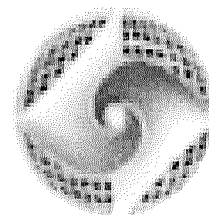


**UNIVERSIDAD AUTONOMA  
DE BAJA CALIFORNIA**



**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“¿EXISTE EFECTO INMUNOESTIMULADOR DEL VENENO  
COMPLETO DEL ESCORPION *Rhopalurus junceus* Herbst  
EN LINFOCITOS B y LINFOCITOS T DE RATONES?”**

**PREGUNTA PROBLEMA  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G O**

**PRESENTA:**

**TANYA AMANDA CAMACHO VILLEGAS**

**ENSENADA, BAJA CALIFORNIA**

**AGOSTO, 2004**

ADQUIRIDO POR _____	<b>DONACIÓN</b>
FECHA DE INGRESO <b>100420</b>	<b>MAR 2025</b>
REG. _____	DEPTO. DE INFORMÁTICA Y BIBLIOTECAS CAMPUS ENSENADA
CLASIFIC. <b>QP632 .I57</b> <b>C35 2004</b>	
NO. DE COPIA _____	BIBLIOTECA ENSENADA
COPIA <b>1</b>	

## AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Faustino Camarena Rosales** por intervenir desde el primer semestre en mi formación profesional, además de todo su apoyo.

A la **Dr. Meredith Gould Chambers** por su innegable vocación y por desarrollar la crítica e inventiva en sus alumnos.

Al **Dr. Alexei F. Licea Navarro** por aceptarme en su equipo de trabajo y proporcionarme la infraestructura y apoyo logístico para desarrollar el mismo.

Al **M.C. A. Mauricio Ortega** por su apoyo en la revisión del escrito y sus enseñanzas.

A los **Maestros** que han contribuido a mi formación profesional.

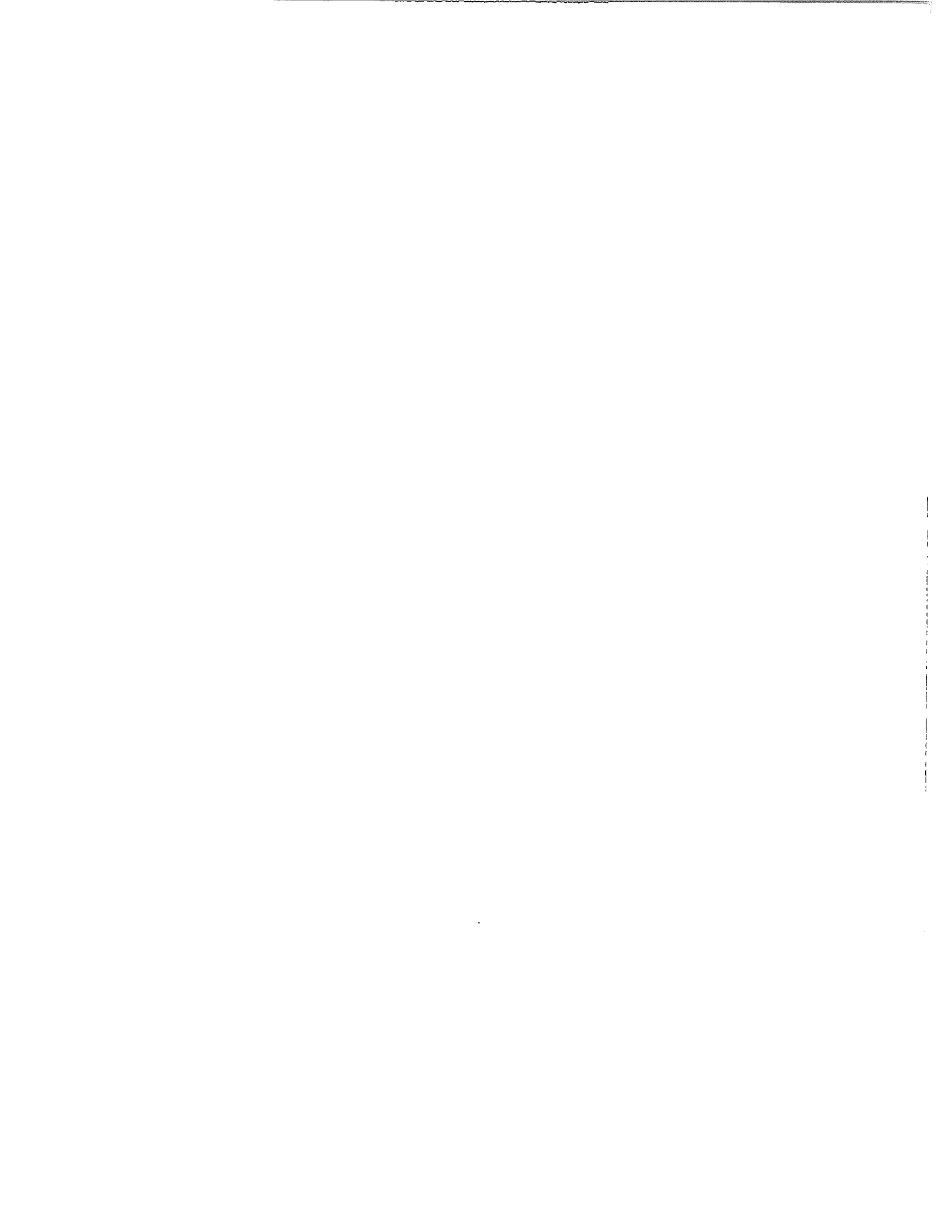
Al **Bioterio** (Facultad de Ciencias, UABC) por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

A mis **Amigos** que han compartido seis años de su vida conmigo, por las risas, las desveladas... el café y demás...

A mis Padres **Néstor Joaquín y Angelina** por motivarme y apoyarme siempre, por permitirme ser lo que hoy soy...

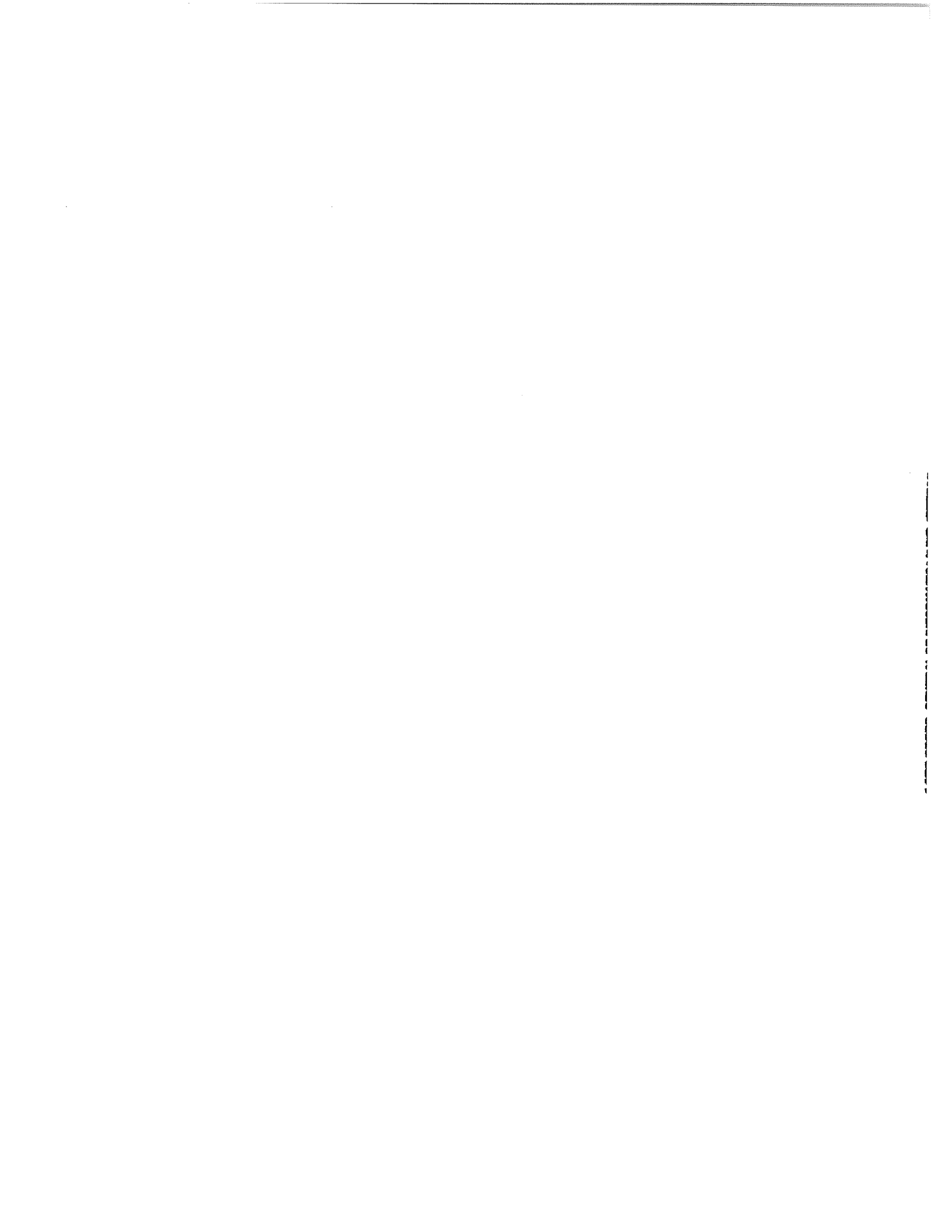
A mis Hermanas **Olessya y Celia Yleana** por sacarme de la rutina y permitirme crecer con ellas.

