

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
Ciencias de la Vida
con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología**

**Efecto de las conotoxinas xm1a, xm1b, xm1c y xm1d del cono
de mar *Conasprella ximenes* en cultivo celular de macrófagos
infectados con *Mycobacterium tuberculosis***

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Ana Gabriela Camorlinga Rojas

Ensenada, Baja California, México
2018

Tesis defendida por
Ana Gabriela Camorlinga Rojas

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Director de tesis

Miembros del comité

Dra. Johanna Bernáldez Sarabia

Dr. Marco Antonio De León Nava

Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra

Dr. Carlos Alberto Brizuela Rodríguez



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Ana Gabriela Camorlinga Rojas © 2018

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Ana Gabriela Camorlinga Rojas** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la vida con orientación en Biomedicina y bionanotecnología.

Efecto de las conotoxinas xm1a, xm1b, xm1c y xm1d del cono de mar *Conasprella ximenes* en cultivo celular de macrófagos infectados con *Mycobacterium tuberculosis*

Resumen aprobado por:

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Director de tesis

Mycobacterium tuberculosis (MTB) es un patógeno intracelular que comúnmente se aloja dentro de los macrófagos alveolares, para de esta manera ser capaz de evadir la respuesta del sistema inmunológico y lograr su supervivencia dentro del hospedero. Existen evidencias sobre los mecanismos descritos que utiliza la micobacteria para impedir que, una vez fagocitada, el macrófago pueda degradarla en su interior. En este trabajo se examinó la actividad de cuatro conotoxinas sintéticas basadas en toxinas del cono *Conasprella ximenes*, como compuestos potenciales que participan en la activación del macrófago, para que éste sea capaz de lisis a la bacteria en su interior. Se evaluó el efecto en la transcripción de citocinas de los péptidos en una línea celular de macrófagos de ratón, y se encontró que los péptidos no tuvieron un efecto promotor de las citocinas pro-inflamatorias. Sin embargo, al aplicar los péptidos como tratamiento en las células que previamente fueron infectadas con la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*, se observó una reducción significativa del número de unidades formadoras de colonia (UFC) posterior a la lisis celular. Este efecto en la reducción se observó principalmente a concentración de 5 μ M para los péptidos xm1c y xm1d, y a 0.5 μ M para el péptido xm1d. Al evaluarse los péptidos en una de las cepas multirresistente de *M. tuberculosis* (1820) no se detectó efecto alguno en la reducción de las UFC. Gracias a este trabajo se implementó un modelo de infección *in vitro* de macrófagos, por lo que se podrá continuar con la investigación al respecto y se tiene información del efecto de estas conotoxinas sintéticas en macrófagos infectados.

Palabras clave:

Macrófago, *Mycobacterium tuberculosis*, receptores nicotínicos de acetilcolina, conotoxinas, péptidos.

Abstract of the thesis presented by **Ana Gabriela Camorlinga Rojas** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Biomedicine and bionanotechnology.

Effect of the conotoxins xm1a, xm1b, xm1c and xm1d of the conus *Conasprella ximenes* in cell culture of infected macrophages with *Mycobacterium tuberculosis*.

Abstract approved by:

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Thesis Director

Mycobacterium tuberculosis (MTB) is an intracellular pathogen that commonly lodges inside the alveolar macrophages, in order to evade the response of the immune system and achieve its survival inside the host. There are described mechanisms that the mycobacterium uses to prevent that, once phagocytosed, the macrophage can degrade it inside. In this work we examined the activity of four synthetic conotoxins based on toxins from from *Conasprella ximenes*, as potential compounds that participate in the activation of the macrophage, so that it is able to lyse the bacteria inside it. We evaluate the effect on the transcription of cytokines of the peptides in a mouse macrophage cell line, and it was found that the peptides did not have a promoter effect of the pro-inflammatory cytokines. However, by applying the peptides as a treatment in cells that were previously infected with the H37Rv strain of *Mycobacterium tuberculosis*, a significant reduction in the number of colony forming units (CFU) after cell lysis was observed. This effect on the reduction was observed mainly at the concentration of 5 μ M or the peptides xm1c and xm1d, and at 0.5 μ M for the peptide xm1d. When evaluating the peptides in one of the multidrug-resistant strains of *M. tuberculosis* (1820), no effect was observed in the reduction of CFU. Thanks to this work, an *in vitro* infection model of macrophages was established, so that we can continue with research on this and evaluate the effect of the peptides in other strains of MTB.

Keywords:

Macrophage, *Mycobacterium tuberculosis*, nicotinic acetylcholine receptors, conotoxins, peptides.

Dedicatoria

Al Creador de la vida, quien me sostiene y me da propósito todos los días de mi vida, está conmigo y me ama tal como soy... ¡¡¡Dios eres grande!!!

Con todo el amor, para mis niños de Casa Hogar Nuevo Amanecer, mis babies y princesas ustedes pueden hacer todo en la vida, ¡los amo con todo mi corazón!

Para mis mejores amigos, que me muestran su amor siempre, y a las amistades que hicieron de esta etapa, maravillosa y feliz, en especial a *Carmel Vilanova* y *Julián Cota* por estar en los mejores y peores momentos, y hacer muy feliz cada día de trabajo.

Con amor, dedicada también para mi mejor amigo **Caleb Smith**, tu luz alegra mis días, sé que ¡lo mejor está por venir!

Agradecimientos

Agradezco principalmente al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por la oportunidad, instalaciones y facilidades otorgadas durante la maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por facilitar la beca de manutención durante estos dos años y así permitir la culminación de mis estudios. (No. Becario 23254)

Al Dr. Alexei F. Licea por brindarme dirección durante estos dos años y por siempre estar disponible para la solución de problemas, mi más sincera admiración hacia usted como asesor y como persona.

A la Dra. Johanna Bernáldez por su compañía, dirección y colaboración en todos los ensayos realizados en el laboratorio de bioseguridad de tuberculosis, pero sobre todo por su amistad y ejemplo que valoro como un gran tesoro.

A los miembros de mi comité de tesis: Dr. Marco Ibarra, Dr. Carlos Brizuela y Dr. Marco León por el tiempo invertido, las sugerencias y su disponibilidad en cada avance de tesis.

A todo el personal administrativo de la División, en especial a *Yolanda Álvarez, Adriana Mejía, Gabriela Altamirano, Elizabeth Avilés* y *Lupita Martínez* por ser personas tan dulces y dispuestas a ayudar en el proceso. Ustedes alegran el ambiente de CICESE.

Tabla de contenido

Resumen en español	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas	ix
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	5
1.2 Justificación	6
1.3 Hipótesis.....	6
1.4 Objetivos	7
1.4.1 Objetivo general	7
1.4.2. Objetivos específicos.....	7
Capítulo 2. Metodología.....	8
2.1 Evaluación de la actividad de los péptidos frente a <i>M. tuberculosis</i>	8
2.1.1 Cultivo de inicial de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	8
2.1.2 Obtención de las conotoxinas sintéticas.....	8
2.1.3 Preparación del inóculo.....	9
2.1.4 Ensayo de proliferación.....	9
2.2 Ensayos en línea celular	11
2.2.1 Estandarización de cultivo celular	11
2.2.2 Ensayo de citotoxicidad de las conotoxinas sintéticas.....	11
2.2.3 Transcripción de citocinas en macrófagos de ratón J774A.1	12
2.3 Modelo de Infección de macrófagos con <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	13
2.3.1 Conteo de Unidades Formadoras de colonia (UFC)	14
2.3.2 Cuantificación de citocinas producidas por el macrófago infectado por medio de qPCR	15
Capítulo 3. Resultados.....	16
3.1 Ensayo de proliferación de <i>M. tuberculosis</i> al aplicar los péptidos.....	16

3.1.2 Ensayo de proliferación de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> al aplicar los péptidos a concentraciones de 5 μ M y 0.5 μ M.....	17
3.2 Ensayos en línea celular	18
3.2.1 Estandarización de la línea J774A.1	18
3.2.2 Ensayo de citotoxicidad de las conotoxinas sintéticas.....	18
3.2.3 Evaluación de las conotoxinas sintéticas en macrófagos de ratón J774A.1	20
3.2.4 Análisis comparativo de la eficiencia del estímulo	21
3.3 Evaluación de conotoxinas sintéticas en macrófagos de ratón J774A.1.....	21
3.3.1 Extracción de ARN	21
3.3.2 Análisis de expresión de citocinas por qPCR	23
3.3.3 Efecto de los péptidos en los niveles de transcripción de citocinas.	24
3.4 Modelo de Infección de macrófagos con <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	27
3.4.1 Conteo de Unidades formadoras de colonia para la cepa H37Rv.....	28
3.4.2 Conteo de unidades formadoras de colonia de la cepa multirresistente de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	30
3.4.3 Efecto de los péptidos en los niveles de transcripción de citocinas del macrófago infectado...31	
Capítulo 4. Discusión	32
4.1 Evaluación de la actividad de las conotoxinas sintéticas frente a <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	33
4.2 Evaluación de la actividad de los péptidos en modelo pro-inflamatorio de macrófagos.....	34
4.3 Macrófagos infectados con <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv en tratamiento con conotoxinas sintéticas.	39
4.4 Macrófagos infectados con <i>M. tuberculosis</i> multirresistente en tratamiento con conotoxinas sintéticas.	42
Capítulo 5. Conclusión	43
Literatura citada	44

Tabla de figuras

Figura	Página
1	Diseño de placa de ensayo colorimétrico.....10
2	Porcentaje de crecimiento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> frente a los péptidos xm1a, xm1b, xm1c, xm1d a una concentración de 132 μ M.....16
3	Porcentaje de crecimiento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (H37Rv) frente a los péptidos xm1a, xm1b, xm1c, xm1d a una concentración de 5 μ M y 0.5 μ M.....17
4	Imagen capturada con EVOS® Cell Imaging Microscope de la línea celular J774A.1 cultivada como monocapa adherida en placa.....18
5	Ensayo de citotoxicidad de péptidos en la línea celular J774A.1.....19
6	Gel para la evaluación de la integridad del ARN extraído.....21
7	Gel para la evaluación de la integridad del ARN extraído.....23
8	Gel para la evaluación de la correcta retro-transcripción del ARN.....24
9	Efecto de las conotoxinas sintéticas xm1a, xm1b, xm1c y xm1d a concentración de 33 μ M sobre la transcripción de citocinas pro-inflamatorias e IL-10.....26
10	Microfotografías de macrófagos infectados con MTB.....27
11	Conteo de UFC de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> remanentes después de la infección en células J774A.1.....29
12	Conteo de unidades formadoras de colonia de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> multirresistente remanentes después de la infección en células J774A.130
13	Niveles de expresión de citocinas en Macrófagos infectados con MTB H37Rv.....31
14	Perfil electrofisiológico de xm1a, xm1b, y xm1c.....36
15	Alineamiento de las secuencias de algunas α -conotoxinas40

Lista de tablas

Tabla	-	Página
1.	Descripción de las características generales de los péptidos.	9
2.	Secuencia de los oligonucleótidos utilizados y clave de acceso a base de datos de genes (GenBank database).....	13
3.	Cantidades extraídas de ARN	20
4.	Características de la extracción de ARN y retrotranscripción.....	22
5.	Valores calculados de pendiente y eficiencia de los oligonucleótidos.	23

Capítulo 1. Introducción

En los últimos años se han extraído numerosos compuestos bioactivos de diferentes organismos que habitan el ecosistema marino, como tunicados, corales, esponjas, y caracoles de mar, entre otros (Donia y Hamann, 2003). Los organismos marinos se han adaptado a ambientes hostiles y en ocasiones muy variables en cuanto a pH, temperatura y presión (entre otros factores). Por esta razón estos organismos difieren en características fisiológicas y potencial de adaptación, siendo capaces de producir compuestos bioactivos con alta diversidad química, estructural y especificidad bioquímica. Estas características los han convertido en un punto de referencia para la identificación de nuevos fármacos (Martins et al., 2014). Bajo esta premisa, se han caracterizado ampliamente venenos de diversos organismos, con el fin de obtener moléculas que ajustadas a dosis específicas, ejerzan un efecto benéfico en el ser humano.

Los conos marinos que pertenecen a la superfamilia *Conoidea*, conforman un grupo de organismos depredadores muy versátiles que varían ampliamente en la morfología, diseño y características de su concha, así como en la rádula. Durante más de dos siglos, todos los conos se encontraron clasificados dentro de la familia *Conidae* (J. Fleming, 1822), sin embargo, en los últimos años se ha propuesto una nueva clasificación basada en análisis filogenético molecular, la cual los ha dividido en cuatro géneros: *Conus*, *Conasprella*, *Profundiconus* y *Californiconus* (Puillandre et al., 2015).

Conasprella ximenes es una de las especies pertenecientes a esta superfamilia, un molusco gasterópodo, que se distribuye principalmente en el Golfo de California, en la costa oeste de México, hasta Perú y en los alrededores de las islas Galápagos. Como la mayoría de las especies en el género *Conasprella*, este cono desarrolló una técnica de cacería rápida, para inmovilizar a su presa en cuestión de segundos, introduciendo a su objetivo un arpón lleno de veneno, que está compuesto de una variedad de péptidos (Tucker y Tenorio, 2009). El estudio de los péptidos contenidos en el veneno, ha llevado a la obtención de nuevos conocimientos sobre las interacciones ligando-receptor y principalmente ha abierto un campo en la investigación de nuevos compuestos farmacológicos con afinidad a canales iónicos, receptores y otras dianas farmacológicas (Bingham et al., 2010).

El veneno de conos marinos está compuesto de una gran variedad de moléculas bioactivas de origen peptídico, denominadas conotoxinas. Las conotoxinas son moléculas de origen proteico ampliamente estudiadas por sus características bioquímicas, las cuales incluyen alta especificidad y selectividad en dianas farmacológicas, además de poseer estabilidad termodinámica y diferentes arreglos

moleculares basados en las uniones que se pueden formar entre los aminoácidos de la molécula (Parashar et al., 2014).

Las toxinas de caracol pueden incluir una cantidad abundante de aminoácidos cisteína, los cuales forman enlaces disulfuro dentro de la molécula, dando lugar a las diferentes estructuras (Rafia et al. 2016). Las toxinas presentes en el veneno de los caracoles marinos, se clasifican de acuerdo a diferentes características; en base a la similitud en la secuencia de aminoácidos del péptido señal (una secuencia altamente conservada entre las conotoxinas), las conotoxinas se agrupan dentro de Superfamilias. Aproximadamente 28 superfamilias se han descrito hasta la fecha (Kaas et al., 2010; Mir et al., 2016).

Otra clasificación son las familias estructurales, una de las características particulares de las conotoxinas es que contienen abundantes aminoácidos cisteína, estos aminoácidos se localizan en las conotoxinas en diferente posición. Al orden en el cual se encuentran formando la secuencia de aminoácidos, se les ha identificado como “patrones de cisteína”, donde los aminoácidos cisteína están alternados con otros aminoácidos en una conotoxina (Kaas Q. et al. 2010). Las conotoxinas que tienen patrones similares se clasifican dentro de la misma familia estructural, y estas pueden formar diferentes arreglos debido a las diferencias en la conectividad de los enlaces disulfuro (Mir et al., 2016).

Finalmente, las conotoxinas también se han clasificado de acuerdo a su diana molecular y su actividad fisiológica, conocidas como Familias farmacológicas; se han descrito diferentes dianas farmacológicas de las conotoxinas y por lo tanto diferentes dianas moleculares, pueden ser canales iónicos y diversos receptores celulares (McIntosh et al., 1999; Terlau y Olivera, 2004; Lewis y Garcia, 2003). La primera familia farmacológica descrita y caracterizada, fue la familia de las α -conotoxinas, que tienen como diana farmacológica los receptores nicotínicos de acetilcolina (Gray, et al., 1981), y presentan un arreglo estructural de tipo “doble-giro” derivado de los dos enlaces disulfuro que éstas presentan. Las α -conotoxinas pueden tener diferente selectividad entre los receptores nicotínicos de acetilcolina, debida principalmente a la variación en la composición de aminoácidos que separan las cisteínas.

En los últimos años, se ha reportado que algunas toxinas del veneno de *Conasprella ximenes* pueden tener efecto de inhibición en el crecimiento de la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (Bernáldez 2013; Cervantes, 2013), esto resulta particularmente importante, debido a que el tratamiento para pacientes que adquieren esta enfermedad, actualmente suele ser poco efectivo. La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, se aloja principalmente en los pulmones (aunque puede colonizar otras partes del cuerpo), y en el estado activo de la enfermedad

ocasiona síntomas como tos crónica con expectoración sanguinolenta, fiebre, sudores nocturnos y pérdida de peso entre otros. El bacilo que causa esta enfermedad se describió explícitamente por primera vez en el año de 1882 por Robert Koch, el primer tratamiento descubierto con capacidad de inhibir el crecimiento de este bacilo, se reportó hasta 61 años después, cuando el científico americano Selman Waksman y colaboradores (premio nobel en Fisiología y medicina 1952), descubrieron un compuesto proveniente del hongo *Streptomyces griseus*, al cual llamaron Estreptomina y con el que se trató por primera vez a un paciente con tuberculosis. Posterior a estos descubrimientos, se desarrollaron nuevos fármacos como la Isoniazida, Rifampicina y Etambutol, sin embargo, la micobacteria ha desarrollado mecanismos de resistencia a estos medicamentos, lo que ha contribuido a que el tratamiento sea ineficaz.

