

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



---

**Maestría en Ciencias  
en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología  
Marina**

---

**Efecto de toxinas de *Californiconus californicus* en la  
diferenciación de los linfocitos T reguladores y Th17**

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

Presenta:

**Daniela Zazueta Favela**

Ensenada, Baja California, México  
2017

Tesis defendida por  
**Daniela Zazueta Favela**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dr. Marco Antonio De León Nava**  
Director de tesis

Miembros del comité

**Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro**

**Dr. Luis Alberto Delgado Argote**



---

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

---

**Dra. Rufina Hernández Martínez**  
Directora de Estudios de Posgrado

*Daniela Zazueta Favela © 2017*

*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 **Daniela Zazueta Favela** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina

**Efecto de toxinas de *Californiconus californicus* en la diferenciación de los linfocitos T reguladores y Th17**

Resumen aprobado por:

---

Dr. Marco Antonio De León Nava  
**Director de tesis**

El sistema inmunológico de los vertebrados está conformado por una serie de mecanismos de defensa que desencadena acciones protectoras contra patógenos. Se divide en un sistema innato y un sistema adaptativo, el cual reconoce antígenos con una alta especificidad. Uno de sus componentes celulares son los linfocitos T, que se subdividen en linfocitos citotóxicos, cooperadores y reguladores. Los linfocitos reguladores contribuyen, entre otras funciones, a mantener la homeostasis del organismo al impedir el ataque a tejidos propios; por otro lado, los linfocitos T cooperadores se diferencian en distintos subtipos, dependiendo de varios elementos como el reto antigénico, que induce la acción de factores de transcripción y de citocinas en el medio; un ejemplo son los linfocitos Th17. Estas células tienen la capacidad de inducir una respuesta inflamatoria al reclutar neutrófilos en el lugar de la infección y también juegan un importante papel en algunas enfermedades autoinmunes. Entre varias características que los distinguen, los linfocitos T poseen canales iónicos específicos importantes para su diferenciación y proliferación. En los últimos años, se han caracterizado diversas moléculas a partir de caracoles marinos cuyos blancos moleculares son diversos canales iónicos y se ha incrementado el interés en la investigación biomédica por sus posibles aplicaciones terapéuticas. Debido a la importancia de los linfocitos T reguladores y Th17 (cooperadores) en la respuesta inmunológica para combatir diversas patologías, se evaluó el efecto de cuatro toxinas de naturaleza peptídica (ccj2, ccj4, ccj5 y ccj6) de la especie *Californiconus californicus*, en la polarización de linfocitos T obtenidos de nódulos linfáticos de ratón. Se observó un incremento en la diferenciación de linfocitos Th17 en el segundo día de cultivo por efecto de ccj4 y ccj6 (5.5  $\mu$ M); asimismo aumentó la producción de interleucina (IL) 10, una citocina con funciones supresoras y antiinflamatorias, por parte de las Treg, en el tercer día, por efecto de ccj2 y ccj5 (5.5  $\mu$ M), y en el cuarto día, por efecto de ccj6 (5.5  $\mu$ M). No se encontraron cambios en la proliferación celular en ninguna de las dos subpoblaciones. Resulta relevante que una conotoxina incrementó la producción de IL10 únicamente en linfocitos T reguladores, y que otro péptido aumentó la cantidad de células Th17, efectos que sugieren la presencia de blancos moleculares específicos en estas poblaciones. En conjunto, este trabajo indica que algunas conotoxinas pueden modular funciones efectoras de los linfocitos T.

**Palabras clave:** Linfocito Th17, linfocito T regulador, toxinas, inmunomodulación, *Californiconus californicus*.

Abstract of the thesis presented by **Daniela Zazueta Favela** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science with orientation in Marine Biotechnology

**Effect of *Californiconus californicus* toxins on the differentiation of Regulatory T lymphocytes and Th17**

Abstract approved by:

---

Dr. Marco Antonio De León Nava  
**Thesis Director**

The vertebrate immune system represents the defense mechanisms that trigger protective actions against pathogens. It is divided into an innate system and an adaptive system, which recognizes antigens with high specificity allowing discrimination of subtle changes. One of its cellular components are T lymphocytes, which can be subdivided into cytotoxic, helper and regulatory T lymphocytes. Regulatory T cells contribute, among other functions, to maintain the homeostasis of the organism by preventing the damage to the own tissues. Helper T cells differentiate into different subtypes, depending on several elements such as the antigenic challenge, which induces the action of transcription factors and cytokines in the medium; an example are Th17 lymphocytes. These lymphocytes have the ability to induce an inflammatory response by recruiting neutrophils to the site of infection and also play an important role in some autoimmune diseases. Among several characteristics that distinguish them, T lymphocytes have specific ion channels that are important for their differentiation and proliferation. In recent years, several marine snail molecules have been characterized delimiting several ion channels as their molecular targets and the interest of biomedical research in these molecules has increased due to their possible therapeutic applications. Due to the importance of regulatory T cells and Th17 lymphocytes in the immune response in combating diverse pathologies, the effect of four toxins (ccj2, ccj4, ccj5 and ccj6) from *Californiconus californicus* was evaluated in the polarization of T lymphocytes obtained from mouse lymph nodes. An increase in Th17 cells was observed on the second day of separate T lymphocyte co-cultures with ccj4 and ccj6 (5.5  $\mu$ M) as well as the production of interleukin (IL) 10, a cytokine with suppressive and anti-inflammatory functions, by regulatory T cells on the third day of co-cultures with ccj2 and ccj5 (5.5  $\mu$ M) and on the fourth day with ccj6 (5.5  $\mu$ M). No effect was found on cell proliferation in either subpopulation. It is relevant that one conotoxin increased IL10 production only in regulatory T lymphocytes and another increased the amount of Th17 cells, effects that suggest the presence of specific molecular targets in these populations. Taken together, this project indicates that some conotoxins can modulate T lymphocyte effector functions.

