanguínea, por tanto baja la presión de la misma, mejora su coagulación, además es un poderoso inmunoestimulante e inmunosupresor, tiene acción anticancerígena, es un excelente antibacteriano, antifúngico y antiviral (Feldman, 2001; Bogdanov, 2015). La apamina, forma parte entre el 2 al 3 % del peso seco del veneno de abejas. Es un excelente antiinflamatorio, estimulante de la liberación de cortisona, acción antiserotonina, aumenta la capacidad de defensa, inmunosupresor y estimula el sistema nervioso central en dosis muy pequeñas (Roldan, 2014).

Las enzimas son proteínas que catalizan reacciones específicas, tal es el caso de fosfolipasa A 10-12%. Destruye los fosfolípidos y disuelve la membrana celular de los organismos de sangre; disminuye la presión arterial y la coagulación de la sangre; en cambio la fosfolipasa B cumple con la actividad de desintoxicación (Bogdanov, 2015).

La hialuronidasa, cataliza la hidrólisis de proteínas, por lo tanto, la penetración en el tejido; dilata los vasos sanguíneos y aumenta su permeabilidad, provocando un aumento de circulación de la sangre (Bogdanov, 2015).

El veneno de abeja tiene cualidades antioxidantes, por lo que es eficaz reforzando el sistema inmunológico. Investigaciones han establecido que la apitoxina estimula la actividad del sistema inmune estimulando al cuerpo a producir sus propios agentes de curación. Estudios demuestran la existencia de compuestos en la apitoxina de importantes propiedades farmacológicas.

Otra aplicación del estudio de la apitoxina es en el desarrollo de fármacos. Gracias a las acciones analgésicas, neurotóxicas, vasoactivas, hemolíticas y citotóxicas de la apitoxina (Peiren *et al.*, 2005) se le han atribuido efectos terapéuticos, aunque en su mayoría no han sido plenamente formalizados por métodos científicos. La acción analgésica y antiinflamatoria de la apitoxina ha impulsado su uso como terapia alternativa en casos de artritis (Lee *et al.*, 2005), además de sugerirse el poder de este veneno para inhibir la infección por VIH (Hood *et al.*, 2013). Recientes estudios realizados en modelos animales han demostrado el efecto de la apitoxina sobre el sistema dopaminérgico que podría beneficiar el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento de trastornos mentales, ya que su principal componente es la melitina, la cual presenta propiedades antipsicóticas sin los efectos secundarios clásicos de los fármacos neurolépticos similares (Dantas *et al.*, 2014).

En conclusión, podemos decir que en las últimas décadas la OMS ha promovido el uso de medicina preventiva, la cual comprende la a los productos naturales y se

promueve su consumo, entre las que se encuentra la Apiterapia, la Fitoterapia, y otras llamadas medicinas "naturales" ganen espacio dentro de la "medicina convencional" (WHA62.13, 2009).

Se ha encontrado una mayor incidencia del uso de este tipo de medicina en pacientes que tiene una enfermedad crónica, como cáncer, dolor e inflamación crónica, depresión, SIDA enfermedades dermatológicas e insuficiencia renal crónica.

La apiterapia tiene una gran potencia para el tratamiento de enfermedades de salud pública, entre las que encontramos a las enfermedades autoinmunes como la artritis, mejorando la calidad de vida del paciente al disminuir el dolor crónico y la inflamación. Esta técnica cien por cierto natural consiste básicamente en picar una o varias picaduras de abeja sobre la piel del paciente; como resultados positivos e inmediatos ya que puede ayudar a mejorar la salud y curar o aliviar distintas dolencias musculares, neurológicas e incluso del sistema inmune. Salvo contraindicaciones (García-Anton *et al.*, 2015).

Algunas de las propiedades generales de apitoxina como se nos muestra en la tabla 1, en donde nos habla de algunos de sus principales parámetros a medir y en la tabla 2 están los principales componentes de la apitoxina (Felice y Padin, 2012).

Tabla 1. Propiedades generales de la apitoxina de *Apis mellifera*

Parámetros	Característica
Gravedad específica	1.1316
pH	Reacción acida
Solubilidad	En agua. Reacción insolubilidad en alcohol. Soluciones acuosas inestables de marcada descomposición por acción bacteriana. Se ha probado su estabilidad en glicerina
Efectos térmicos	Unidades de rápido secamiento a la temperatura ambiente. Soporta 100 °C durante 1 h o Unidades durante 10 días sin perder su poder.
Estabilidad química	Presenta Unidades actividad reductora frente al permanganato de potasio, bicromato de potasio, bromo, cloro y peróxido de hidrógeno. Desnaturalizada por amoniac, ácido pícrico y dicromato de potasio.
Estabilidad enzimática	Las pepsinas, pancreatina, renina y vegetales papaína, papayotina reducen su actividad.
Unidades Convencionales	Una abeja aporta en la aguijoneada unos 0.0010 mg de apitoxina seco (0.25-0.35) mg de apitoxina líquida. A esto se le llama una unidad convencional.

Tabla 2. Características de los componentes principales de la apitoxina

Componente	Observaciones
Melitina	Fracción F1, integrada por 13 aminoácidos: leucina, glicina, alanina, isoleucina, treonina, lisina, arginina, ácido glutámico y otros. La fracción F1 tiene efecto hemolítico.
Fosfolipasa A e hialuronidasa	Fracción F2, integrada por 18 aminoácidos, principalmente lisina y arginina. La fracción F2 tiene efecto hemolítico indirecto.
Proteínas	Adolapina, Apamina, Catecolaminas, Dopamina, Histamina, Histidina, Noradrenalina, Péptido 401, Péptido MCD, Secapina y Tetrapina.

1.1.3 Extractor de apitoxina

De acuerdo con García (2012), el extractor de apitoxina es una tecnología electrónica que consta de una bandeja de vidrio atravesada por hilos metálicos, los cuales se conectan a una fuente de energía que emite pulsos eléctricos periódicamente. El flujo de corriente genera un campo electromagnético que causa una gran alteración dentro de las abejas haciendo que ataquen a la bandeja de vidrio, inoculando en esta acción una gota de su veneno. La ubicación del extractor de veneno debe ser en la entrada de la colmena. La cantidad de veneno que se obtenga varía significativamente de acuerdo con el clima, al estado de salud de la colmena, al aparato colector y a la técnica de extracción. Una ventaja de este procedimiento es que la tasa de mortalidad de las abejas es muy baja, ya que no pueden incrustar su aguijón en el vidrio, anulando el riesgo de que se desprenda de su cuerpo, como usualmente sucede cuando pican directamente. En el proceso de extracción es indispensable aislar el veneno de abejas del aire para evitar que se oxide y se deteriore. El veneno en micro- cristales es retirado con una fina cuchilla de la superficie del vidrio y se almacena en frascos ámbar que lo protegen de la luz mientras espera para ser procesado en el laboratorio (Dussart, 2007). El veneno se obtiene en láminas de vidrio color ámbar las que se deben llevar posteriormente a un laboratorio donde se remueve, pesa, envasa y almacena. El tiempo adecuado para la extracción de apitoxina no debe sobrepasar los 30 minutos ya que existe la

volatilización de los compuestos de la apitoxina. De acuerdo con la fisiología de la abeja la frecuencia adecuada para la extracción de apitoxina es de 20 días, ya que en este tiempo la abeja renueva su veneno para su exteriorización. Para la extracción de apitoxina se debe mantener intervalos eléctricos, ya que las abejas sufren daños al ser impactadas en forma permanente con corriente eléctrica, los intervalos eléctricos deben ser de alrededor de 4 segundos apagados y 4 segundos encendidos durante 30 minutos como máximo.

1. El raspado de los cristales de apitoxina, debe efectuarse con una hoja muy fina de una trincheta. La operación se hará después de que hayan transcurrido entre 15 y 20 horas, para permitir que el veneno pierda la humedad. La cosecha se realiza dentro de una caja de madera recubierta, o construida con madera de formica, y en la parte superior, con un vidrio corredizo. En uno de los laterales tiene dos orificios y una manga, para introducir los brazos. Hay que almacenar los cristales en un frasco oscuro color ámbar, que lo proteja de la luz solar, posteriormente colocarlo en una conservadora con hielo seco y de ahí alojarlo y conservarlo en la heladera, por un tiempo máximo de 2 años.
2. Debe usarse mascara protectora de nariz y gafas para los ojos.
3. Procurando no inhalarlo.

1.1.4 Inflamación

Es un proceso tisular constituido por una serie de fenómenos moleculares, celulares y vasculares de finalidad defensiva frente a agresiones físicas, químicas o biológicas.

La inflamación se puede dividir en diferentes fases, la primera es la liberación de mediadores, la segunda el efecto de estos, la llegada de las moléculas y células inmunes, finalmente la regulación del proceso inflamatorio y la reparación del daño, los mediadores de origen celular como son los mediadores preformados en gránulos secretores, los mediadores de nueva síntesis, son metabolitos derivados del ácido araquidónico tales como: prostaglandinas, leucotrienos y lipoxinas, y son

sintetizados por dos tipos de enzimas: ciclooxigenasa (que forma las prostaglandinas y tromboxanos), lipooxigenasa que origina lipoxinas (para formar los ácidos monohidroeucoico, eicoico y dihidroeucoicosatetraico) y leucotrienos (Toledo, 2014).

Desde el punto de vista de importancia, la regulación del proceso inflamatorio se divide en dos etapas, una primera fase inicial con alteraciones vasculares que facilitan el traslado celular, y una segunda fase caracterizada por la secreción de factores quimiotácticos, que determinan la llegada de células inmunes procedentes de la sangre y de los tejidos circundantes.

En la fase inicial llegan moléculas como las inmunoglobulinas, el complemento y proteínas de fase aguda. Aunque todos los tejidos al lesionarse van a liberar mediadores de la inflamación, la fuente principal de los mismos es el mastocito, esta es una célula inmune inespecífica que también procede de la médula ósea, aunque los mecanismos de su diferenciación no son bien conocidos. El mastocito contiene en el citoplasma gránulos con mediadores de la inflamación preformados. Cuando se activa, libera estos factores, junto con otros de carácter lipídico que son sintetizados de *novo*. El mastocito se detecta en casi todos los tejidos, siendo localizado principalmente alrededor de los pequeños vasos, sobre los que actuarán los mediadores una vez liberados (Gallin, 1988; Ishizaka, 1989; Roit *et al.*, 1992).

La liberación de mediadores ocurre por distintas causas, pero quizás la más frecuente sea la lesión directa de la célula por el agente agresivo. Cuando la inflamación progresa y se acumulan en el foco suficientes factores activados del complemento, el C3a y el C5a, actuando sobre receptores de membrana, inducen la activación del mastocito y la consiguiente liberación de mediadores. Otro mecanismo de activación se desarrolla mediante la IgE que es captada en la membrana del mastocito, ya que éste presenta receptores para la porción Fc de esta inmunoglobulina (FcεR). El antígeno activa al mastocito cuando conecta específicamente con dos IgE contiguas sobre la membrana (Ishizaka, 1984; Koo, 1989).