A pesar de que han pasado más de 130 años de que se describió por primera vez la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) en pacientes que tenían esta enfermedad, el tratamiento actual contra esta enfermedad es poco eficiente. *Mycobacterium tuberculosis* es un microorganismo aerobio obligado, por esta razón en una infección clásica por tuberculosis, la bacteria se localiza principalmente en los pulmones donde la oxigenación es alta. MTB ha desarrollado mecanismos de resistencia a los fármacos del tratamiento de primera y segunda línea de la enfermedad, algunos de estos mecanismos de resistencia han sido descritos, sin embargo la mayoría permanece sin ser dilucidado. Una de las principales formas de evasión inmunológica de la micobacteria, es que en su ciclo de vida, se aloja de manera intracelular en los macrófagos alveolares, y de este modo logra también evadir la acción de diversos fármacos (Todar's textbook of bacteriology, 2012).

La tuberculosis es una de las 10 principales causas de mortalidad en el mundo, los datos que se tienen del año 2015, estiman que 10.4 millones de personas enfermaron de tuberculosis durante ese año y 1.8 millones murieron por esta enfermedad (entre ellos 0.4 millones de personas con VIH). Se calcula que de este número de individuos enfermos, 480,000 personas a nivel mundial desarrollaron tuberculosis multirresistente (TB-MR), esta clase de cepas no sucumben ante el tratamiento actualmente disponible de fármacos antifímicos y por lo tanto, representa mayor riesgo para los pacientes infectados con ellas (OMS, 2017). Otras de las cepas existentes de *Mycobacterium tuberculosis* han desarrollado también mecanismos de multirresistencia, conocidas como *Mycobacterium tuberculosis* extremadamente farmacorresistente (TB-XR) (Kumar y Patel, 2017).

Tratamiento para *Mycobacterium tuberculosis*

Más de 65 años de investigación en el área, han concluido que para el tratamiento de esta enfermedad es necesario la administración simultánea de dos o más fármacos al paciente, durante un periodo de 6 meses o superior (Fox et al., 1999; Mitchison y Davies, 2012), por lo que el apego al tratamiento de parte de los pacientes no suele ser el correcto, sumado a que este tratamiento involucra diferentes efectos adversos, que son perjudiciales para el paciente. El tratamiento para *Mycobacterium tuberculosis* que no se sabe, o no se sospecha que sea farmacoresistente, generalmente consiste en un régimen que consta de una fase intensiva de dos meses de administración de Isoniazida (INH), Rifampicina (RIF), Piracinamida (PZA) y etambutol (ETB), seguido de una fase de continuación de 4 meses de INH y RIF, el régimen puede ser modificado si se han hecho pruebas de susceptibilidad a antibióticos (Guía clínica de la IDSA USA, 2016). De acuerdo con un reporte de la OMS en 2016 aproximadamente 123 países han reportado casos confirmados de TB-XR (OMS, 2016) e incluso en algunos países se ha reportado casos que sugieren que *M. tuberculosis* ha desarrollado resistencia a todos o casi todos los fármacos de primera línea y segunda línea del tratamiento antifímico, cepas denominadas como “*tuberculosis* totalmente drogoresistente” (TDR TB) (Kumar y Patel, 2017).

Debido a esto, es de gran relevancia continuar con investigaciones dirigidas a la búsqueda de nuevos fármacos antifímicos, y enfocarse en la exploración de nuevas estructuras o nuevos mecanismos de acción, a los cuales la bacteria no se ha mostrado resistencia.

Receptores nicotínicos de acetilcolina

Los macrófagos alveolares tienen en su superficie receptores que los ayudan a responder a su entorno fisiológico y químico, uno de los receptores que recientemente se ha estudiado son los receptores nicotínicos de acetilcolina. Particularmente en los macrófagos se expresa el receptor nicotínico de acetilcolina tipo α -7, este receptor se ha descrito que está relacionado con la modulación en la producción de citocinas pro-inflamatorias en respuesta a la unión con el neurotransmisor acetilcolina. El efecto que tiene la acetilcolina en la modulación de la respuesta inmune es una inhibición en la producción de citocinas pro-inflamatorias (WJ de Jonge y Ulloa, 2009).

Como se mencionó anteriormente, los péptidos que se utilizaron para este trabajo tienen como diana los receptores nicotínicos de acetilcolina, por lo que será de importancia evaluar la expresión de citocinas

en el macrófago cuando ha sido expuesto al péptido, evaluando así el efecto en transcripción de citocinas que tienen los péptidos sobre las células.

1.1 Antecedentes

En el año 2013 Bernáldez aisló y caracterizó por primera vez el veneno de *Conasprella ximenes*, el veneno extraído fue purificado por medio de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC-RP). Para objeto de este trabajo, se utilizarán las secuencias obtenidas de conotoxinas aisladas del veneno de *Conasprella ximenes* por ser las que mostraron ser moléculas con potencial antifímico, y poseer un tamaño pequeño, por lo que es factible sintetizar químicamente estos péptidos.

En este trabajo se continuará con el análisis de uno de los péptidos aislados del veneno, denominado como xm1a, es un péptido con masa molecular de 1519.6 Da y se encontró que posee una estructura primaria de 14 aminoácidos, que sólo presenta un tipo de modificación post-traducciona, correspondientes a enlaces disulfuro entre los 4 aminoácidos cisteína que contiene. En este trabajo se propuso que esta conotoxina tiene capacidad de unirse a los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR), basándose en la comparación de su estructura primaria con otras α -conotoxinas. La conotoxina presenta relación con el patrón de las conotoxinas clasificadas en el grupo α , mostrando un patrón globular de enlaces disulfuro entre las cisteínas 1 y 3 / cisteína 2 y 4 dentro del patrón #1 (CC-C-C) llamado también 4/3 (Bernáldez, 2013). Posteriormente, la unión al receptor nAChR ha sido confirmada mediante otros experimentos que se mencionan en este trabajo.

Se han realizado estudios donde se ensayó la capacidad de la conotoxina xm1b (versión amidada de la conotoxina xm1a) para inhibir el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* en un modelo *in vivo* de ratón, en la cual se llegó al resultado de que la conotoxina xm1b logra tener un efecto en la inhibición del crecimiento de la micobacteria en el tejido de los ratones infectados (Bernáldez, 2013).

Como se mencionó anteriormente, la versión amidada de la conotoxina xm1a se denominó xm1b, ambas toxinas se ensayaron en cultivo celular de macrófagos para dilucidar su papel en la estimulación inmunológica, y se obtuvo que ambas toxinas lograron revertir el efecto de la nicotina, aparentemente al unirse a los nAChR e incrementaron la transcripción de citocinas generadas por la activación con lipopolisacárido (LPS), particularmente para la citocina TNF- α , siendo la forma amidada la que mostró

mayor efecto (Cervantes, 2013). En este trabajo el objetivo principal es determinar el efecto de las conotoxinas sintéticas xm1a, xm1b, xm1c y xm1d de *Conasprella ximenes*, en la sobrevivencia y activación de macrófagos infectados con *Mycobacterium tuberculosis*, las cuales al no encontrarse directamente en contacto con la micobacteria, si no, con el macrófago, se propone que ésta puede actuar con un mecanismo de acción distinto a los comúnmente descritos.

1.2 Justificación

La tuberculosis continúa siendo una enfermedad de prevalencia mundial considerada como epidemia, una de las razones por las cuales aún no ha sido erradicada, es debido a que la bacteria presenta diversos mecanismos de resistencia y evasión del sistema inmune. Lo anterior aunado a que desde hace poco más de 25 años, el arsenal de antibióticos disponibles no ha crecido, y a la fecha se utilizan los mismos medicamentos que se descubrieron en los años anteriores a la década de los 90's. Por lo tanto, es necesario continuar en la búsqueda de nuevos fármacos que logren inhibir a la bacteria, y aún de mayor relevancia, es encontrar moléculas que no actúen bajo los mecanismos conocidos de los fármacos antifímicos, dado que la mayoría ya presenta por lo menos un mecanismo de resistencia en cepas multi o poliresistentes. En este trabajo se analizará la acción de las conotoxinas sintéticas xm1a, xm1b, xm1c, xm1d como una alternativa de inhibición frente a la micobacteria, y se estudiará el efecto sobre macrófagos infectados.

1.3 Hipótesis

Los péptidos sintetizados a partir de secuencias de conotoxinas del cono *C. ximenes* nombradas como xm1a, xm1b, xm1c, xm1d, estimulan la actividad del macrófago infectado permitiendo la lisis de la micobacteria en su interior.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Determinar el efecto de las conotoxinas sintéticas xm1a, xm1b, xm1c y xm1d en la actividad citolítica y activación inmunológica de macrófagos infectados con *Mycobacterium tuberculosis*.

1.4.2. Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de las conotoxinas sintéticas xm1a, xm1b, xm1c y xm1d sobre la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*.
2. Implementar las condiciones óptimas del ensayo de infección de macrófagos con *Mycobacterium tuberculosis*.
3. Determinar la capacidad de las conotoxinas sintéticas xm1a, xm1b, xm1c y xm1d para inhibir el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* dentro del macrófago infectado.
4. Determinar el efecto de los péptidos xm1a, xm1b, xm1c y xm1d en la activación inmunológica de macrófagos infectados por *Mycobacterium tuberculosis*.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Evaluación de la actividad de las conotoxinas sintéticas frente a *M. tuberculosis*

2.1.1 Cultivo de inicial de *Mycobacterium tuberculosis*

En este trabajo se utilizó la cepa *Mycobacterium tuberculosis subsp. tuberculosis* H37Rv (ATCC® 27294™) recomendada para pruebas de susceptibilidad. Del vial obtenido se continuó cultivando la bacteria indefinidamente en medio Löwenstein-Jensen preparado en vertido diagonal en tubo, y mantenido en incubación a 37°C y CO₂ al 5% dentro del laboratorio de Bioseguridad nivel III. Una vez que se observó el crecimiento de la micobacteria, se realizaron raspados de las colonias para preparar inóculos específicos para cada experimento. El medio de crecimiento Löwenstein-Jensen para la micobacteria se preparó en el laboratorio a partir de medio base y clara de huevo, los otros medios de cultivo que se utilizaron para el crecimiento, fueron Middlebrook 7H9 que es un medio de crecimiento líquido, y Middlebrook 7H10 agar, que se utilizó como medio sólido para el conteo posterior de unidades formadoras de colonia (UFC).

2.1.2 Obtención de las conotoxinas sintéticas

La conotoxina aislada de *Conasprella ximenes* previamente descrita por Bernáldez en el 2013, que presentó actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), se obtuvo por síntesis química y además se solicitaron otros péptidos con la misma secuencia, pero diferentes modificaciones postraduccionales que se presentan en la Tabla 1. Los péptidos se obtuvieron mediante síntesis con tecnología FlexPeptide™, realizada por el laboratorio Pepmic®. Se nos entregó un total de 5 mg de cada péptido y se diluyó en 1 ml de agua destilada, para dividir en 5 alícuotas de 1 mg de péptido cada una. Posteriormente se prepararon alícuotas cuya concentración final fue de 1 µg/µl. Las características de los péptidos se describen en la Tabla 1.

Tabla 1 Descripción de las características generales de los péptidos.

Péptido sintético	xm1a	xm1b	xm1c	xm1d
Secuencia	DGCCRDPRCAINCV		a: DGCCR b: DPRCAINCV	
Longitud	14 aa	14 aa	A: 5 aa B: 9 aa	A: 5 aa B: 9 aa
Conectividad	1-3, 2-4	1-3, 2-4	aC1 – bC1 aC2 – bC2	aC1 – bC1 aC2 – bC2
Otras modificaciones postraduccionales	No	Amidación COOH-terminal	No	Amidación COOH-terminal
Familia	α -conotoxinas		No clasificado	

2.1.3 Preparación del inóculo

El cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* se mantuvo en medio sólido hasta su utilización, y se utilizaron exclusivamente cultivos jóvenes de aproximadamente 1 a 2 meses de crecimiento. Para el ensayo se tomó un raspado del cultivo sólido con un asa de 1 μ l, y se transfirió a un tubo con perlas vidrio de borosilicato de 3 mm conteniendo 1 ml de agua destilada estéril. La solución se homogenizó para disgregar la colonia por medio de vortex y el sobrenadante se transfirió a un tubo de cristal donde se comparó la turbidez con la escala de McFarland. Para el ensayo se utilizó una turbidez equiparable con el tubo 1 de la escala de McFarland que corresponde a 3×10^8 células/ml, seguido de una dilución 1:20 del inóculo, resultando en una suspensión bacilar de 1.5×10^7 células/ml aproximadamente.

2.1.4 Ensayo de proliferación

En este bioensayo se evaluó la capacidad de las conotoxinas sintéticas de inhibir la proliferación de *Mycobacterium tuberculosis*, mediante la utilización de un reactivo indicador de crecimiento/viabilidad celular. Para este experimento se utilizó el compuesto MTS tetrazolio (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio) que en presencia de células metabólicamente activas es transformado a un producto colorido de formazán soluble en el medio de cultivo, esta reacción de conversión es llevada a cabo por las enzimas deshidrogenasa dependientes de NAD(P)H en células metabólicamente activas. Para este protocolo, en una placa de 96 pocillos, se colocaron 200 μ l de agua destilada estéril en todos los

pocillos de la periferia (esto para disminuir la vaporización de las muestras), posteriormente se añadió el medio Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC al 10% (ácido oleico, albumina, dextrosa y catalasa) a los pocillos siguientes; 200 µl pocillo control de esterilidad (CE), 100 µl control de crecimiento (CC), 100 µl control del día 7 (C7) y 50 µl controles positivos. Para los controles positivos se utilizaron en concentración final los fármacos; Isoniazida [1 µg/ml], Etambutol [12 µg/ml] y Rifampicina [1.5 µg], la concentración de los péptidos en el pocillo de ensayo fue de 132 µM en el primer ensayo y de 5 µM y 0.5 µM en ensayos posteriores. Finalmente se añadieron 100 µl de suspensión bacteriana de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) a una concentración aproximada de 1.5×10^7 células/ml en cada pocillo de ensayo del péptido y en los pocillos CC, C7 y controles positivos. Los experimentos se realizaron por triplicado y las placas fueron incubadas a 37° C y CO₂ al 5% por 7 días. Al final del periodo de incubación se reveló el pocillo C7 para verificar que el crecimiento fue óptimo, añadiendo 20 µl del reactivo MTS, y se colocó la placa de nuevo en incubación por 2 horas. Transcurrido el tiempo, y de observarse el total viraje de MTS, se procedió a revelar los pocillos faltantes del experimento con el reactivo MTS, se incubó durante 2 horas y se midió absorbancia a longitud de onda de 490 nm. Cuando no se presentó buen crecimiento celular al revelar el pocillo C7, fue necesario incubar la placa durante uno o dos días más, para permitir el crecimiento de la bacteria.

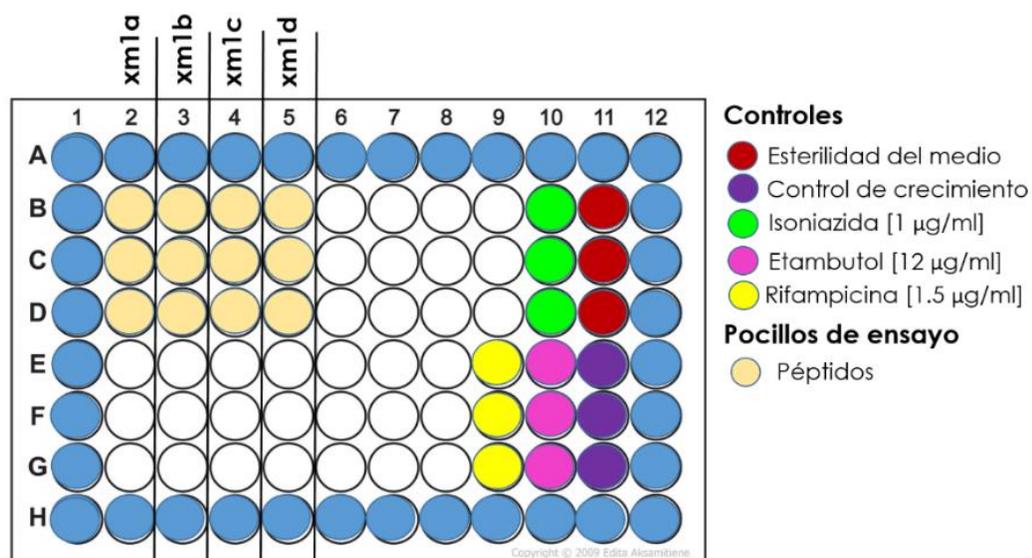


Figura 1. Diseño de placa de ensayo colorimétrico. Se ejemplifica la evaluación de la actividad de cuatro conotoxinas sintéticas por triplicado para determinar la capacidad antimicobacteriana. Las concentraciones utilizadas se describen en la parte derecha de la figura en código de colores. Las concentraciones del péptido variaron en los diferentes ensayos. El color azul indica el agua de la periferia.