**Keywords:** Th17 lymphocyte, regulatory T cell, toxins, immunomodulation, *Californiconus californicus*.

## Dedicatoria

A mi abuelo, **Juan Manuel Favela Arredondo**, quien desde el cielo ha sido mi ángel

de la guarda...

Sé que estarías muy orgulloso de mí.

Te dedico mi trabajo a ti, Mamel.

## Agradecimientos

Al **Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE)** por darme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría en el Posgrado en Ciencias de la Vida.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por el apoyo económico brindado durante el posgrado, con número de becario 298162.

A mi Director de tesis, **Marco De León**, por darme la oportunidad de colaborar con este proyecto, por no sólo ser mi mentor sino además un amigo que me apoyó y aconsejó cuando más lo necesité, por preocuparse siempre por mi bienestar, por nunca dejarme sola, por tenerme paciencia y aguantar mis ataques de estrés y por contagiarme ese gusto y amor por los linfocitos.

A los miembros de mi comité, el **Dr. Alexei** y el **Dr. Luis**, por sus sabios consejos y soporte en mi proyecto de tesis.

Al **Dr. Luis Donis Maturano**, por el apoyo brindado en mi trabajo de tesis, por compartir tantos conocimientos y enseñanzas y por todos esos momentos de alegría y arduo trabajo.

A la **Dra. Johanna Bernáldez**, por su ayuda en el laboratorio, por instruirme en las conotoxinas y sus buenos consejos.

Al **Dr. Leopoldo Flores Romo** por su colaboración con material para la elaboración de mis experimentos.

A mis padres, **Laura y Eriberto** quienes siempre han estado muy orgullosos de mí. Nunca perdieron su fe y siempre me ayudaron a salir adelante en los momentos más difíciles. Sin ustedes no habría llegado tan lejos. Los quiero.

A mi tía **Emma** por abrirme las puertas de su casa y quererme como otra hija; a mi prima **Mandy** por convertirse en una hermana para mí y por todos esos instantes de risa que me hacían salir de la rutina.

A mi tía **Maribel** y mi tío **Carlos**, por todo su apoyo y cariño y estar siempre pendientes de mí. Y no puede faltar mi prima **Maribel**, por todos esos cafecitos coquetos y platicadores para bajar el estrés y ponernos al corriente de la vida.

A mi **Machi**, por ser la mejor abuela del mundo y por ser como mi segunda mamá, siempre preocupada por mí y que me consentía cada vez que iba de vacaciones.

A mis tíos **Manuel, Lucy, Sergio y David**, por su cariño y apoyo incondicional en esta etapa de mi vida.

A **Kee**, mi hermanito académico, gracias ser mi distracción en los cubos, por hacerme reír, por terapearme en mi máximo estrés, por cantar conmigo a todo pulmón, por hacerle bullying al jefe y por la convivencia en el BB.

A mis compañeras **Nayeli, Aimé, Briceida, Danna**, por su amistad y por los buenos momentos y risas durante nuestra maestría.

A **Anayatzin**, por convertirme en mi mejor amiga, compañera de alegrías y tristezas, mi confidente y soporte estos dos años. Mi guachaporita monita.

A **Diana**, porque siempre has estado conmigo en las buenas y en las malas, por esas largas conversaciones, risas y payasadas; por esperarme con ansias cada vez que eran vacaciones y recibirme con toda su alegría. Gracias por ser mi cómplice y partner in crime, y por supuesto, por llevarme por mi smoothie de fresa que sabes que tanto me gusta.

A **Tania**, porque después de tantos años sigues siendo la amiga loca y divertida que conocí desde el primer momento; gracias por esas largas llamadas y todas las chocoaventuras que sé que algún día tendremos que plasmar en un libro para recordar en algunos años, y sobre todo, gracias por hacerme cómplice de tus más descabelladas locuras.

A **Wong**, por alentarme a seguir adelante, por ayudarme con mi cronograma de actividades, por estar al pendiente de mí y aconsejarme en los momentos de frustración.

A **Adriana**, por ser mi amiga fiel y siempre estar al pendiente de mí, en las buenas y en las malas, y nunca dejarme sola; por escucharme siempre, tratar de aconsejarme y echarme porras para salir adelante a pesar de todo.

Al profe **Víctor**, por ser el temible maestro que se convirtió en un muy buen amigo y que me ha acompañado en este largo camino. Gracias por su aprecio y cariño.