Los mecanismos bioquímicos que subyacen a este proceso no son aún bien conocidos. Parece que el proceso se inicia en la membrana con activación de adenilato-ciclasa y de fosfolipasa A2. La adenilato-ciclasa determina un incremento inicial de la concentración intracitoplasmática de cAMP, mientras que la fosfolipasa ataca a los lípidos de membrana produciendo ácido araquidónico (Martínez-Beltrán,1992; David *et al.*, 1984).

Estos mediadores, que se encontraban preformados en los gránulos, son principalmente histamina, enzimas proteolíticas, el factor quimiotáctico del eosinófilo (ECF-A, eosinophil chemotactic factor), factor quimiotáctico del neutrófilo (NCF, neutrophil chemotactic factor) y heparina (Ishizaka,1984).

El ácido araquidónico formado puede seguir dos vías metabólicas, la de la enzima ciclooxigenasa que determina la producción de prostaglandinas (PG) y tromboxanos y la de la lipooxigenasa que conduce a la formación de leucotrienos (LT) (Martínez-Beltrán,1992).

Todas estas sustancias de carácter lipídico, sintetizadas de *novo* por el mastocito, son un segundo grupo importante de mediadores de la inflamación. El basófilo es una célula preponderantemente sanguínea, acude a los tejidos durante el proceso inflamatorio y supone un refuerzo en la liberación de mediadores ya que se activa por los mismos mecanismos que el mastocito y libera mediadores equivalentes a los de esta célula (Roit *et al.*, 1992).

En la fase tardía llegan las células como los basófilos que contribuye, junto con el mastocito, a la liberación de mediadores. El neutrófilo que elimina al germen mediante fagocitosis liberando factores tóxicos, el monocito/macrófago procedente de la sangre, y de los tejidos cercanos el macrófago que sintetizan péptidos inespecífico, que son el Factor de Necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleucina 1 y 6 (IL-1 β y IL-6), que determina la aparición de fiebre, probablemente induciendo la síntesis de prostaglandinas E (PGE) en las células endoteliales que revisten los

vasos sanguíneos del hipotálamo; a su vez la PGE actúa sobre el centro termorregulador. Sobre la médula ósea favorece la producción y liberación de neutrófilos, con la consiguiente neutrofilia. En el hígado incrementa la síntesis de proteínas de la fase aguda. A nivel local, activan la proliferación y diferenciación de las células T y B contribuyendo, así a la respuesta específica. También activa la proliferación de fibroblastos y producción de colágeno, fenómenos incluidos en la fase de reparación de la inflamación (Watkins *et al.*, 1995).

Como la mayor parte de las respuestas inmunes, el fenómeno inflamatorio se encuentra estrechamente regulado. Algunos de los mediadores que producen activación, al variar su concentración o actuar sobre distintos receptores, van a producir inhibición, consiguiendo, de esta forma, un equilibrio o modulación de la respuesta inflamatoria.

Algunos mediadores inflamatorios son las citocinas entre las más importantes tenemos TNF- α , IL-1 β e IL-6.

Las citocinas son proteínas glucosiladas de bajo peso molecular, Extremadamente potentes que actúan en concentraciones picomolares. En general se producen de forma transitoria y local, transmitiendo la información entre células de un tejido o entre varios tejidos con mecanismos preferentemente de tipo paracrino y autócrino. Implicadas en los procesos de inmunidad e inflamación regulan el comienzo, la amplitud y la duración de la respuesta (Balkwill y Burke 1989).

1.1.4.1. Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α)

El TNF- α es el principal mediador de la respuesta inflamatoria aguda frente a microorganismos infecciosos. Su principal origen celular son los macrófagos, linfocitos T estimulados y las NK. El estímulo más potente para activar la síntesis de TNF- α por macrófagos es la presencia de lipopolisacáridos. La principal función del TNF- α es estimular la atracción de neutrófilos y monocitos a los focos de infección y activar a estas células para que erradiquen a los microorganismos (Abbas *et al.*, 2015).

1.1.4.2. Interleucina 6 (IL-6)

La IL-6 es una citocina que participa en la inmunidad innata y adaptativa. Se sintetiza por macrófagos, Linfocitos T, células endoteliales y linfoblastos en respuesta a microorganismos y a otras citocinas como IL-1 y TNF. En la inmunidad adaptativa la IL-6 estimula el crecimiento de los linfocitos B que se han diferenciado en células productoras de anticuerpos. IL-6 también actúa como factor de crecimiento autócrino. Favorece las relaciones inmunitarias celulares estimulando la síntesis de algunas citocinas proinflamatorias e inhibiendo la generación y las acciones de los linfocitos T reguladores que actúan suprimiendo la activación del sistema inmune manteniendo la homeostasis (Abbas et al., 2015).

1.1.4.3. Interleucina 1beta (IL-1 β)

La interleucina-1 es una citocina producida por múltiples estirpes celulares, principalmente por macrófagos activados. Se produce en grandes cantidades como respuesta a infecciones o cualquier tipo de lesión o estrés. Es un mediador clave en la respuesta inflamatoria ocasionando fiebre, neutrofilia y producción de proteínas de fase aguda. (Abbas et al., 2015).

Cuando las causas de la agresión han desaparecido o han sido eliminadas por la propia respuesta inflamatoria, se inician los procesos de reparación.

1.1.5 Línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7

Esta línea celular deriva de la línea celular monocito/macrófago RAW 264.7, para diferenciarse necesita de lipopolisacárido (LPS). Esta propiedad hace que su comportamiento sea más parecido a macrófagos normales procedentes de diferentes cepas de ratón.

Las células RAW 264.7 son células de tipo monocito / macrófago derivada de ratones BALB / c. Estas células son descritas como un excelente modelo de

macrófagos, por lo que son capaces de realizar todas sus funciones, como secreción de citocinas hasta pinocitosis y fagocitosis.

Tras la estimulación con LPS, las células RAW 264.7 aumentan la producción de óxido nítrico (NO) y aumenta su capacidad de la fagocitosis.

La American Type Culture Collection (ATCC), el principal proveedor de líneas celulares recomienda su uso hasta el pasaje no. 18. Esta recomendación se basa en los resultados de un estudio que muestra que la capacidad RAW 264.7 para diferenciarse en osteoclastos. (Collin-Osdoby P, Osdoby P, 2012).

Los macrófagos, junto con los neutrófilos constituyen el principal mecanismo de defensa del organismo frente agentes extraños como los microorganismos (Abbas et al. 2015).

Los macrófagos juegan un papel crítico en el desarrollo de la respuesta inmunológica. Estas células actúan como mediadoras de un sin número de mecanismos diferentes, ya que se encuentran en disposición de realizar una serie de funciones sin necesidad de ningún tipo de estímulo, dentro de las cuales encontramos el proceso inflamatorio (Comalada, 1998).

El sistema inmunológico del ratón es semejante al del ser humano, tiene una respuesta inmune humoral (anticuerpos producidos por linfocitos B) y otra mediada por células (linfocitos T citotóxicos, macrófagos, linfocitos T asesinos naturales y liberación de citocinas como TNF- α , IFN- γ , etc.).

2. Hipótesis

2.1 Hipótesis Nula

No existe diferencia en el efecto antiinflamatorio de la apitoxina de *Apis mellifera* mexicana y la *Apis mellifera* argentina en células mononucleadas *in vitro*.

2.2 Hipótesis Alterna

Existe diferencia en el efecto antiinflamatorio de la apitoxina de *Apis mellifera* mexicana y la *Apis mellifera* argentina en células mononucleadas *in vitro*.

3. Objetivo General

Evaluar el efecto antiinflamatorio dosis respuesta de la apitoxina de *Apis mellifera* mexicana y la *Apis mellifera* de argentina en células mononucleadas *in vitro*.

4. Objetivos Particulares

- Estandarizar el cultivo de la línea celular RAW 264.7.
- Evaluar la viabilidad celular a diferentes concentraciones de la apitoxina mexicana y la argentina por el método del MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), C₁₈H₁₆N₅ Br S, en cultivo de células mononucleadas.
- Analizar la respuesta antiinflamatoria a diferentes concentraciones de la apitoxina mexicana y la argentina por la secreción de citocina inflamatorias TNF- α , IL-1 β y IL-6 por el método de ELISA.
- Comparar el efecto anti-inflamatorio de la Apitoxina mexicana y la argentina en sus diferentes concentraciones.

5. Metodología

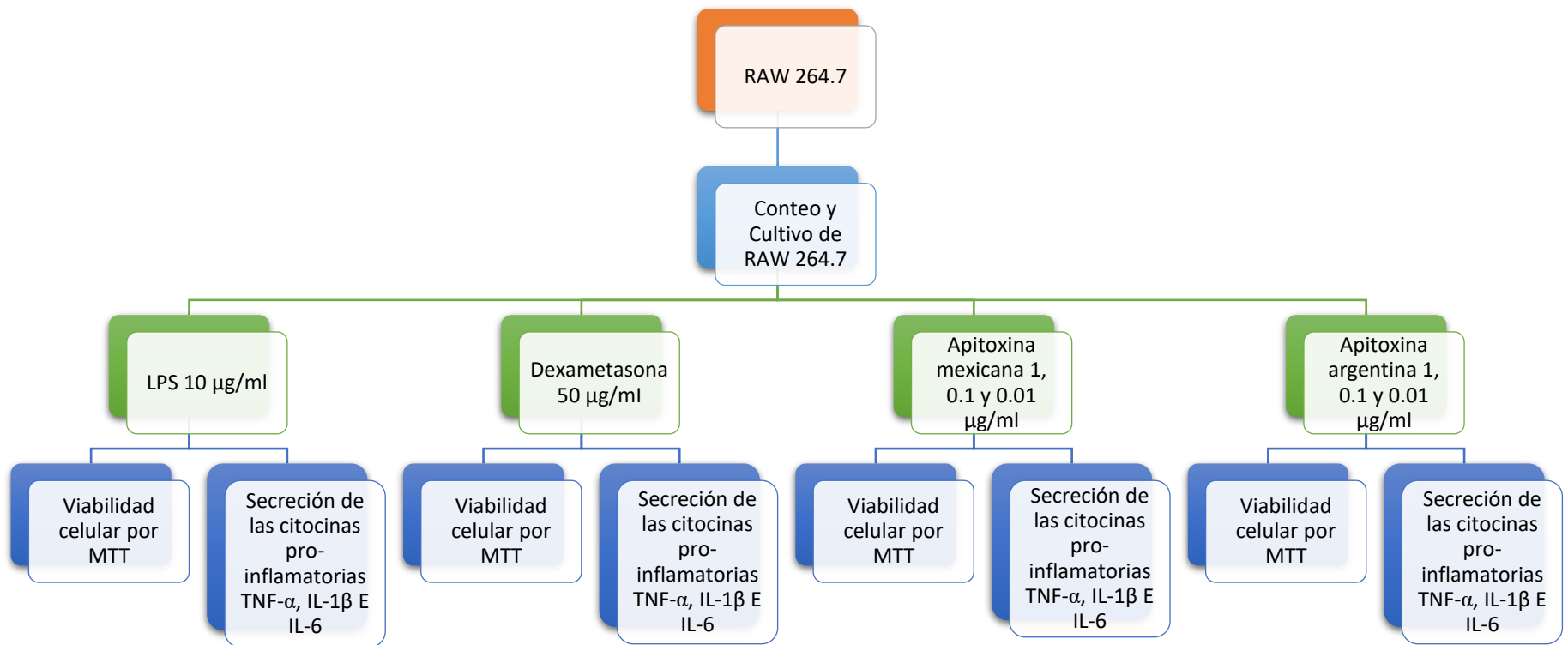


Figura 1 Diseño experimental

5.1 Cultivo de la línea celular RAW 264.7

A partir de una alícuota de la línea celular RAW 264.7 se realizó un cultivo a trabajarse entre las transferencias 1 y 7.

