

Efecto del tratamiento de apitoxina (veneno de *Apis mellifera*) en la sobrevida de ratones BALB/c con Linfoma murino L-5178-Y

Effect of treatment of apitoxin (*Apis mellifera* venom) in the survival of BALB/c mice with murine lymphoma L-5178-Y

Edgardo Flores Torales*¹, Sergio Álvarez Barajas¹, Jesse Haramati¹, Juan Manuel Viveros Paredes², Rocío Ivette López Roa².

¹Departamento de Biología Celular y Molecular. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara. Camino Ing. Ramón Padilla Sánchez No. 2100 La Venta del Astillero, Zapopan, 45110, Jalisco, México.

²Departamento de Farmacobiología, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Universidad de Guadalajara.

*Autor para correspondencia: fte17707@cucba.udg.mx

Resumen

La apitoxina, o veneno de abeja, es un líquido amargo e incoloro. Posee un aroma específico y fuerte, tiene un peso específico de 1.1313 y un pH ácido de 5.5. La porción activa de este veneno es una mezcla compleja de proteínas. El principal componente es la melitina, abarcando el 52% de los péptidos del veneno. La melitina es un poderoso agente anti-inflamatorio, así como también induce la producción de cortisol en el cuerpo. La fosfolipasa A2 suma del 10 al 12% de los péptidos y es el componente más destructivo de la apitoxina. Es una enzima que degrada los fosfolípidos de los cuales las membranas celulares están hechas. También disminuye la presión sanguínea e inhibe la coagulación. La fosfolipasa A2 activa al ácido araquidónico el cual se metaboliza en la ruta de la ciclooxigenasa para la síntesis de prostaglandinas. La apitoxina ha sido empleada en la medicina tradicional para tratar diversas enfermedades tales como: inflamaciones de origen traumático, reumatismo, osteoartritis, artritis reumatoide, neuralgia lumbar, esclerosis múltiple, radiculitis, arterioesclerosis de las extremidades, lupus y afecciones del sistema nervioso periférico, tratamiento de la presión arterial, úlceras tróficas, deficiencias inmunológicas, edemas, asma, síndrome migrañoso, trastornos cardiovasculares caracterizados por baja eficiencia del miocardio, así como trastor-

nos vasculares cerebrales y las enfermedades de tipo viral como herpes Zoster y herpes genital, esto debido a sus propiedades anticoagulantes, anti-inflamatorias y antivirales. También ha mostrado poseer propiedades anti-cancerígenas, varios tipos de células cancerosas, incluyendo las renales, de pulmón, de hígado, de próstata, de vejiga, y células cancerosas mamarias así como también células de leucemia, pueden ser blanco de los péptidos del veneno de abeja, como las ya mencionadas melitina y fosfolipasa A2. Se ha sugerido que los efectos citotóxicos celulares a través de la activación de la fosfolipasa A2 por melitina es un mecanismo crítico para la actividad anti-cancerígena del veneno de abeja. La inducción de muerte celular programada a través de varios mecanismos de muerte celular cancerígena, incluida la activación de la caspasa y las metaloproteinasas de matriz, es importante para los efectos anti-cancerígenos inducidos por la melitina. La conjugación del péptido celular lítico (melitina) con receptores hormonales y la terapia génica cargando melitina pueden ser útiles como una novedosa terapia dirigida para el tratamiento de algunos tipos de cáncer, tales como el cáncer de mama y de próstata. Objetivo: El objetivo de este trabajo, fue evaluar la capacidad anti-cancerígena de la apitoxina, a través de un modelo de tumor in vivo. Método: Se utilizaron

ratones de la cepa BALB/c con el Linfoma murino L-5178-Y, evaluamos diferentes vías y tiempos de administración, intraperitoneal, intramuscular y oral, administrando 200µg. de apitoxina por dosis diaria a cada ratón hasta el día de su muerte, los grupos fueron por duplicado para cada una de las vías de administración, para así tener grupos donde se administró la apitoxina 15 días antes de inocular el tumor, y otros grupos que iniciaron su tratamiento al siguiente día de inoculado el tumor. Resultados: De los diferentes grupos trabajados, encontramos que los grupos donde se administró la apitoxina previamente a la inoculación del tumor, específicamente en los grupos con vía de administración oral e intramuscular, mostraron diferencia significativa con respecto al grupo control, es decir, la vida de los ratones tratados 15 días con apitoxina antes de inocular el tumor, prolongó más la vida que en los ratones que solo tenían tumor y no se les administró apitoxina en ningún momento. Conclusiones: La apitoxina prolonga la vida de los ratones con tumor cuando la administración se realiza vía oral e intramuscular y de manera previa a la inoculación del tumor.

Palabras claves: Apitoxina, linfoma, veneno.