Al profe **Chevo**, por ser un gran amigo que desde lejos me brindó su ayuda y consejo para salir adelante.

Al **Dr. Leonardo Germán Gandarilla**, por poner su fe y creer en mí y ser una de las personas que me impulsó a estudiar mi posgrado para crecer en mi vida profesional.

A todas y cada una de las personas que estuvieron a mi lado en este recorrido, muchas gracias.



## Tabla de contenido

<b>Resumen en español</b> .....	<b>ii</b>
<b>Resumen en inglés</b> .....	<b>iii</b>
<b>Dedicatoria</b> .....	<b>iv</b>
<b>Agradecimientos</b> .....	<b>v</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>x</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>xii</b>
<b>Lista de acrónimos</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Capítulo I</b> .....	<b>1</b>
1. Introducción .....	<b>1</b>
1.1 Sistema inmunológico .....	<b>1</b>
1.1.1 Sistema inmune innato .....	<b>2</b>
1.1.2 Sistema inmune adaptativo .....	<b>2</b>
1.1.2.1 Linfocitos T .....	<b>3</b>
1.1.2.2 Linfocitos Th17 .....	<b>4</b>
1.1.2.3 Células T reguladoras (Treg) .....	<b>5</b>
1.1.2.4 Plasticidad de los linfocitos T CD4 <sup>+</sup> .....	<b>6</b>
1.2 Caracoles <i>Conus</i> .....	<b>8</b>
1.3 <i>Californiconus californicus</i> .....	<b>9</b>
1.4 Conotoxinas .....	<b>9</b>
1.5 Canales iónicos .....	<b>11</b>
2. Antecedentes .....	<b>12</b>
3. Justificación .....	<b>15</b>
4. Hipótesis .....	<b>16</b>
5. Objetivos .....	<b>16</b>
5.1 Objetivo General .....	<b>16</b>
5.2. Objetivos específicos .....	<b>16</b>
<b>Capítulo II</b> .....	<b>17</b>
6. Metodología .....	<b>17</b>
6.1 Toxinas .....	<b>17</b>

6.2 Animales.....	18
6.3 Extracción de órganos y cultivo celular.....	18
6.4 Proliferación celular.....	20
6.5 Detección de poblaciones celulares (linfocitos Treg/Th17) por citometría de flujo.....	23
6.6 Detección de poblaciones celulares (Th17/Treg) con respecto al tiempo.....	24
6.7 Análisis estadístico.....	24
<b>Capítulo III.....</b>	<b>25</b>
7. Resultados.....	25
7.1 Efecto de las toxinas de <i>C. californicus</i> en la proliferación de linfocitos Treg/Th17.....	25
7.2 Efecto de las toxinas de <i>C. californicus</i> en la diferenciación de linfocitos Treg/Th17.....	27
7.3 Efecto de las toxinas de <i>C. californicus</i> en la diferenciación de linfocitos Treg/Th17 con respecto al tiempo.....	30
<b>Capítulo IV.....</b>	<b>35</b>
8. Discusión.....	35
<b>Capítulo V.....</b>	<b>39</b>
9. Conclusiones.....	39
10. Perspectivas.....	39
<b>Literatura citada.....</b>	<b>40</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>46</b>

## Lista de figuras

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Clasificación del sistema inmune. Células representativas de la inmunidad innata y adaptativa (Modificado de Dranoff, 2004).....	1
2. Subgrupos de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> a partir de la diferenciación de una célula T vírgen (Modificado de O’Shea y Paul, 2010).....	4
3. Flexibilidad y plasticidad de los subgrupos de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> (Modificado de Nakayamada <i>et al.</i> , 2012) .....	7
4. Imagen de <i>C. californicus</i> . Archivo del Laboratorio de Inmunología y Biotoxinas, CICESE. ....	9
5. Esquema general de la metodología del proyecto.....	17
6. Disección del ratón para extracción de ganglios linfáticos inguinales, axilares y mesentéricos (Modificado de Coligan <i>et al.</i> , 2011). ....	19
7. Diseño experimental de cultivo de células de ganglios de ratón en placa de 24 pozos.. ....	20
8. Diseño experimental de cultivo de células de ganglios de ratón en placa de 24 pozos para evaluar proliferación celular por tinción con CFSE. ....	22
9. Diseño experimental para evaluar la proliferación celular con la sal resazurina sódica en placa de 96 pozos. ....	22
10. Efecto de cuatro toxinas de <i>C. californicus</i> en la proliferación de linfocitos Th17 y Treg, evaluado por la incorporación de CFSE.....	26
11. Efecto de cuatro toxinas de <i>C. californicus</i> en la proliferación de linfocitos mediante reacciones de óxido-reducción.....	27
12. Efecto de conotoxinas de <i>C. californicus</i> en la diferenciación de linfocitos al tercer día de cultivo, evaluado mediante citometría de flujo.....	28
13. Efecto de conotoxinas de <i>C. californicus</i> en la diferenciación de linfocitos al cuarto día de cultivo, evaluado mediante citometría de flujo.....	30
14. Efecto de conotoxinas de <i>C. californicus</i> en la diferenciación de linfocitos Treg, evaluada mediante citometría de flujo.....	31
15. Efecto de conotoxinas de <i>C. californiconus</i> en la expresión de IL10 por parte de los linfocitos Treg, evaluada mediante citometría de flujo.....	31
16. Efecto de conotoxinas de <i>C. californicus</i> en la diferenciación de linfocitos Th17, evaluada mediante citometría de flujo.....	32