La alícuota correspondiente a 5×10^6 células fue descongelada a temperatura ambiente y con ayuda de 5ml de medio suplementado Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con Suero fetal bovino (SFB) al 10% (Tabla 3), las células fueron centrifugadas en 5ml a 1500 rpm, se descartó el sobrenadante y el pellet celular fue resuspendido en medio y sembrado en placas p100 hasta llegar a confluencia del 80% realizando cambios de medio cada tercer día y manteniendo las células a 37°C con 5% CO₂.

Tabla 3. Composición de los medios de cultivo

Tipo de Medio de cultivo	Composición.
Medio de base	Medio de Eagle modificado de Dulbecco de alta glucosa (4,500 mg/L) formulado por ATCC número de catálogo 30-2002.
Medio de crecimiento	Medio base suplementado con L-glutamina 4 mM, piruvato de sodio 1 mM, SFB al 10%, Antibiótico y antimicótico: Penicilina 100 U, estreptomycin 0.1 mg, Anfotericina B 0.25 µg, Piruvato de sodio 1mM y HEPES acido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico 10mM.
Medio de congelación	Medio de crecimiento completo complementado con DMSO al 5% (v / v)

El medio base contiene una concentración de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) de 1.5 g / L. Esta concentración está destinada para uso en CO₂ al 5% en aire. Se puede requerir bicarbonato de sodio adicional para su uso en incubadoras que contienen porcentajes más altos de CO₂, debido a que el cultivo se realizó en incubadora al 5% se mantuvieron las concentraciones de NaHCO₃.

El medio de cultivo debe tener un pH de 7.1 ajustado con HCL 1M y NaOH 1M, para mantener la esterilidad el medio fue filtrado a través de una membrana de 0.22µm, que ayudó a incrementar el pH hasta un resultado final de 7.4 aproximadamente. Se ajustará la suspensión celular a una concentración de 2.5×10^5 células/ml. Se realizarán cultivos celulares en dos tipos de placas. Para la cuantificación de la secreción de citocinas pro-inflamatorias se utilizaron placas de fondo plano de 12 pozos a las que se agregará 2 ml de la suspensión celular por pozo; para la evaluación de la viabilidad celular se utilizarán placas de fondo plano de 96 pozos a las que se agregará 200 µl de la suspensión celular por pozo. Las placas fueron incubadas a 37°C y a una atmósfera de CO₂ al 5%, durante 24 y 48 horas. Los cultivos se realizarán bajo estrictas condiciones de esterilidad, en una campana de flujo laminar horizontal.

5.2 Conteo de la línea celular RAW 264.7

Se agregará 90 µl de azul tripán al 0.4% y 10 µl de la suspensión celular en un microtubo de PCR, la cual se mezcla por pipeteo de 5 a 8 veces. Se colocarán 10 µl de la mezcla en cada cámara del hemocitómetro, dejando que las células se asienten por 1 minuto. En un microscopio en campo iluminado se colocará el objetivo 40x en el trayecto óptico y se contarán por separado a las CMN azules (muertas) y a las CMN birrefringentes o blancas (vivas) que sean observadas en cada uno de los cuadros por considerar.

La cuenta celular para cada cuadrante externo (cuadros 4x4) deberá oscilar entre 20-50 células, teniendo un total de células para los cuatro cuadrantes 4x4 de 80-200 células. Las células localizadas en los márgenes externos de cada esquina no deberán ser incluidas en las cuentas.

Para calcular la concentración celular presente en la suspensión celular original (aquella de la cual se tomó la alícuota cuando se han utilizado los cuatro cuadros de 4x4 del hemocitómetro):

Concentración=Cuenta de células vivas ÷ 4 × factor de dilución × 10,000.

5.3 Tratamientos

Para determinar el efecto de los tratamientos sobre la viabilidad celular se utilizarán los siguientes tratamientos: LPS 10 µg/ml, Meloxicam 50 µM (1752 µg/ml), Apitoxina mexicana 1, 0.1 y 0.01 µg/ml, Apitoxina argentina 1, 0.1 y 0.01 µg/ml y un testigo de medio RPMI-1640. Se preparará un stock por tratamiento en medio de cultivo como vehículo, de manera que la concentración se ajustará a un volumen de 20 µl y 200 µl por pozo. Todos los tratamientos serán esterilizados por filtración utilizando filtros de 0.22 µm de diámetro.

Para la determinación de la secreción de las citocinas pro-inflamatorias se utilizarán cultivos celulares en presencia del estímulo inflamatorio (10 µg/ml de LPS), a los cuales se les adicionará por separado cada uno de los tratamientos previamente descritos (Figura 2).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Testigo	Testigo	Testigo			1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml	} Apitoxina Mexicana				
B	Control de muerte (H ₂ O ₂)	Control de muerte (H ₂ O ₂)	Control de muerte (H ₂ O ₂)			Control positivo (Dexametasona)	Control positivo (Dexametasona)	Control positivo (Dexametasona)					
C	Control de LPS	Control de LPS	Control de LPS			□ LPS 10 µg/ml							
D	0,01 µg/ml	0,01 µg/ml	0,01 µg/ml	} Apitoxina Argentina									
E	0.1 µg/ml	0.1 µg/ml	0.1 µg/ml										
F	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml										
G	0,01 µg/ml	0,01 µg/ml	0,01 µg/ml	} Apitoxina Mexicana									
H	0.1 µg/ml	0.1 µg/ml	0.1 µg/ml										

Figura 2. Disposición de los tratamientos y controles por triplicado en la placa de 96 pocillos, la distribución se realizó de la misma forma para 24 y 48h.

Se preparó un stock por tratamiento en medio de cultivo como vehículo, de manera que la concentración se ajustará a un volumen de 20 µl y 200 µl por pozo. Todos los tratamientos fueron esterilizados por filtración utilizando filtros de 0.22 µm de diámetro.

5.4 Evaluación de los tratamientos sobre la viabilidad celular

La citotoxicidad de los tratamientos se evaluará mediante la prueba de MTT, este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5 dimetiliazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio (MTT) por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, esta reacción produce un compuesto de color azul insoluble (formazan), que permite determinar la actividad mitocondrial de las células tratadas.

La prueba de viabilidad se llevará a cabo en placas de fondo plano de 96 pozos, donde se incubará cada tratamiento por triplicado, considerando dos tiempos de incubación 24 y 48 h. Pasado el tiempo de incubación para cada placa, se adicionará 20 µl de MTT a una concentración de 5 mg/ml de RPMI-1640/pozo y se incubarán durante 4 h más; posteriormente se centrifugarán las placas a 1500 rpm por 8 min, se descartará el sobrenadante y se resuspenderá el botón celular con

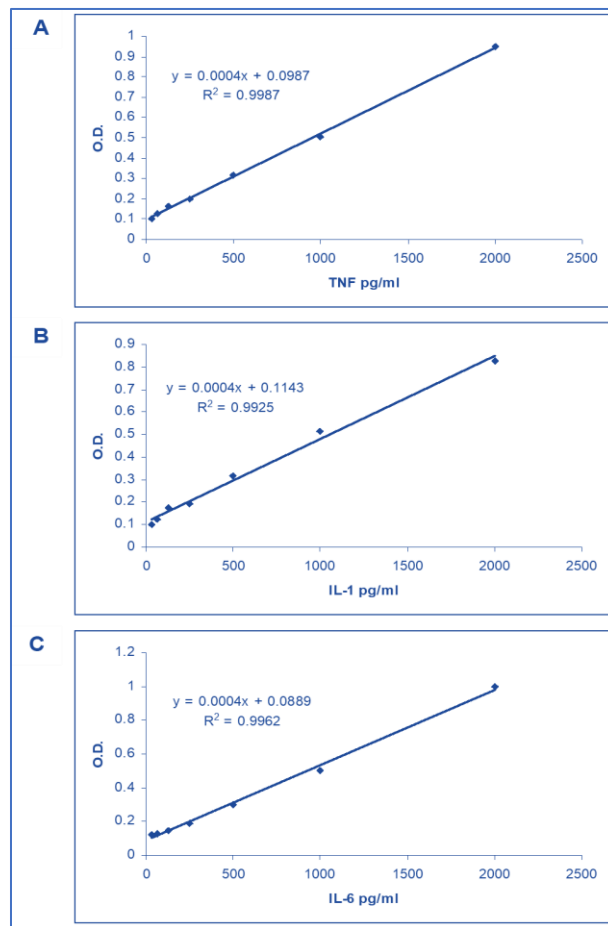
100 μ l de DMSO/pozo durante 20 min para disolver los cristales de formazan. Al finalizar este tiempo, se medirá la coloración en un lector de ELISA a una longitud de onda de 570 nm.

5.5 Evaluación de la secreción de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-1 β E IL-6

El método que se utilizará para medir la secreción de citocinas pro-inflamatorias, será el método de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay); esta metodología consiste en recubrir los pozos de la placa con un primer anticuerpo (100 μ l de 100 μ g/ml) el cual reconoce en este caso a las citocinas de estudio, este se incuba por 24h a 4°C, posterior al periodo de incubación se retira el excedente y se realizan lavados de 200 μ l con PBS1x y Tween 20, es común que en el pozo de reacción queden espacios disponibles por lo cual se agrega una solución de bloqueo de SFB al 10% (200 μ l) y se incuba por 1h, el segundo paso crítico es la adición de la muestra problema (50 μ l), permitiendo que las citocinas presentes en la muestra se adhieran al anticuerpo, esta muestra o en su caso los estándares (50 μ l de estándar a 2000pg/ml en diluciones seriales 1:1 con PBS 1x) permanecen en incubación durante 24h a 4°C posteriormente se realizan los lavados correspondientes para retirar el exceso de muestra y se adicionan 100 μ l de un segundo anticuerpo a una concentración de 25 μ g/ml, este reconoce una porción proteica diferente de las citocinas este segundo anticuerpo denominado también anticuerpo de detección se encuentra conjugado con biotina la cual servirá como anclaje para la enzima que producirá la coloración en este caso la avidina peroxidasa, se incuba en la placa por 2h a temperatura ambiente para mejorar su adherencia; Finalmente se agrega avidina peroxidasa (100 μ l), la cual se incuba para su conjugación con la biotina por 30 minutos y se agregan 100 μ l del sustrato peróxido de hidrogeno y ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzothiazolina-6-sulfónico) la reacción enzimática producirá una coloración verde esmeralda proporcional al contenido de citocinas. Se determina la densidad óptica (O.D.) de

las muestras en un lector de ELISA dentro de los siguientes 10 min a una longitud de onda de 405 nm. Los resultados se compararán contra una curva patrón (Gráficas 2, 3 y 4), para determinar la concentración de citocinas presentes en los sobrenadantes de los cultivos celulares.