2.2 Ensayos en línea celular

2.2.1 Estandarización de cultivo celular

En este proyecto se trabajó con la línea celular J774A.1 (ATCC® TIB67™) de macrófagos de ratón, las células se mantuvieron en medio de cultivo completo RPMI 1640 1X con L-glutamina y HEPES [25 mM] suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y antibiótico/antimicótico al 1% (10,000 UI penicilina, 10 mg estreptomina y 25 µg anfotericina B por ml), el protocolo para descongelar y cultivar las células se siguió conforme a las direcciones del proveedor en la hoja de seguridad del producto. El vial se descongeló con una agitación suave en baño de agua a 37°C durante 2 minutos aproximadamente, después se descontaminó con un rociado de etanol al 70% y el contenido del vial se transfirió a un tubo con 9 ml de medio de cultivo RPMI 1640 (SFB 10%, antibiótico/antimicótico al 1%), para posteriormente centrifugarse a 800 rpm por cinco minutos. El sobrenadante fue descartado, quedando al fondo el sedimento de células, el cual fue resuspendido cuidadosamente en 1 ml de medio completo, y dispensado en placas de cultivo que contenían previamente 7 ml de medio completo. Las células se mantuvieron a 37°C y en CO₂ al 5% durante los tiempos de cultivo y experimento.

2.2.2 Ensayo de citotoxicidad de las conotoxinas sintéticas

Se evaluó la posible citotoxicidad que pueden presentar los péptidos frente a los macrófagos murinos en las concentraciones que se utilizarán en los siguientes experimentos. Para esto, se sembraron un total de 1×10^4 células por pocillo en placas de 96 pozos en un volumen de 200 µl y se permitió la adherencia durante 24 horas de incubación a 37°C y CO₂ al 5%. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se agregó medio nuevo de cultivo completo con las concentraciones de los péptidos a ensayar, las cuales fueron 33 µM, 6.6 µM, 1.3 µM, 0.25 µM, 0.05 µM y 0.01 µM el volumen final del pocillo fue de 200 µl. Los péptidos se incubaron en contacto con las células por 24 horas. Posteriormente, se determinó la viabilidad celular mediante ensayo colorimétrico de MTS, como se ha descrito anteriormente. La densidad óptica fue leída a 490 nm en espectrofotómetro y la viabilidad celular se expresó como porcentaje de células vivas, comparada con el control de crecimiento sin tratamiento.

2.2.3 Transcripción de citocinas en macrófagos de ratón J774A.1

Para evaluar el efecto de las conotoxinas sintéticas en la respuesta inflamatoria generada por la exposición a lipopolisacárido (LPS), se sembró un total de 7.5×10^5 células por pocillo en placas de 24 pocillos en un volumen de 1 ml, y se incubó durante 24 horas a 37°C y CO₂ al 5% para adherencia. Terminado el tiempo de incubación se retiró el medio completo, se lavó con 1ml de PBS 1x estéril, se agregó medio de crecimiento RPMI no suplementado con SFB (RPMI-S) y se incubó por 8 horas en las mismas condiciones. Al finalizar este tiempo, se retiró el medio RPMI-S y se añadió medio completo suplementado con LPS [1 µg/ml], cinco minutos previos a la adición de los péptidos. Posteriormente se añadió el volumen necesario de los péptidos xm1a, xm1b, xm1c, xm1d al medio con LPS para lograr la concentración final de 33 µM dentro del pocillo. Las células tratadas se incubaron por 12 horas manteniendo la concentración mencionada de LPS y de los péptidos en el medio durante este periodo de tiempo, el cultivo se mantuvo a 37°C y en atmósfera de CO₂ al 5%. Terminado el tiempo de exposición, se retiró el medio de cultivo y se procedió a la lisis celular con TRI Reagent®. Las muestras se procesaron inmediatamente, de lo contrario el homogenizado se almacenó en un tubo de 1.5 ml estéril a -80°C hasta su procesamiento.

2.2.3.1 Extracción de ARN total y retrotranscripción.

La extracción de ARN total se realizó de acuerdo a las especificaciones descritas por el fabricante (TRI Reagent®). El precipitado de ARN se resuspendió en H₂O con DEPC al 0.1%, se cuantificó por medio de NanoDrop Lite® Spectrophotometer (Thermo Scientific) y se retrotranscribió con el uso del kit SuperScript III™ Reverse Transcriptase para la obtención de ADNc. Este homogenizado se almacenó en un tubo de 1.5 ml estéril a -80°C hasta su procesamiento.

2.2.3.2 PCR en tiempo real (qPCR)

Este ensayo se llevó a cabo para medir la expresión de los genes principalmente característicos de la respuesta pro-inflamatoria, los genes evaluados fueron: óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), las interleucinas IL-1 β e IL-12 y se evaluó también IL-10 como citocina anti-inflamatoria en los diferentes tratamientos. Para la evaluación se utilizó como gen endógeno el gen de la

subunidad ribosomal 18S. El ARN total extraído fue retrotranscrito a ADNc utilizando oligonucleótidos dT₂₀ (Superscript III Invitrogen®) como se describió anteriormente. Las condiciones de reacción fueron: 95°C x 10 min (inicio), 40 ciclos de 95°C x 1 min, seguido de 60°C x 30 seg. y 72°C x 1 min., empleando 5µl de Sybr green mastermix (Applied Biosystems), la concentración de los oligonucleótidos fue de 200 nM y una cantidad de 20 ng de ADNc por reacción ajustado a la concentración del análisis.

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados y clave de acceso a base de datos de genes (GenBank database)

GEN	SECUENCIA DE OLIGONUCLEÓTIDOS	GenBank
18S	F: GTAACCCGTTGAACCCATT R: CCATCCAATCGGTAGTAGCG	NR_003278
INOS	F: CAGCTCCACAAGCTGGCTCG R: CAGGATGTCCTGAACGTAGACCTTG	NM_010927
TNF-α	F: TCTCATGCACCACCATCAAGGACT R: ACCACTCTCCCTTTCAGAACTCA	M 13049.1
IL-1β	F: ATGGCAACTGTTCTGAACTCAACT R: CAGGACAGGTATAGATTCTTTCCTTT	NM_008361
IL-12p40	F: CAGAAGCTAACCATCTCCTGGTTTG R: CCGGAGTAATTTGGTGCTCCACAC	NM_00352
IL-10	F: ATGCAGGACTTTAAGGGTACTTGGGTT R: ATTCGGAGAGAGGTACAAACGAGGTTT	NM_010548.2
UBQ	F: CCCAGTGTTACCACCAAGAAG R: CCCCATCACACCAAGAACA	NM_019639.4

2.3 Modelo de Infección de macrófagos con *Mycobacterium tuberculosis*

Para evaluar la influencia que tienen los péptidos de *C. ximenes* en la activación citolítica e inmunológica de los macrófagos, se llevó a cabo un experimento donde los macrófagos son infectados con *Mycobacterium tuberculosis* (cepas H37Rv y multirresistente), para posteriormente ser tratados con los péptidos a evaluar. En este experimento se utilizaron macrófagos de ratón, línea celular J774A.1 (ATCC® TIB67™), el manejo del cultivo se realizó de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Se sembró un total de 4.5x10⁵ macrófagos en placas de 24 pocillos en un volumen de 500 µl, los macrófagos fueron incubados toda la noche a 37°C y en atmósfera de CO₂ al 5% la noche previa a la infección, para lograr su adherencia. Por otra parte, 12 días previos a la infección se preparó un cultivo líquido de la cepa de MTB H37Rv con el objetivo de lograr el crecimiento en fase pre-logarítmica un día antes de la infección. Al cabo de los 12 días

el cultivo líquido se traspasó a un tubo cónico de 15 ml de plástico, y se centrifugó a $3000 \times g$ por 10 minutos, el sobrenadante fue descartado, y se lavó una vez con PBS (pH 7.4). El precipitado celular resultante se resuspendió en medio para cultivo celular RPMI-SFB 10% sin antibiótico y se manejó hasta lograr una densidad óptica de 0.1 a 600 nm leída en el espectrofotómetro, correspondiente a 1×10^7 UFC/ml (Bettencourt et al., 2017). Para la preparación del inóculo es muy importante que la solución quede lo más homogénea y unicelular posible, por lo que el inóculo se agitó vigorosamente en vortex para disgregar las colonias y posteriormente esta solución bacteriana se pasó por un filtro de 5 μm de diámetro, con la finalidad de asegurar que la solución filtrada sea mayormente unicelular. Una vez obtenida la densidad antes especificada, se añadió el inóculo resuspendido en medio de cultivo celular a los pocillos con la monocapa de macrófagos en un volumen de 450 μl , obtenido por medio de cálculos respecto al número de células. Los macrófagos se infectaron a una multiplicidad de infección de 10:1 (MOI 10), durante 3h a 37°C y CO₂ al 5%. Al final de este tiempo de infección, se lavó vigorosamente la monocapa celular con PBS 1x, y esto se llevó a cabo en tres ocasiones para retirar las bacterias no internalizadas. Después de esto, se añadió medio de cultivo RPMI (SFB al 10%, no antibiótico) que contenía los péptidos a ensayar a una concentración de 5 μM para el primer ensayo y 0.5 μM para el segundo ensayo en un volumen final de 500 μl . Cada experimento constó de dos placas de 24 pocillos que se lisaron al primer y tercer día después de la infección. Las placas se incubaron por un máximo de tres días a 37°C y CO₂ al 5%, el medio de cultivo se renovó cada día conteniendo el compuesto de ensayo, manteniendo el volumen de 500 μl . Se utilizaron como controles las células infectadas sin tratamiento, y células en tratamiento con isoniazida [1 $\mu\text{g}/\text{ml}$]. Para la cepa de tuberculosis multirresistente se añadió etambutol [12 $\mu\text{g}/\text{ml}$] como control, con el fin de corroborar la sensibilidad al fármaco.

2.3.1 Conteo de Unidades Formadoras de colonia (UFC)

Al final de la incubación de cada placa las células se lisaron con IGEPAL CA-630® al 1% (Sigma-Aldrich), y con los lisados se prepararon diluciones seriadas para posteriormente sembrar en placas Middlebrook 7H10 suplementado con OADC. Las placas se incubaron durante 18 a 21 días dependiendo del crecimiento, a 37°C y CO₂ al 5% para finalmente realizar el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC).

2.3.2 Cuantificación de citocinas producidas por el macrófago infectado por medio de qPCR

Este ensayo se realizó para medir la expresión de los genes óxido nítrico sintasa (iNOS), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), y de las interleucinas IL-1 β , IL-12 e IL-10 en los diferentes tratamientos, utilizando como gen endógeno el gen de Ubiquitina (UBQ). El método para cuantificación se describió en párrafos anteriores. La concentración utilizada de los péptidos fue 5 μ M y como control isoniazida [1 μ g/ml]

Capítulo 3. Resultados

En este trabajo, el objetivo principal fue determinar la acción que los péptidos ensayados tienen sobre los macrófagos una vez que estos han sido infectados con *Mycobacterium tuberculosis*, sin embargo, es importante determinar el efecto que los péptidos *per se*, tienen sobre la cepa de MTB, por lo que el primer ensayo que se realizó fue para dilucidar el efecto de los péptidos sobre la cepa.

3.1 Ensayo de proliferación de *M. tuberculosis* al aplicar los péptidos

Para corroborar lo anteriormente reportado acerca de la actividad antifúngica de los péptidos xm1a, xm1b y ahora de sus otras variantes, se realizó un ensayo de proliferación celular de MTB en exposición a los péptidos mencionados. En este experimento se evaluaron dos concentraciones de los péptidos: 66 μM (datos no mostrados) y 132 μM (Figura 2). Para ambas concentraciones, los péptidos no mostraron inhibir el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*, de acuerdo al ensayo colorimétrico de MTS.

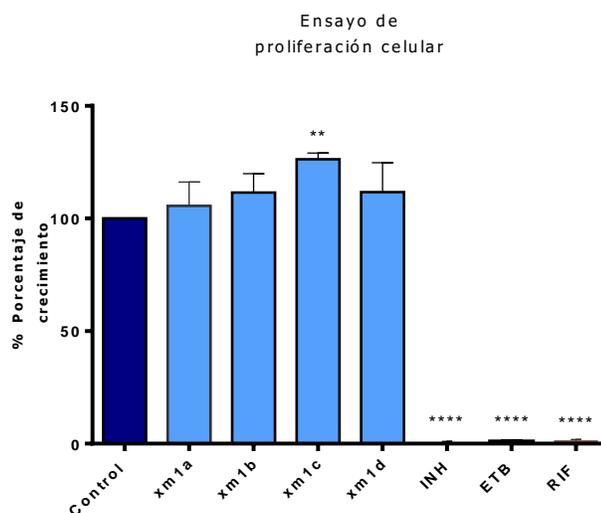


Figura 2. Porcentaje de crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* frente a los péptidos xm1a, xm1b, xm1c, xm1d a una concentración de 132 μM . Una cantidad aproximada de 1.5×10^7 células bacterianas fueron expuestas a los péptidos durante 7 días de incubación. El porcentaje de crecimiento se obtuvo con la utilización del reactivo MTS. Los resultados se expresan como la media \pm SD del porcentaje de crecimiento en cada tratamiento. $n=3$ ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ (análisis ANOVA).

3.1.2 Ensayo de proliferación de *Mycobacterium tuberculosis* al aplicar los péptidos a concentraciones de 5 μ M y 0.5 μ M

En la primera etapa de evaluación, los péptidos fueron analizados a concentración de 66 μ M y 132 μ M, dado que estas fueron las concentraciones utilizadas en investigaciones anteriores cuando se trabajó el péptido nativo. Sin embargo, en este trabajo se está utilizando el péptido sintético, es probable que las conotoxinas puedan tener efecto a concentraciones más bajas que las que anteriormente mostraron tener actividad. Por ello, en este experimento se evaluaron dos concentraciones diferentes de los péptidos, las cuales fueron 5 μ M y 0.5 μ M, para mantener un rango de dilución 1:10 en las concentraciones. Al revelar con el reactivo MTS, cuyo viraje representa proporcionalmente la proliferación celular, en este experimento no se observó disminución en la cantidad de micobacterias al ser expuestas a los diferentes péptidos durante 11 días, por el contrario, el control de crecimiento mostró tener menor crecimiento de micobacteria en comparación con los pocillos tratados con las conotoxinas sintéticas. En todos los casos, la proporción de micobacterias fue mayor cuando fueron tratadas con los péptidos a concentración de 5 μ M, y solamente se observó este efecto a 0.5 μ M con los péptidos xm1c y xm1d.

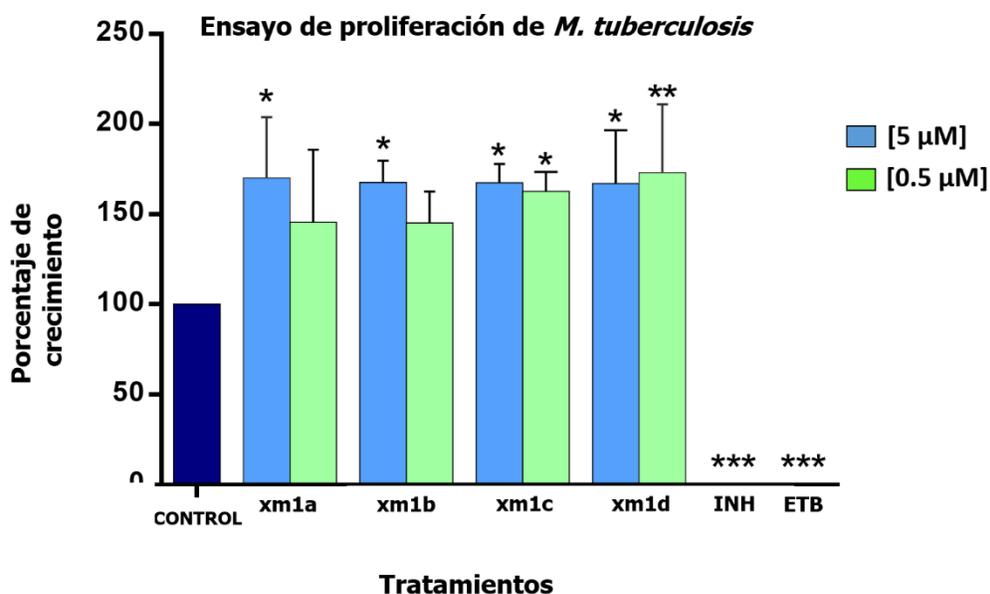


Figura 3. Porcentaje de crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) frente a los péptidos xm1a, xm1b, xm1c, xm1d a una concentración de 5 μ M y 0.5 μ M. Los resultados se expresan como la media \pm SD del porcentaje de crecimiento en cada tratamiento. n=3 *p<0.05. **p<0.01 y ***p<0.001 (análisis ANOVA).

3.2 Ensayos en línea celular

3.2.1 Estandarización de la línea J774A.1

Las células de la línea J77A.1 de macrófagos de ratón, se mantuvieron en cultivo durante la duración de este proyecto a 37°C y CO₂ al 5%, con cambio de medio completo RPMI 1640 cada tercer día y subsecuentes expansiones. Las células alcanzaban confluencia de 80%, aproximadamente cada 5 días después de una expansión 1:3.