Y en especial a quien ha decidido compartir su vida conmigo, Gracias **Pavel Hayl...**



## INDICE

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCION</b> .....	1
	1. Características del veneno de escorpión .....	5
	2. Activación de Linfocitos .....	5
	a. Activación de Células T.	
	b. Activación de Celular B.	
	c. Proliferación Celular.	
	3. Descripción de la especie <i>Rhopalurus junceus</i> Herbst .....	9
<b>II.</b>	<b>ANTECEDENTES</b> .....	10
<b>III.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	18
	Objetivos Particulares .....	18
<b>IV.</b>	<b>MATERIALES Y METODOS</b>	
	1. Producción de Anticuerpos	
	1.1 Inmunización de ratones .....	19
	1.2 Diseño del Ensayo Inmunoenzimático Ligado a Enzima (ELISA) .....	20
	2. Ensayo de Linfoproliferación	
	2.1 Cultivo de células de Cáncer de mama SBKBR3 .....	21
	2.2 Inmunización para Extracción de Ganglios .....	22
	2.3 Extracción de Ganglios .....	23
	2.4 Ensayo de Linfoproliferación .....	23
	2.5 Análisis Estadístico .....	23
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS</b>	
	1. Producción de Anticuerpos .....	26
	2. Ensayo de Linfoproliferación .....	27
<b>VI.</b>	<b>DISCUSIONES</b>	
	1. Producción de anticuerpos .....	30
	2. Ensayo de linfoproliferación .....	31
<b>VII.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	34
<b>VIII.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	35
<b>IX.</b>	<b>LITERATURA CITADA</b> .....	36
<b>X.</b>	<b>PAGINAS DE INTERNET</b> .....	45



## I. INTRODUCCION

El sistema inmunológico está compuesto de dos tipos celulares principales: **Células T** y **Células B**. Ambos tipos de células interactúan para la defensa del organismo (Muñoz, 1994).

Hay dos tipos de respuesta inmunitaria adaptativa, la **Inmunidad Humoral** y la **Inmunidad Celular**, en la primera participan los anticuerpos (Ac) que son producidos por los linfocitos B. Los anticuerpos reconocen específicamente a los antígenos (Ag), neutralizando su infectividad y dirigiendo su acción contra el Ag para su eliminación por medio de mecanismos efectores. En la inmunidad celular, participan los linfocitos T, que inducen la destrucción de los Ag residentes en células infectadas (Abbas *et al.*, 2002).

La inmunoterapia que comprende la inmunomodulación, tiene el potencial de ser el tratamiento con mayor especificidad de antígenos de tumor, esto radica en el hecho de que las terapias actuales contra el cáncer dependen de fármacos que destruyen las células en división o bloquean la división celular, tendiendo graves efectos en las células normales en proliferación. Esta terapia inmunológica está dirigida a aumentar las respuestas inmunitarias débiles del huésped frente al tumor o a la administración de anticuerpos o células T específicas de tumores (Abbas *et al.*, 2002).

Los inmunomoduladores son sustancias biológicas o sintéticas, que influyen directamente una función específica o modifican uno o más componentes de la red inmunológica, estos tienen un efecto directo en una función inmune específica. Por ejemplo, tenemos las citocinas (IL-2), productos microbianos (BCG), productos sintéticos (Levamisol), anticuerpos

monoclonales, productos de hormonas tóxicas y productos de plantas medicinales (Nicoara y Crisan, 2003; Singh y O'Hagan, 1998).

Al utilizar un inmunomodulador se busca que: 1) Induzca una fuerte y rápida respuesta inmune de anticuerpos de isotipos apropiados, 2) Induzca respuesta eficiente de linfocitos T cooperadores ( $T_{H1}$ ) y citolíticos (CTL), 3) La incorporación de antígenos en vacunas de fórmula sencilla que reduzcan el número de inmunizaciones requeridas (Kovarik y Siegrist, 1998).

En los últimos años, los inmunomoduladores han sido estudiados ampliamente porque pueden ser usados para estimular los mecanismos de profilaxis, tratamiento contra virus, bacterias, parásitos y hongos (Masihi, 2000), también en desordenes de inmunodeficiencias, infecciones y cáncer (Nicoara y Crisan, 2003; Calatayud *et al.*, 2002) además, el sistema inmune es capaz de identificar y destruir las células tumorales y de generar memoria de largo plazo producto de esta interacción (Agha-Mohammdi y Lotze, 2000).

Una de las aplicaciones de estos métodos inmunológicos, se ha enfocado a la producción de la respuesta inmune contra venenos de escorpión. Estos venenos de escorpión son ampliamente conocidos como fuentes de péptidos con acción en canales de  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$  y  $Ca^{2+}$  (Possani *et al.*, 1999; Legros *et al.*, 2000; D' Suze *et al.*, 2003). Estas toxinas tienen efectos profundos en órganos y sistemas, por ejemplo desencadenando cambios histopatológicos en órganos vitales, cambios neurológicos, alteraciones en la coagulación, aumento de factores inflamatorios y de necrosis tumoral (D' Suze *et al.*, 2003).

Los canales iónicos son poros formados por proteínas integrales de membrana. Estos poros pueden estar abiertos (conduciendo) o cerrados

(sin conducción). La transición entre los estados abierto y cerrado está determinada por el mecanismo de apertura, hay canales que se abren en respuesta a alteraciones en el potencial de membrana y son llamados canales modulados por voltaje. Los que se abren cuando un ligando se une a un receptor específico son denominados canales modulados por ligando. Otros son modulados por la unión de iones, como  $\text{Ca}^{2+}$  (Muñoz, 1994).

Los canales iónicos de membrana plasmática son fáciles de acceder y a menudo son expresados en concentraciones relativamente bajas en células y tejidos específicos, lo cual los hace un excelente blanco para el diseño de fármacos que regulen su actividad (Niemeyer *et al.*, 2001; Vargas 2004).

La capacidad de las toxinas de alta afinidad para reconocer diversos tipos de canales iónicos, se origina de la interacción química entre los grupos funcionales de la toxina y el canal. En este contexto, las toxinas pueden ser utilizadas como sondas para identificar sitios importantes en el canal, como los relacionados con la permeabilidad y la selectividad iónica (Muñoz, 1994).

Los canales iónicos en las células del sistema inmune intervienen en una gran variedad de funciones, entre las mejor conocidas se incluyen: quimiotaxis, crecimiento celular, proliferación, producción y secreción de anticuerpos y citocinas, además en la muerte de células extrañas o infectadas por virus (Muñoz, 1994; Ullrich y Sontheimer 1997).

Como ejemplo de toxinas que bloquean diversos canales iónicos se encuentra la caribdotoxina (CTX) un purificado proveniente del veneno de *Leiurus quinquestriatus* (var. *hebraeus*) que bloquea los canales de potasio ( $\text{K}^+$ ) en linfocitos T humanos y murinos e inhibe la mitogénesis y la

producción de IL-2 (Price *et al.*, 1989, Sands *et al.*, 1989; Leonard *et al.*, 1992; Peter *et al.*, 1998).

Los canales de voltaje de potasio en linfocitos T, llamados Kv1.3, son importantes en la búsqueda molecular de agentes inmunosupresores (Kalman *et al.*, 1998) ya que son expresados por estas células y se ha demostrado que el bloqueo de Kv1.3 depolariza la membrana y atenúa la señal del ciclo de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) que es vital para la activación de linfocitos (Ullrich y Sontheimer, 1997). Asimismo, la entrada acelerada de  $\text{Ca}^{2+}$  puede ser un componente de la ruta que regula la proliferación en ciertos tipos de cáncer (Vargas, 2004).

Wulff *et al.* (2003) emplea el canal de  $\text{K}^+$  Kv1.3 y el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  activado por  $\text{K}^+$  IKCa1 en linfocitos T de memoria y linfocitos T efectores de memoria en pacientes que padecen esclerosis múltiple obteniendo que, con potentes inhibidores de dichos canales se bloquea la proliferación de los linfocitos T de memoria, concluyendo que los inhibidores selectivos de Kv1.3 representan una nueva terapia para pacientes de esclerosis múltiple y otros desórdenes autoinmunes en que las células de memoria contribuyen a la patogénesis.

También, los canales de cloro ( $\text{Cl}^-$ ) han sido implicados en la respuesta proliferativa de células de Schwann, linfocitos B y células de glioma, sugiriendo una relación entre la activación de sus canales y la proliferación (Ullrich y Sontheimer, 1997).

## **1. Características del Veneno de Escorpión.**

El veneno de los escorpiones se compone principalmente de proteínas de diferentes pesos moleculares, aminoácidos libres, sales inorgánicas, nucleótidos y lípidos (Muñoz, 1994). La composición del veneno varía no solo entre especies y estación, también por la edad y el estado nutricional del escorpión (Rimsza *et al.*, 2001).

Para la especie de *Rhopalurus junceus* Herbst, se ha reportado un peso de 14.3 KDa para el componente proteico mayoritario (Rieumont *et al.*, 2003); además, para lograr la separación de los principales componentes proteicos del veneno se ha realizado Cromatografía de Alta Presión (HPLC) (Possani, comunicación personal). Bordier y col. reportan en su patente el contenido de proteasas y fosfolipasas (Patente CU 22413 A1).

## **2. Activación de linfocitos.**

Como se mencionó anteriormente, las células B son productoras de inmunoglobulinas (Ig) y responsables de la inmunidad humoral, mientras que las células T son responsables de la inmunidad celular (Muñoz, 1994). En la siguiente tabla se muestran las clases de linfocitos, su función y su porcentaje en sangre y órganos linfoides.

**Tabla No. 1.-** Clase de Linfocitos y su función (Modificada de Abbas *et al.*, 2002).

CLASE	FUNCIONES	PORCENTAJE DE LINFOCITOS TOTALES		
		Sangre	Ganglio linfático	Bazo
Linfocitos B	Producción de anticuerpos	10-15	20-25	40-45
Linfocitos T cooperadores	Estímulo para el crecimiento y diferenciación de células B. Activación de macrófagos.	50-60	50-60	50-60
Linfocitos T citolíticos	Lisis de células infectadas, células tumorales y aloinjertos.	20-25	15-20	10-15
Células asesinas naturales (NK)	Lisis de células infectadas, células tumorales.	~10	Raro	~10

**a) Células T:**

Las células T antes de ser estimuladas se encuentran en la fase G<sub>0</sub> del ciclo celular, durante su activación se induce su entrada a G<sub>1</sub>, en respuesta a la transducción de gran número de señales. Bajo condiciones fisiológicas normales, la activación es iniciada por la interacción entre un receptor de superficie específico de antígeno y el antígeno extraño, asociado con una molécula de membrana de las células presentadoras de antígeno. Estudios *in vitro* muestran que éstas interacciones fisiológicas pueden ser mimetizadas parcialmente por el tratamiento de las células T con lectinas mitogénicas, como Concanavalina A (Con A), fitohemaglutinina (PHA) o, con anticuerpos específicos para algunas proteínas de la superficie celular.