Para determinar la secreción de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6, se utilizará el sobrenadante obtenido de los medios de cultivo. El sobrenadante será separado en tubos estériles, los cuales serán centrifugados a 1200 rpm durante 5 min. Se alicuotará el sobrenadante en tubos eppendorf y se guardarán en oscuridad a -70° C hasta su análisis.



Gráfica 2, 3 y 4. Curva patrón para TNF, IL-1 e IL-6 respectivamente.

5.6 Análisis estadístico

Se realizará estadística descriptiva; para evaluar la diferencia entre grupos de tratamiento se realizará la prueba t-Student para las variables que mostraran distribución normal. Para la evaluación de más de dos grupos de tratamientos se realizará el análisis de varianza (ANOVA) usando como prueba post-hoc la prueba de Bonferroni. Se considera como valor de significancia diferencias con $p < 0.05$.

6. Resultados

6.1 Cultivo celular

A partir de una alícuota descongelada de las células RAW 264.7, correspondiente a una densidad de 5×10^6 células/ml se realizó un cultivo celular, el cual se dejó en 5 ml de medio DMEM por 48 horas (Imágenes 1 y 2).

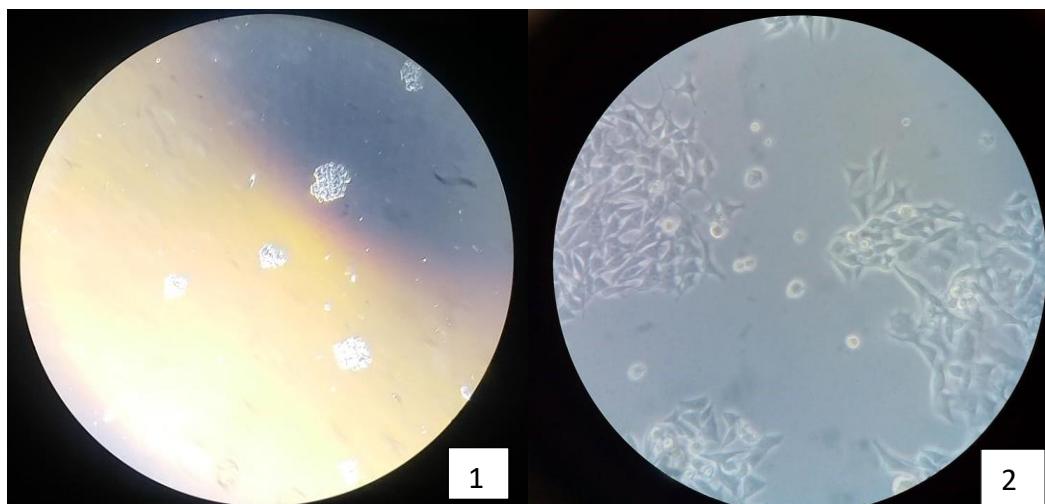


Imagen 1. Crecimiento celular. Con un objetivo de 10 X.

Imagen 2. Crecimiento celular. Con un objetivo de 45 X.

A estas células se les evaluó la viabilidad celular mediante el método de exclusión con azul tripano, encontrando una viabilidad superior al 80%. A partir de este se realizaron otros cultivos ajustando a una densidad de 1.25×10^6 células/ml. por pozo en una placa de 96 pocillos, para la evaluación de la viabilidad celular y secreción de citocinas. Los cultivos se realizarán bajo estrictas condiciones de esterilidad, en una campana de flujo laminar vertical (Imagen 3).

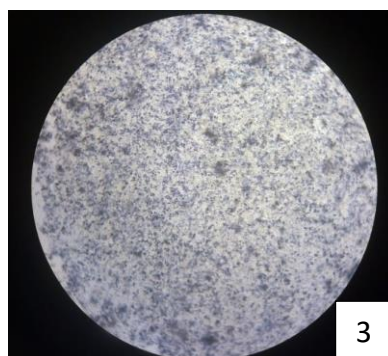


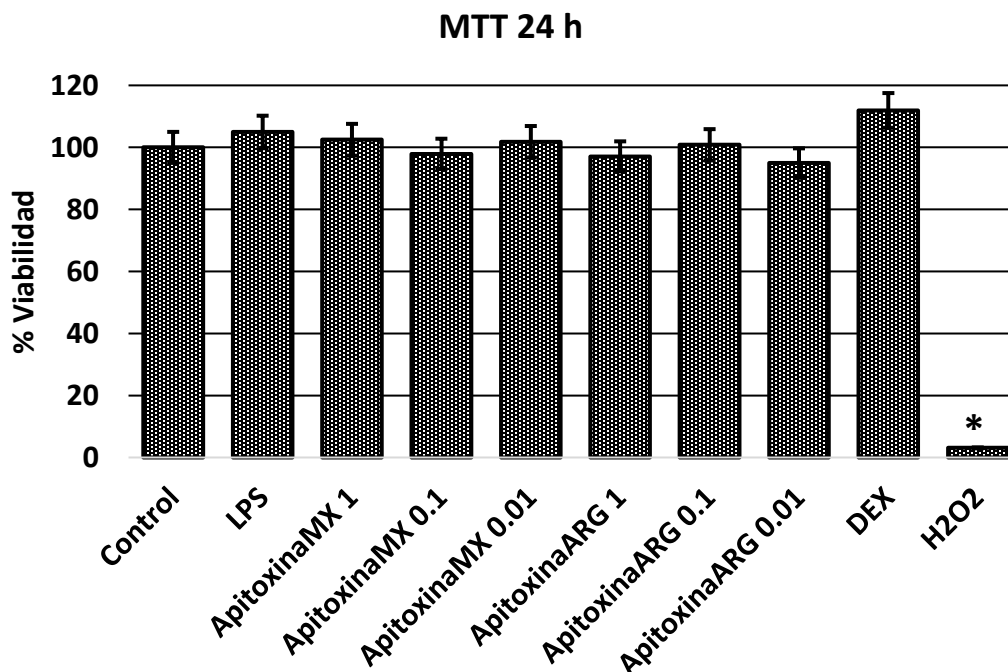
Imagen 3. Células con azul de tripano

6.2 Evaluación del efecto citotóxico de los tratamientos

Para evaluar la posible citotoxicidad de los tratamientos, se determinó la viabilidad celular mediante la prueba de MTT en la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7, esto con el fin de asegurar que los cambios observados en la secreción de las citocinas pro-inflamatorias, se deban a la acción de los tratamientos y no a que exista una muerte celular. El porcentaje promedio obtenido en el cultivo celular sin tratamiento fue considerado como el porcentaje total de viabilidad (100%), debido a que no se encuentran bajo el estrés de ningún tratamiento.

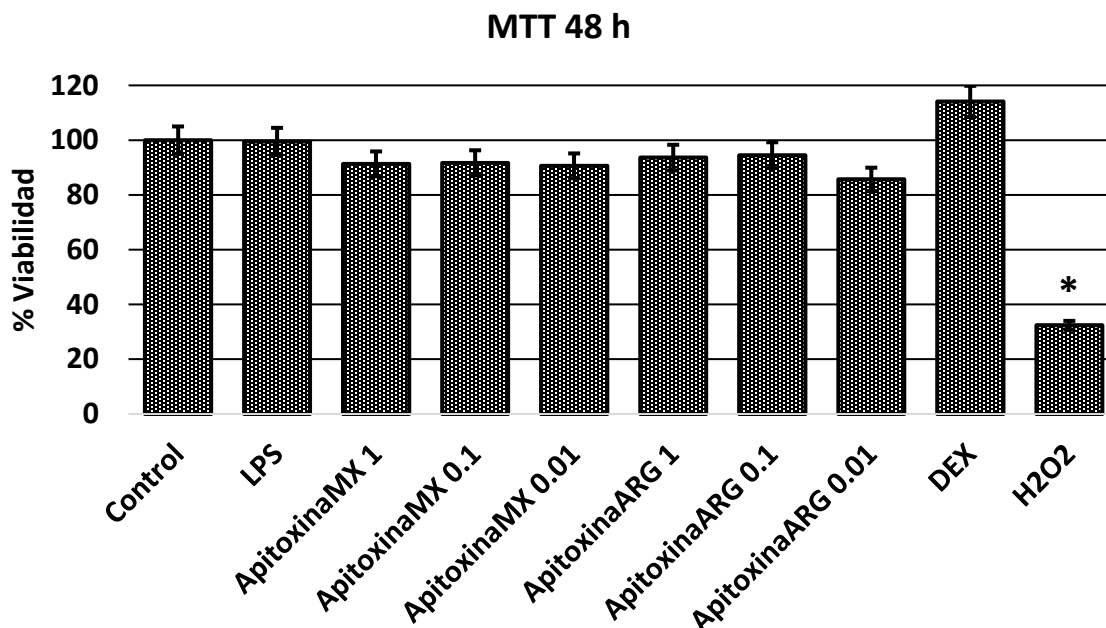
Se realizaron cultivos celulares con una densidad 1.2×10^6 cel./ml, a los cuales se les aplicaron los diferentes tratamientos por triplicado. En estos cultivos se realizó la prueba de citotoxicidad a las 24 y 48 h.

Los resultados de esta prueba a las 24 h muestran que la mayor viabilidad fue con el tratamiento de dexametosona con un efecto estimulante, lo que proporciona un porcentaje de viabilidad del 111.92 %. En este mismo experimento observamos que el tratamiento de apitoxina argentina a una concentración de 0.01 $\mu\text{g/ml}$ fue el que presentó el porcentaje de viabilidad más bajo de 94.93 %, sin embargo, esta es una buena viabilidad para continuar evaluando esta concentración (Gráfica 5).



Gráfica 5. Porcentajes de la viabilidad celular. Las barras representan el porcentaje de viabilidad celular a las 24 h en función de la actividad metabólica, considerando el 100% de la viabilidad en las células control. n=3 por triplicado, *p<0.05 vs control.

Para validar los resultados de esta prueba se utilizó un control de muerte celular con la adición de H₂O₂, el cual genera ruptura de la membrana celular causando muerte por necrosis. En este control observamos un porcentaje de viabilidad del 3.09% a las 24 h. Se encontró diferencia significativa del control con el tratamiento de H₂O₂. Este mismo experimento se realizó, pero a las 48 h, observando un efecto parecido al de 24 h, esto es que la dexametasona es el tratamiento con mejor viabilidad y la apitoxina argentina a la concentración de 0.01 µg/ml fue el de más baja viabilidad (Gráfica 6). En lo que respecta al control de muerte se encontró una viabilidad del 32.39%.



Gráfica 6. Porcentajes de la viabilidad celular. Las barras representan el porcentaje de viabilidad celular a las 48 h en función de la actividad metabólica, considerando el 100% de la viabilidad en las células control. n=3 por triplicado, *p<0.05 vs control.