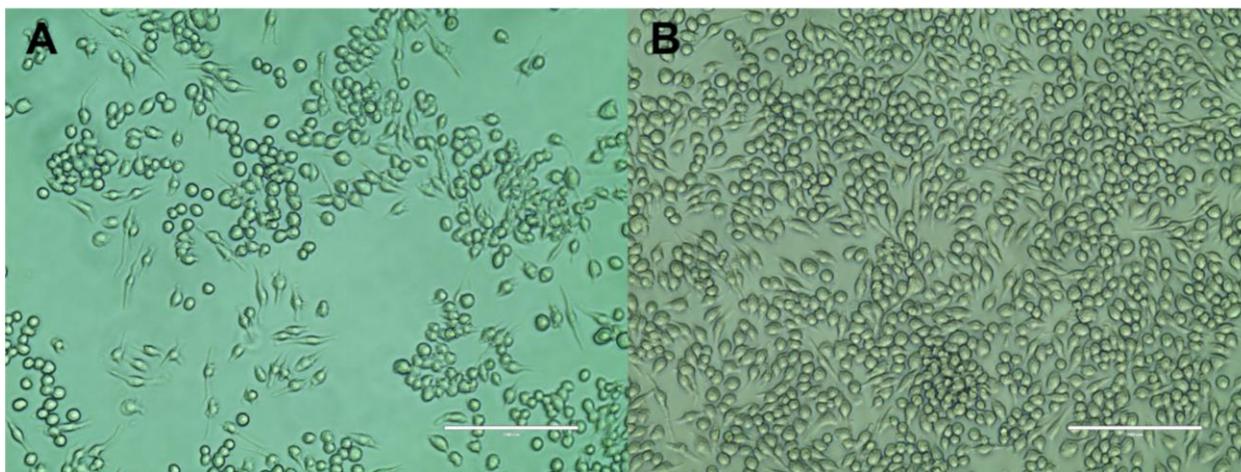


Figura 4. Imagen capturada con EVOS® Cell Imaging Microscope de la línea celular J774A.1 cultivada como monocapa adherida en placa, (A) en la parte izquierda se observa una confluencia celular de 50% y (B) en lado derecho de 80% aproximadamente, en ambas imágenes se observa la morfología alargada normal de los macrófagos adheridos. Objetivo 10x, la barra corresponde a 200 μ m.

3.2.2 Ensayo de citotoxicidad de las conotoxinas sintéticas

Las conotoxinas sintéticas fueron evaluadas a diferentes concentraciones frente a los macrófagos murinos, con el objetivo de probar que éstas no están teniendo un efecto citotóxico sobre las células. Los resultados de este experimento muestran que ninguno de los péptidos presentó efecto citotóxico a ninguna de las concentraciones ensayadas, por el contrario, con la aplicación del péptido xm1b (figura 5B) las células muestran una proliferación significativamente mayor a la del control de crecimiento, cuando son expuestas al péptido a concentraciones de 1.3 μ M y 0.25 μ M. Los péptidos xm1c y xm1d también mostraron incremento en la proliferación celular en la mayoría de las concentraciones a las que se expusieron las células (figura 5 C y D). El péptido xm1c tuvo un porcentaje de proliferación mayor cuando las células se expusieron a una concentración de 1.3 μ M al igual que xm1b, sin embargo, presentó este

efecto significativo en todas las concentraciones ensayadas ($p < 0.05$). El péptido xm1d que corresponde a la versión hidrolizada y amidada del péptido inicial, mostró un mayor efecto en la proliferación que los demás péptidos aumentando el porcentaje de proliferación celular hasta $\sim 125\%$ a concentraciones de $6.6 \mu\text{M}$ y $0.05 \mu\text{M}$ principalmente ($*** p < 0.001$). Éste péptido también aumentó significativamente la proliferación en las otras tres concentraciones ensayadas ($33 \mu\text{M}$, $1.3 \mu\text{M}$ y $0.01 \mu\text{M}$).

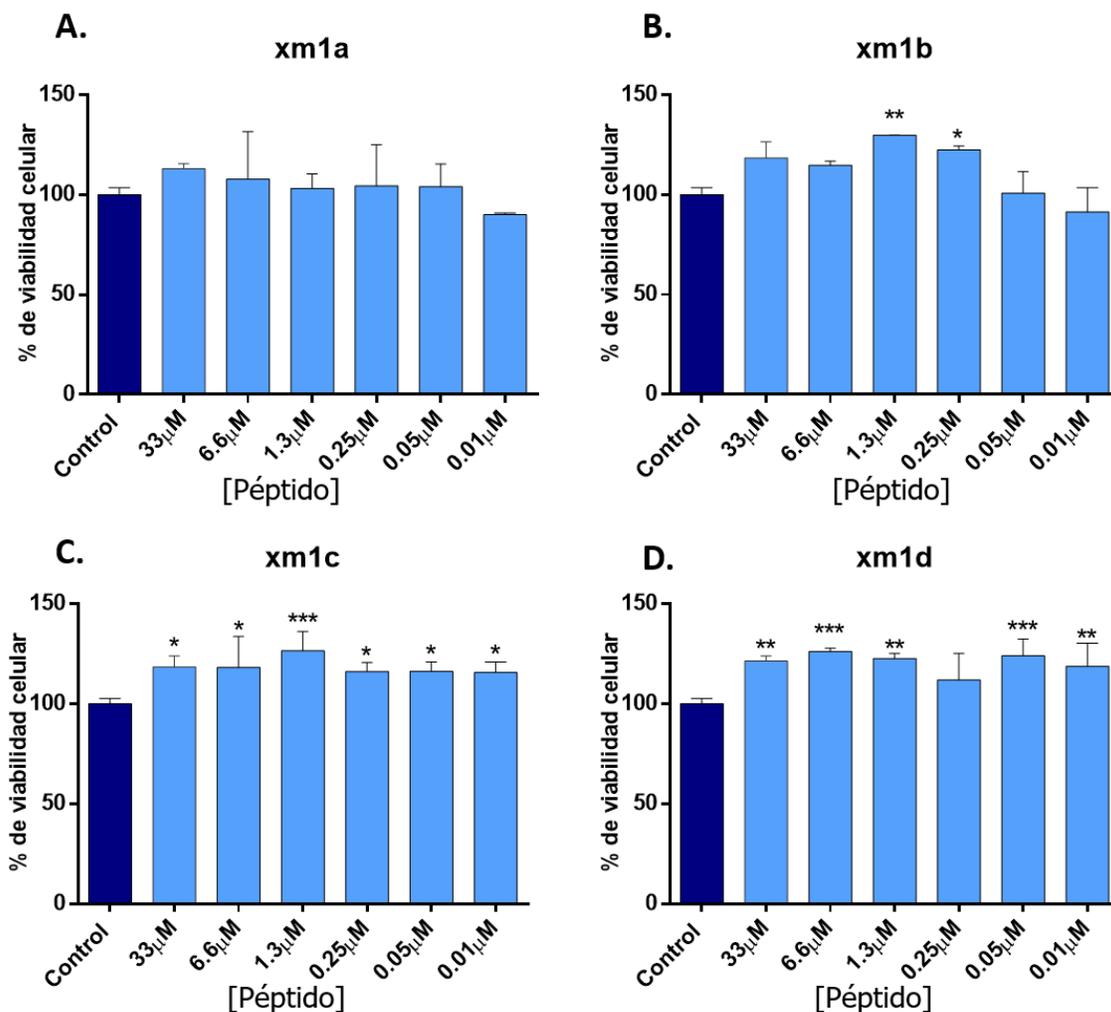


Figura 5. Ensayo de citotoxicidad de péptidos en la línea celular J774A.1. Un total de 1×10^4 células fueron tratadas a diferentes concentraciones de los péptidos. Ninguno de los péptidos presentó efecto citotóxico en los cultivos a ninguna de las concentraciones. Las células tratadas con el péptido xm1b a concentraciones entre los $33 \mu\text{M}$ y $0.25 \mu\text{M}$ mostraron un porcentaje de crecimiento superior al control de células no tratadas, al igual que la mayoría de las concentraciones de xm1c y xm1d. $n=3$ * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ (análisis ANOVA)

3.2.3 Evaluación de las conotoxinas sintéticas en macrófagos de ratón J774A.1

3.2.3.1 Estandarización de Oligonucleótidos

Para llevar a cabo la estandarización de los oligonucleótidos que se utilizaron en los experimentos siguientes, se realizó un experimento en donde sólo se trató a las células con LPS, para obtener de ellas muestras de ARN y posteriormente retrotranscribir a ADNc para la estandarización. Las cantidades extraídas de ARN por tratamiento, fueron las siguientes:

Tabla 3. Cantidades extraídas de ARN

TRATAMIENTO Células	$\Delta 260$	$\Delta 260/280$	ARN total (ng/ μ l)	ADNc calculado retrotranscrito (ng/ μ l)
Sin estímulo (C- 1)	2.20	1.78	881	176.2
Sin estímulo (C- 2)	1.37	1.90	547	109.4
Sin estímulo (C- 3)	2.3	1.90	928	185.6
LPS 1	1.35	1.88	543	108.6
LPS 2	2.63	1.84	1053	210.6
LPS 3	2.05	1.90	820	164.0

Cantidades de ARN calculadas con Nanodrop, Thermo Scientific®

Para verificar la integridad del ARN extraído de todas las muestras, se corrió un gel de agarosa al 2% adicionado con NaClO al 5%, en el cual se corroboró la integridad de las muestras al observarse las bandas correspondientes al 28S ARNr y 18S ARNr, características de las muestras de ARN. En la Figura 6 se observan las corridas en gel de las muestras de ARN obtenidas de los diferentes tratamientos.

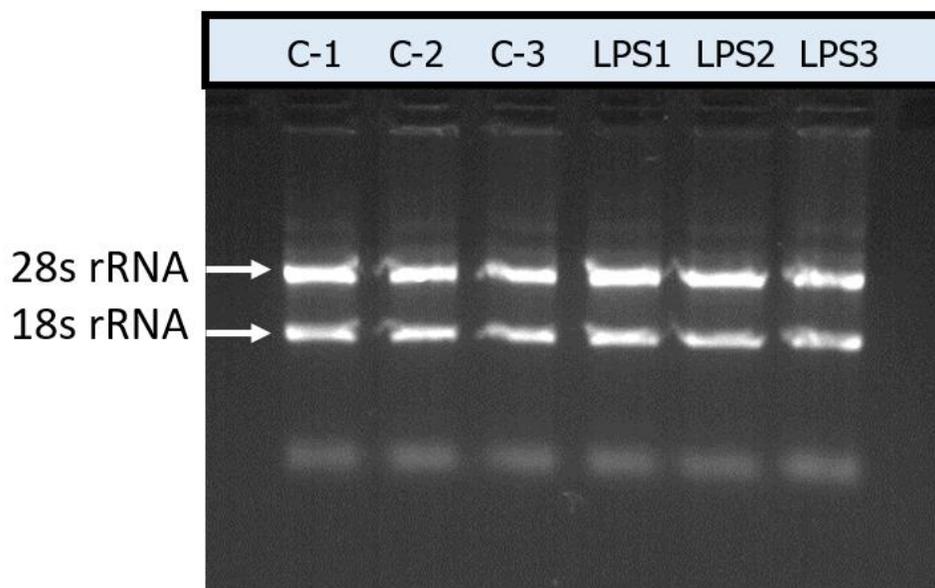


Figura 6. Gel para la evaluación de la integridad del ARN extraído. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio donde se observan las dos bandas correspondientes al 28S ARN y 18S ARN. En el carril del 1 al 3 se encuentran los triplicados del control negativo (células sin estímulo) y en el carril 4 al 6 ARN los triplicados del control positivo (células con estímulo de LPS)

3.2.4 Análisis comparativo de la eficiencia del estímulo

Con el fin de validar la efectividad del estímulo con LPS, se analizaron las muestras por medio de qPCR para medir la expresión de citocinas en los macrófagos estimulados y no estimulados. En los resultados se comprobó la eficiencia del LPS como inductor pro-inflamatorio, al elevar la transcripción de las citocinas relacionadas con este mecanismo de respuesta. Los resultados no se muestran debido a que son repetitivos con los resultados posteriores.

3.3 Evaluación de conotoxinas sintéticas en macrófagos de ratón J774A.1

3.3.1 Extracción de ARN

Para la cuantificación de la transcripción de los genes que se evaluaron, se realizó primeramente la extracción de ARN de cada tratamiento por triplicado, las cantidades fueron las siguientes:

Tabla 4. Características de la extracción de ARN y retrotranscripción.

TRATAMIENTO Células	Δ 260	Δ 260/280	ARN total (ng/μl)	ADNc retrotranscrito (ng/μl)
Sin estímulo (C - 1)	2.578	1.84	1031.0	206.2
Sin estímulo (C - 2)	2.37	1.87	950.0	190.0
Sin estímulo (C - 3)	2.308	1.81	923.0	184.6
LPS (1)	2.853	1.84	1141.0	228.2
LPS (2)	2.846	1.85	1139.0	227.8
LPS (3)	2.869	1.82	1147.0	229.4
xm1a (1)	2.808	1.88	1123.0	224.6
xm1a (2)	2.663	1.89	1065.0	213.0
xm1a (3)	2.896	1.89	1158.0	231.6
xm1b (1)	5.99	1.84	2396.0	239.6
xm1b (2)	2.80	1.82	1124.0	224.8
xm1b (3)	4.37	1.81	1750.0	262.5
xm1c (1)	9.409	1.85	3764.0	376.4
xm1c (2)	4.37	1.83	1751.0	262.6
xm1c (3)	4.661	1.81	1865.0	279.7
xm1d (1)	8.893	1.73	3557.0	355.7
xm1d (2)	3.719	1.81	1487.0	223.0
xm1d (3)	5.91	1.80	2364.0	236.4

*Cantidades de ARN calculadas con Nanodrop, Thermo Scientific®

Para verificar la integridad del ARN extraído de todas las muestras, se corrió un gel de agarosa al 2% adicionado con NaClO al 5%, en el cual se corroboró la integridad de las muestras al observarse las bandas correspondientes al 28S ARNr y 18S ARNr, características de las muestras de ARN. En la Figura 7 se observan las corridas en gel de las muestras de ARN obtenidas de los diferentes tratamientos.

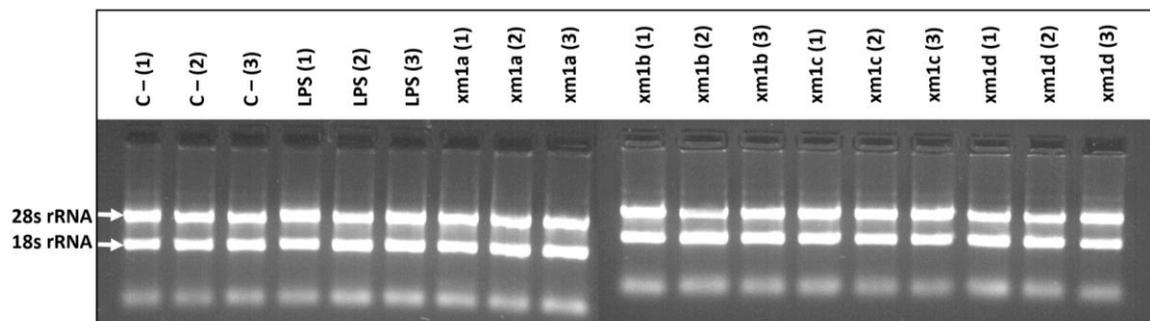


Figura 7. Gel para la evaluación de la integridad del ARN extraído. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio donde se observan las dos bandas correspondientes al 28S ARN y 18S ARN, que corroboran la integridad del ARN extraído. En los carriles se corrieron todas las muestras del ensayo con sus respectivos triplicados.

3.3.2 Análisis de expresión de citocinas por qPCR

3.3.2.1 Validación de Oligonucleótidos

Para el análisis de PCR en tiempo real, fue necesario validar el funcionamiento correcto de los oligonucleótidos que se utilizaron, al igual que calcular la pendiente y el porcentaje de eficiencia que se utilizó posteriormente en el análisis estadístico. Para cada uno de los cebadores se obtuvieron curvas estándar del intervalo de 100 ng a 0.16 ng de ADNc (5 puntos en diluciones 1:5), y a la par se analizó la curva de fusión de cada primer, para verificar la fidelidad en sus productos. En la Tabla 5 se observan los diferentes valores calculados para los oligonucleótidos, la mayoría de ellos mostró tener alrededor de 100% de eficiencia y un solo amplicón observable en la curva de disociación, por lo que todos los oligonucleótidos fueron adecuados para el análisis, y se utilizaron para cada experimento en el que se evaluó la transcripción por medio de qPCR.

Tabla 5. Valores calculados de pendiente y eficiencia de los oligonucleótidos.

Oligonucleótidos	PENDIENTE	EFICIENCIA
18S	-3.268	102.3
iNOS	-3.352	98.76
IL-1 β	-3.118	109.3
TNF- α	-3.109	98.431
IL-12p40	-3.109	109.74
IL-10	-3.285	101.56
UBQ	-3.299	100.96

3.3.2.2 Validación de la retrotranscripción

Para corroborar que la retrotranscripción de ARN a ADNc se haya llevado a cabo correctamente, se realizó un PCR con los primers del gen 18S a algunas de las muestras retrotranscritas, y el producto del PCR se corrió en un gel de electroforesis para verificar la amplificación y tamaño de fragmento. Los resultados nos muestran que para las muestras analizadas, se detectó la amplificación del fragmento 18S, que teóricamente consta de 195 pb (Figura 8), por lo que la muestra se compone principalmente de ADNc, además que el fragmento amplificado se observa de buena calidad y con muy poco residuo de otro tipo de material genético. Basados en este resultado se prosiguió al siguiente paso que fue la cuantificación por PCR en tiempo real.