Como resultado de estas interacciones iniciales aparecen otros receptores de superficie celular para la interleucina 2 (IL-2), un factor de crecimiento de linfocitos. También, se activa la síntesis y secreción de IL-2, dando lugar a una estimulación autócrina. La interacción de la IL-2 con su receptor (IL-2r) promueve la transición de la fase G<sub>1</sub> a S, seguida por la propagación de la fase mitótica del ciclo celular (Muñoz, 1994). La activación de linfocitos T cooperadores depende de la estricta activación del Receptor de la Célula T (TCR) por el antígeno y el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) y está regulado por un número de moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86 (Kneitz *et al.*, 1999).

#### **b) Células B:**

La activación de las células B resulta del entrecruzamiento de las inmunoglobulinas (Ig) de membrana, como resultado de la unión del antígeno. Esto puede ser reproducido experimentalmente usando anti-inmunoglobulinas (anti-Ig) o lipopolisacáridos (LPS). Ésta interacción incrementa la expresión del MHC tipo I el cual, facilita la interacción entre las células B y T antígeno específicas. Después de ésta interacción, las células T cooperadoras proveen el estímulo requerido para la proliferación y diferenciación de células B (Muñoz, 1994).

La secreción acumulada de inmunoglobulinas (Ig) puede ser estimada mediante el sobrenadante de cultivos de linfocitos o el suero de organismos inmunizados, cuantificándose por el método de Radioinmunoanálisis (RIA) y el de Análisis de Inmunoabsorción Ligado a Enzima (ELISA) (Abbas *et al.*, 2002).

### **c) Proliferación celular:**

La cantidad y calidad de respuesta celular a un estímulo particular varía con las condiciones de cultivo, la densidad celular, la concentración de agentes activadores como las citocinas por ejemplo IL-2, IL-4 e IL-5, (Kneitz *et al.*, 1999) el tejido donador de las células y el grado de estrés del animal utilizado.

El tiempo y duración del pico de respuesta varía con el tipo celular activado, el uso de un activador particular y su concentración (Muñoz, 1994).

La proliferación de los linfocitos B, al igual que la de otras células, se valora *in vitro* midiendo la cantidad de timidina marcada con tritio ( $^3\text{H}$ ) que se incorpora al ADN en replicación de las células cultivadas. La incorporación de la timidina proporciona una medida cuantitativa de la velocidad de síntesis de la división celular (Abbas *et al.*, 2002); también pueden ser utilizadas otras sustancias como el reactivo Cell Titer 96 Aqueous Assays (PROMEGA) que es un método no radiactivo, por lo tanto es más sencillo de emplear y se utilizará en este trabajo.

### 3. Descripción de la especie *Rhopalurus junceus* Herbst 1800.

**Taxonomía:**

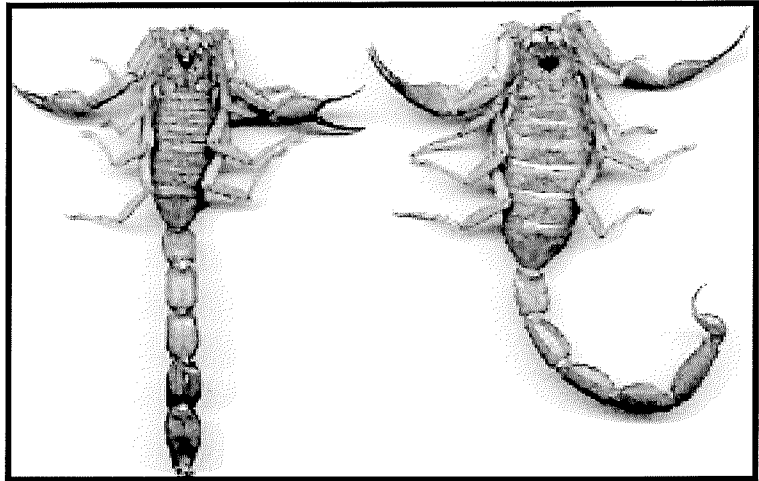
**Clase:** Arachnida.

**Orden:** Scorpiones.

**Familia:** Buthidae.

**Especie:** *Rhopalurus junceus*.

**Nombre común:** escorpión azul.



**Características:** los adultos

miden 55-100 mm de longitud. Su cuerpo es de color azul oscuro con un triángulo intercalar negro.

**Distribución:** Caribe, en las islas de Cuba, Haití y Sur América en Venezuela.

**Clima:** tropical templado con humedad relativa en todo el año.

**Hábitat:** es un organismo generalista, vive en varios tipos de bosques (de la costa seca a montañas lluviosas), sabanas y áreas semidesérticas. Se encuentra bajo rocas, sobre troncos de árboles caídos, epífitas, sobre la tierra y generalmente ingresa a las casas de los alrededores.



**Escorpionismo:** muy común en Cuba y mucha gente es picada al año. No se han reportado muertes, con la excepción de pocas muertes debidas a choques anafilácticos. (Cao *et al.*, 1997).

## II. ANTECEDENTES

El cáncer constituye uno de los principales problemas sanitarios en todo el mundo y es una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad tanto de la infancia como en la edad adulta (Abbas *et al.*, 2002).

Según la Organización Mundial de la Salud (página de internet No. 1) más de 10 millones de personas son diagnosticadas con algún tipo de cáncer cada año, causando el 12% de las muertes en el mundo es decir, causa el fallecimiento de 6 millones de personas en el mundo. En México, según la Secretaría de Salud (página de internet No. 2) e INEGI (página de internet No. 3) el porcentaje de defunciones por el padecimiento del cáncer fue del 12.7% para el año 2001.

Puede haber diversas razones por las que la inmunidad antitumoral no sea capaz de erradicar las células transformadas en cancerígenas: en primer lugar, las células tumorales derivan de células del huésped, segundo, el crecimiento y la diseminación de los tumores pueden superar la capacidad del sistema inmunitario de erradicar las células tumorales y en tercer lugar, muchos tumores tienen mecanismos especializados para evadir las respuestas inmunitarias del huésped (Abbas *et al.*, 2002). Por ejemplo, los tumores pueden secretar moléculas inmunosupresoras como IL-10, TGF- $\beta$ , y PGE2 y, no secretan citocinas que afectan a las células inflamatorias activando la respuesta inmune local (Agha-Mohammdi y Lotze, 2000).

Se han realizado estudios en los que se busca dirigir la respuesta inmune contra un antígeno utilizando veneno de escorpión como el de Calderón-Aranda (1992) que empleó veneno soluble, macerado de telson, fracción II y la toxina Cn2 del escorpión *Centruroides noxius* Hoffman inmunizando intraperitonealmente en ratones, encontrando una

inmunodominancia antigénica de los que contienen proteínas que bloquean canales de  $\text{Na}^+$ .

Muñoz (1994) analiza el efecto de la toxina 2 (Cn2) del veneno del escorpión *Centruroides noxius* en linfocitos T y B murinos, aislados de bazo, ganglios y timo, utilizando dos estrategias: en una de ellas se preinmuniza ratones hembras con la toxina y en la segunda no se inmunizan. Además, se agrega para cada uno de los dos casos arriba mencionados el mitógeno Concanavalina A (Con A) a distintas horas de cultivo. Después se agrega Cn2 a distintas concentraciones, antes o después de agregar el mitógeno. Los resultados muestran que, para las células de timo no inmunes, activadas con Con A, se disminuye en 20% la proliferación. Los linfocitos B no muestran efecto después de activados con IgG. Se empleó la línea celular Jurkat con el propósito de dilucidar si existe efecto de la toxina sobre canales de  $\text{Na}^{2+}$  pero, dado que estas células no mantienen sus mecanismos de regulación intactos no es posible inferir lo antes mencionado. Concluyendo que no se puede definir el mecanismo de acción de la Cn2 sobre los linfocitos T y B murinos.

En 1992 el Lic. Bordier y colaboradores (La Habana, Cuba), investigaron las formas de preparación, dosis, vías de administración y esquemas de tratamientos para el uso en humanos del veneno del escorpión *Rhopalurus junceus* Herbst logrando en 1996, patentar un preparado natural como "Composición Antitumoral", al ser demostrada su actividad sobre algunas líneas celulares cancerígenas entre las que se encuentran: hígado, estómago, próstata, útero, huesos, cerebro, sangre, riñón, pulmón y mama (Patente Cu-22413 A1).

Aunados con el laboratorio cubano LABIOFAM, Rieumont *et al.* (2003) después de hacer extracciones por estimulación eléctrica del veneno del escorpión azul reportan una fracción mayoritaria con un peso de 14.3

KDa y similitudes en el patrón electroforético (SDS-PAGE) de organismos de diversas localidades así como, una inhibición del crecimiento de las líneas tumorales Hela, Hep-2 y NCI-H292, a concentraciones inhibitorias medias ( $IC_{50}$ ) de 1.5 mg/mL, 1.6 mg/mL, 1.2 mg/mL respectivamente. Para la línea MRC-5 la  $IC_{50}$  es de 2.1 mg/mL, lo cual indica que hay poca afectación en esta línea celular debida al veneno total.

En Brasil, se analizó el efecto del veneno de la serpiente *Bothrops jararaca* (BjV) *in vivo* e *in vitro* sobre células de tumor de Ehrlich. *In vivo*, se observa un incremento en los leucocitos poliformonucleados y mononucleados a lo largo del tratamiento en los organismos tratados con BjV debido al proceso inflamatorio. *In vitro*, se observa una gran toxicidad del veneno al incrementar la concentración (de 2.5, 5 y 10 a 20  $\mu$ g) en contacto con células tumorales pero, existe más viabilidad de estas células tumorales que las intraperitoneales. Concluyendo que el tratamiento con BjV promueve el 99% de inhibición del tumor, además las células tumorales tienen más resistencia al veneno respecto a las no tumorales (da Silva *et al.*, 2002).