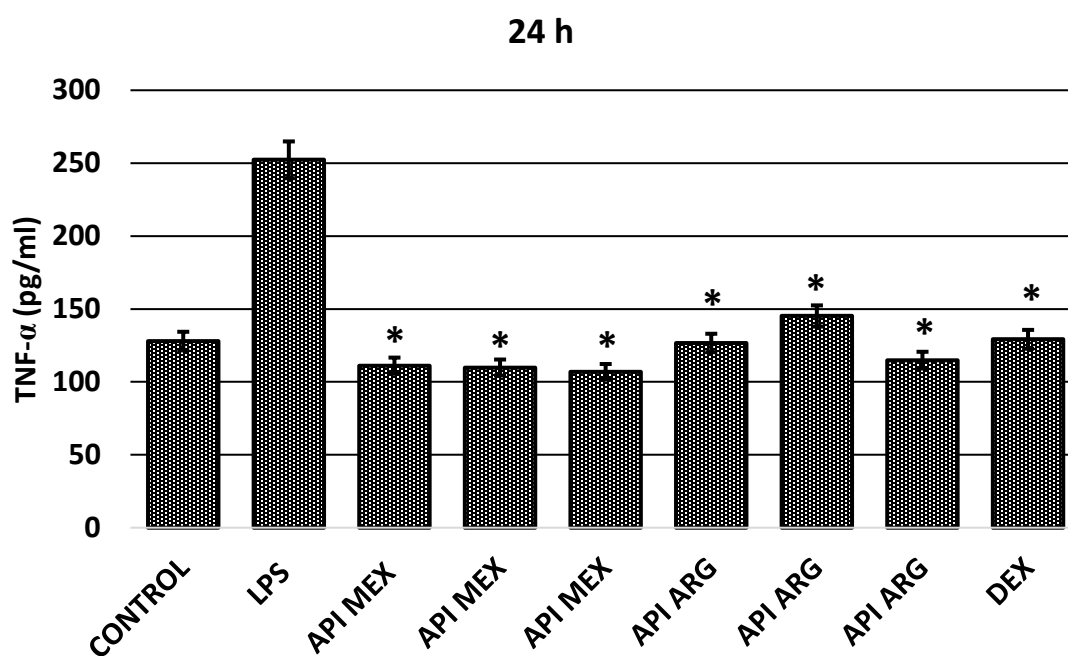
Los resultados obtenidos demostraron que ninguno de los tratamientos induce citotoxicidad celular; esto indica que las dosis utilizadas de la apitoxina, de dexametasona y de LPS, no afectan la viabilidad celular a las 24h y 48h (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentajes de la viabilidad celular después de 24 y 48 h de tratamiento. La tabla muestra el porcentaje de viabilidad celular a las 24 y 48 h en función de la actividad metabólica (Los valores representan la media ± DE).

% Viabilidad	24 h	48 h
Control	100	100
LPS	104.97	99.52
ApitoxinaMX 1	102.46	91.31
ApitoxinaMX 0.1	97.90	91.72
ApitoxinaMX 0.01	101.80	90.62
ApitoxinaARG 1	97.09	93.62
ApitoxinaARG 0.1	100.84	94.51
ApitoxinaARG 0.01	94.94	85.67
DEX	111.92	114.13
H2O2	3.09	32.40

6.3 Evaluación de la secreción de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6

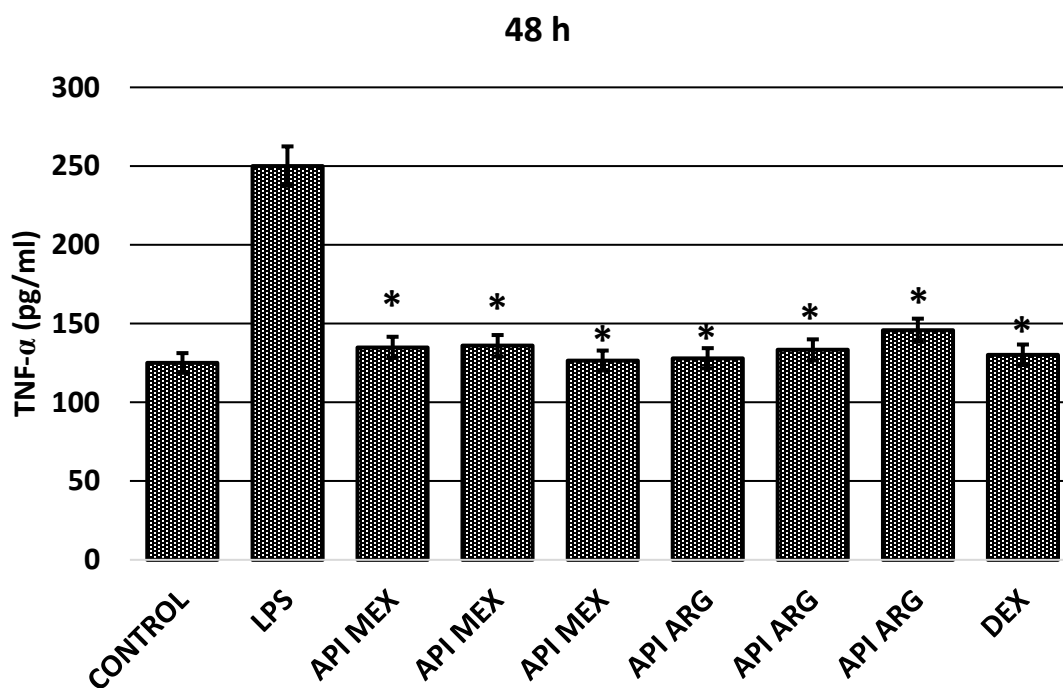
En relación con el efecto de la apitoxina sobre la secreción de TNF- α , se observó una disminución significativa en la secreción de esta citocina pro-inflamatoria con todos los tratamientos, en comparación con los cultivos estimulados únicamente con LPS a las 24 h de incubación (Gráfica 7).



Gráfica 7. Secreción de TNF- α (pg/ml). Los valores representan la media \pm DE de la secreción de citocina a las 24 h de tratamiento de apitoxina mexicana (API MEX) y argentina (API ARG). n=3 por triplicado, *p<0.05 vs LPS.

Por otra parte, se observa una mayor inhibición en la secreción de esta citocina, con la apitoxina mexicana a la concentración de 1 μ g/ml, encontrando una secreción de 106.90 pg/ml. Esta inhibición llega a ser tan buena como el tratamiento con dexametasona que tiene una secreción de 129.21 pg/ml, sin que exista diferencia entre ambos tratamientos.

A las 48 h se sigue observando la misma tendencia a la inhibición de todos los tratamientos en comparación con el estímulo de LPS. Encontrando que al igual a las 24 h el tratamiento con la apitoxina mexicana a la concentración de 1 µg/ml presento la mejor inhibición (Gráfica 8).



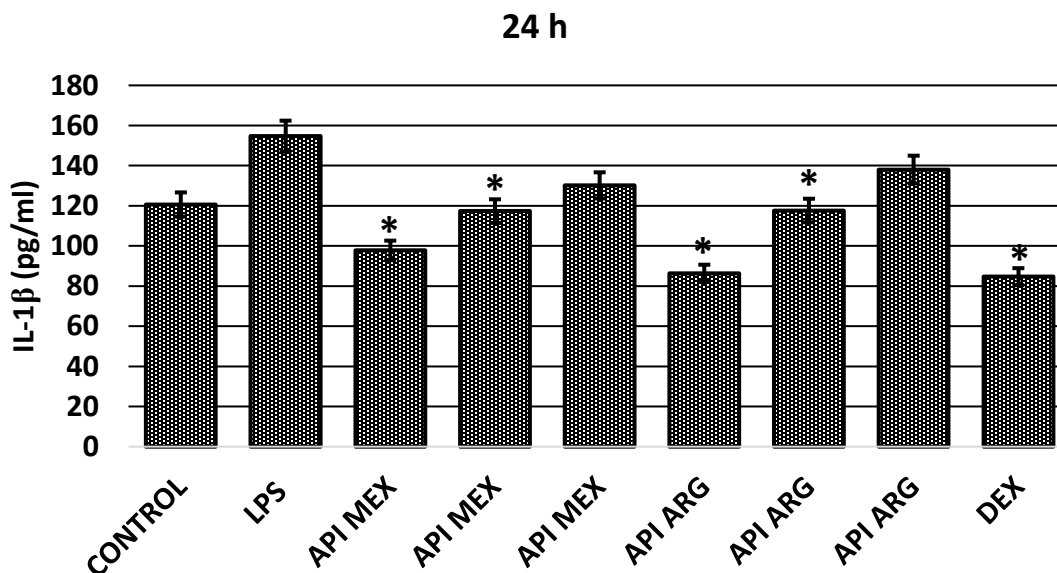
Gráfica 8. Secreción de TNF-α (pg/ml). Los valores representan la media ± DE de la secreción de citocina a las 48 h de tratamiento de apitoxina mexicana (API MEX) y argentina (API ARG). n=3 por triplicado, *p<0.05 vs LPS.

Sin embargo, la secreción de TNF-α no se incrementa de manera significativa de las 24 a las 48 h, de manera homogénea en todos los tratamientos. Manteniéndose la misma secreción en el tratamiento con LPS y aumentando en el resto de los tratamientos (Tabla 5).

Tabla 5. Secreción de TNF- α (pg/ml) después de 24 y 48 h de tratamiento. La tabla muestra la secreción de citocina a las 24 y 48 h (Los valores representan la media \pm DE).

SECRECIÓN TNFα	24 h	48 h
CONTROL	127.97	125
LPS	252.29	250
APITOXINA MEX 0.01	111.11	134.90
APITOXINA MEX 0.1	109.85	135.94
APITOXINA MEX 1	106.90	126.56
APITOXINA ARG 0.01	126.68	128
APITOXINA ARG 0.1	145.20	133.33
APITOXINA ARG 1	114.90	145.83
DEX	129.21	130.21

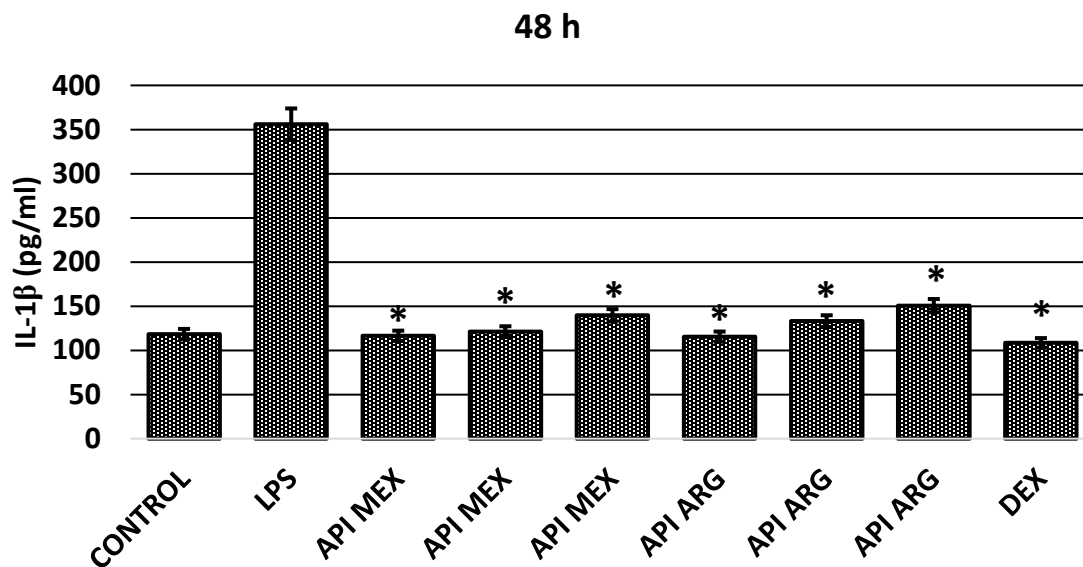
La Gráfica 9 muestra el efecto de los tratamientos sobre la secreción de IL-1 β después de 24 h de incubación. Los resultados mostraron una disminución en la secreción de esta citocina con todos los tratamientos, siendo el mejor el de apitoxina argentina a la concentración de 1 μ g/ml, encontrando una secreción de 86.33 pg/ml. Esta inhibición llega a ser tan buena como el tratamiento con dexametasona que tiene una secreción de 84.69 pg/ml, sin que exista diferencia entre ambos tratamientos.