<b>17.</b> Efecto de conotoxinas de <i>C. californicus</i> en la expresión de IL10 por parte de linfocitos Treg al tercer día de cultivo, evaluada mediante citometría de flujo. ....	<b>33</b>
<b>18.</b> Efecto de conotoxinas de <i>C. californicus</i> en la expresión de IL10 por parte de los linfocitos Treg al cuarto día de cultivo, evaluada mediante citometría de flujo .....	<b>33</b>
<b>19.</b> Efecto de conotoxinas de <i>C. californicus</i> en la diferenciación de linfocitos Th17 en el segundo día de cultivo, evaluado mediante citometría de flujo .....	<b>34</b>
<b>20.</b> Componentes generales del citómetro de flujo. ....	<b>47</b>
<b>21.</b> Citogramas de puntos del análisis multiparamétrico de linfocitos T reguladores y expresión de IL10 por parte de Treg .....	<b>48</b>
<b>22.</b> Citogramas de puntos del análisis multiparamétrico de linfocitos Th17 .....	<b>48</b>

## Lista de tablas

Tabla	Página
1. Características de toxinas de <i>Californiconus californicus</i> : nombre, secuencia de aminoácidos y masa molecular.....	<b>18</b>

## Lista de acrónimos

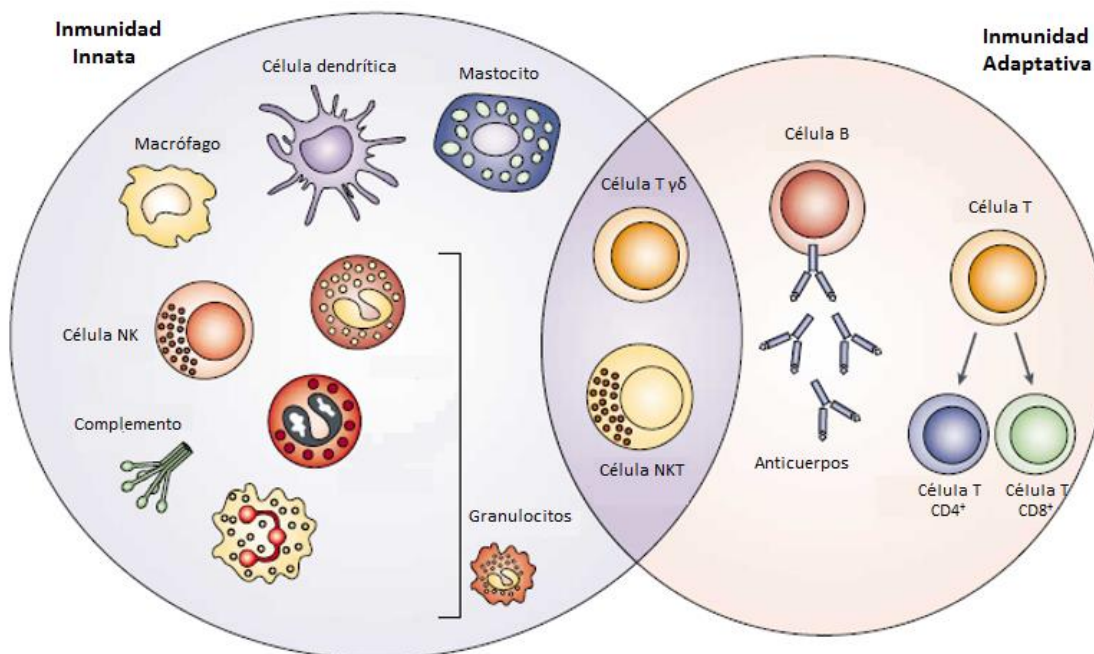
<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>APC</b>	Célula presentadora de antígeno
<b>BFA</b>	Brefeldina A
<b>CFSE</b>	Éster de carboxifluoresceína diacetato succimidil
<b>Con A</b>	Concanavalina A
<b>CRAC</b>	Canales de calcio activados por la liberación de calcio
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>Foxp3</b>	Factor de transcripción asociado a linfocitos Treg
<b>GATA3</b>	Factor de transcripción asociado a linfocitos Th2
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>IL</b>	Interleucina
<b>iTreg</b>	Células T reguladoras inducidas
<b>nAChR</b>	Receptor nicotínico de acetilcolina
<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>NFAT</b>	Factor nuclear de células T activadas
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>ROR<math>\gamma</math>t</b>	Factor de transcripción asociado a linfocitos Th17
<b>STAT</b>	Transductor de señal y activador de la transcripción
<b>T-bet</b>	Factor de transcripción asociado a linfocitos Th1
<b>TCR</b>	Receptor de célula T
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento y transformación beta
<b>Th</b>	Célula T colaboradora
<b>Treg</b>	Células T reguladoras