Yang-Feng *et al.* (2002) aislaron un péptido antitumoral del veneno del escorpión chino *Buthus martensii* Karsch. Después de una extensa separación por medios cromatográficos, lograron purificar a homogeneidad un péptido llamado ANTP de peso aproximado de 6,280 Da. Los ensayos farmacológicos fueron llevados a cabo en dos modelos de cáncer en ratones *in vivo*. El primer modelo fue de tumor de ascitis de Ehrlich, en donde se determinó que, a una dosis de 0.6 mg/kg de ANTP se prolongan los días de sobrevivencia hasta en un 31.5%. El segundo modelo, fue el de fibrosarcoma S-18 en el cual, con la misma dosis que en el tumor de Ehrlich, se disminuyó el tamaño del tumor hasta en un 39%.

Fraser *et al.* (1999) investigan la posibilidad de que canales de Na<sup>+</sup> estén involucrados en el desarrollo morfológico de células MAT-LyLu que son altamente metastásicas. Incubando dos líneas celulares; MAT-LyLu y AT-2 con 6 μM de tetrodotoxina (TTX) procedente de pez globo, se altera solamente la morfología de MAT-LyLu produciendo decrementos significativos en el tiempo de proceso celular y un incremento en el diámetro del cuerpo celular. Esto indica que los canales de Na<sup>+</sup> pueden estar involucrados en el potencial metastático de éstas células.

Harvestick *et al.* (2000) producen un agente farmacológico llamado TH-1177 con la habilidad de retardar el influjo de Ca<sup>2+</sup> en líneas celulares de cáncer de próstata humano LNCaP y PC-3, logrando inhibir su proliferación por medio de mecanismos citoestáticos en vez citotóxicos. Administrando TH-1177 en ratones se retarda significativamente la progresión del cáncer letal sin toxicidad aparente.

En Estados Unidos, se han realizado estudios sobre el tratamiento de tumores cerebrales primarios, donde se demostró el posible mecanismo de acción de la clorotoxina (Cltx), un péptido de 4kD purificado del veneno del escorpión israelí *Leiurus quinquestriatus* para el tratamiento de gliomas (Soroceanu *et al.*, 1998).

Según Lyons *et al.* (2002) la clorotoxina es un marcador muy específico de los tumores de origen neuroectodermal y de gliomas; de 262 biopsias tomadas de gliomas humanos recurrentes, la mayoría (74-79) unieron un 90% de clorotoxina, contra 32 biopsias procedentes de tumores no ectodermales que son negativos a la unión de la clorotoxina.

Lo cual indica que, la clorotoxina es muy específica a la unión de tumores ectodermales dado que presenta la capacidad de cruzar la barrera

hematoencefálica y reacciona con los canales de cloro específicos del glioma llamados GCC (Ullrich y Sontheimer, 1997).

La corporación TransMolecular (EE. UU.) (pág. de internet No.4) ha creado un péptido sintético derivado de la clorotoxina, llamado  $^{131}\text{I}$ -TM-601. Una sola dosis del péptido administrado intracranealmente en ratones xenoinjertados con glioma humano, extiende la supervivencia en un 269% demostrado en estudios separados (Alvarez *et al.*, 2003).

Dicho laboratorio cuenta con permiso de la Oficina de Alimentos y Medicinas (FDA, EE. UU.) para llevar a cabo un ensayo clínico Fase II en humanos con este péptido, donde se evaluará la tolerancia, seguridad y respuesta del tumor al tratamiento (Mamelak *et al.*, 2003).

Prior Mier (2002) analiza el efecto inmunomodulador del extracto crudo y tres fracciones procedentes de exclusión molecular de la anémona *Anthopleura xantogrammica* en ratones, encontrando que el extracto crudo no tiene efecto inmunogénico pero, los ratones inmunizados con extracto crudo y albúmina de suero bovino (BSA) sí presentan aumento en la producción de anticuerpos. Lo cual indica que el extracto crudo es inmunoestimulante, relacionándolo con canales de calcio.

También se probó el efecto citotóxico *in vitro* del extracto en células de cáncer de colon LIM1215, de mama SKBR3 y de próstata DU145. El extracto crudo y las fracciones I y II, presentaron efecto de estimulación en la división celular de cáncer de colon, al contrario de la fracción III que tuvo efecto contrario inhibiendo la división celular. Para las células de cáncer de mama, el extracto crudo y la fracción I estimularon la división celular, la fracción II presentó actividad citotóxica. Por otro lado, las células de cáncer de próstata se dividieron al estar en contacto con la fracción III. El extracto crudo y las fracciones I y II no tienen efecto en estas células. Estos

resultados muestran que el extracto crudo estimula el crecimiento de las células cancerígenas probadas, lo cual puede ser resultado de la acción sinérgica de péptidos sobre canales de calcio (Prior Mier, 2002).

De la misma manera, Ruiz (2004) inmuniza intraperitonealmente ratones con el extracto crudo de *Conus californicus*, encontrando efecto inmunoestimulador del extracto dirigido contra BSA.

Además, probó el efecto del extracto de *C. californicus* en líneas celulares de cáncer de próstata DU145 y de mama SKBR3, agregando 50  $\mu$ L de extracto de *C. californicus* y sus fracciones, encontrando para las células de próstata que solo sobreviven el 53.25%, de la misma manera, la fracción 1 y 9 con el 29% y 40% de sobrevivencia respectivamente. Las fracciones 7, 8, 10 y 12 presentan un efecto de alrededor del 25-30% de inhibición del crecimiento. Para las células de SKBR3, existe un efecto del 35% de inhibición del crecimiento con extracto crudo, debido presumiblemente a la presencia de conotoxinas (Ruiz, 2004).

Se puede resumir el efecto antitumoral de los venenos de escorpión sobre el organismo en tres niveles:

- 1) **Nivel Tisular:** logrando la inhibición de la angiogénesis, es decir, impidiendo la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los existentes (Barroso, 1998) ya que, las células endoteliales juegan un importante papel en el crecimiento, progresión y metástasis del tumor debido a que las células neoplásicas requieren acceso a vasos sanguíneos como fuente de factores de crecimiento, oxígeno y nutrientes para mantener su actividad metabólica y supervivencia (Abbas *et al.*, 2002; Rak *et al.*, 2002).

Dichos inhibidores producen isquemia dentro de la masa tumoral debido a anomalías funcionales y anatómicas de la microcirculación del tumor.

Se ha llegado a plantear que el uso de inhibidores de la angiogénesis en células endoteliales puede dar mejores resultados que el mismo tratamiento en células tumorales (Barroso, 1998).

- 2) **Nivel Molecular:** alterando el funcionamiento de las membranas celulares de células tumorales, en particular los canales iónicos, produciendo un efecto citostático que puede inducir la apoptosis o muerte celular. Los canales iónicos principalmente afectados por los péptidos contenidos en el veneno de diversos escorpiones afectan principalmente la ATPasa de Sodio ( $\text{Na}^+$ ), Potasio ( $\text{K}^+$ ), Cloro ( $\text{Cl}^-$ ), Calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Muñoz, 1994), provocando una disminución del metabolismo de esas células y finalmente la muerte celular.

La apoptosis es muy importante en el sistema inmune porque interviene en la formación del repertorio de células B y T, en los mecanismos de tolerancia central y periférica, en la eliminación de células autoreactivas, en el establecimiento de la memoria inmunológica y en los mecanismos citolíticos de células asesinas naturales (NK) y linfocitos T citotóxicos (Arango, 1997).

- 3) **Nivel Sistémico:** esto se logra aumentando la respuesta inmunológica del organismo.

Recientemente, se ha demostrado que IL-6, IL1- $\alpha$ , IL1- $\beta$ ,  $\alpha$ 1-AT, NO, IFN- $\gamma$ , GM-CSF se incrementan después de la picadura de escorpiones de los géneros *Leiurus*, *Buthotus* y *Tityus* (D'Suze *et al.*, 2003).

Devaux *et al.*, (2002) en su artículo inmuniza de 4-12µg/peso de ratón, vía subcutánea de tres toxinas principales (AahI, AahII y AahIII) del veneno del escorpión *Androctonus australis hector* con la intención de, inducir respuesta inmune en dos cepas de ratones (Balb/C y C57BL/6) cuantificado la producción de Ac por los métodos de ELISA y RIA, encontrando que la Dosis Letal media (LD<sub>50</sub>) es de 0.38µg/20g para ratones cepa C57BL/6 y 1.4µg para Balb/C. La toxina AahI no induce respuesta inmune, pero al ser acoplada a tres moléculas acarreadoras: BSA, KLH y un péptido sintético (Abu)<sub>8</sub>AahII, hay respuesta contra AahI, esto depende de una apropiada presentación por las moléculas H-2<sup>b</sup> o H-2<sup>u</sup> del Complejo Mayor de Histocompatibilidad. Fukuara *et al.* (2003) encuentra resultados similares en pacientes envenenados severa o moderadamente por picadura del escorpión *Tityus serrulatus*.

Dado que no existe información sobre el efecto inmunoestimulador del veneno del escorpión azul, se ha realizado la siguiente investigación para determinar si existe en ratones Balb/C sanos, analizando la producción de anticuerpos policlonales específicos (acción sobre linfocitos B) contra un antígeno (BSA) por medio de un inmunoensayo enzimático (ELISA) y, la proliferación de linfocitos T policlonales en respuesta a un lisado de células de cáncer de mama SKBR-3 por el método de MTT.

### III. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del Veneno Completo del escorpión *Rhopalurus junceus* Herbst sobre la producción de anticuerpos y la proliferación *in vitro* de linfocitos T de ratones.

#### OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto del Veneno Completo del escorpión *Rhopalurus junceus* Herbst en la producción de anticuerpos policlonales por un Inmunoensayo Colorimétrico Ligado a Enzima (ELISA) en suero de ratones previamente inmunizados.
2. Evaluar el efecto del Veneno Completo del escorpión *Rhopalurus junceus* Herbst sobre la proliferación *in vitro* de poblaciones policlonales totales de linfocitos T de ganglios poplíteos de ratones inmunizados con un lisado de células de cáncer de mama SKBR3 por el método de MTT.

## IV. MATERIALES Y METODOS

### 1. Producción de Anticuerpos.

#### 1.1 Inmunización de ratones.

Se inmunizaron ratones hembras Balb/C de 5-6 semanas de edad, formando 5 grupos de 5 animales cada uno (Tabla No. 2). Se realizaron 7 inmunizaciones vía intraperitoneal.

El Veneno Completo del escorpión *R. junceus* fue proporcionado por el Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro (CICESE). Los organismos se mantuvieron en un bioterio (UABC, Ensenada).

Las concentraciones de inmunización fueron: 10 µg/20g de BSA para el Grupo 1; 5 µg/20g de Veneno Completo (VC) de *R. junceus* para el Grupo 2; 10 µg/20g de BSA y 5 µg/20g de VC Grupo 3; 10 µg/20g de BSA y 100 µL de Adyuvante Completo de Freud para el Grupo 4; 10µg/20g de extracto de anémona *Anthopleura xantogrammica* para el Grupo 5; todos a un volumen final de 200µL con PBS 1X pH 7.4. Al Grupo 1 inmunizado con BSA, después de la tercera inmunización se le disminuyó la concentración de albúmina a 3µg/20g (Tabla No. 2). Se empleó el extracto de anémona como control positivo por que existe referencia de su efecto inmunoestimulante (Prior Mier, 2002).

**Tabla No. 2.-** Protocolo de inmunización.

<b>Grupo Número:</b>	<b>Inmunizado con:</b>	<b>Concentración</b>
1	Albúmina de Suero Bovino (BSA)	10µg/20g
2	Veneno completo (VC) de <i>Rhopalurus junceus</i>	5µg/20g
3	VC de <i>Rhopalurus junceus</i> + BSA	5µg/20g y 10µg/20g
4	BSA + Adyuvante Completo de Freid	10µg/20g y 100µL
5	Extracto de Anémona <i>Anthopleura xantogrammica</i> + BSA	10µg/20g + 10µg/20g

### **1.2 Diseño del Ensayo Inmunoenzimático Ligado a Enzima (ELISA)**

Los ratones fueron sangrados un día después de cada una de las inmunizaciones empleando una trampa para inmovilizar ratones (Broome Restraints, Plas-Labs, VWR). La sangre colectada se incubó 10 minutos a 37° C, después de desprender el coágulo se centrifugó a 12,000g durante 30 minutos con el fin de obtener suero.

Para medir la respuesta de los linfocitos B en la producción de anticuerpos, se realizó el ELISA, colocando BSA como antígeno a una concentración de 0.5µg/mL en 50 µL, se incubó toda la noche a 4° C. Después se eliminó el sobrenadante y se adicionaron los sueros de ratón diluidos 1:50 en suero de gallina 3% (en amortiguador TBS 1X pH 7.6) y se

incubó toda la noche a 4° C. Al término de la incubación se descartó el sobrenadante y se lavó la placa tres veces con amortiguador TBS-Tween20 al 0.05%. Posteriormente, se agregaron 50 µL del conjugado enzimático compuesto de un anticuerpo anti-ratón acoplado a fosfatasa alcalina y se incubó a 4° C toda la noche.

Después se desechó el conjugado y se lavó la placa tres veces con TBS-Tween20 al 0.05%. Para revelar se adicionó el sustrato para fosfatasa alcalina y se incubó por 20 minutos. El color desarrollado, se determinó espectrofotométricamente a 405nm en el lector de ELISA (Microplate Reader Benchmark, Bio Rad).

## **2. Ensayo de Linfoproliferación**

### **2.1 Cultivo de Células de Cáncer de mama SKBR-3**

Las células criopreservadas a -70° C en dimetilsulfóxido (DMSO) 10% en BSA, se descongelaron a temperatura ambiente. La manipulación de las células se realizó en condiciones estériles en una campana de flujo laminar (Purifier Class II Biosafety Cabinet, LABCONO). Después de ambientadas, se colocaron en una placa de cultivo celular (FALCON) con 9 mL de medio RPMI 1640 (SIGMA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de antibiótico (10,000U/mL de penicilina, 10,000U/mL de estreptomina y 25µg/mL de anfotericina, GIBCO).

El medio se ambientó previamente en la campana. Se rotuló la placa y se colocó a 37° C y CO<sub>2</sub> al 5% por 24 horas en la incubadora (Water Jacketed CO<sub>2</sub> Incubator, VWR Scientific Products). Después se extrajo por completo el medio y se agregaron 9 mL de medio recién ambientado y se colocó en la incubadora. El medio fue reemplazado cada 48 horas. Dado que las células tienen la capacidad de adherirse a la placa de cultivo y

**Tabla No. 3.-** Diseño de la Inmunización para Ensayo Linfoproliferativo

<b>Grupo Número:</b>	<b>Grupo</b>	<b>Inmunizado con:</b>
1	Prueba	Lisado de células SKBR3 [4µg/mL] + Aceite mineral (10 µL)
2	Control Negativo	No inmunizado

### **2.3 Extracción de Ganglios**

Después de las inmunizaciones y cuando se observaba inflamación en los ganglios poplíteos, los organismos fueron sacrificados por dislocación cervical. Bajo condiciones de esterilidad se procedió a disectar los ganglios poplíteos, posteriormente fueron macerados en una gasa estéril y lavadas con medio RPMI 1640 (SIGMA) ambientado, suplementado y estéril. Se realizó un conteo celular de cuatro cuadrantes en la cámara de Neubauer tomando 10µL de la solución. Para el control negativo se realizó el mismo procedimiento.

### **2.4 Ensayo de Linfoproliferación.**

Se colocaron  $4.2 \times 10^4$  células en cada pozo de la placa de microcultivo (COSTAR) de 96 pozos a un volumen final de 100µL bajo condiciones de esterilidad. Después de incubarlas por 24 horas a 37° C con CO<sub>2</sub> al 5%, se agregaron 10µg/mL de los diferentes tratamientos en un volumen de 20 µL, por triplicado. Los tratamientos son: No. 1.- lisado de células SKBR3, No. 2.- extracto de *Conus californicus*, No. 3.- extracto de

anémona *Anthopleura xanthogrammica*, No. 4.- veneno completo de *Rhopalurus junceus*, No. 5.- Concanavalina A y finalmente el No. 6.- consistiendo en una combinación del lisado de SKBR3 y VC de *R. junceus*.

El Veneno Completo se aplicó a dos concentraciones, la antes mencionada de 10µg/mL y otra de 5µg/mL. Para la combinación de lisado y Veneno Completo también se emplearon las concentraciones de veneno antes mencionadas, respetando la concentración del lisado.

Como control negativo se emplearon linfocitos T no sensibilizados, es decir de un organismo no inmunizado, como control positivo se aplicó a linfocitos T sensibilizados el mitógeno Concanavalina A en diferentes tiempos de aplicación, el primero en el día 1 de cultivo y el otro en el día 4 (Tabla No. 4). Se cultivaron 5 días a una atmósfera parcial de CO<sub>2</sub> al 5% a una temperatura de 37° C. Después de 72 horas de cultivo se agregó 20 µL de medio RPMI 1640 estéril a cada pozo. Los ensayos se realizaron por triplicado, solo se realizó un experimento.

Posteriormente se adicionaron 20 µL del reactivo Cell Titer 96 Aqueous, se incubó por dos horas a 37° C con CO<sub>2</sub> al 5%. La cantidad de células vivas se determinó por el método de MTT en un lector de placas de microcultivo a 495nm (Microplate Reader Benchmark, Bio Rad).

## **2.5 Análisis Estadístico.**

Se realizó un análisis estadístico *a posteriori*, con la Prueba de Tukey con un intervalo de confianza del 95%.

**Tabla No. 4.-** Diseño del ensayo linfoproliferativo.

Inducido con:	Concentración:	Día de aplicación:
Lisado de células SKBR-3	10µg/mL	1
Extracto de <i>Conus californicus</i>	10µg/mL	1
Extracto de Anémoma <i>Anthopleura xanthogrammica</i>	10µg/mL	1
Veneno Completo de <i>Rhopalurus junceus</i>	10µg/mL ó 5µg/mL	1
Con A	10µg/mL	4
Lisado de células SKBR-3 + VC de <i>Rhopalurus junceus</i>	10µg/mL de lisado + 10µg/mL ó 5µg/mL	1
Control negativo (naive)	10µg/mL	1
Control negativo (naive) + Con A	10µg/mL + 10µg/mL	4

## V. RESULTADOS

### 1. Producción de Anticuerpos

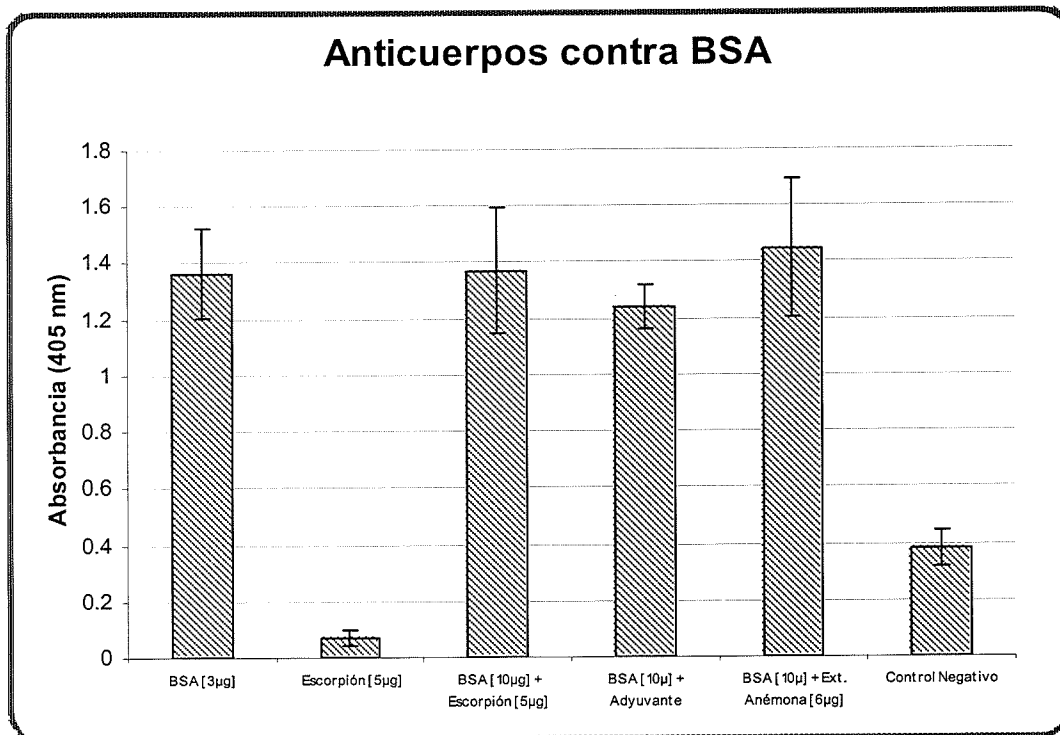
El grupo de ratones inmunizado con BSA (Grupo 1) presenta una respuesta mayor respecto al control negativo no inmunizado, pues existe una mayor producción de anticuerpos específicos para este antígeno.