Gráfica 9. Secreción de IL-1 β (pg/ml). Los valores representan la media \pm DE de la secreción de citocina a las 24 h de tratamiento de apitoxina mexicana (API MEX) y argentina (API ARG). n=3 por triplicado, *p<0.05 vs LPS.

En relación con el tiempo de 48 h, se observa un incremento en la secreción de esta citocina con todos los tratamientos, siendo menor estadísticamente, en todos los tratamientos en comparación con el tratamiento con LPS. Encontrando que al igual a las 24 h el tratamiento con la apitoxina argentina a la concentración de 1 μ g/ml presento la mejor inhibición (Gráfica 10).

Los resultados obtenidos para esta citocina presentan diferencia con respecto al TNF α , ya que los tratamientos con apitoxina mexicana y argentina a la concentración más baja de 0.01 μ g/ml a las 24 h no inhiben de manera significativa su secreción, aunque existe una disminución de esta. A las 48 h la secreción es inhibida de manera significativa en todos los tratamientos en comparación con el LPS (Tabla 6)

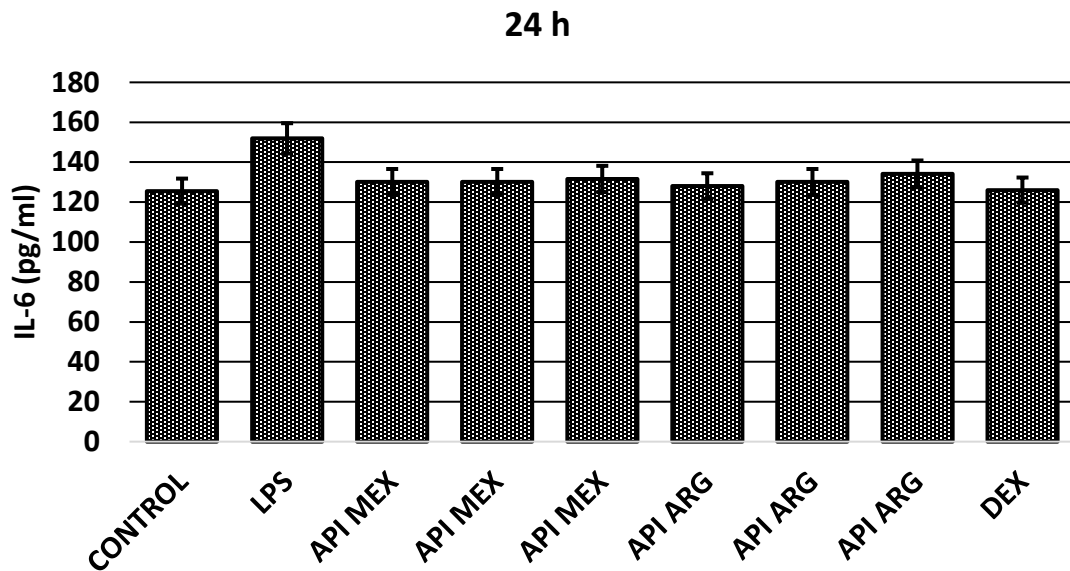


Gráfica 10. Secreción de IL-1 β (pg/ml). Los valores representan la media \pm DE de la secreción de citocina a las 48 h de tratamiento de apitoxina mexicana (API MEX) y argentina (API ARG). n=3 por triplicado, *p<0.05 vs LPS.

Tabla 6. Secreción de IL-1 β (pg/ml) después de 24 y 48 h de tratamiento. La tabla muestra la secreción de citocina a las 24 y 48 h (Los valores representan la media \pm DE).

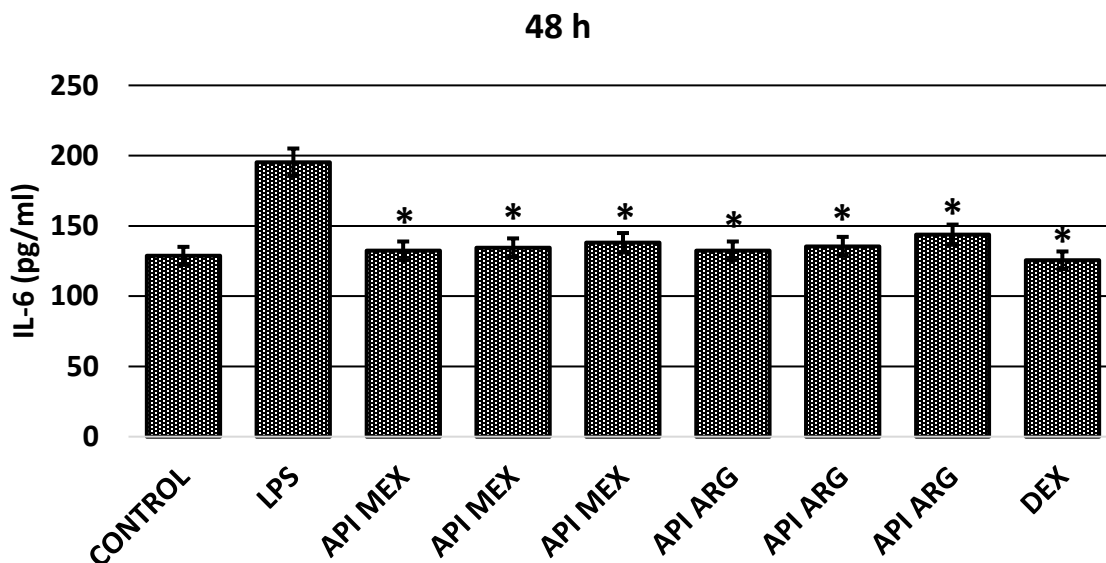
SECRECIÓN IL-1 β	24 h	48 h
CONTROL	120.64	118.37
LPS	154.68	356.06
APITOXINA MEX 1	97.77	116.48
APITOXINA MEX 0.1	117.37	121.21
APITOXINA MEX 0.01	130.17	139.68
APITOXINA ARG 1	86.33	115.53
APITOXINA ARG 0.1	117.65	133.05
APITOXINA ARG 0.01	138.07	150.57
DEX	84.69	108.43

Respecto al efecto de la apitoxina sobre la secreción de IL-6, no se observó diferencia significativa en la inhibición sobre esta citocina entre los tratamientos en comparación con el control de LPS a las 24 h de incubación (Gráfica 11).



Gráfica 11. Secreción de IL-6 (pg/ml). Los valores representan la media \pm DE de la secreción de citocina a las 24 h de tratamiento de apitoxina mexicana (API MEX) y argentina (API ARG). n=3 por triplicado.

A las 48 h ya se observa una inhibición en la concentración de esta citocina, el cual se presenta en todos los tratamientos, siendo estos estadísticamente significativo. Los resultados mostraron una disminución en la secreción de esta citocina con todos los tratamientos, siendo el mejor el de apitoxina a la concentración de 1 μ g/ml, tanto en la mexicana como la argentina, encontrando una secreción de 132.29 pg/ml. Esta inhibición llega a ser tan buena como el tratamiento con dexametasona que tiene una secreción de 125.52 pg/ml, sin que exista diferencia entre ambos tratamientos (Gráfica 12).



Gráfica 12. Secreción de IL-6 (pg/ml). Los valores representan la media \pm DE de la secreción de citocina a las 48 h de tratamiento de apitoxina mexicana (API MEX) y argentina (API ARG). n=3 por triplicado, *p<0.05 vs LPS.

El comportamiento de esta citocina fue muy diferente al comportamiento de las otras dos, al no encontrar inhibición en todos los tratamientos a las 24 h. Este comportamiento también se encontró en la dexametasona (Tabla 6).

Tabla 7. Secreción de IL-6 (pg/ml) después de 24 y 48 h de tratamiento. La tabla muestra la secreción de citocina a las 24 y 48 h (Los valores representan la media \pm DE).

SECRECIÓN IL-6	24 h	48 h
CONTROL	125.51	128.65
LPS	151.93	195.31
APITOXINA MEX 1	130.08	132.29
APITOXINA MEX 0.1	130.08	134.38
APITOXINA MEX 0.01	131.61	138.02
APITOXINA ARG 1	128.05	132.29
APITOXINA ARG 0.1	130.08	135.42
APITOXINA ARG 0.01	134.15	143.75
DEX	126.02	125.52

7. Discusión

Este proyecto de investigación fue con el fin de demostrar el efecto antiinflamatorio de la apitoxina mexicana y compararla con la argentina, debido a que los apicultores mexicanos recién han comenzado a obtenerla como producto de la colmena. Se tenían serias dudas sobre si la técnica de recolección del veneno era el adecuado y si esto repercutía en la calidad de la apitoxina. El hecho que la apitoxina es utilizada como medicina alternativa natural en muchos lugares sobre todo en el sur del continente americano y en otras naciones, da pie a su evaluación farmacológica, la Organización Mundial de la Salud, 2009, en la 62ª Asamblea Mundial de la Salud, Ginebra, 18- 22 de mayo de 2009, menciona que es una alternativa de la medicina tradicional.

Además, puede haber usos adicionales para la acupuntura con veneno de abeja. Uno de estos podría ser para la artritis gotosa. Un estudio preliminar en ratas indicó que la administración intradérmica de veneno de abeja como un gel transdérmico con una micro aguja produjo una disminución de la inflamación, respuesta medida por la liberación de óxido nítrico (Zhao *et al.*, 2016).

Yuva Bellik en el 2015 nos habla de esta posibilidad, “en los últimos tiempos, el veneno de abeja (*Apis mellifera* L.) se ha convertido en el foco de interés como una forma de medicina alternativa y preventiva para el tratamiento de una serie de casos clínicos como artritis, reumatismo, dolor, cáncer y una amplia gama de otras condiciones. La apitoxina contiene varias sustancias bioquímicas y farmacológicamente activas. Algunos de estos compuestos están bien estudiados y sus mecanismos de acción establecidos, a pesar del hecho de que pocos están en ensayos clínicos”.