# Capítulo I

## 1. Introducción

### 1.1 Sistema inmunológico

El sistema inmune está conformado por una serie de mecanismos de defensa compuesto por un conjunto heterogéneo de células que confieren protección contra agentes extraños. Este sistema se basa en una red compleja de comunicación entre células en diversos sitios del cuerpo (Arnold *et al.*, 2015), llevando a cabo respuestas protectoras, específicas y rápidas contra múltiples patógenos. Es responsable de mantener la homeostasis a través de la eliminación de células y moléculas derivadas de diversas fuentes malignas como virus, bacterias, protozoarios, entre otras. Por tanto, el sistema inmune es muy eficaz y específico al decidir acerca de cuándo y cómo tolerar a antígenos derivados del organismo hospedero o de otros organismos cuando es necesario (Knutson *et al.*, 2007).



**Figura 1.** Clasificación del sistema inmune. Células representativas de la inmunidad innata y adaptativa (Modificado de Dranoff, 2004).

Los procesos biológicos más importantes de la respuesta inmune son: a) la eliminación de agentes microbianos a través de los mecanismos de protección no específicos del sistema inmune innato, b) la

transferencia de información por parte del sistema inmune innato a las células del sistema adaptativo y por lo tanto, generar respuestas en la forma y momento apropiados, c) el reconocimiento de antígenos extraños por medio de las células del sistema inmune adaptativo y la movilización de mecanismos potentes para la eliminación de los microbios que traen consigo estos antígenos, y d) el desarrollo de la memoria inmunitaria a partir de sus respuestas a exposiciones anteriores y la tolerancia a antígenos propios (Paul, 2013).

Debido a la presión selectiva impuesta por los diversos microorganismos infecciosos, el sistema inmune evolucionó, teniendo como resultado que los organismos multicelulares desarrollaran mecanismos de defensa con la capacidad de activarse y eliminar los factores infecciosos presentes en el hospedero. Filogenéticamente, el mecanismo más antiguo de defensa se conoce como sistema inmune innato, el cual posee receptores para el reconocimiento de patógenos microbianos. Además, se encuentra el sistema inmune adaptativo, característico sólo de las especies vertebradas y genera un amplio repertorio de receptores antigénicos con numerosas especificidades (Medzhitov *et al.*, 1997).

### **1.1.1 Sistema inmune innato**

La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra los microorganismos, es la protección que existe en el momento de nacer, siempre está disponible para proporcionar respuestas rápidas que protegen contra la enfermedad y no implica el reconocimiento específico de un microorganismo (Tortora *et al.*, 2007). Se caracteriza por montar respuestas a los pocos minutos de exposición a antígenos microbianos, generando una respuesta inflamatoria de protección y desempeña un papel importante en la activación de la respuesta inmune adaptativa subsiguiente. Aunque su repertorio de receptores es limitado para detectar patógenos invasores, puede compensar esta limitante gracias a que existen muchos componentes microbianos altamente conservados que son compartidos por grandes grupos de agentes infecciosos. El sistema inmune innato consta de mecanismos de defensa celulares y bioquímicos cuyos principales componentes son: a) barreras físicas y químicas, como el epitelio y sustancias antimicrobianas producidas en las superficies epiteliales; b) células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos), c) células dendríticas y linfocitos citolíticos naturales (NK), d) proteínas sanguíneas, incluyendo el sistema del complementos y otros mediadores de la inflamación y citocinas (Turvey *et al.*, 2010).

### **1.1.2 Sistema inmune adaptativo**

El sistema inmune adaptativo, también conocido como específico o adquirido, surge en respuesta a la infección y se adapta a ella. Es un tipo de respuesta inmunitaria estimulada por la exposición a



microorganismos infecciosos y aumenta en magnitud y capacidad defensiva con cada exposición sucesiva a un microbio en particular. Éste tiene una gran especificidad frente a moléculas diferentes, genera memoria inmunológica y por ello exhibe una gran capacidad para recordar y responder a exposiciones repetidas al mismo microorganismo, y desarrolla extraordinarias habilidades para distinguir entre diferentes antígenos, aunque estos sean muy similares (Abbas *et al.*, 2012).

Las células del sistema inmune adaptativo son los linfocitos B y T. Estas células son altamente móviles y después de su desarrollo en los órganos linfáticos primarios (médula ósea y timo) se trasladan a los órganos linfáticos secundarios (bazo y ganglios linfáticos), los cuales sirven para capturar antígenos en circulación. Por ello, la inmunidad adaptativa surge en estas zonas bajo la influencia de las señales de la inmunidad innata provistas directamente por los patógenos en circulación o indirectamente por las células presentadoras de antígenos (APC) activadas por patógenos (Bonilla *et al.*, 2010).