Abstract

Apitoxin, or bee venom, is a bitter and colorless liquid. It has a specific and strong aroma, has a specific weight of 1.1313 and an acidic pH of 5.5. The active portion of this poison is a complex mixture of proteins. The main component is melittin, comprising 52% of the peptides of the poison. Melitin is a powerful anti-inflammatory agent, as well as induces the production of cortisol in the body. Phospholipase A2 adds 10 to 12% of the peptides and is the most destructive component of apitoxin. It is an enzyme that degrades the phospholipids of which the cell membranes are made. It also lowers blood pressure and inhibits coagulation. Phospholipase A2 activates arachidonic acid, which is metabolized in the cyclooxygenase pathway for the synthesis of prostaglandins. Apitoxin has been used in traditional medicine to treat various di-

seases such as inflammation of traumatic origin, rheumatism, osteoarthritis, rheumatoid arthritis, lumbar neuralgia, multiple sclerosis, radiculitis, arteriosclerosis of the extremities, lupus and peripheral nervous system disorders, treatment of blood pressure, trophic ulcers, immunological deficiencies, edema, asthma, migrainous syndrome, cardiovascular disorders characterized by low myocardial efficiency, as well as cerebral vascular disorders and viral diseases such as herpes Zoster and genital herpes, this due to its properties anticoagulants, anti-inflammatory and antiviral. It has also been shown to possess anticarcinogenic properties, various types of cancer cells, including kidney, lung, liver, prostate, bladder, and breast cancer cells as well as leukemia cells, can be targeted by poison peptides of bee, like the aforementioned melittin and phospholipase A2. It has been suggested that the cellular cytotoxic effects through the activation of phospholipase A2 by melittin is a critical mechanism for the anti-carcinogenic activity of bee venom. The induction of programmed cell death through several mechanisms of cancer cell death, including the activation of caspase and matrix metalloproteinases, is important for the anti-carcinogenic effects induced by melittin. The conjugation of lytic cell peptide (melittin) with hormone receptors and gene therapy loading melitin may be useful as a novel targeted therapy for the treatment of some types of cancer, such as breast and prostate cancer. Objective: The objective of this work was to evaluate the anti-carcinogenic capacity of apitoxin, through a tumor model in vivo. Method: We used mice of the BALB / c strain with the murine lymphoma L-5178-Y, evaluated different routes and times of administration, intraperitoneal, intramuscular and oral, administering 200µg. of apitoxin per daily dose to each mouse until the day of death, the groups were in duplicate for each of the administration routes, in order to have groups where the apitoxin was administered 15 days before inoculating the tumor, and other groups that They started their treatment the next day after the tumor was inoculated. Results: Of the different groups studied, we found that the groups where the apitoxin was

administered prior to the tumor inoculation, specifically in the groups with oral and intramuscular route of administration, showed significant difference with respect to the control group, that is, life of mice treated for 15 days with apitoxin before inoculating the tumor, prolonged life longer than in mice that only had tumors and were not administered apitoxin at any time. Conclusions: Apitoxin prolongs the life of mice with tumors when administered orally and intramuscularly and prior to inoculation of the tumor.

Keywords: Apitoxin, lymphoma, venom.

Introducción

El crecimiento y la proliferación celular son eventos normales en el desarrollo de los órganos durante la embriogénesis, crecimiento y reparación tisular. La regulación anormal de estos procesos produce como resultado pérdida de control sobre el crecimiento (Kash et al. 2001). El cáncer representa de modo colectivo un espectro de enfermedades que se caracterizan por crecimiento anormal de la célula (Verkasalo et al. 1999).

Algunas son las teorías que intentan explicar los mecanismos por los cuáles se desarrollan. Una teoría menciona que los cambios genéticos en el cáncer pueden producirse al azar, debido a la inestabilidad genética inherente de las células malignas. Sin embargo, ciertas alteraciones parecen producir o contribuir al fenotipo maligno. Estas se producen en general con una ganancia de función que se conocen como oncogenes, mientras los genes en los cuales las deleciones o las mutaciones producen pérdida de la función de control se define como genes supresores de tumores (Verkasalo et al. 1999).

Un gran número de factores son atribuidos como de riesgo para el desarrollo de los tumores, aunque en la actualidad se conoce que su etiología es multifactorial (Ekman et al. 1999). En México ocupa uno de los primeros lugares de mortalidad. Una de las enfermedades cancerígenas que ocupan un lugar importante en nuestro país, son los linfomas, los cuales son más frecuentes en hombres, en edades de entre 15 y 34

años (Secretaría de Salud 2018). Estos tumores, que también son llamados neoplasias del sistema inmunitario, son definidos como un grupo heterogéneo de tumores, cuyas células de origen pueden ser linfocitos. Se piensa que cada neoplasia es una expansión monoclonal de células malignas, aunque sólo se ha demostrado de manera concluyente en tumores linfocíticos (Williams et al. 2000).