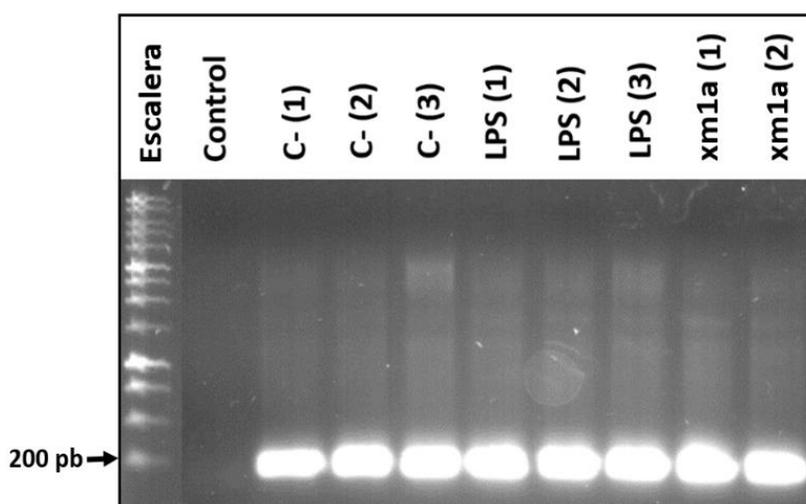


Figura 8. Gel para la evaluación de la correcta retro-transcripción del ARN. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio donde se observan las bandas correspondientes al fragmento de 195 pb del gen 18S amplificado por los oligonucleótidos. En el carril número uno el marcador de peso molecular, en el segundo carril se corrieron los oligonucleótidos en ausencia de ADNc, y en los carriles del dos al ocho se muestran algunas de las muestras que se corrieron para verificar la correcta retrotranscripción. Se observa la amplificación principalmente del fragmento de interés.

3.3.3 Efecto de los péptidos en los niveles de transcripción de citocinas

Con el objetivo de identificar qué tipo de efecto tienen los péptidos sintetizados a partir de secuencias similares de *Conasprella*, se realizó un experimento donde se cuantificó la expresión relativa de ARNm de diferentes genes, algunos relacionados con el efecto pro-inflamatorio. Para este análisis se utilizó como gen de referencia el 18S y los cálculos se realizaron mediante el método de Pfaffl (Pfaffl,

2001). La actividad de los péptidos fue evaluada en presencia del estímulo inflamatorio de LPS en todos los casos.

En la Figura 9 se muestra el efecto en los niveles de transcripción de ARNm de cada péptido, las células tratadas con LPS presentan un aumento en la transcripción de citocinas pro-inflamatorias e iNOS, en comparación con las células no estimuladas. Las células tratadas con el péptido xm1a muestran un aumento no significativo en la transcripción de los genes INOS, TNF- α e IL-1 β (Fig. 9 A,B,C), en el caso de la IL-12, se presentó un incremento significativo de la transcripción del gen (Fig. 9D). La forma amidada xm1b presentó un efecto en su mayoría opuesto al péptido no amidado, disminuyendo no significativamente la transcripción de INOS e IL1 β (Fig. 9 A,C) y significativamente la transcripción de TNF- α (Fig. 9 B). El péptido que conserva la misma secuencia que xm1a, pero con una hidrólisis entre el 5to y 6to aminoácido, denominado como xm1c no tuvo efecto significativo en los niveles de transcripción de INOS e IL-12 (Fig. 9 A,D), sin embargo, para los genes TNF- α e IL-1 β mostraron un decremento (Fig. 9 B,C). Finalmente, la versión amidada de xm1c, denominado como xm1d, presentó un efecto similar en la transcripción al antes mencionado por el péptido xm1c, no obstante, mostró reducir significativamente la transcripción del gen TNF- α (Fig. 9 B) cuando las células se encontraban expuestas al estímulo de LPS y al péptido. Los niveles de transcripción de IL-10 no mostraron ningún cambio significativo, esto debido probablemente a que es una citocina anti-inflamatoria y no se expresa en este modelo pro-inflamatorio.

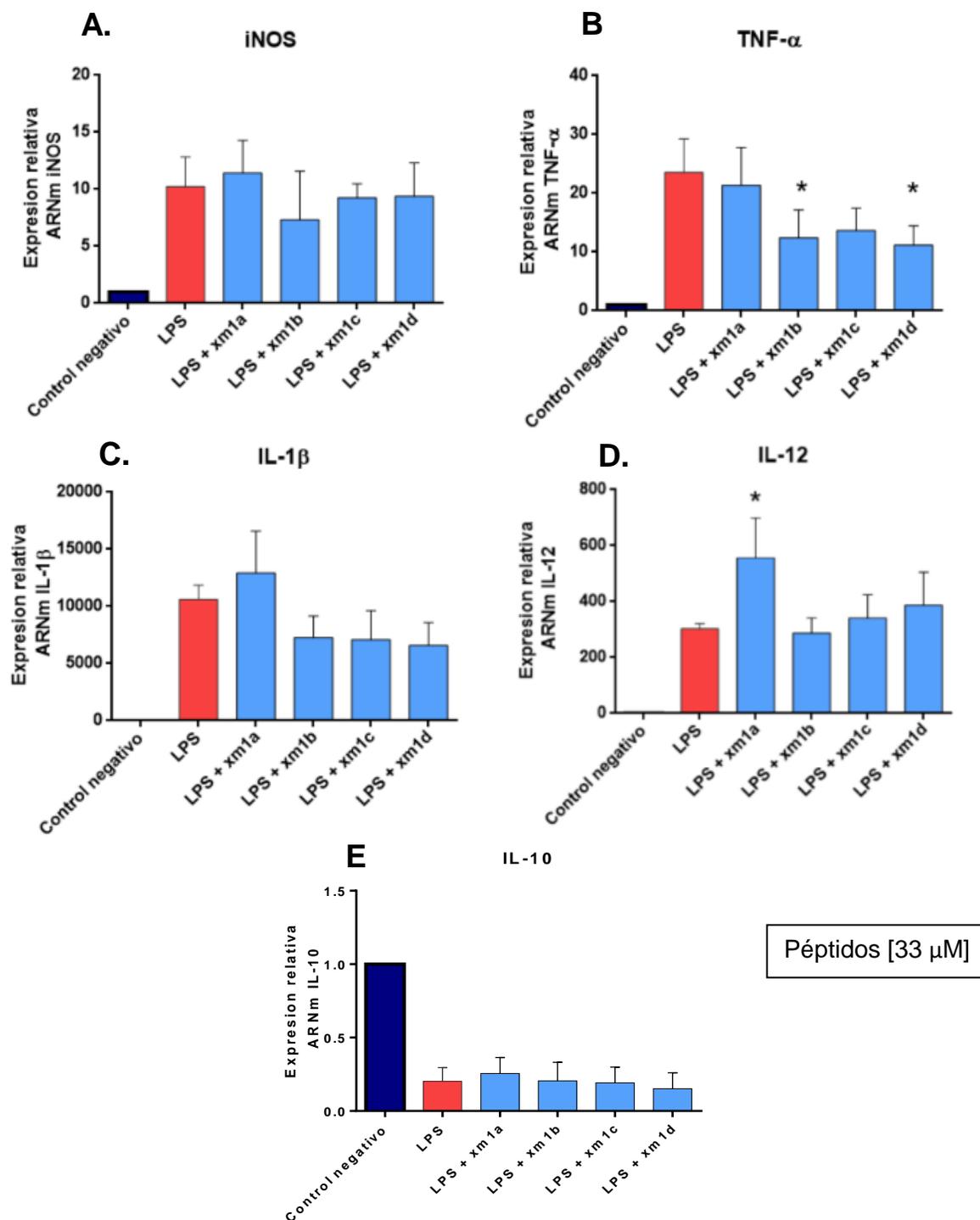


Figura 9. Efecto de las conotoxinas sintéticas xm1a, xm1b, xm1c y xm1d a concentración de 33 μ M sobre la transcripción de citocinas pro-inflamatorias (A,B,C y D) e IL-10 (E). Un total de 7×10^5 células fueron estimuladas con LPS [1 μ g/ml] y tratadas con los péptidos a una concentración de 33 μ M durante 12 horas. Los niveles de expresión de cada gen fueron evaluados por qPCR y analizados con el método de Pfaffl normalizado con el gen de referencia 18S. Los resultados se expresan como la media del radio de expresión relativa \pm SD del incremento del gen de interés, respecto al nivel del gen normalizado en las células no estimuladas. n=3 *p<0.05 (Student t-test).

3.4 Modelo de Infección de macrófagos con *Mycobacterium tuberculosis*

Para evaluar el efecto que poseen las conotoxinas sintéticas de *C. ximenes*, se realizó el experimento de infección de macrófagos. Sin embargo, dado su complejidad, uno de los objetivos de este trabajo fue estandarizar el protocolo de infección y conteo de UFC. Como se describió en la metodología, para este experimento los macrófagos fueron infectados con la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* durante un tiempo de 3 horas, ya que es necesario evaluar la actividad de los péptidos sobre los macrófagos infectados durante tres días posteriores a la infección, es necesario mantener las células en observación y cambios de medio durante estos tres días. El protocolo se estableció desde un inicio con parámetros consultados en la bibliografía, sin embargo, se tuvieron que realizar modificaciones y ajustes, debido a que los macrófagos eran lisados totalmente por la micobacteria al cabo del segundo o tercer día post-infección como se observa en la Figura 10.

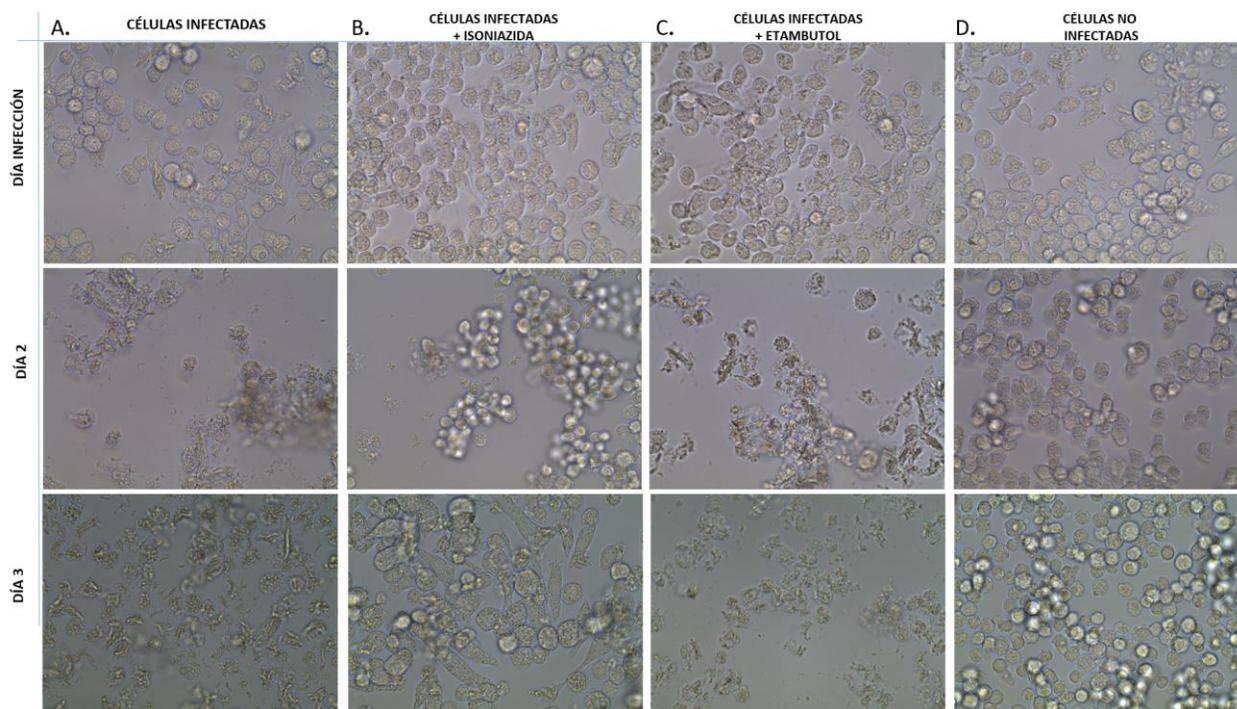


Figura 10. Microfotografías de macrófagos infectados con MTB. Un total de 5×10^5 células se sometieron a diferentes condiciones como se explica a continuación. La columna (A) pertenece a células que fueron infectadas y no se les añadió ningún tratamiento, las columnas (B) y (C) son células infectadas a las que posteriormente se les añadió isoniazida [$1 \mu\text{g/ml}$] y etambutol [$12 \mu\text{g/ml}$] respectivamente. Finalmente, la columna (D) representa el control negativo, donde las células no fueron infectadas. Las microfotografías se tomaron el día de la infección, al segundo y tercer día posteriores a ésta. El tiempo de infección fue de 3 horas en todos los casos a una MOI de 10. El medio de cultivo se reemplazó cada segundo día, añadiendo compuesto nuevo en el medio. Imágenes capturadas con EVOS® Cell Imaging Microscope.

Después de transcurrido el tiempo indicado para el día uno y día tres posterior a la infección, se retiró el medio de cultivo y las células se lisaron con 200 μl de IGEPAL-CA 630 al 1%. Después de esto, el lisado celular se sembró en diferentes diluciones, con esto se analizó cuál sería la dilución más adecuada para conteos en experimentos posteriores.

3.4.1 Conteo de Unidades formadoras de colonia para la cepa H37Rv

Las placas se incubaron durante 18 a 21 días a 37°C y CO₂ al 5% para permitir el crecimiento de la micobacteria, al final del tiempo de incubación, el conteo se realizó en las cuatro diluciones sembradas, sin embargo, se tomó en cuenta solo la dilución en la que se lograron contar las colonias con claridad. El experimento se realizó por triplicado, los resultados para este experimento se muestran en la Figura 11.

Es importante recalcar que el medio de cultivo se cambió cada día, por lo que la efectividad en la muerte bacteriana en el tercer día es atribuible a la nueva dosis administrada de ambos fármacos en el primer y segundo día, es por ello que la inhibición es superior al día uno, donde solo se había administrado una única dosis de los fármacos.

El péptido xm1c reduce la cantidad de UFC a [5 μM], disminuyendo 300,000 UFC al primer día y 340,000 UFC al tercer día, lo que representa que al primer día hubo una inhibición respecto al control del 27% y al tercer día fue de 35%, esta inhibición se mantiene y aumenta dependiendo del tiempo de exposición al péptido. A esta misma concentración de 5 μM , el péptido xm1d reduce la cantidad de UFC dentro del macrófago al primer día en un número de 390,000 y al tercer día la inhibición aumenta a 610,000 UFC, esto representa una disminución para el primer día de 31% y para el tercer día de más del 50% respecto al control de infección sin tratamiento. En lo referente al ensayo donde se utilizó una concentración diez veces menor, correspondiente a 0.5 μM , el péptido xm1d continuó mostrando un efecto de reducción del número de UFC dentro del macrófago infectado. Este efecto fue ligeramente menor, con un porcentaje de inhibición del crecimiento de 29% (170,000 UFC) para el primer día de tratamiento y de 40% (285,000 UFC) para el final del tercer día del tratamiento. En todos los casos, para estos dos péptidos el efecto fue en aumento cuando se mantiene la administración en el transcurso de los días.