#### **1.1.2.1 Linfocitos T**

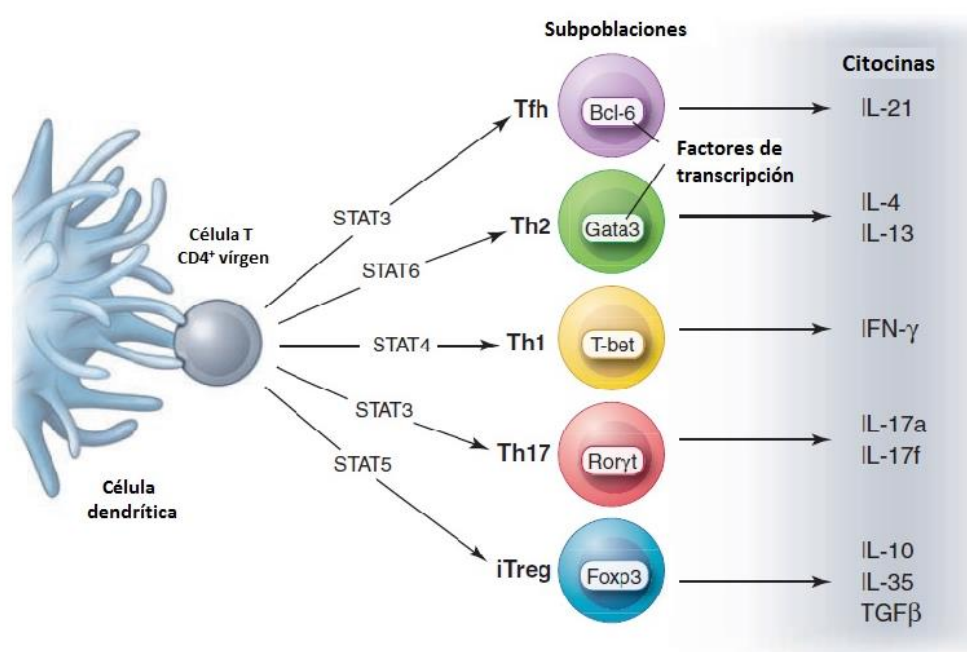
Los linfocitos T provienen de progenitores de la línea linfoide que surgen en la médula ósea y migran al timo para completar su maduración. En su membrana se encuentra el receptor de célula T (TCR), el cual interactúa con el antígeno para la posterior activación del linfocito y sus correspondientes acciones efectoras.

Durante el proceso de maduración de las células T, ocurren diversos procesos de selección que llevan a la diferenciación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (citotóxicos) y linfocitos T CD4<sup>+</sup> (cooperadores). Los primeros actúan neutralizando patógenos intracelulares, incluyendo virus y células transformadas, a través del ataque directo a las células y utilizando enzimas que inducen la apoptosis de las mismas (Bonilla *et al.*, 2010); mientras que los linfocitos cooperadores son células esenciales de la inmunidad adaptativa, ya que regulan a las células B para que produzcan anticuerpos, así como a los linfocitos citotóxicos, reclutan otras células de la inmunidad innata para llevarlas a los sitios de infección, inducen a los macrófagos a incrementar su actividad microbicida y liberan citocinas para orquestar su respuesta (Kleinewietfeld y Hafler, 2013).

Una vez que los linfocitos completan su maduración, migran a los órganos linfáticos secundarios donde se da la activación de las células T. Esto ocurre por la interacción del TCR con el antígeno presentado por la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tipo II (para linfocitos T CD4<sup>+</sup>) (Luckheeram *et al.*, 2012) en las células dendríticas, macrófagos o células B, denominadas células

presentadoras de antígeno (APC), o por la sinapsis del TCR con el MHC tipo I presente en todas las células nucleadas para linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

Las células CD4<sup>+</sup> vírgenes pueden inducirse y diferenciarse en varios subtipos de células T colaboradoras (Th) determinadas por las señales que reciben durante su interacción inicial con el antígeno, así como la acción de citocinas en el medio en que se encuentran. Se han clasificado principalmente cuatro poblaciones mayoritarias claramente definidas en función de las citocinas que producen y de su actividad predominante: Th1, Th2, Th17 y células T reguladoras (Treg) (Chen *et al.*, 2012).



**Figura 2.** Subgrupos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> a partir de la diferenciación de una célula T virgen (Modificado de O'Shea y Paul, 2010).

### 1.1.2.2 Linfocitos Th17

Coffman y Mosmann (1986) descubrieron que no todas las células CD4<sup>+</sup> tenían la capacidad de producir todas las citocinas que secretaban los linfocitos T y definieron por primera vez dos grupos de células T CD4<sup>+</sup>: Th1 y Th2 (Zhu *et al.*, 2008).

Las células Th1 secretan principalmente interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), inducen respuestas inflamatorias y están involucradas en la inmunidad contra patógenos intracelulares. Las células Th2 producen citocinas como la interleucina 4, 5 y 13 (IL-4, IL-5, IL-13) y participan en la inmunidad humoral

contra parásitos y reacciones alérgicas. Recientemente se descubrió otro tipo de células Th: las células Th17, las cuales se caracterizan por la producción de IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, y participan en procesos de inflamación y enfermedades autoinmunes (Awasthi *et al.*, 2008).

Después de la activación de los linfocitos por el antígeno, la producción de cierto grupo de células CD4<sup>+</sup> está mediada por factores de transcripción específicos para cada grupo: T-bet y STAT-4 para células Th1 y GATA-3 y STAT-6 para células Th2. Adicionalmente, los análisis de perfil genético de las células Th17 mostraron que la sobreexpresión de ROR $\gamma$ t promueve la diferenciación de linfocitos Th17 y regula la secreción de IL-17, mientras que, si las células son deficientes en este factor, producen poca cantidad de la citocina IL-17 (Ji *et al.*, 2010).