Según Lee y Bae (2016) el efecto antiinflamatorio de la melitina es efectiva en enfermedades como la artritis, arterioesclerosis, inflamación del hígado y enfermedades neurodegenerativas como lo es la esclerosis lateral amiotrófica.

Mencionan (Alizadehnohi M *et al*, 2012) que el veneno de abeja es una alternativa incluso para el cáncer de ovarios, también Yuva Bellik menciona la posibilidad que esta toxina sea antitumoral, este trabajo menciona que hay evidencias de diversos estudios que han afirmado que proponen que la apoptosis, necrosis y lisis de células tumorales como posibles mecanismos por los cuales la apitoxina inhibe el crecimiento tumoral, esto depende de la concentración evaluada, teniendo que agregar altas concentraciones para tal efecto.

Lo anterior, demuestra que para poder tener efecto citotóxico se necesitan concentraciones altas para generar efecto citotóxico. Dejando nuestras concentraciones viables para evaluar efectos antiinflamatorios, obtenidos estos resultados también por la técnica MTT utilizando 5 µg/mL.

Esto nos abre un campo de investigación muy prometedor para lo cual hemos establecido una metodología, utilizando una línea celular, esto debido a las características que presentan las células normales que generalmente se dividen solo un número limitado de veces antes de perder su capacidad de proliferación, que es un evento determinado genéticamente conocido como senescencia. Estas líneas celulares son conocidas como finitas. Sin embargo, algunas líneas celulares se vuelven inmortales a través de un proceso llamado transformación, que puede ocurrir espontáneamente o puede ser inducida química o viralmente. Cuando una línea celular finita sufre una transformación y adquiere la capacidad de dividirse por tiempo indefinido, se convierte en una línea celular continua (Vera, 2007).

Utilizamos la línea celular RAW 264.7 cuyas características fueron las adecuadas para esta investigación. Esta línea celular es fácil de propagar, tiene una alta eficacia para la transfección de ADN, es sensible a la interferencia del ARN y admite la replicación de norovirus murinos. Esta línea celular es negativa para inmunoglobulina de superficie (slg-), la (la-) y Thy-1.2 (Thy-1.2). Cuando se estableció esta línea, se describió como que no secretaba partículas de virus detectables y era negativa utilizando el ensayo de formación de placa XC. Basado

en un estudio publicado por la Dra. Janet W Hartley, Leonard H Evans, Kim Y Green, Zohreh Naghashfar, Alfonso R Macias, Patricia M Zerfas y Jerrold M Ward en 2008.

El ensayo de viabilidad celular (actividad metabólica) por reducción del compuesto MTT, lo utilizamos para tener la certeza que las apitoxinas son viables en concentración como lo menciona Lee y Bae, menciona que en concentraciones muy altas de melitina puede ocurrir muerte celular, en todo caso el resultado de nuestro proyecto ha demostrado que dosis de apitoxina mexicana 1, 0.1 y 0.01 $\mu\text{g/ml}$ y apitoxina argentina 1, 0.1 y 0.01 $\mu\text{g/ml}$, los resultados de viabilidad celular están en los parámetros permitidos, incluso están por encima del 80%.

Los investigadores (Hannaneh *et al*, 2017) también mencionan que el ensayo de MTT es excelente para demostrar la viabilidad en líneas celulares.

El método que utilizamos para medir la secreción de citocinas pro-inflamatorias, fue el método de ELISA, los resultados se compararon contra una curva patrón para determinar la concentración de citocinas presentes en los sobrenadantes de los cultivos celulares antes mencionados.

Las respuestas inflamatorias mediadas por citoquinas proinflamatorias son un componente clave de la inmunidad protectora contra muchas infecciones.

Nam, KW., Je, KH., Lee, J.H. *et al*. Mencionan que la actividad antiinflamatoria del veneno de abeja (*Apis mellifera*) fue estudiada mediante la actividad de la ciclooxigenasa (COX) y la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF- α e IL-1 β), *in vitro*. COX-2 participa en la producción de prostaglandinas que median el dolor y apoyan el proceso inflamatorio. La partición acuosa del veneno de abeja mostró fuertes efectos inhibitorios dependientes de la dosis sobre la actividad de la COX-2 pero no inhibió la actividad COX-1. La partición acuosa se fraccionó en tres partes por diferencias de peso molecular, inhibieron fuertemente la actividad de la COX-2 y la expresión del ARNm de la COX-2 de una manera dependiente de la dosis, sin revelar efectos citotóxicos. TNF- α e IL-1 β son potentes citocinas

proinflamatorias y son indicadores tempranos del proceso inflamatorio. También investigaron los efectos de tres fracciones en la producción de TNF- α e IL-1 β utilizando el método ELISA, en todas las concentraciones disminuyeron las citocinas cuyas concentraciones de apitoxina son similares a las utilizadas en nuestro experimento.

Estos resultados sugieren que las actividades farmacológicas del veneno de abeja en el proceso antiinflamatorio incluyen la inhibición de la expresión de COX-2 y el bloqueo de las citocinas proinflamatorias (TNF- α). Muy en línea con los resultados que hemos tenido en nuestro proyecto de investigación.

Las células mononucleares (macrófagos y linfocitos entre otras), juegan un papel central en el proceso inflamatorio y varios procesos esenciales en la interfase entre la inmunidad innata y adaptativa (Celada y Nathan, 1994). En particular, los macrófagos son estimulados por LPS a través del receptor TLR4, esta interacción induce la expresión de varios mediadores inflamatorios, como: óxido nítrico, PGs y citocinas pro-inflamatorias (Raetz y Whitfield, 2002; Gomez *et al.*, 2005).

Para la parte experimental *in vitro*, se utilizó cultivos de células RAW264.7, los cuales fueron estimulados con LPS para provocar la respuesta inflamatoria experimental. Observando una inhibición en la secreción de TNF- α , IL-1 β e IL-6, de igual orden de magnitud en los tratamientos con apitoxina mexicana y argentina.

La secreción de las citocinas pro-inflamatorias se lleva a cabo a través de un mecanismo en cascada, en donde la secreción de TNF- α induce la secreción de IL-1 β y esto a su vez, lleva a la secreción de IL-6; estas citocinas participan de manera importante en el curso de la respuesta inflamatoria (Belligan, 1999; Kenneth *et al.*, 2005). De acuerdo con los resultados obtenidos, es evidente que la inhibición en la secreción de estas citocinas provocará una disminución en la respuesta inflamatoria.

Sin embargo, a través de la metodología empleada no es posible establecer si la modulación de estos mediadores es a través del control en la expresión de genes específicos o vías de señalización.

A pesar de ello, y tomando en consideración la relevancia de nuestros hallazgos y de la literatura científica, consideramos como posible blanco de acción de la apitoxina al factor de transcripción NF- κ B, el cual es un complejo proteico que al ser activado se trasloca al núcleo, se une al DNA y activa la transcripción de una amplia variedad de genes, incluyendo los responsables de la síntesis de citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas, moléculas de adhesión, LOX, COX-2, Óxido nítrico sintetasa y mieloperoxidasa (Baldwin, 1996; Ali *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2004). Debido a la importante interacción de NF- κ B en la síntesis de mediadores inflamatorios, existe una amplia investigación relacionada al desarrollo de potentes inhibidores de NF- κ B como terapia anti-inflamatoria (Tak y Firestein, 2001; Huang *et al.*, 2004).

Retomando los hallazgos sobre la secreción de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6, no se observó diferencia significativa sobre la capacidad inhibitoria de la secreción de estas citocinas entre la apitoxina y la dexametasona lo que indica un mecanismo intracelular.

8. Conclusión

- La apitoxina muestra un efecto anti-inflamatorio, mediado a través de la inhibición de la expresión de mediadores inflamatorios como TNF- α , IL-1 β e IL-6, los cuales participan en el desarrollo del proceso inflamatorio.
- El efecto antiinflamatorio de la apitoxina es parecido al observado en el control negativo de inflamación con Dexametasona, consideramos como posible blanco al factor de transcripción NF- κ B.
- No existen diferencias significativas entre la apitoxina mexicana y argentina.

9. Recomendaciones

- En relación con los resultados *in vitro*, es necesario corroborar el posible mecanismo de acción propuesto sobre la modulación del factor de transcripción NFkB.
- Evaluar otros blancos moleculares que participan en el proceso inflamatorio como COX-2, Óxido nítrico.
- Elucidar la concentración de los componentes de la apitoxina mexicana y argentina y determinar el efecto anti-inflamatorio de los componentes principales.
- Con base a los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, resalta la necesidad de determinar el efecto anti-inflamatorio *in vivo*.

10. BIBLIOGRAFÍA

(ERMNH1) Estudio experimental. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Junio, 1992

Álvarez, R., Rodríguez, Z., Alonso, Y. (2007). Citocinas inflamatorias, sus acciones y efectos en la sepsis y el choque séptico. Cuba. Centro de Investigaciones del Ozono. Recuperado el 4 de septiembre 2018 de http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol26_4_07/ibi07407.htm

Baldwin, A.S. 1996. The NFkB and IκB proteins: new discoveries and insights. *Ann Rev Immunol*, 14: 649–681.

Balkwill, F. and F. Burke. 1989. The cytokine network. *Immunology Today*.10: 299-304 p.

Bellingan G. 1999. Inflammatory cell activation in sepsis. *Br Med Bull*, 55: 12-29.

Bentancourt-Pulsan, A., Ortega, M., Torres, M., Marlene, Q., & García., A. (2015). *Fitoterapia y apiterapia en la obra de José Martí*.

Bingham, C.O. 2002. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. *J Rheumatol Suppl*, 65: 3–9.

Bogdanov, S. (2015). *Bee Venom: Composition, Health, Medicine*. Obtenido el 23 de abril 2019 de <http://www.beehexagon.net/files/fileE/Health/VenomBookReview.pdf>

Bøyum, A., "Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood." *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21 Suppl. 97 (Paper IV): 77-89, 1968.



Bøyum, A., "Separation of white blood cells." *Nature* 204: 793-794, 1964.

Castro, C. (2006).). Práctica iv.2. pruebas de tamizaje para determinar efectos citotóxicos en extractos, fracciones o sustancias, utilizando la prueba del MTT. Facultad de Medicina. Fundación Universitaria San Martín. Bogotá, Colombia. Recuperado el 4 de septiembre 2018 de https://old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/Practica-IV-2.pdf

Celada, A.; C.F. Nathan. 1994. Macrophage activation revisited. *Immunol. Today*,15:100-102.

Cell Culture Manual 2008-2009, 3rd Edition. Sigma Life Science, pp 230-231.

Collin-Osdoby P, Osdoby P. RANKL-mediated osteoclast formation from murine RAW 264.7 cells. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2012; 816: 187±202. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-415-5_13 PMID: 22130930

Comalada, V. 1998. Decisiones en los macrófagos: proliferar, activarse o morir. Universidad de Barcelona. España. 376 p.