Es característico el hecho de que a menudo las neoplasias conservan muchas propiedades morfológicas, funcionales y migratorias comunes a sus correspondientes células normales (Fisher et al. 1998).

El veneno de la abeja (*Apis mellifera*) conocido como apitoxina, es un líquido amargo e incoloro. La porción activa de este veneno es una mezcla compleja de proteínas. Este veneno es producido en el abdomen de las abejas obreras desde una mezcla de secreciones ácidas y alcalinas. El veneno de abeja ha sido utilizado en la medicina como anti-inflamatorio y antiviral (Park 2016).

La apitoxina, también ha mostrado poseer propiedades anti-cancerígenas, varios tipos de células cancerosas, incluyendo las renales, de pulmón, de hígado, de próstata, de vejiga, y células cancerosas mamarias así como también células de leucemia, pueden ser blanco de los péptidos del veneno de abeja, como la melitina y la fosfolipasa A2 (Kong et al. 2016).

Se ha sugerido que los efectos citotóxicos celulares a través de la activación de la fosfolipasa A2 por melitina es un mecanismo crítico para la actividad anti-cancerígena del veneno de abeja. La inducción de muerte celular programada a través de varios mecanismos de muerte celular cancerígena, incluida la activación de la caspasa y las metaloproteinasas de matriz, es importante para los efectos anti-cancerígenos inducidos por la melitina (Wu et al. 2015).

Una vez que inicia el tratamiento de las células con la melitina, la cascada inicial puede ser la activación de canales de calcio y la fosfolipasa A2, llevando a la elevación de calcio intracelular y la activación de CaMKII calcio -sensitiva. La TAK1 es uno de los blancos de la CaMKII y se

ha demostrado anteriormente que está ampliamente involucrada en la activación de IKK α/β por IL-1R, receptores tipo Toll, y receptores TNF (Factor de Necrosis Tumoral). La activación de la TAK1 puede llevar a la subsecuente activación de las vías de MKK-JNK/p38 y IKK α/β -I κ B α -NF κ B. La melitina puede activar a la TAK1 vía activación de CaMKII calcio-dependiente, lo cual provee un enlace entre el influjo de calcio y la activación de MAPK/NFB. La inhibición de la apoptosis inducida por melitina por cinasas inhibitorias como la KN62, SP600125, SB203580, y la dominante TAK1 negativa demuestran que la apoptosis inducida por melitina es dependiente de la activación de la vía CaMKII-TAK1-MKK-JNK/p38 (Zheng et al. 2015).

Materiales y Métodos

Estudio de carácter experimental, con grupos independientes de comparación.

Animales

Ratones BALB/c machos de 8-12 semanas de edad. Los animales se mantendrán con ciclos de luz oscuridad de 12 horas y el agua y alimento les será proporcionado ad libitum.

Células tumorales

El linfoma murino L-5178-Y de origen espontáneo y estirpe tímica, se mantiene en fase ascítica por trasplante intraperitoneal a ratones BALB/c.

Evaluación de la sobrevivencia

Se utilizaron ratones de la cepa BALB/c de 8 a 12 semanas de edad y de 20 a 25g. de peso con el Linfoma murino L-5178-Y, evaluamos diferentes vías y tiempos de administración, intraperitoneal, intramuscular y oral, administrando 200 μ g. de apitoxina por dosis diaria a cada ratón hasta el día de su muerte, los grupos fueron por duplicado para cada una de las vías de administración, para así tener grupos donde se administró la apitoxina 15 días antes de inocular el tumor, y otros

grupos que iniciaron su tratamiento al siguiente día de inoculado el tumor. Se establecerán dos tipos de tratamiento, el primero considerado como "pretratados" en el cual se tratarán tres grupos de 10 ratones con dosis de apitoxina de 200 μ g vía intraperitoneal, intramuscular y oral 15 días antes de la implantación del tumor el cual se inoculará en la región peritoneal (1x10⁶ células tumorales) y se continuará la administración de la apitoxina vía oral, hasta la muerte. La segunda forma de tratamiento será "postratados" en el cual, en este grupo de 10 ratones, se iniciará el tratamiento vía oral con la apitoxina al día siguiente al que se le implante el tumor, inoculado en la región peritoneal (1x10⁶ células tumorales), el tratamiento se prolongará hasta la muerte de los ratones. A otros 2 grupos de 10 ratones cada uno, se les dará el mismo tratamiento (apitoxina) que a los dos grupos anteriores, solo que no se les implantará el tumor. Y por último, 2 grupos más de 10 ratones cada uno, serán dosificados de igual manera que los anteriores, pero únicamente con el vehículo (agua destilada) y se les implantará el tumor en la región peritoneal (1X10⁶ células tumorales), de igual manera se continuará la administración del vehículo (agua destilada), hasta la muerte de los ratones.