Se describió que STAT-3, principal factor para la generación de IL-6, IL-21 e IL-23, también es un elemento crucial para la regulación del linaje de las células Th17. Su desarrollo es independiente de las citocinas requeridas para la diferenciación de Th1 y Th2, sin embargo TGF- $\beta$  e IL-6 son necesarias para el desarrollo de las células Th17 (O'Shea *et al.*, 2009). Los linfocitos de este subgrupo son críticos para la respuesta inmune contra hongos, contribuyen a reclutar neutrófilos e inducen la producción de factores antimicrobianos (Chen *et al.*, 2014). Secretan grandes cantidades de IL-17 en los lugares de la infección, son abundantes en los tejidos mucosos, particularmente en el tubo digestivo y por ello se dice que son importantes para combatir infecciones intestinales. Se ha encontrado que las células Th17 son las principales participantes en algunas enfermedades autoinmunes como esclerosis múltiple, colitis, artritis reumatoide, psoriasis (Chen *et al.*, 2011), lupus eritematoso y enfermedad de crohn (Bi *et al.*, 2006), y también se ha descubierto que tienen un papel importante en el desarrollo de tumores (Ji *et al.*, 2010). Se les ha considerado como un blanco prometedor en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes y su prevalencia y función en el cáncer se encuentra en constante investigación (Li *et al.*, 2013).

### **1.1.2.3 Células T reguladoras (Treg)**

Gershon y colaboradores (1970) reportaron haber encontrado en sus experimentos una población celular a la que llamaron "células T supresoras" y asumieron que pertenecían al grupo de las células CD4<sup>+</sup>. Esta sugerencia no fue apreciada hasta que Sakaguchi *et al.* (1995) encontraron una población celular que poseía actividades inmunosupresoras y se identificó un marcador que las distinguiría de las demás células T: la molécula CD25. A esta población se les denomina células T reguladoras (Guzmán *et al.*, 2013).

Las células T reguladoras (Treg), también conocidas como células supresoras o células reguladoras CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> (Quesniaux *et al.*, 2006), son un subgrupo especial de las células T CD4<sup>+</sup> y se generan

en el timo, aunque pueden ser inducidas (iTreg) a partir de las células T vírgenes por exposición al factor de crecimiento de transformación (TGF- $\beta$ ) y se propagan gracias a la interleucina 2 (IL-2) (Dang *et al.*, 2011). Además, TGF- $\beta$  estimula la expresión de Foxp3, el cual es un factor de transcripción que se identificó como marcador para las células Treg y su expresión contribuye a la diferenciación de estas células supresoras (Beyer *et al.*, 2006).

Estas células son activadas a través de su TCR frente a un antígeno específico, pero después de recibir la estimulación de las APCs, pueden suprimir a su vez la activación de las células T cooperadoras y citotóxicas (Linehan *et al.*, 2005).

Entre las funciones de las células T reguladoras, se encuentra el mantener la homeostasis inmune al proteger al hospedero, al suprimir la respuesta inmune y manteniendo la tolerancia de las células T ante los antígenos propios (Lai *et al.*, 2011).

La función supresora de las Treg en linfocitos T está relacionada con la habilidad de inhibir la producción de IL-2 y promover el arresto del ciclo celular de las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> por un mecanismo que requiere contacto célula-célula (Miyara *et al.*, 2011). Las células T reguladoras se caracterizan por la producción del factor de crecimiento de transformación (TGF- $\beta$ ) e interleucina 10 (IL-10) donde esta última se considera una citocina inhibidora potente con la habilidad de suprimir las respuestas inflamatorias y así, limita el daño tisular por este tipo de procesos (Luckheeram *et al.*, 2012).

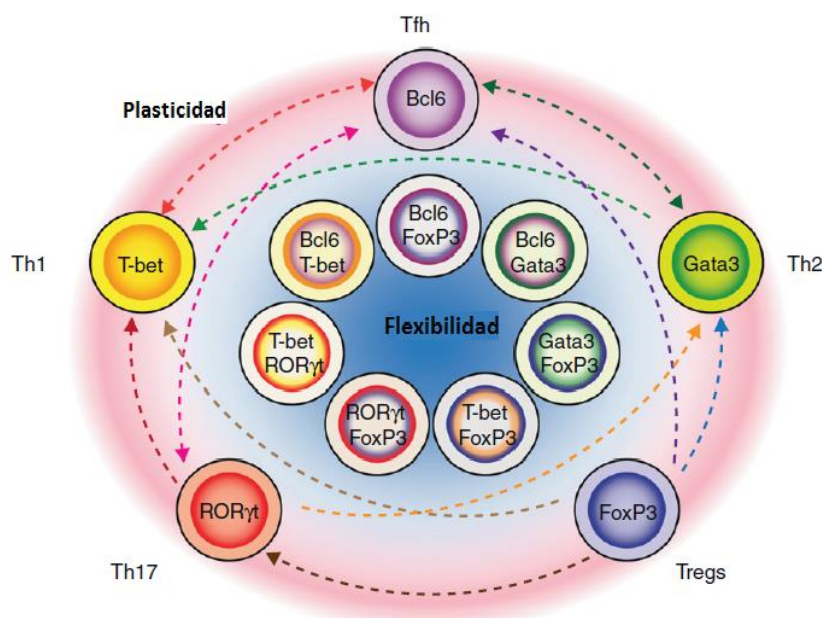
Las células Treg y Th17 comparten un linaje común, hay evidencia que sugiere que las Treg maduras pueden ser reprogramadas en células Th17 efectoras competentes, y la plasticidad del linaje de las células T puede ser un mecanismo importante por el cual se mantiene la homeostasis inmunológica (Gnerlich *et al.*, 2010).