Dantas CG, Nunes T, Nunes T, Paixão A, Reis FP, Júnior W de L, et al. Pharmacological evaluation of bee venom and melittin. *Rev Bras Farmacogn*. 2014;24(1):67-72. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/0102-695X20142413365>

David, P; Bailey, PJ; Glodenberg, MM; Ford-Hutchinson, AW. The role of the arachidonic acid products in pain and inflammation. *Ann. Rev. Immunol*. 1984; 335

de Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. (2011). Citocinas y Dolor. *Rev Bras Anesthesiol* Recuperado e 4 de septiembre 218 de http://www.scielo.br/pdf/rba/v61n2/es_v61n2a14.pdf

Denizot F., Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 1986; 89: 271–277.



Dussart, E. (2007). Taller elaboración de subproductos de la miel y las colmenas - Cosecha y conservación de la apitoxina. Obtenido de http://www.iica.int.ni/IICA_NICARAGUA/Publicaciones/Estudios_PDF/Subprodu

Faúndez, W. (2011). Anti-inflammatory effect of apitoxin and *Apis mellifera* on prostaglandin E2 in gingival crevicular fluid of patients with and without periodontal disease, submitted to apitherapy. Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral, (4(2)).

Feldman, N. (2001). Apitoxina: veneno para la salud. Obtenido de <http://www.holadoctorfeldman.com.ar/tratamientos1.html#api>

Felice, D. & Padin, D. (2012). Apitoxina: su preparado, especificaciones y farmacología. Argentinas y Americanas.

Ferrari, C., Currao, H., Bessone, J. (2011). La Apicultura Argentina y sus regiones. Una visión panorámica. Recuperado el 23 de abril del 2019 de <http://biblioteca.cfi.org.ar/documento/la-apicultura-argentina-y-sus-regiones-una-vision-panoramica/>

Fotino, M., Merson, E.J. and Allen, F.H., "Instant lymphocytes". Vox Sang 21: 469-470, 1971.

Fotino, M., Merson, E.J. and Allen, F.H., "Micromethod for rapid separation of lymphocytes from peripheral blood." Ann. Clin. Lab. Sci. 1: 131-133, 1971.

Fragoso, J., Alarcon, G., Morales, S., Hernández, O., Bello, J. (2014). El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en las enfermedades autoinmunes (EA): biología molecular y genética. . Gaceta Médica de México. Recuperado el 4 de septiembre 2018 de https://www.anmm.org.mx/GMM/2014/n4/GMM_150_2014_4_334-344.pdf



Fundación Comprarte Vida, A.C. Manual de Procedimientos Serológicos y Celulares de Histocompatibilidad. Departamento de Inmunología e Inmunogenética del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, 2007.

G. Salamanca Grosso, F. A. Rivera., & J.M. Salamanca Grosso. (2018). Características y propiedades de la Apitoxina de *apis mellifera* (2000). Departamento de Química-Facultad de Ciencias Universidad del Tolima. Merck Colombia-Sección Inspección y Control de proceso Santa Fé de Bogotá. Recuperado el 4 de septiembre de 2018 de <https://www.apiservices.biz/es/articulos/ordenar-por-popularidad/720-caracteristicas-y-propiedades-de-la-apitoxina-de-apis-mellifera>

Gallin, JI. Inflammation. En: Paul, WE. (Ed.) Fundamental Immunology. Raven Press, New York, 1989: 721-733

García, J., Paico, F. & Norly, T. (2015). Los poderes de la abeja. Universidad Nacional de Piura, Centro de apiterapia.

Gomez, P.F.; M.H. Pillinger; M. Attur; N. Marjanovic; M. Dave; J. Park; C.O. Bingham; H. Al-Mussawir; S.B. Abramson. 2005. Resolution of inflammation: prostaglandin E2 dissociates nuclear trafficking of individual NF-kappaB subunits (p65, p50) in stimulated rheumatoid synovial fibroblasts. J Immunol,10: 6924-30.

Guatámano, Cuba: Facultad de Ciencias Médicas. Bonifaz L., Terrazas L., García F. Medida de la linfoproliferación in vitro por reducción de sales de tetrazolium. Bioquímica 1992; 17 (68): 31–38.

Güemes, F.; Echazarreta, C.; Villanueva, R. y Pat, R. 2003. La apicultura en la Península de Yucatán. Actividad de subsistencia en un entorno globalizado. Rev. Mexicana del Caribe. 7(16):117-132.



Hannaneh Z., Amir M., Monireh P., Mehdi M., Ali M., Kamran P., Delavar S. (2017). Apoptotic Effect of Melittin Purified from Iranian Honey Bee Venom on Human Cervical Cancer HeLa Cell Line. Recuperado el 29 de mayo 2019 de <https://link.springer.com/article/10.1007/s10989-017-9641-1>

Hood JL, Jallouk AP, Campbell N, Ratner L, Wickline SA. Cytolytic nanoparticles attenuate HIV-1 infectivity. *Antivir Ther.* 2013;18(1):95-103. Doi:<http://dx.doi.org/10.3851/IMP2346>

Huang, M.T; G. Ghai; C.T. Ho. 2004. Inflammatory Process and Molecular Targets for Antiinflammatory Nutraceuticals. *CRFSFS*, 3: 127-139.

Ishizaka, K. Most cell activation an mediator release. *Progress in Allergy*, 1984; vol. 34

Kenneth, M.; F. Jamali. 2005. Drug disease Interactions: role of inflammatory mediators in disease end variability in drug response. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 8: 602-625.

Koo, CH; Sherman, JW; Band, L; Goetzl, E. Molecular diversity of human leukocyte receptors. *Adv. ProstaglandinThromboxane Leucotriene Res.* 1989; 191 (19)

Lee J-D, Park H-J, Chae Y, Lim S. An overview of bee venom acupuncture in the treatment of arthritis. *Evid-Based Complement Altern Med.* 2005;2(1):79-84. Doi:[http:// dx.doi.org/10.1093/ecam/neh070](http://dx.doi.org/10.1093/ecam/neh070)

Lema, E. (2013). APIFARMA - El veneno de abejas como una opción terapéutica. Obtenido de <http://www.apifarma.com.uy/medicos.html>

Magaña, M.; Aguilar, A.; Lara, P. y Sanginés, J. 2007. Caracterización socioeconómica de la actividad apícola en el estado de Yucatán, México. *Agronomía, Universidad de Caldas, Colombia.* 15(2):17-24.



Magaña, Miguel A., Tavera Cortés, María E., Salazar Barrientos, Lucila L., & Sanginés García, José R. (2016). Productividad de la apicultura en México y su impacto sobre la rentabilidad. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 7(5), 1103-1115. Recuperado en 26 de septiembre de 2018, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342016000501103&lng=es&tlng=es.

Martínez, M. Valoración de la lesión medular traumática mediante espectroscopia de RMN de protones

Marz, Ch., (2009). *Health and the Honeybee*. Recuperado el 23 de abril de 2019 de <http://www.ichikung.com/html/apiterapia.php>

Milagros L., León R., Ania A., José Omar de Armas G., Luciano Miranda A., Javier Antonio V., José Ángel Cuesta del Sol. (2015). Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares. Recuperado el 29 de mayo del 2019 de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2221-24342015000100006
Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods* 1983; 65: 55–63.

Oliveira, A. (2005). Fundamentação Teórica para iontoforese. *Revista brasileira de Fisioterapia*, (), p.1-7.,

Peiren N, Vanrobaeys F, de Graaf DC, Devreese B, Van Beeumen J, Jacobs FJ. The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1752(1):1-5. Doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.07.017>

Peper, R.J., Tina, W.Z. and Mickelson, M.M., "Purification of lymphocytes
Raetz, R. C.; Whitfield C. 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*, 71: 635-700.



Roit, IM; Brostoff, J; Male, DK: Inmunología. 2ª ed. Barcelona: Salvat, 1992
Roldan, J. (28 de abril de 2014). Camino al agro. Obtenido de <https://www.youtube.com/watch?v=skKB5c63dWI>

SAGARPA; Coordinación General de Ganadería. 2010. Situación actual y perspectiva de la apicultura en México. Claridades Agropecuarias. 199:3-34.

Sekut, L.; K.M Connolly. 1996. Pathophysiology and regulation of TNF- α in inflammation. Drug News Perspect, 9: 261–269.

Serna, M., & Soto, D. (2012). Evaluación de la calidad de la apitoxina en las abejas *apis mellifera* de la región de onzaga santander mediante la cuantificación de los componentes melitina, apamina, fosfolipasa a2 y mcd. Recuperado el 2 de septiembre de 2018 de https://datospdf.com/download/evaluacion-de-la-calidad-apitoxina-en-apis-mellifera-_5a4bb9e0b7d7bcb74fc7225f_pdf
Sigma-Aldrich, Histopaque-1077, Procedure No. 1077.

Skoog, W.A. and Beck, W.S., "Studies in the fibrinogen, dextran, and phytohemagglutinin methods of isolating leukocytes." Blood 11: 436-454, 1956.
SOP #290 Cell Counting and Viability Determination, Johns Hopkins University. The Genetic Resources Core Facility: The Cell Center, MD, USA.

Soto-Muciño, L., Elizarraras-Baena, R., Soto-Muciño, I. Situación apícola en México y perspectiva de la producción de miel en el Estado de Veracruz. Revista de Estrategias del Desarrollo Empresarial. 2017. Recuperado el 22 de abril 2019 de http://www.ecorfan.org/spain/researchjournals/Estrategias_del_Desarrollo_Empresarial/vol3num7/Revista_de_Estrategias_del_Desarrollo_Empresarial_V3_N7_5.pdf

Souto Guimarães, M., & Nayara Evangelista, J. (2014). Análisis del efecto de la apitoxina introducido en el tejido muscular esquelético por vía transdérmica



mediante la fonoforesis en ratas Wistar. Recuperado el 4 de septiembre 2018 de <http://www.redalyc.org/html/4773/477347197004/>

Tak, P.P; G.S. Firestein. 2001. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*, 107: 7–11.

Thorsby, E. and Bratlie, A., "A rapid method for preparation of pure lymphocyte suspensions." *Histocompatibility Testing* ed. P.I. Terasaki: 665-666, 1970.

Ting, A. and Morris, P.J., "A technique for lymphocyte preparation from stored heparinized blood." *Vox Sang* 20: 561-563, 1971.

Toledo, C. (2014). INFLAMACION: MEDIADORES QUIMICOS. Recuperado el 1 de octubre 2018 de http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2304-37682014000400005&script=sci_arttext

Vidal. E. (2012). Historia de la apicultura en México. Recuperado el 24 de septiembre 2018 de <http://expresionesveterinarias.blogspot.com/2012/02/historia-de-la-apicultura-en-mexico.html>

Watkins LR, Maier SF, Goehler LE. (1995) Cytokine-to-brain communication: a review & analysis of alternative mechanisms. *Life Sci* 57:1011-26.

WHA62.13. Medicina tradicional. En: 62^a Asamblea Mundial de la Salud, Ginebra, 18- 22 de mayo de 2009. Resoluciones y decisiones, anexos. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 2009 (WHA62/2009/REC/1. Recuperado el 24 de septiembre 2018 de http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA62-REC1/WHA62_REC1-sp-P1.pdf

Wottawa, A., Klein, G. and Altman, H., "A method for the isolation of human and animal lymphocytes with Ficoll-Urografi n." *Wiener Klin. Wochenschr.* 86: 161-163, 1974.