Resultados

De los diferentes grupos de ratones trabajados, encontramos que los grupos donde se administró la apitoxina previamente a la inoculación del tumor, específicamente en los grupos con vía de administración oral e intramuscular, mostraron diferencia significativa con respecto a su respectivo grupo control, es decir, la vida de los ratones tratados 15 días con apitoxina antes de inocular el tumor, prolongó más la vida que en los ratones que solo tenían tumor y no se les administró apitoxina en ningún momento, también se observó diferencia significativa en todos los grupos pretratados comparados con los grupos postratados. El promedio de vida de los ratones controles pretratados y postratados con el vehículo sin apitoxina, fue de 28 días. El promedio de

vida de los grupos de ratones postratados con la apitoxina, fue de 30 días. El promedio de vida de los ratones de grupo pretratado con apitoxina vía intraperitoneal, fue de 32 días y el promedio de los grupos de ratones postratados con apitoxina vía oral e intramuscular, mostró un periodo de vida promedio de 38 días, siendo estos grupos los de mayor sobrevivencia, mostrando diferencias significativas con respecto a los demás grupos.

Discusión

Se ha reportado la actividad de la apitoxina a través de diversas moléculas que la componen en diversas células tumorales, sin embargo, no se conoce el efecto que la apitoxina pueda tener en el modelo de ratón con linfoma murino L-5178-Y, en este trabajo, se pudo establecer que la apitoxina tiene un efecto significativo en la sobrevivencia de los ratones tratados con apitoxina vía oral e intramuscular pretratándolos 15 días antes de la inoculación del tumor.

Se ha sugerido que los efectos citotóxicos celulares a través de la activación de la fosfolipasa A2 por melitina es un mecanismo crítico para la actividad anti-cancerígena del veneno de abeja. La inducción de muerte celular programada a través de varios mecanismos de muerte celular cancerígena, incluida la activación de la caspasa y las metaloproteinasas de matriz, es importante para los efectos anti-cancerígenos inducidos por la melitina.

Conclusiones

Nuestros resultados indican que la apitoxina prolonga la vida de los ratones con tumor cuando la administración se realiza vía oral e intramuscular y de manera previa a la inoculación del tumor. Estos resultados sugieren, que la apitoxina podría tener efectos positivos en aplicaciones clínicas.

Literatura citada

- Kathryn M. Kash, Mary Kay Dabney. 2001. *Psychological Aspects of Cancer Screening Inhigh-Risk Populations. Medical and Pediatric Oncology. 36:519-524.*
- Pia k. Verkasalo, Jaakko Kaprio, Markku Koskenvuo, Eero Pukkala. 1999. *Genetic Predisposition, Environment and Cancer Incidence. International Journal of Cancer. 83:743-749.*
- Peter Ekman, Henrik Gronberg, Hideyasu Matsuyama, Merja Kivineva, Ulf S. R. Bergerheim, Chunde Li. 1999. *Links Between Genetic and Environmental Factors and Cancer Risk. Genes. Chromosomes and Cancer. 39:262-268.*
- Estadísticas Vitales. 2018. *Principales Causas de Mortalidad General Estados Unidos Mexicanos. Secretaria de Salud (SSA). Fuente; INEGI.*
- Williams SF, Golomb HM. 2000. *Non-Hodgkin's Lymphoma. Semin Oncology. 17:1.*
- Fisher RI, Gaynor ER, Dahlborg S. 1998. *Comparison of a Standard Regimen with Three Intensive Chemotherapy Regimens for Advanced Non-Hodgkin's Lymphoma. N. England Journal Medicine. 328:1002.*
- Pak SC. 2016. *An Introduction to the Toxins Special Issue on "Bee and Wasp Venoms: Biological Characteristics and Therapeutic Application". Toxins (Basel). 28;8(11):1-6.*
- Kong GM, Tao WH, Diao YL, Fang PH, Wang JJ, Bo P, Qian F. 2016. *Melittin induces human gastric cancer cell apoptosis via activation of mitochondrial pathway. World J Gastroenterol. 21;22(11):3186-95.*
- Wu X, Zhao B, Cheng Y, Yang Y, Huang C, Meng X, Wu B, Zhang L, Lv X, Li J. 2015. *Melittin induces PTCH1 expression by down-regulating MeCP2 in human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells. Toxicol Appl Pharmacol. 1;288(1):74-83.*
- Zheng J, Lee HL, Ham YW, Song HS, Song MJ, Hong JT. 2015. *Anti-cancer effect of bee venom on colon cancer cell growth by activation of death receptors and inhibition of nuclear factor kappa B. Oncotarget. 29;6(42):44437-51.*