El Veneno Completo del escorpión no induce una respuesta marcada por células B contra BSA cuando es inmunizado solo, puesto que las unidades de absorbancia son más bajas que el control negativo no inmunizado.

Cuando se inmuniza el VC de escorpión más el BSA (Grupo 3), se incrementa la respuesta inmune pero es menor en un 9.2% en relación al control positivo que fue inmunizado con BSA (Grupo 1). Cuando se inmunizó con BSA y Adyuvante (Grupo 4), se esperaba una respuesta mucho mayor que el Grupo 1, pero la respuesta es similar.

El Grupo 5, que fue inmunizado con BSA y Extracto de Anémona, presenta un incremento del 6% en la producción de anticuerpos dirigidos para BSA comparado con el Grupo No. 1.

Como se puede observar, no existe efecto inmunoestimulante del VC cuando es combinado con BSA (Grupo 3) dado que esta respuesta es igual a la del Grupo 1 que fue inmunizado únicamente con BSA (Gráfica No. 1).



**Gráfica No. 1.- ELISA de suero de ratón contra BSA.**

Se muestran los promedios de cada grupo, con la desviación estándar. El Control negativo consta de suero pre-inmune. Lectura a 405nm. A los promedios se les ha restado el control negativo, para mostrar la diferencia de este con cada uno de los grupos.

## 2. Ensayo de linfoproliferación

Después de las inmunizaciones en los cojinetes plantares traseros los ratones se sacrificaron y se extrajeron los ganglios poplíteos, cultivándose 24 horas a 37° C con CO<sub>2</sub> al 5%, se pusieron en contacto con los diferentes tratamientos; siendo el lisado de células SKBR3 el que presenta un mayor efecto linfoproliferativo, además de ser estadísticamente significativo ( $p= 0.00201$ ), esto se espera puesto que los ratones fueron inmunizados con este lisado celular y los linfocitos T ya se encuentran sensibilizados contra los antígenos presentes en el lisado.

El extracto de *Conus californicus*, no es significativamente estadístico respecto al control negativo que no fue inmunizado, por lo tanto no tiene efecto en el aumento de la proliferación celular.

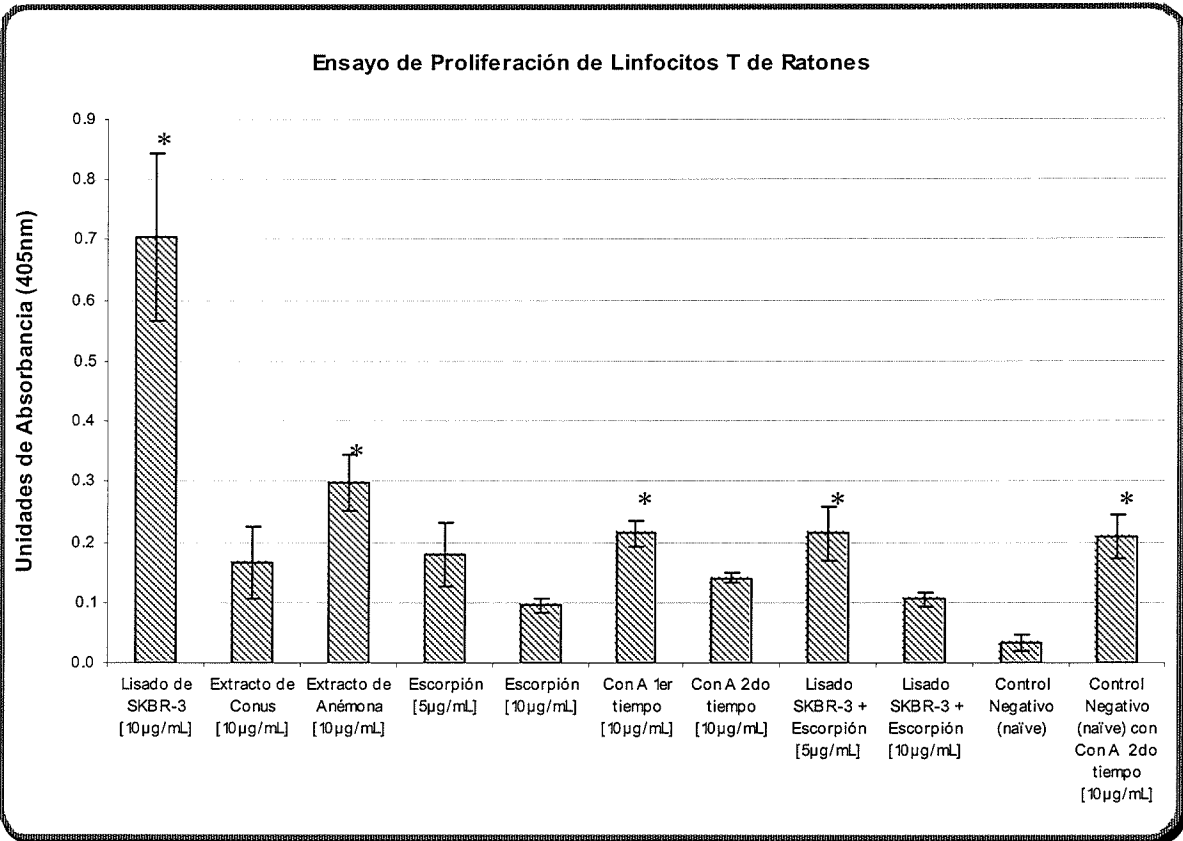
El extracto de Anémona estimula la división de los linfocitos T significativamente ( $p= 0.000348$ ) respecto al control negativo que no fue inmunizado.

A pesar de que el VC de *R. juncus* se agregó en dos concentraciones finales de 10  $\mu\text{g/mL}$  y 5  $\mu\text{g/mL}$ , no existe estimulación en la proliferación celular comparado con el control negativo, no es estadísticamente significativo.

Las células ya sensibilizadas al estar en contacto con Con A, fueron estimuladas mayormente cuando el mitógeno fue agregado después de 24 horas de cultivo. Otros pozos fueron estimulados después de 96 horas de cultivo y la lectura obtenida es menor que las sensibilizadas después de un día de cultivo. Por lo tanto, las células sensibilizadas estimuladas con Con A después de 24 horas son estadísticamente significativas ( $p= 0.0143$ ) respecto al control negativo.

También se realizó una mezcla de lisado de SKBR3 y VC de escorpión con dos concentraciones de Veneno Completo, siendo la concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$  la que presenta mayor estimulación y es estadísticamente significativa ( $p= 0.015$ ) respecto al control negativo no estimulado.

El control negativo de células no sensibilizadas que fue estimulado con Con A, muestra que la concanavalina sí estimula la división celular dado que es estadísticamente significativo ( $p= 0.0187$ ).



**Gráfica No. 2.-** Ensayo de Linfoproliferación.

Se muestran las absorbancia a 495nm y las desviaciones estándar. El control positivo son linfocitos T de organismos sensibilizados, retados *in vitro* con SBKR3. El control negativo (naïve) consta de células no sensibilizadas y no fue inducido. \* Resultados estadísticamente significativos respecto al control negativo naïve sin Con A.

## VI. DISCUSIONES

### 1. Producción de anticuerpos contra BSA.

Como muestra en la gráfica No. 1, en los sueros de los organismos existe un incremento en la producción de anticuerpos contra BSA, aunque esto no aplica para el Grupo 2, que fue inmunizado con Veneno Completo de *R. juncus*, pues la lectura obtenida fue menor que la del control negativo que consistió en suero pre-inmune, lo cual significa que no es inmunoestimulador. Como se muestra, se incrementó la respuesta respecto al Control negativo en el Grupo 5 que fue inmunizado con BSA y Extracto de Anémona, lo cual concuerda con lo reportado por Prior Mier (2002).

El Grupo 3, inmunizado con la mezcla de BSA y VC, no muestra respuesta significativa respecto del Grupo 1, lo cual significa que no tiene efecto inmunoestimulante sobre células B.

El Grupo 4, que fue inmunizado con Adyuvante y BSA no presenta un aumento significativo en la respuesta respecto al Grupo 1; se esperaba que el adyuvante potenciara la respuesta inmune al poner en contacto el antígeno a las células presentadoras favoreciendo su presentación y la infiltración de otras células del sistema inmune, sin embargo, en este experimento no fue así.

El control negativo que proviene de un organismo no inmunizado, presenta respuesta de anticuerpos contra BSA, esto puede ser resultado de las similitudes (del 80%) que existe entre BSA y la Albúmina de Suero de Ratón (MSA) (Ruiz, 2004). Y dado que en la placa de ELISA el BSA es utilizado como antígeno y éste se encuentra unido a la placa dejando espacios que pueden ser muy compartidos entre ambas albúminas, existe el reconocimiento de anticuerpos circulantes.