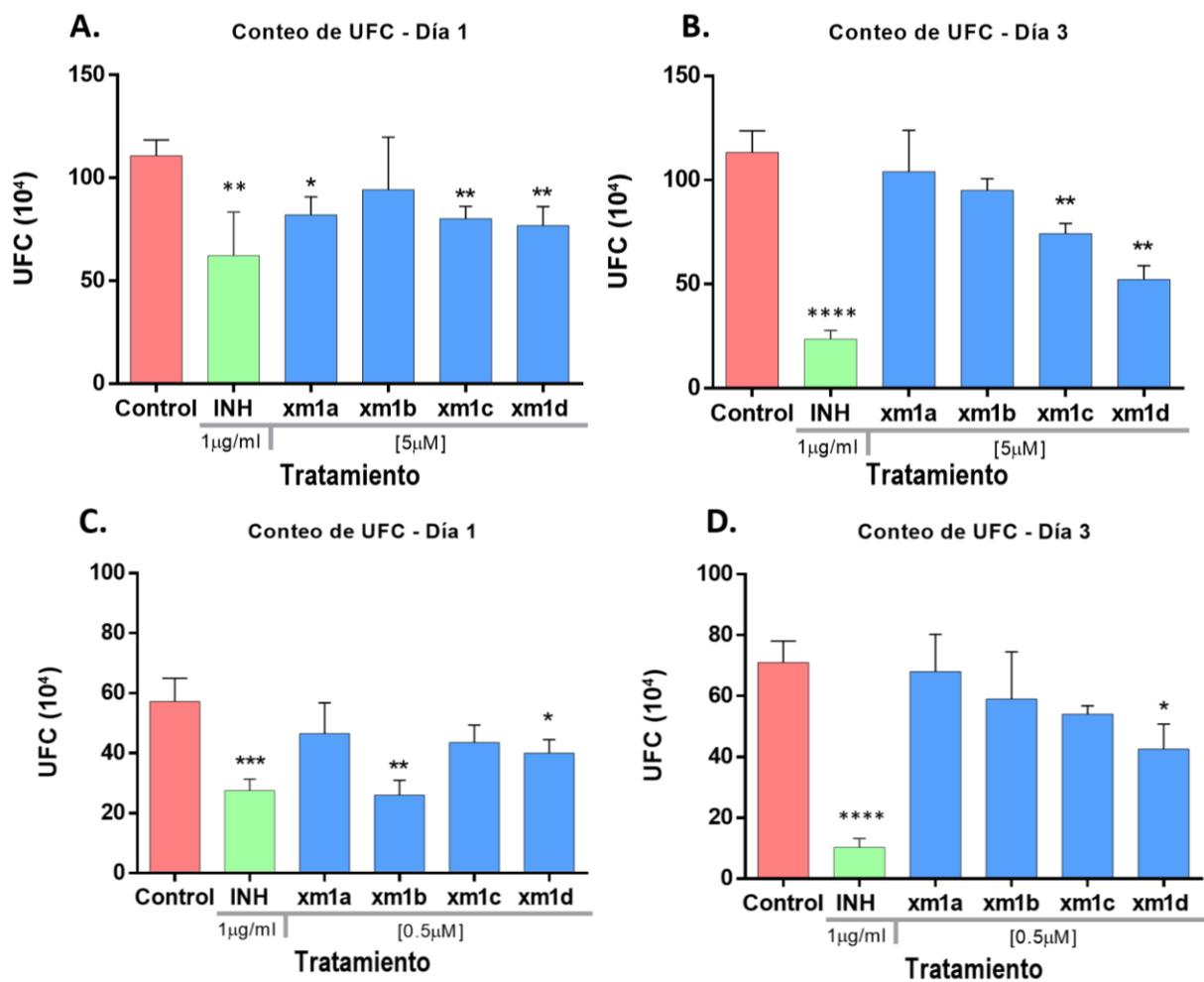


Figura 11. Conteo de UFC de *Mycobacterium tuberculosis* remanentes después de la infección en células J774A.1, las células fueron tratadas con los diferentes péptidos a concentración de 5 μ M (inciso A y B) y 0.5 μ M (inciso C y D), en los dos diferentes días en que se realizó la lisis. INH=Isoniazida n=3. * p <0.05, ** p <0.01 *** p <0.001 **** p <0.0001 (análisis ANOVA).

3.4.2 Conteo de unidades formadoras de colonia de la cepa multirresistente de *Mycobacterium tuberculosis*

Se analizó la cantidad de unidades formadoras de colonia remanentes dentro del macrófago, una vez que éste fue tratado con los diferentes péptidos. Este ensayo se realizó debido a que los péptidos mostraron tener actividad contra la cepa H37Rv de MTB que no presenta resistencia a ningún fármaco del tratamiento antifímico. Sin embargo, se consideró de gran importancia analizar el efecto que los péptidos tienen sobre una de las cepas multirresistente de MTB, debido a que la resistencia a fármacos es una característica ampliamente extendida en las cepas de MTB, y son causantes de las epidemias actuales. En este experimento se ensayaron los cuatro péptidos a concentración de 5 μM y la lisis celular se realizó al primer y tercer día post-infección. En el análisis al primer día no se observó disminución notable del número de unidades formadoras de colonia cuando los macrófagos infectados se trataron con los péptidos, y solamente el fármaco etambutol mostró disminuir la cantidad de UFC al primer día de tratamiento. Cuando se mantuvieron las células durante tres días con los diferentes tratamientos, se observó una disminución considerable en presencia de isoniazida y con el fármaco etambutol, los cuales fueron nuestros controles positivos. Sin embargo, no se observó reducción significativa en el número de UFC cuando las células se trataron con los péptidos de *C. ximenes*. Los resultados se muestran en la Figura 12.

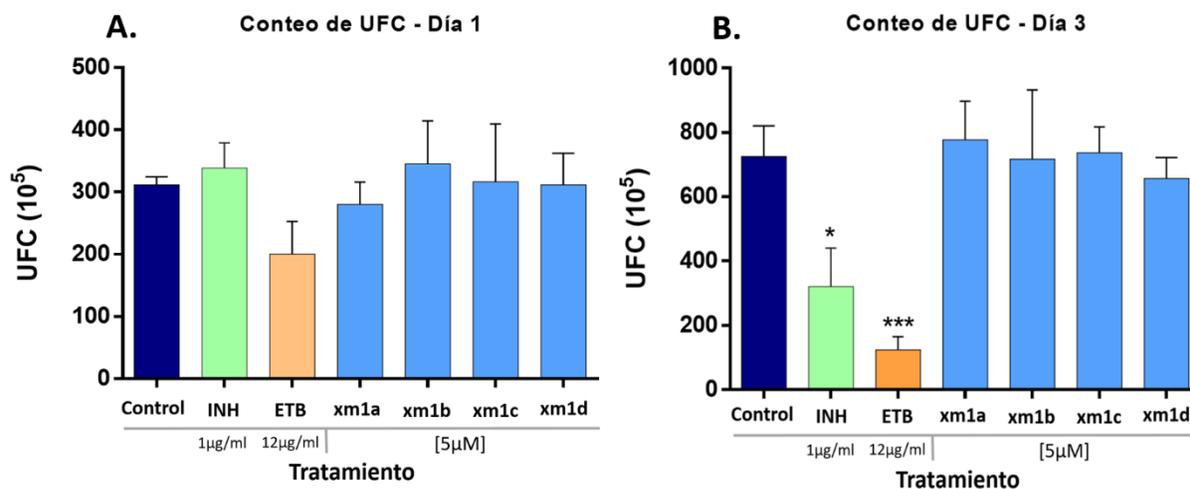


Figura 12. Conteo de unidades formadoras de colonia de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente remanentes después de la infección en células J774A.1 que fueron tratadas con los diferentes péptidos a concentración de 5 μM , y lisadas al primer día (izquierda) y tercer día (derecha). Isoniazida (INH) Etambutol (ETB) $n=3$ * $p<0.05$ y *** $p<0.001$ (análisis ANOVA)

3.4.3 Efecto de los péptidos en los niveles de transcripción de citocinas del macrófago infectado

Se analizaron los niveles de transcripción de las seis citocinas en el modelo de infección por MTB, y se encontró que xm1a y xm1b tuvieron un efecto en la disminución de TNF- α , sin embargo el cambio en la expresión relativa es minúsculo, aunque es estadísticamente significativo. En cuanto al gen iNOS, el péptido xm1d disminuyó su expresión en los macrófagos infectados. Los resultados se muestran en la Figura 13.

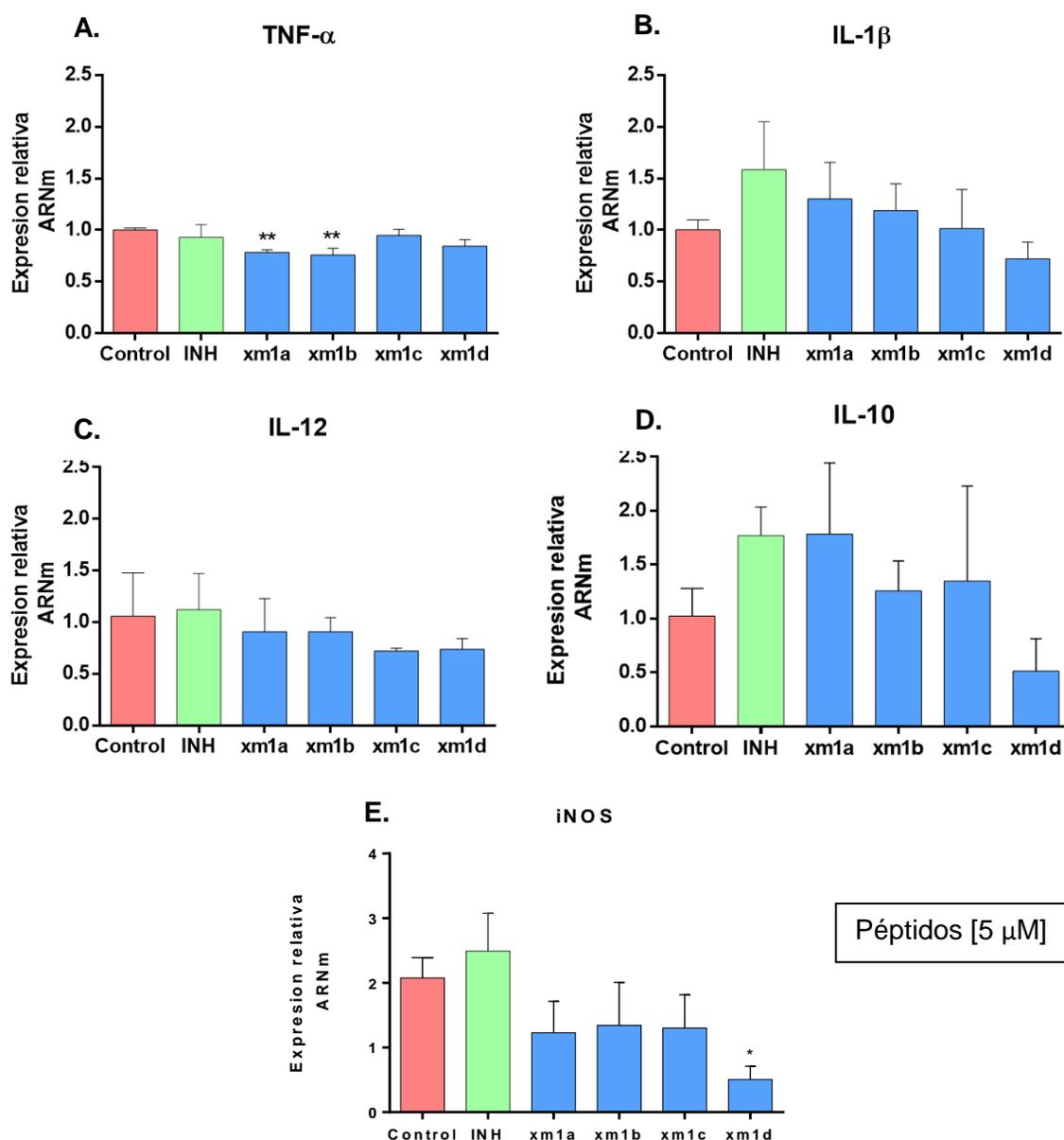


Figura 13. Niveles de expresión de citocinas en Macrófagos infectados con MTB H37Rv. Los resultados se expresan como la media del radio de expresión relativa \pm SD del incremento del gen de interés, respecto al nivel del gen endogeno (UBQ) en las células no tratadas. INH [1 μ g/ml]. n=3 *p<0.05. **p<0.01 (Student's t-test).

Capítulo 4. Discusión

El estudio de nuevos tratamientos para evitar el crecimiento de MTB, es una necesidad inherente, dado que la bacteria no responde a los tratamientos actuales y los pacientes se ven obligados a ajustarse a regímenes de antibióticos con duración de hasta 9 meses, sin ninguna garantía de sanidad total. El objetivo general de este trabajo fue el de determinar la actividad de los cuatro péptidos sintéticos derivados de la secuencia de la conotoxina xm1a aislada de *Conasprella ximenes* en el 2013, en dicho trabajo se evaluó la actividad de diferentes fracciones de veneno de *C. ximenes*, resultando en el descubrimiento de la fracción F3-F6.7 a la cual posteriormente se le caracterizó y se encontró que era un solo péptido. La secuencia de este péptido se obtuvo y se sintetizó para ensayarse frente a la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* y así evaluar su actividad, en ese trabajo, la después denominada conotoxina xm1a mostró tener un efecto inhibitorio en el crecimiento de la bacteria MTB (Bernáldez, 2013). Estos resultados fueron el preámbulo para un nuevo enfoque de investigación en el laboratorio, que ha sido indagar sobre la capacidad antimicobacteriana de estos péptidos. Sin embargo, uno de los principales mecanismos que la bacteria utiliza para persistir en el huésped y que se ha descrito ampliamente, es que ésta puede ser fagocitada por el macrófago y mediante diversos mecanismos, evitar que el macrófago la procese en su interior, utilizándolo como nicho donde la bacteria escapa de ataques del sistema inmune y de algunos medicamentos de la terapia antifímica, así la enfermedad es más difícil de erradicar y se disemina en el organismo con facilidad (Stanley et al., 2014).

Está reportado también que algunos pacientes pueden haber estado en contacto con el bacilo y no presentar la enfermedad, lo cual indica que el sistema inmune activado correctamente es capaz de atacar a la bacteria y prevenir el establecimiento de la enfermedad. Es por ello la importancia de la búsqueda de compuestos que actúen principalmente sobre las células del sistema inmune, revirtiendo o evitando los mecanismos que la micobacteria utiliza para evitar ser destruida dentro de las células.

El objetivo de este trabajo fue determinar la acción que los péptidos tienen sobre las células del sistema inmune una vez que han sido infectadas por la micobacteria; proponiendo como mecanismo de acción la unión al receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$, un canal iónico de unión a ligando expresado en macrófagos, cuya activación o bloqueo se ha visto involucrado en la modulación de la expresión de citocinas pro-inflamatorias. El ligando principal de este receptor es la acetilcolina, que tiene como acción inhibir la producción de citocinas pro-inflamatorias tras su unión a este receptor por la vía colinérgica anti-inflamatoria (CAP por sus siglas en inglés) (Báez-Pagán et al., 2015). Con el fin de esclarecer los

mecanismos bajo los cuales pueden actuar los péptidos para erradicar la MTB, primeramente se realizó un ensayo para evaluar si los péptidos tienen efecto directo sobre la cepa de MTB.

4.1 Evaluación de la actividad de las conotoxinas sintéticas frente a *Mycobacterium tuberculosis*

Para este trabajo se utilizaron conotoxinas sintéticas derivadas de secuencias del veneno de *C. ximenes*, estos péptidos se han ensayado muy pocas veces en otros trabajos, por lo que, fue difícil establecer la concentración a la cual puedan mostrar actividad. Anteriormente las fracciones del veneno presentaron actividad frente a la cepa a concentraciones que variaban en el intervalo de 66 μM y 132 μM , siendo ésta última, la concentración a la cual la mayoría de las fracciones presentó efecto. Es por ello que al inicio de los ensayos, se manejó esta concentración y posteriormente se fue modificando al observar que no tuvo efecto sobre la cepa. En el primer experimento se comenzó utilizando la concentración a la cual se había probado la fracción correspondiente a 132 μM , sin embargo, esta concentración no mostró tener el efecto deseado sobre el crecimiento de la cepa. En un artículo recientemente publicado de Padilla y colaboradores (2017), se analizó la capacidad de modulación de la α -conotoxina Iml en la transcripción de citocinas pro-inflamatorias, en este artículo se trabajó con la concentración de 5 μM y 0.5 μM , y los autores reportaron que la α - conotoxina presentó efecto en la transcripción de citocinas pro-inflamatorias. Por lo anterior se consideró apropiado realizar los siguientes experimentos a estas dos concentraciones y tomarlo como referencia.

Los resultados del experimento nos muestran que los péptidos evaluados no tienen efecto inhibitorio directamente en la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv tanto a [5 μM] como a [0.5 μM]. Esto puede deberse a que en trabajos anteriores se utilizó el veneno nativo de *Conasprella ximenes*, y en este proyecto se utilizaron los péptidos sintetizados a partir de la secuencia de xm1a. Los enlaces entre las cisteínas del péptido son cruciales para su función y para el plegamiento correcto de la estructura tridimensional, las α -conotoxinas exhiben un patrón conservado de enlaces disulfuro que consiste en la unión de las cisteínas C1-C3 y C2-C4 como conformación nativa (Tse Siang et al., 2005). A pesar de que para la síntesis del péptido se solicitó este tipo de enlaces entre las cisteínas específicamente, es preciso determinar si el péptido sintético es idéntico estructuralmente al nativo, por lo que podría ser esta una de las causas de las diferencias en cuanto a resultados previos.

Se ha reportado la utilización de péptidos antimicrobianos como una nueva terapia para MTB, dado que estos péptidos tienen pocas probabilidades de generar resistencia en la bacteria, sin embargo, las características de algunos de los péptidos descritos a la fecha contienen más de 20 aminoácidos y están positivamente cargados, además que presentan anfipaticidad (Abendizadeh et al., 2015). En cuanto a dichas características es difícil predecir el tipo de interacción que los péptidos de *C. ximenes* pudieran tener con la cepa de MTB, ya que son péptidos relativamente pequeños en comparación con los antes mencionados y con carga neutra a pH fisiológico (7.4), se sabe que estos péptidos presentan unión principalmente a los receptores nAChR $\alpha 7$, sin embargo, también se ha reportado su unión a otro tipo de receptores (Abraham et al., 2017), por lo que en un principio se consideró que pese a que MTB no presenta este tipo de receptores, la diana farmacológica que evita el crecimiento de la cepa podría haber sido otro receptor u otro mecanismo.