## 2. Ensayo Linfoproliferativo.

Este sistema de linfoproliferación *in vitro*, ha sido previamente utilizado para evaluar el efecto de otras toxinas sobre células linfoides como cardiotoxina y caribdotoxina (Muñoz, 1994) ya que permite un primer acercamiento para evaluar el efecto de toxinas sobre los linfocitos.

Se utilizó el activador Con A puesto que, induce una fuerte acción mitogénica principalmente sobre linfocitos T, se ha propuesto que es un estímulo similar al mediado por la respuesta proliferativa inducida con anticuerpos monoclonales anti-TCR. Esto permite evaluar una respuesta policlonal que no es posible estudiar cuando se utiliza como mecanismo de inducción a la proliferación un antígeno específico pues, limita la respuesta solo de algunas clonas con el receptor para el antígeno activador.

El Control positivo que es el lisado de células SKBR3, tiene más absorbancia debido a que los ratones fueron inmunizados con este lisado y los linfocitos T ya tenían un reto para ese antígeno, siendo estadísticamente significativo ( $p= 0.000201$ ) respecto al control negativo naive.

El extracto de *C. californicus*, no muestra estimulación de linfocitos T, no es significativo estadísticamente, por lo tanto el extracto de *Conus* no inmunoestimula pero sí tiene un efecto citotóxico, lo cual se había encontrado por Ruiz (2004) en células de cáncer de mama donde se inhibe el crecimiento celular en un 65%.

El extracto de anémona, presenta un efecto de estimulación en la división celular a una concentración de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  según lo reportado por Prior Mier (2002). Se observó un incremento de la división celular aunque éste no es mayor que la del control positivo (SKBR3) pero, dicho

crecimiento es estadísticamente significativo respecto al control negativo no sensibilizado y no estimulado (naive). La concentración utilizada en este trabajo es de 10 µg/mL, lo cual sugiere que la estimulación de la división celular está relacionada con la concentración del extracto pues, la concentración que empleada es menor a la reportada por Prior Mier (2002) entonces, entre más concentrado existen más moléculas estimuladoras de canales iónicos y otros receptores de membrana. Esta actividad de canales iónicos se refiere principalmente a la activación o inactivación de proteínas de membrana, causando diferencias en los flujos de entrada y salida de iones, modificando así, el curso del ciclo celular.

El veneno del escorpión *R. junceus* se agregó en dos concentraciones una de 5 µg/mL y otra de 10 µg/mL, observando una mayor proliferación de las células en contacto con la menor concentración (de 5 µg/mL), como posible resultado de un efecto inhibitorio del crecimiento celular, por lo tanto, si se aumenta la concentración del veneno puede tener un efecto citotóxico en vez de estimulador.

Como controles se agregó a las células T sensibilizadas Con A en dos tiempos. Puesto que la concanavalina es un mitógeno que promueve la división celular al ser un péptido pequeño se sugiere (Licea, 1994) que no es necesaria la presentación de este péptido por las células presentadoras de antígeno (APC) sino que, puede formar complejos directamente sobre moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II (MHC II) de superficie de la células presentadoras profesionales (APC) e iniciar la estimulación de los linfocitos T. Sin embargo, en el ensayo de MTT la lectura obtenida es menor que para las células control inducidas con SKBR3, esto puede ser causado por que el máximo de estimulación de la Con A es de 48 horas (Licea, 1994) por lo tanto la lectura tomada después de 72 horas de cultivo con inducción fue menor, por lo que se presume disminuye la proliferación de las células T. En el segundo tiempo de

inducción aún no había llegado al máximo de estimulación reportado por Licea (1994). Sin embargo, las células sensibilizadas y estimuladas después de 24 horas de cultivo son estadísticamente significativas respecto del control negativo que no fue estimulado, lo cual indica que si existe estimulación.

La combinación de lisado SKBR3 a una concentración de 10 µg/mL y VC de *R. junceus* en dos concentraciones 5 µg/mL ó 10 µg/mL, no presenta estimulación de la división celular respecto a las células tratadas con SKBR3, sin embargo, el tratamiento de lisado+VC a 5µg/mL es estadísticamente significativo respecto al control negativo de células naive (no sensibilizadas y no estimuladas), esto apoya la hipótesis de un efecto supresor o citotóxico del veneno en linfocitos T.

Aunque no es posible discernir el nivel de acción del Veneno Completo, éste puede darse sobre macrófagos, que son las células que presentan el antígeno *in vitro*, por lo tanto, no hay estimulación de las células T puesto que no habría células capaces de presentar el antígeno. Tampoco se puede descartar un efecto directo del veneno sobre los linfocitos T, ya sea a nivel de canales iónicos o de inhibición de la cascada de señales para el inicio del ciclo celular.

El control negativo que fue inducido con Con A después de 24 horas de cultivo, presenta un aumento en la proliferación celular estadísticamente significativo ( $p= 0.0187$ ) respecto del control negativo no sensibilizado y no estimulado (naive), lo cual apoya la idea de que la Con A si estimuló los linfocitos T promoviendo una división celular independiente del antígeno con el cual fueron inmunizados los ratones.

## VII. CONCLUSIONES

Con el esquema de inmunización planteado en este trabajo y con las concentraciones de inmunización vía intraperitoneal utilizadas, no existe efecto inmunoestimulante del Veneno Completo del escorpión *Rhopalurus junceus*.

En el ensayo linfoproliferativo, no existe aumento significativo estadísticamente en la división celular de linfocitos T sensibilizados tratados con el Veneno Completo del escorpión a dos concentraciones.

Por lo tanto se propone, que el Veneno Completo del escorpión *R. junceus* tiene efecto supresor dependiente de la concentración. Además, se debe realizar investigación más profunda sobre los posibles mecanismos de acción de este veneno en células del sistema inmune.

## VIII. PERSPECTIVAS

Se recomienda realizar una purificación y caracterización de los compuestos proteicos del Veneno Completo de *Rhopalurus junceus*, para inmunizar ratones con las fracciones ya purificadas del veneno y analizar de manera separada su acción en el sistema inmune. De esta manera, se elimina la posibilidad de que exista un enmascaramiento de la posible acción inmunomoduladora que contengan algunas de las fracciones del veneno.

## IX. LITERATURA CITADA

1. Abbas A., Lichtman A., Pober J. 2002. Inmunología celular y molecular. 4ta edición. Mc Graw-Hill Interamericana. 552 pp.
2. Abdul M. y Hoosein N. 2002. Expression and activity of potassium ion channels in human prostate cancer. *Cancer Letters*. **186**: 99-105.
3. Agha-Mohammadi S. y Lotze M. 2000. Immunomodulation of cancer: potencial use of selectively replicating agents. *The Journal of Clinical Investigation*. **105**(9): 1173-1176.
4. Alvarez L., Mamelak A., Raubitschek A., Rosenfeld S., Nabors B., Fiveash B., Khazaeli M., Shen S., Bucholz R., Hablitz D., Gonda M. 2003. A phase I/II clinical trial for adult recurrent glioma using <sup>131</sup>I-TM-601, an iodinated peptide derived from scorpion venom which targets a receptor found on tumor cells. Presented at the Advances in the Application of Monoclonal Antibodies in Clinical Oncology Conference
5. Arango M., Llanes L., Díaz T., Faxas E. 1997. La apoptosis: sus características y su papel en la transformación maligna de la célula. *Rev. Cubana de Oncol.* **13**(2): 126-134.
6. Barroso M. 1998. Angiogénesis tumoral. *Rev. Cubana de Oncol.* **14**(3): 181.
7. Bertazzi D., de Assis-Pandochi A., Azzolini A., Talhaferro A., Lazzarini M., Arantes E. 2003. Effect of *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major toxin, TsTX-1, on the complement system in vivo. *Toxicon*. **14**(4): 501-508.

8. Bessalem S., Hammoudi-Triki D., Laraba-Djebari F. 2003. Effect of immunotherapy on metabolic and histopathological modifications after experimental scorpion envenomation. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **96**(2): 110-114.
9. Bonnote B., Larmonier N., Favre N., Fromentin A., Moutet M., Martin M., Gurbuxani S., Solary E., Chauffert B., Martin F. 2001. Identification of tumor-infiltrating macrophages as the killers of tumor cells after immunization in a rat model system. *The Journal of Immunology.* **167**: 5077-5083.
10. Bordier M., Martínez M., Salgado H., Bory G., Perry F., Granado R., Capó R., Aguirre R., Guitián J. 1996. Certificado de Autor de Invención. Composición Antitumoral. CU 22413 A1.
11. Calatayud S., Warner T., Mitchell J. 2002. Modulation of colony factor release and apoptosis in human colon cancer cells by anticancer drugs. *Br. J. Cancer.* **86**(8): 1316-1321.
12. Calderón-Aranda E. 1992. Estudio de la relación estructura-función y capacidad inmunogénica de neurotoxinas y péptidos análogos sintéticos del veneno del alacrán *Centruroides noxius* Hoffmann. Tesis de Doctorado. UNAM. 87 pp.
13. Calderón-Aranda E., Hozbor D., Posan L. 1993. Neutralizing capacity of murine sera induced by different antigens of scorpion venom. *Toxicon.* **31**(3): 327-337.
14. Calderón-Aranda E. Rivière G., Choument V., Possani L., Bon C. 1999. Pharmacokinetics of the toxic fraction of *Centruroides limpidus limpidus*

venom in experimentally envenomed rabbits and effects of immunotherapy with specific F(ab')<sub>2</sub>. *Toxicon*. **37**: 771-782.