El hecho de que los péptidos no presenten la actividad inhibitoria en el crecimiento de MTB, no minimiza el potencial que los péptidos pudiesen tener en este tipo de infecciones, dado que MTB es un patógeno intracelular que exitosamente puede permanecer dentro de las células del hospedero y proliferar en su interior, evadiendo el sistema inmune por medio de varios mecanismos (Arranz-Trullén et al., 2017). Por lo anterior, se prosigue con el análisis del efecto de los péptidos sobre los macrófagos J774A.1 que han sido infectados previamente con MTB.

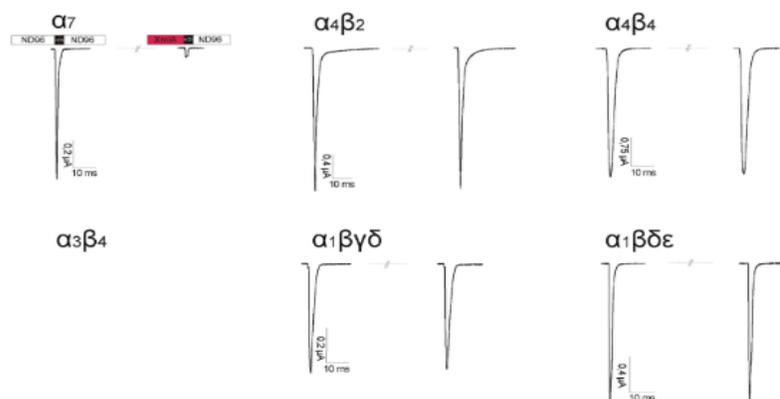
4.2 Evaluación de la actividad de los péptidos en modelo pro-inflamatorio de macrófagos

Los procesos de defensa del sistema inmune son altamente complejos, las vías de señalización que llevan a la activación celular y por consiguiente a la identificación y aniquilación del antígeno causante de una infección pueden involucrar cientos de moléculas y vías de señalización diferentes. Es por ello que es complicado estipular cuáles son las citocinas cruciales en la activación del macrófago para que éste logre aniquilar a la micobacteria en su interior. Para efectos de este trabajo se consideraron cinco citocinas las cuales se ha reportado tienen gran importancia en este proceso y promueven la correcta activación del macrófago durante el proceso infeccioso.

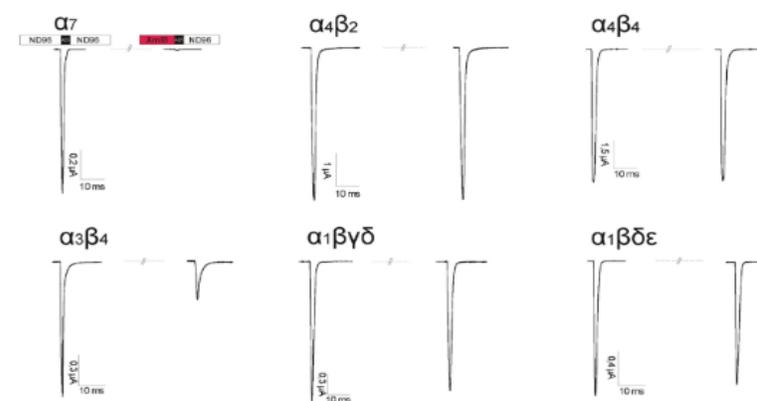
La correcta activación de las células blancas durante los procesos inflamatorios es uno de los pasos más importantes durante la infección, entre los diferentes mecanismos de regulación del sistema inmune,

actualmente se ha reportado una regulación por medio del nervio vago, quien también está involucrado en el control de los latidos del corazón, la secreción endocrina y motilidad intestinal (Hong Wang et al., 2003). En este caso en particular el nervio vago puede regular algunas de las actividades inmunes mediante la estimulación de la secreción del neurotransmisor acetilcolina. La acetilcolina se une a los receptores nAChR de las células del sistema inmune para lograr esta regulación, pero principalmente a los receptores de tipo α -7 nAChR (De Jonge y Ulloa, 2007). El receptor presenta una activación tras la unión de la molécula a este receptor, que selectivamente inhibe la producción de citocinas pro-inflamatorias, sin efecto sobre las citocinas anti-inflamatorias, a esta vía de activación se le llamó vía colinérgica antiinflamatoria (Báez-Pagán et al., 2015). Anteriormente se ha reportado la importancia del receptor α 7-nAChR en la regulación de la secreción de citocinas pro-inflamatorias por la vía CAP. Donde en un experimento se comprobó que esta vía de regulación deja de funcionar si los macrófagos que están siendo estimulados con acetilcolina no contienen este receptor en su superficie, el cual ha sido eliminado por medio de delección del gen que codifica para las subunidades del receptor (CHRNA7) (Báez-Pagán et al., 2015). Los péptidos xm1a y xm1b, se unen al receptor α 7-nAChR (IC_{50} = 1.33 μ M e IC_{50} = 0.14 μ M respectivamente), antagonizando la acción de la nicotina sobre el receptor, de acuerdo a un reporte de laboratorio solicitado al Dr. Jan Tygat de la Universidad de Leuven, Bélgica y que se presenta en la Figura 14, por lo que se propuso que la unión a este receptor puede tener efecto similar a la acetilcolina secretada por el nervio vago.

A. xm1a 5 μ M



B. xm1b 5 μ M



C. xm1c 5 μ M

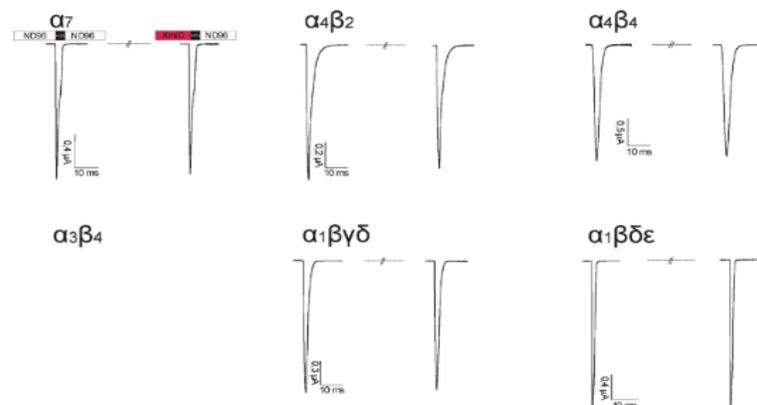


Figura 14. Perfil electrofisiológico de xm1a (A) xm1b (B) y xm1c (C). Durante el experimento los ovocitos fueron continuamente perfundidos con solución amortiguadora ND96 (barra blanca) a una velocidad de 10 ml/min, con 5 μ M de cada uno de los péptidos (barra roja) aplicados durante 30s antes que se aplicara acetilcolina (ACh) (barra negra). ACh (200 μ M) se aplicó por 2s a 10 ml/min, con periodos de lavado de 30s entre las diferentes aplicaciones de ACh. (Dr. Jan Tytgat, comunicación personal, agosto 2018)

El péptido xm1a como tratamiento en las células, no mostró efecto en el aumento de la transcripción del gen iNOS, TNF- α , así como IL-1 β , sin embargo, para IL-12 presentó un aumento significativo en la expresión de esta citocina, esto ya se había reportado anteriormente, donde se demostró que xm1a aumentaba la transcripción de esta citocina, a la vez que inhibe el efecto antiinflamatorio que tiene la nicotina sobre la transcripción de este gen en macrófagos (Cervantes, 2013). El péptido xm1a representa la secuencia fiel del péptido nativo que se une directamente con el receptor α -7 nicotínico, evitando la apertura del canal y bloqueando el flujo de calcio hacia el interior de la célula, bajo este concepto se esperaba que el péptido amidado xm1b tuviera mayor efecto en la modulación de esta citocina, dado que se ha reportado que la amidación favorece la unión al receptor.

Los péptidos amidados xm1b y xm1d mostraron disminuir la expresión de TNF- α en los macrófagos ($p < 0.05$) posterior a la activación con LPS, esto es diferente a lo que se reportó recientemente en un artículo, donde la α -conotoxina Iml de *Conus imperialis* exagera los efectos pro-inflamatorios del LPS, antagonizando el receptor α 7-nAChRs y aumentando la expresión de TNF- α secretados por la célula (Padilla et al., 2017). Como se comparó anteriormente, Iml tiene un 86% de similitud en secuencia con el péptido xm1b, además del mismo patrón de cisteínas, es por ello que se le clasificó dentro de la familia de las α -conotoxinas, y posteriormente se comprobó su unión al receptor α 7- nAChR mediante el ensayo electrofisiológico de patch clamp (Figura 14). Por lo anterior, se esperaba un efecto similar al de esta conotoxina. Esta disminución también se observó para las células que fueron infectadas con *M. tuberculosis* y posteriormente estimuladas con los péptidos, en este caso solamente xm1b mostró una disminución significativa de los niveles de expresión relativa de ARNm de TNF- α después de ser tratadas con los péptidos por 24 horas. Se ha reportado que los agonistas del receptor α -nAChR son los que regulamente disminuyen la expresión de TNF- α en las células del sistema inmune (Pavlov et al., 2007). Sin embargo, el péptido xm1b siendo antagonista de este receptor mostró un efecto similar al de la acetilcolina, disminuyendo los niveles de expresión de TNF- α . Favorablemente esta citocina se produce de manera redundante en diferentes tipos de células durante la infección por lo que no es crucial la producción por parte del macrófago (Dorhoi y Kaufmann et al., 2014).

Como se mencionó anteriormente, los péptidos xm1b y xm1d mostraron un efecto en la disminución de la transcripción de TNF- α . Se ha visto que los macrófagos no son las únicas células que secretan esta citocina en los procesos inflamatorios, también es secretada por las células T-ayudadoras y NK (del inglés) que han sido previamente estimuladas por la presencia de IL-12, por lo que sería de importancia investigar en la capacidad de estos péptidos de disminuir la producción de TNF- α como ayuda en las terapias de inflamación aguda y choque séptico.

Se observó también que xm1a tiene un efecto en el aumento de la transcripción de la IL-12, cabe resaltar que la IL-12 tiene un papel muy importante en la susceptibilidad del organismo a infecciones por MTB, se ha reportado que particularmente la ausencia de IL-12p40 (la subunidad que se analizó en este trabajo) está involucrada en las respuestas de protección celular del huésped contra la bacteria y en la promoción de la supervivencia celular del macrófago, especialmente se ha reportado que la incidencia de tuberculosis en pacientes puede deberse al síndrome mendeliano de susceptibilidad a *Mycobacterium* que es un resultado de una completa deficiencia de IL-12R β 1, IFN- γ R1 e IL-12p40 (Cooper et al., 2007), por lo que por el contrario la elevación de esta citocina, participa en la erradicación definitiva de la bacteria al interior de los macrófagos.

El principal objetivo de evaluar la acción de los péptidos en un modelo de macrófagos estimulados con LPS, fue el de encontrar una actividad promotora de la transcripción de citocinas pro-inflamatorias por efecto de los péptidos, de manera que el macrófago sea activado en presencia de los ellos. Sin embargo, a la concentración ensayada para los macrófagos, solamente xm1a mostró tener un efecto significativo en el aumento de IL-12, y a su vez un aumento no significativo en la transcripción de iNOS e IL-1 β . Por lo tanto, xm1a podría estar causando el efecto pro-inflamatorio deseado e importantemente activando la transcripción de IL-12, que en conjunto con TNF- α promueve la transcripción de INF- γ , citocina que activa diversos mecanismos microbicidas anti-micobacterianos en macrófagos murinos.

Las citocinas evaluadas en este trabajo se seleccionaron por su importancia en el proceso de activación, sin embargo son numerosas moléculas que se involucran en este proceso, es por eso que pese a que no se observó en general un aumento de las citocinas proinflamatorias al tratarse con los péptidos, existen un sinnúmero de moléculas que participan en la defensa frente a MTB. Por ejemplo, en la mayoría de los individuos la activación de los macrófagos por IFN- γ puede ayudar positivamente en el proceso infeccioso y colaborar al control de la infección, llevando al paciente a un estado de latencia (Stanley et al., 2014). También la citocina IL-8, se encuentra involucrada principalmente en la activación de diferentes tipos de células blancas durante la infección por MTB y el reclutamiento de los linfocitos T (CD3⁺, CD4⁺) al sitio de infección (Krupa et al., 2015). Por lo tanto, una de las perspectivas de este trabajo, sería la de analizar otras citocinas involucradas en el proceso y su diferente modulación al estar en contacto con las conotoxinas sintéticas.

4.3 Macrófagos infectados con *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en tratamiento con conotoxinas sintéticas

Para este objetivo se estandarizó un protocolo *in vitro* de macrófagos infectados por micobacteria, con el fin de investigar si la unión de los péptidos en cuestión al receptor de nAChR tiene efecto en la activación inmunológica y/o procesamiento de la micobacteria en su interior. El estudio de la supervivencia de la bacteria dentro del macrófago se realizó al primer y al tercer día de tratamiento. La importancia del análisis del crecimiento en la cantidad de unidades formadoras de colonias al tercer día es debida a que éste representa un tiempo óptimo donde el crecimiento de la micobacteria es homogéneo y comienza a presentarse la muerte celular de macrófagos.

En el primer ensayo de infección, se trabajó con los péptidos a una concentración de 5 μM , y se utilizó como control positivo un fármaco ante el cual se sabe que la cepa H37Rv es susceptible, en este caso se utilizó Isoniazida [1 $\mu\text{g/ml}$]. En este primer experimento, se observó que la cantidad de unidades formadoras de colonia (UFC) disminuye significativamente al primer día de tratamiento, cuando se puso en contacto los macrófagos con el péptido xm1a a una concentración de 5 μM , sin embargo, este efecto se pierde cuando se permite la permanencia de los macrófagos hasta el tercer día, esto puede ser debido a que las micobacterias comienzan con un crecimiento exponencial después del 1er día de la infección, el cual ya no es detenido por la presencia del péptido, y por ende el número de UFC presenta un aumento en el tercer día. No obstante, cuando el experimento se realizó a 0.5 μM , xm1a no mostró disminuir la cantidad de UFC de MTB en ninguno de los dos periodos analizados. El péptido xm1b, cuya modificación postraduccional corresponde a la amidación en el carboxilo terminal, mostró tener efecto a una concentración menor que xm1a, correspondiente a 0.5 μM y únicamente, al primer día post-infección. El hecho de que xm1b presente esta disminución en UFC a menor concentración que xm1a, puede deberse a que la amidación favorece el efecto que este péptido tiene sobre la célula, debido a una posible mayor afinidad por el receptor nAChR atribuible a esta modificación (Cervantes, 2013). Se ha reportado que este tipo de receptores de unión a ligando, pasan a un estado de desensibilización cuando han estado expuestos de forma prolongada al ligando (Dellisanti et al., 2013), por lo que puede ser esta una de las razones por las cuales xm1a y xm1b no presentan efecto al tercer día de tratamiento, debido a una estimulación continua del receptor por la constante renovación del medio con compuesto durante el tratamiento.

Los péptidos xm1a y xm1b son muy similares entre sí, y la única diferencia estructural es la amidación en el carboxilo terminal, sin embargo, es necesario hacer ahínco en la diferencia estructural con

xm1c y xm1d, debido a que estos péptidos presentan una hidrólisis entre el 5to y 6to aminoácido de la secuencia. Esta modificación hace que ambos péptidos se cataloguen como dipéptidos (como se mencionarán de aquí en adelante) ya que son dos secuencias por separado que se encuentran unidas por enlaces disulfuro. Sin embargo, es de inferirse que la estructura terciaria entre estos péptidos y los péptidos que no presentan hidrólisis es muy diferente. Los péptidos con el esqueleto de cisteínas como el que presenta xm1a y xm1b, como se vio anteriormente presentan una estructura en forma globular, al presentar el patrón de unión de cisteínas C1-C3 y C2-C4, esto permite que la prolina que se encuentra en la posición 7 de la secuencia quede aproximadamente en uno de los dos giros de la molécula, permitiendo que la prolina en esta posición otorgue especificidad por los receptores nicotínicos de acetilcolina, al establecer una importante contribución de contactos hidrofóbicos con el sitio de unión al receptor (Lewis et al., 2012).

Al realizarse la hidrólisis para la síntesis de los péptidos xm1c y xm1d, el bucle 1 no se forma dentro de la molécula, dado que este incluye los residuos que se encuentran entre la cisteína 2 y 3. Esta hidrólisis hace que la prolina 7 dentro del péptido no forme parte de este bucle, y pasa a pertenecer a la segunda parte del dímero (Figura 15).

					Bucle 1				Bucle 2												
PnlA	<i>C. pennaceus</i>	-	G	C	C	S	L	P	P	C	A	A	N	N	P	D	Y	C	-	-	-
PnlB	<i>C. pennaceus</i>	-	G	C	C	S	L	P	P	C	A	L	S	N	P	D	Y	C	-	-	-
lml	<i>C. imperialis</i>	-	G	C	C	S	D	P	R	C	A	W	R	-	-	-	-	C	-	-	-
ArIB	<i>C. arenatus</i>	D	E	C	C	S	N	P	A	C	R	V	N	N	P	H	V	C	R	R	R
LsIA	<i>C. limpusi</i>	S	G	C	C	S	N	P	A	C	R	V	N	N	P	N	I	C	-	-	-
MrlC	<i>C. marmoreus</i>	P	E	C	C	T	H	P	A	C	H	V	S	N	P	E	L	C	-	-	-
xm1a	<i>C. ximenes</i>	D	G	C	C	R	D	P	R	C	A	I	N	-	-	-	-	C	V		
xm1c	<i>Sintético</i>	D	G	C	C	R	D	P	R	C	A	I	N	-	-	-	-	C	V		

↑
Hidrólisis

Patrón de enlaces: C1-C3, C2-C4

Figura 15. Alineamiento de las secuencias de algunas α -conotoxinas, el patrón de enlaces disulfuro es C1-C3 y C2-C4, los datos están colocados para hacer posible la comparación de longitud. La primera columna es el nombre de las conotoxinas, la segunda columna corresponde al nombre de la especie de la cual provienen, la tercera columna es la secuencia de aminoácidos. El bucle 1 y bucle 2 están marcados en la parte superior de la figura, al igual que la hidrólisis en la parte inferior. Los aminoácidos cisteína están marcados con letra gris. (Figura modificada Eline et al., 2014)

La prolina 7 en cuestión es altamente conservada entre las conotoxinas que se unen a los $\alpha 7$ -nAChR y muy importante para generar esta unión. Por lo tanto el cambio de posición de este aminoácido,

así como el cambio en la estructura terciaria del péptido, hace que el péptido pierda especificidad de unión por el receptor $\alpha 7$ -nAChR como se observa en la Figura 14. A pesar de que los dipéptidos xm1c y xm1d no presentan unión al receptor nAChR, éstos mostraron disminuir la cantidad de unidades formadoras de colonias a concentración de 5 μ M, los péptidos pueden estar estimulando al macrófago mediante la unión a otros receptores. Es poca la información que se tiene sobre conotoxinas en forma de dipéptidos, una de las conotoxinas que presenta esta estructura es la Vt3.1 aislada de *Conus vitulinus*. La conotoxina Vt3.1 representa a un novedoso grupo de conopéptidos que están formados por dos monómeros unidos por enlaces disulfuro entrecruzados, este péptido tiene afinidad por la subunidad β de los canales BK (canales de K^+ dependientes de Ca^{+2} de gran conductancia), que regulan parte de la excitabilidad neuronal. Esta conotoxina no inhibe los canales por medio de bloqueo del poro, si no que inhibe parcialmente el canal alterando principalmente el mecanismo de apertura del canal voltaje dependiente (Lei et al., 2014).

Estructuralmente Vt3.1 presenta similitud con los péptidos xm1c y xm1d, ya que ambos dipéptidos se encuentran unidos por dos enlaces disulfuro que de manera cruzada unen ambos péptidos. Existe otro tipo de unión entre los dímeros, que corresponde a enlaces disulfuro unidos de manera paralela, los dipéptidos que tienen este arreglo mostraron tener una menor a nula actividad que los dipéptidos unidos por enlaces disulfuro entrecruzados (Wu et al., 2010). Los enlaces que presentan xm1c y xm1d son de tipo cruzado, por lo que es aún más probable que este tipo de estructura este favoreciendo la unión a receptores y ejerciendo actividad sobre el macrófago.

El dipéptido que mostró tener mayor efecto fue la versión amidada correspondiente a xm1d, al presentar acción inhibitoria en el crecimiento de MTB a la concentración mínima probada de 0.5 μ M. La amidación en este péptido puede dar lugar a una diferente conformación que la de xm1c, como se ha observado en la α -conotoxina lml, la cual al presentar una amidación muestra tendencia a plegarse en una forma globular y la sustitución de esta amida por un ácido carboxílico resulta en un cambio de conformación preferentemente a la estructura tipo listón (Kang TS et al., 2005).

Aunque se desconoce la diana farmacológica de xm1c y xm1d, ambos péptidos muestran una importante reducción en el conteo de UFC de *M. tuberculosis* en el modelo de infección, actuando principalmente sobre el macrófago, debido a que como se observó en este trabajo estos péptidos no tienen efecto frente a la cepa *per se*. El péptido xm1d, por lo tanto presenta un efecto novedoso sobre las células que no se había reportado anteriormente. Si la acción que tiene el péptido sobre las células está estimulando de alguna manera el sistema inmune para la aniquilación de la bacteria en su interior, la utilización de estos péptidos puede resultar en el desarrollo de una nueva generación de medicamentos

basados en conopéptidos que actúan principalmente sobre las células, así evitando que la micobacteria sobreviva dentro de las células del hospedero.

4.4 Macrófagos infectados con *M. tuberculosis* multirresistente en tratamiento con conotoxinas sintéticas

Existen diferentes cepas de MTB dispersas en el mundo, en el 2016 se reportó que en 123 países se presentó por lo menos un caso de TB-XR y globalmente se estimó que 4.1% de los nuevos casos de tuberculosis y 19% de los casos previamente tratados fueron causados por cepas multirresistentes. Estas cepas son resistentes a uno o diversos fármacos del tratamiento antifímico, es por ello que para este trabajo se consideró de gran importancia el análisis del efecto de los péptidos sobre una de las cepas multirresistente de MTB. Se llevó a cabo el experimento sobre la cepa multirresistente de MTB denominada 1820, que presenta resistencia ante estreptomina, isoniazida y piracinamida, siendo sensible únicamente al fármaco etambutol. En los resultados no se observó efecto estadísticamente significativo de disminución de UFC cuando las células infectadas fueron tratadas con las conotoxinas sintéticas, esto puede deberse a que la cepa seleccionada muestra resistencia a tres diferentes fármacos, por lo que este tipo de cepas presenta diferentes tipos de mecanismo que pueden evitar la acción del péptido. Las cepas de tuberculosis multirresistente han mostrado tener diferencias considerables, respecto a las cepas no resistentes, entre los mecanismos de resistencia se encuentran diferentes bombas de eflujo y mutaciones en ciertos genes importantes para la sensibilidad de la micobacteria a fármacos (Xu et al., 2015), sabemos que el efecto que se observó en la disminución de la cantidad de UFC al aplicar el péptido es debido principalmente a la acción del péptido sobre las células, y no hay efecto directo del péptido sobre las bacterias, sin embargo, el mecanismo de activación que el péptido promueve para destruir la bacteria al interior del macrófago no se conoce con seguridad. En contraste con los resultados de la cepa H37Rv, podemos concluir que ese mecanismo de activación del macrófago no está siendo efectivo contra la cepa de TB, o bien, esta cepa tiene una capacidad de supervivencia superior dentro del macrófago, la cual posiblemente necesite de concentraciones mayores de péptido para hacer efectiva la acción de la célula sobre la micobacteria.

Existen más de 489,000 casos reportados globalmente de tuberculosis multirresistente, que involucran diferentes cepas de TB-MR (OMS 2017). Es por ello que este resultado no exime a los péptidos de ser efectivos en macrófagos infectados con diferentes cepas TB-MR, como se vio con la cepa H37Rv. Es necesario realizar experimentos con otras cepas que presentan menor grado de resistencia y por lo tanto menor grado de complejidad estructural o diferencias genéticas.

Capítulo 5. Conclusión

Las conotoxinas sintéticas xm1c y xm1d promueven la muerte celular bacteriana de *M. tuberculosis* H37Rv dentro de los macrófagos. Se encontró que xm1c disminuye hasta en un 35% el número de UFC dentro del macrófago a una concentración de 5 μ M, este efecto se mantiene y va en aumento, probablemente debido a la constante administración del péptido, presentando un efecto tiempo-dependiente, observable del primer al tercer día de tratamiento.

El péptido xm1d también promueve la eliminación de la bacteria al interior del macrófago a las dos concentraciones ensayadas, con un efecto de aumento en la inhibición del crecimiento bacteriano en relación al tiempo, y con mayor potencia que xm1c. Éste péptido es el que mostró mayor inhibición en las concentraciones ensayadas y en todos los tiempos, disminuyendo hasta en un 53% la cantidad de UFC respecto al control de crecimiento. Sin embargo, el efecto no se presentó cuando las células fueron infectadas con TB-MR, probablemente debido a la gran densidad de bacterias que proliferaron en este ensayo a diferencia del realizado con la cepa MTB H37Rv.

Por lo tanto, los péptidos xm1c y xm1d pueden ser candidatos importantes en la investigación de fármacos nuevos para el tratamiento antifímico, que actúan principalmente sobre el macrófago, sin embargo, es necesario la realización de nuevos experimentos con ésta y otras cepas de MTB.

Finalmente, este trabajo corresponde a un acercamiento sobre el efecto que los péptidos tienen en el macrófago infectado con MTB, este efecto no se había reportado anteriormente. También logró establecer el modelo de infección de macrófagos con la cepa de referencia y TB-MR en el laboratorio de bioseguridad del CICESE, para explorar nuevas moléculas con potencial antifímico.

Literatura citada

- Abedinzadeh, M., Gaeini, M., y Sardari, S. (2015). Natural antimicrobial peptides against Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(5), 1285-1289.
- Abraham, N., Healy, M., Ragnarsson, L., Brust, A., Alewood, P. F., & Lewis, R. J. (2017). Structural mechanisms for α -conotoxin activity at the human $\alpha 3\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptor. *Scientific reports*, 7, 45466.
- Arranz-Trullén, J., Lu, L., Pulido, D., Bhakta, S., y Boix, E. (2017). Host antimicrobial peptides: The promise of new treatment strategies against tuberculosis. *Frontiers in immunology*, 8, 1499.
- Báez-Pagán, C. A., Delgado-Vélez, M., y Lasalde-Dominicci, J. A. (2015). Activation of the Macrophage $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor and Control of Inflammation. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 10(3), 468–476. <https://doi.org/10.1007/s11481-015-9601-5>
- Bernáldez, J. (2013) Aislamiento y caracterización de toxinas de organismos marinos con capacidad inhibitoria del canal mecanosensible de alta conductibilidad presente en Mycobacterium tuberculosis. Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
- Bingham, J. P., Mitsunaga, E., y Bergeron, Z. L. (2010). Drugs from slugs-Past, present and future perspectives of α -conotoxin research. *Chemico-Biological Interactions*, 183(1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2009.09.021>
- Cervantes, K. (2013). Aislamiento y caracterización de péptidos inmunomoduladores presentes en el veneno de caracoles marinos del género Conus, 67. Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
- Clark, R. J., Akcan, M., Kaas, Q., Daly, N. L., y Craik, D. J. (2012). Cyclization of conotoxins to improve their biopharmaceutical properties. *Toxicon*, 59(4), 446–455. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.12.003>
- Cooper, A. M., Solache, A., y Khader, S. A. (2007). Interleukin-12 and tuberculosis: an old story revisited. *Current opinion in immunology*, 19(4), 441-447.
- De Jonge, W. J., y Ulloa, L. (2007). The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. *British Journal of Pharmacology*, 151(7), 915–29. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707264>
- Dellisanti, C. D., Ghosh, B., Hanson, S. M., Raspanti, J. M., Grant, V. A., Diarra, G. M., y Czajkowski, C. (2013). Site-directed spin labeling reveals pentameric ligand-gated ion channel gating motions. *PLoS biology*, 11(11), e1001714.
- Donia, M., y Hamann, M. T. (2003). Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *Lancet Infectious Diseases*, 3(6), 338–348. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(03\)00655-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00655-8)
- Dorhoi, A., y Kaufmann, S. H. E. (2014). Tumor necrosis factor alpha in mycobacterial infection. *Seminars in Immunology*, 26(3), 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.04.003>
- Fox W, Ellard GA, Mitchison DA. (1999). Studies on the treatment of tuberculosis undertaken by the British Medical Research Council tuberculosis units, 1946–1986, with relevant subsequent publications. *Int J Tuberc Lung Dis*; 3(10 suppl 2): S231

- Gray, W. R., Luque, A., Olivera, B. M., Barrett, J., y Cruz, L. J. (1981). Peptide toxins from *Conus geographus* venom. *Journal of Biological Chemistry*, 256(10), 4734-4740.
- Hundie, G. B., Woldemeskel, D., y Gessesse, A. (2016). Evaluation of Direct Colorimetric MTT Assay for Rapid Detection of Rifampicin and Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169188>
- Kaas, Q., Westermann, J. C., y Craik, D. J. (2010). Conopeptide characterization and classifications: An analysis using ConoServer. *Toxicon*, 55(8), 1491–1509. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.002>
- Kang TS, Vivekanandan S, Jois SD, Kini RM.(2005) Effect of C-terminal amidation on folding and disulfide-pairing of alpha-conotoxin Iml. *Angewandte chemie*. Volumen 44, Issue39 Páginas 6333-6337
- Krupa, A., Fol, M., Dziadek, B. R., Kepka, E., Wojciechowska, D., Brzostek, A., y Kurdowska, A. K. (2015). Binding of CXCL8/IL-8 to *Mycobacterium tuberculosis* modulates the innate immune response. *Mediators of inflammation*, 2015.
- Koch R. (1882) Die Ätiologie der Tuberkulose. *Berliner klinische Wochenschrift* ; 15: 221–230.
- Kumar, V., y Patel, S. (2017). New structural classes of antituberculosis agents, (November 2016), 1–57. <https://doi.org/10.1002/med.21454>
- Lei, L., Chen, S., Tsair-Fuh, L., Jiayu, S., Shuili, Y., Ran, S., y Naiyun, G. (2014). Conopeptide Vt3. 1 preferentially inhibits BK potassium channels containing 4 subunits via electrostatic interactions.
- Lewis RJ, Garcia ML. (2003) Therapeutic potential of venom peptides. *Nature reviews. Drug Discov*; 2 (10): 790-802.
- Lewis, R. J., Dutertre, S., Vetter, I., y Christie, M. J. (2012). *Conus* venom peptide pharmacology. *Pharmacological reviews*, pr-111.
- Organización mundial de la salud, (2016) Global tuberculosis report, Recuperado de <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250441/1/9789241565394eng.pdf?ua=1>
- Organización mundial de la salud. (2017). Nota descriptiva Tuberculosis. Recuperado el 10 de junio 2017, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>
- Padilla, A., Keating, P., Hartmann, J. X., y Marí, F. (2017). Effects of α -conotoxin Iml on TNF- α , IL-8 and TGF- β expression by human macrophage-like cells derived from THP-1 pre-monocytic leukemic cells. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11586-2>
- Parashar Thapa, Michael J. Espiritu, Chino C. Cabalteja, Jon-Paul Bingham (2014). Conotoxins and their regulatory considerations. *Regulatory toxicology and pharmacology* 70, 197-202
- Pavlov, V. A., Ochani, M., Yang, L. H., Gallowitsch-Puerta, M., Ochani, K., Lin, X. y LaRosa, G. J. (2007). Selective $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 improves survival in murine endotoxemia and severe sepsis. *Critical care medicine*, 35(4), 1139-1144.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45.
- Puillandre, N., Duda, T. F., Meyer, C., Olivera, B. M., y Bouchet, P. (2015). One, four or 100 genera? A new classification of the cone snails. *Journal of Molluscan Studies*, 81(1), 1–23. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyu055>

- Stanley, S. A., Barczak, A. K., Silvis, M. R., Luo, S. S., Sogi, K., Vokes, M., Hung, D. T. (2014). Identification of Host-Targeted Small Molecules That Restrict Intracellular Mycobacterium tuberculosis Growth. *PLoS Pathogens*, 10(2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003946>
- Tucker J.K. y Tenorio M.J. (2009), *Systematic Classification of Recent and Fossil Conoidean Gastropods*, ConchBooks, Hankenheim, Germany, 295 pp.
- Martins, A., Vieira, H., Gaspar, H., y Santos, S. (2014). Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: Tips for success. *Marine Drugs*, 12(2), 1066–1101. <https://doi.org/10.3390/md12021066>
- McIntosh JM, Santos AD, Olivera BM. (1999) Conus peptides targeted to specific nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Ann Rev Biochem* ; 68 59-88
- Mir, R., Karim, S., Kamal, M. A., Wilson, C. M., y Mirza, Z. (2016). Conotoxins: Structure, therapeutic potential and pharmacological applications. *Current Pharmaceutical Design*, 22(5), 582–589. <https://doi.org/10.2174/1381612822666151124234715>
- Mitchison D, Davies G. (2012). The chemotherapy of tuberculosis: past, present and future. *Int J Tuberc Lung Dis*; 16:724–32.
- Terlau H, Olivera BM (2004). Conus venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiol Rev*; 84 (1): 41-68
- Todar K. (2012) *Todar's Online Textbook of bacteriology*. Recuperado 13 junio 2017, de <http://textbookofbacteriology.net/tuberculosis.html>
- Wang, H., Yu, M., Ochani, M., Amella, C. A., Tanovic, M., Susarla, S., ...Tracey, K. J. (2003). Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*, 421(6921), 384–388. <https://doi.org/10.1038/nature01339>
- Wu, X. C., Zhou, M., Peng, C., Shao, X. X., Guo, Z. Y., y Chi, C. W. (2010). Novel conopeptides in a form of disulfide-crosslinked dimer. *Peptides*, 31(6), 1001-1006.
- Xu, Y., Zhang, Z., y Sun, Z. (2015). Drug resistance to Mycobacterium tuberculosis: from the traditional Chinese view to modern systems biology. *Critical reviews in microbiology*, 41(3), 399-410.