15. Cao J., Rivera F., Bello F. 1997. Algunos aspectos bioecológicos y farmacológicos del veneno crudo procedente de dos especies de escorpiones cubanos. IV Simposio de Zoología. La Habana, Cuba. p. 70.
16. Chavez-Olortegui C., Fonseca C., Campolina D., Amaral F., Diniz C. 1994. ELISA for the detection of toxic antigens in experimental and clinical envenoming by *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon*. **32**(12): 1694-1656.
17. da Rocha, A.B., Lopez, R.M. y Shwartsman, G. 2001. Natural products in anticancer therapy. *Curr Opin Pharmacol*. **1**(4): 364-369.
18. da Silva R., da Silva M., Vilela L., Fecchio D. 2002. Antitumor effect of *Bothrops jararaca* venom. *Mediators of Inflammation*. **11**: 99-104.
19. D'Suze S., Moncada C., Gonzalez C., Sevick C., Aguilar V., Alagón A. 2003. Relationship between plasmatic levels of various cytokines, tumour necrosis factor, enzymes, glucose and venom concentration following *Tityus* scorpion sting. *Toxicon*. **41**:367-375.
20. Devaux C., Clot-Faybesse O., Pugniere M., Mani J., Rochat H., Granier C. 2002. A strategy for inducing an immune response against *Androctonus australis* scorpion venom toxin I in mice. Production of high-affinity monoclonal antibodies and their use in a sensitive two-site immunometric assay. *J. Immunol. Methods*. **271**(1-2): 37-46.

21. Fraser S., Ding Y., Liu A., Foster C., Djamgoz M. 1999. Tetrodotoxin suppresses morphological enhancement of the metastatic MAT-LyLu rat prostate cancer cells line. *Cell Tissue Res.* **295**(3): 505-512.
22. Fukuhara Y., Reis M., Dellalibera-Joviliano R., Cunha F., Donadi E. 2003. Increased plasma levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- $\alpha$  in patients moderately or severely envenomed by *Tityus serrulatus* scorpion sting. *Toxicon.* **41**: 49-55.
23. Garcia C., Calderón-Aranda E., Anguiano G., Becerril B., Possani L. 2003. Analysis of the immune response induced by a scorpion venom sub-fraction, a pure peptide and a recombinant peptide, against toxin Cn2 of *Centruroides noxius* Hoffman. *Toxicon.* **41**: 417-427.
24. Harvestick D., Heady T., Macdonald T., Gray L. 2000. Inhibition of human prostate cancer proliferation in vitro and in a mouse model by a compound synthesized to block Ca<sup>2+</sup> entry. *Cancer Research.* **60**: 1002-1008.
25. Hertler A., Frankel A. 1989. Immunotoxins: a clinical review of their use in the treatment of malignancies. *J. Clin. Oncol.* **7**(12): 1932-1942.
26. Hibbert P. y Rubin R. 1989. Immunization strategies for the immunocompromised host: the need for immunoadjuvants. **110**: 955-956.
27. Kalman K., Pennington M., Lanigan M., Nguyen A., Rauer H., Mahnir V., Paschetto K., Kem W., Grissmer S., Gutman G., Christian E., Cahalan M., Norton R., Chandy G. 1998. ShK-Dap<sup>22</sup> a potent Kv1.3-specific immunosuppressive polypeptide. *The Journal of Biological Chemistry.* **273**(49): 32697-32707.

28. Kneitz C., Goller M., Wilhelm M., Mehringer C., Wohlleben G., Schimpl A. Tony H-P. 1999. Inhibition of T cell/ B cell interaction by B-CLL cells. *Leukemia*. **13**: 98-104.
29. Kovarik J., Siegrist C-A. 1998. Optimization of vaccine responses in early life: The role of delivery systems and immunomodulators. *Immunology and Cell Biology*. **76**: 222-236.
30. Leonard R., Garcia M., Slaughter R., Reuben J. 1992. Selective blockers of voltage-gated K<sup>+</sup> channels depolarize human T lymphocytes: Mechanism of the antiproliferative effect of charybdotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 10094-10098.
31. Legros C., Pollmann V., KnausH-G., Farrel A., Darbon H., Bougis P., Martin-Eauclaire M-F., Pongs O. 2000. Generating a high affinity scorpion toxins receptor in KcsA-Kv1.3 chimeric potassium channels. *The Journal of Biological Chemistry*. **276**(22): 16918-16924.
32. Licea Navarro A. F. 1994. Incremento de la respuesta inmunológica de linfocitos T dirigida contra *Mycobacterium leprae* utilizando polímeros de péptidos sintéticos. Tesis de Maestría. IBT/UNAM. Cuernavaca, México. 42 pp.
33. Lyons S., O'Neal J., Sontheimer H. 2002. Cholotoxin, a scorpion-derived peptide, specially binds to glioma tumor of neuroectodermal origin. *GLIA*. **39**: 162-173.
34. Mamelak A., Raubitscheck A., Morgan R., Rosenfeld S., Nabors L. Buckholtz R., Guthrie B., Colcher D. 2003. A phase I/II trial of

intracavitary <sup>131</sup>I-TM-601 in adult patients with recurrent high-grade glioma. Presented at The Society of Neuro-Oncology Annual Meeting.

35. Masihi K. N. 2000. Immunomodulators in infectious diseases: panoply of possibilities. *Int. J. Immunopharmacol.* **22**(12): 1083-1091.
36. Muñoz Garay C. 1994. Determinación del efecto de la toxina 2 de *Centruroides noxius* sobre la proliferación *in vitro* de linfocitos murinos. Tesis de Licenciatura. UNAM. México. 96 pp.
37. Nicoara E. y Crisan A. 2003. Possibilities to modulate the immune response during infections. *T. M. J.* **53**(3-4): 303-307.
38. Niemeyer B., Mery L., Zawar C., Suckow A., Monje F., Pardo L., Stühmer W., Flockerzi V., Hoth M. 2001. Ion channels in health and disease: 83<sup>rd</sup> Boehringer Ingelheim Fonds International Titisee Conference. *EMBO reports.* **2**(71): 568-573.
39. Padilla A., Govezensky T., Possani L., Larralde C. 2003. Experimental envenoming of mice with venom from the scorpion *Centruroides limpidus limpidus*: differences in mortality and symptoms with and without antibody therapy relating to differences in age, sex and strain of mouse. *Toxicon.* **41**(8): 959-965.
40. Peter M., Varga Jr., Panyi G., Bene L., Damjanovich S., Prieri C., Possani L., Gaspar R. 1998. Pandinus imperator scorpion venom blocks voltage-gated K<sup>+</sup> channels in human lymphocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **242**: 621-625.

41. Price M., Lee S., Deutsch C. 1989. Charybdotoxin inhibits proliferation and interleukin 2 production in human peripheral blood lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. **86**: 10171-10175.
42. Prior Mier y Terán G. 2002. Aislamiento y caracterización de toxinas peptídicas de la anémona *Anthopleura xanthogrammica*. Tesis de Maestría. CICESE. Baja California, México. 66 pp.
43. Possani L., Becerril B., Delepierre M., Tytgat J. 1999. Scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup> channels. Eur. J. Biochem. **264**: 287-300.
44. Rak J., Yu J., Kerbel R., Coomber B. 2002. What do oncogenic mutations have to do with angiogenesis/vascular dependence of tumor?. Cancer Research. **62**: 1931-1934.
45. Rader R., Kahn L., Anderson G., Martin C., Chinn K., Gregory S. 1996. T cell activation is regulated by voltage-dependent and calcium-activated potassium channels. The Journal of Immunology. **156**(4): 1425-1430.
46. Rieumont R., Díaz A., González Y., Fadruga M., Maestre J., Morier L., Pérez L., Rodríguez A. 2003. Caracterización bioquímica parcial y evaluación de la actividad biológica, en tres líneas celulares tumorales y fibroblastos normales de pulmón del veneno del escorpión cubano *Rhopalurus junceus*. Biotecnología Habana 2003. La Habana, Cuba.
47. Rimsza M., Zimmerman D., Bergeson P. 1980. Scorpion Envenomation. Pediatrics. **66**(2): 298-302.
48. Ruiz Durán B. 2004. Purificación y caracterización preliminar de toxinas del veneno del caracol marino *Conus californicus*. Tesis de Maestría. CICESE. Baja California, México. 56 pp.

49. Sands S., Lewis R., Cahalan M. 1989. Charybdotin blocks voltage-gated K<sup>+</sup> channels in human and murine T lymphocytes. *The Journal of General Physiology*. **93**: 1061-1074.
50. Selisko B., García C., Becerril B., Gómez-Lagunas F., Garay C., Possani L. 1998. Cobatoxins 1 and 12 from *Centroroides noxius* Hoffman constitute a subfamily of potassium-channel-blocking scorpion toxins. **254**: 468-479.
51. Singh M. y O'Hagan D. 1999. Advances in vaccine adjuvants. *Nature Biotechnology*. **17**: 1075-1081.
52. Soroceanu L., Gillespie Y., Khazaeli M. Sontheimer H. 1998. Use of chlorotoxin for targeting of primary brain tumors. *Cancer Research*. **58**(21): 4871-4879.
53. Ullrich N. and Sontheimer H. 1997. Cell cycle-dependent expression of glioma-specific chloride current: proposed link to cytoskeletal changes. *The American Physiological Society*. 1290-1297.
54. Vargas C. 2004. Identificación y aislamiento de dos agentes citotóxicos del caracol marino *Conus californicus*. Tesis de Maestría. CICESE. Baja California, México.
55. Wulff H., Calabresi P., Allie R., Yun S., Pennington M., Beeton C., Chandy G. 2003. The voltage-gated Kv1.3 K<sup>+</sup> channel in effector memory T cells as new target for MS. *J. Clin. Invest.* **111**: 1703-1713.
56. Yang-Feng L., Jian H., Zhang J-H., Wang S-L., Wu C-F. 2002. Isolation, purification and N-terminal partial sequence of an antitumor

peptide from the venom of the Chinese scorpion *Buthus martensii*  
Karsch. Prep. Biochem. and Biotech. **32**(4): 317-327.

## X. PAGINAS DE INTERNET

**No. 1.-** Organización Mundial de la Salud.

<http://www.who.int/cancer/en/>

**No. 2.-** Secretaria de Salud.

[www.ssa.gob.mx/](http://www.ssa.gob.mx/)

**No. 3.-** Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática.

[www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx)

**No. 4.-** Corporación TransMolecular.

[www.transmolecular.com](http://www.transmolecular.com)