#### **1.1.2.4 Plasticidad de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>**

Los linfocitos cooperadores son considerados heterogéneos y flexibles en sus características fenotípicas. La plasticidad se define como la habilidad de una célula T CD4<sup>+</sup> para adoptar características de otros subgrupos de linfocitos T cooperadores y podría deberse a la co-expresión de diversos factores de transcripción, citocinas y receptores quimiotácticos (Wang *et al.*, 2010).

Las citocinas como IL-12 e IL-4 fueron las primeras en ser caracterizadas en la polarización de las células Th1 y Th2, respectivamente (estableciendo que una vez polarizadas, las células ya no podrían cambiar). Sin embargo, con el paso del tiempo este concepto cambió llevando a la conclusión de que las

células se diferenciaban y adquirirían funciones flexibles. La capacidad que poseen las células T polarizadas, particularmente las Th17 y Treg para cambiar de fenotipo, reafirma la hipótesis de que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> son adaptables y pueden exhibir plasticidad fenotípica en respuesta a cambios en el ambiente, respaldando la idea de que las células T poseen una flexibilidad inherente (DuPage *et al.*, 2016).



**Figura 3.** Flexibilidad y plasticidad de los subgrupos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Modificado de Nakayama *et al.* 2012).

Se creía que las células Treg se comportaban como un fenotipo estable, pero el descubrimiento de que la diferenciación tanto de células Th17 y Treg requiere del factor de crecimiento de transformación (TGF- $\beta$ ) provee evidencia de que estos subgrupos podrían estar vinculados en su desarrollo. Las Treg pueden convertirse en células productoras de IL-17 cuando son cultivadas con IL-6 y en ausencia de TGF- $\beta$ . La habilidad paradójica de esta citocina al tener efectos opuestos en rutas similares, muestra su capacidad de inducir y suprimir inflamación en diferentes escenarios y las funciones de la misma en el desarrollo de Th17 o Treg se ven reflejadas en los factores de transcripción que controlan la divergencia de estos linajes (Zhu *et al.*, 2010).

Se dice que a altas concentraciones de TGF- $\beta$ , la función de ROR $\gamma$ t se reprime incrementando la expresión de Foxp3, mientras que a bajas concentraciones de TGF- $\beta$  las señales iniciadas por IL-6 a través del factor de transducción y activador de transcripción 3 (STAT3), llevan a la predominancia de ROR $\gamma$ t sobre Foxp3, comprometiendo el linaje hacia Th17. Al llevarse a cabo la activación de las células T en presencia

de un antígeno y su exposición a TGF- $\beta$ , éstas son inducidas a co-expresar Foxp3 y ROR $\gamma$ t. Cuando las células dendríticas son activadas por microorganismos que promueven la producción de la citocina pro-inflamatoria IL-6, la diferenciación de las células T vírgenes influida por TGF- $\beta$  es desviada de la ruta que lleva hacia las células T reguladoras y se dirige hacia la ruta de los linfocitos Th17 (Weaver *et al.*, 2009).

Existen reportes como los de Yang *et al.* y Zhou *et al.* (2008) que indican que las Treg pueden expresar a ROR $\gamma$ t y, bajo ciertas circunstancias, pueden convertirse en células efectoras productoras de IL-17. A su vez, la expresión de IL-17 dependiente de ROR $\gamma$ t puede ocurrir en presencia del factor de transcripción Foxp3, pero la concentración de éste, debe ser lo suficientemente escasa para no bloquear la función de ROR $\gamma$ t. Lo anterior sugiere que las células T tienen el potencial de desarrollarse en Treg o Th17 de acuerdo con el estímulo que reciben, lo cual es un factor crítico para mantener la homeostasis inmunológica y por lo tanto, resultan posibles blancos para modular ciertos aspectos de la respuesta inmune.

## **1.2 Caracoles *Conus***

Los caracoles de la familia Conidae son moluscos carnívoros que comprenden el género más grande de animales marinos (Wang *et al.*, 2004) y despiertan mucho interés por sus potentes venenos utilizados en la captura de sus presas (Elliger *et al.*, 2011). Las conchas de estas especies son espirales y cónicas, de donde se deriva su nombre. Existen aproximadamente 830 especies (Uribe *et al.*, 2017) en mares cálidos y océanos, principalmente en las regiones del Pacífico e Índico-oeste. En América, los caracoles cónicos se ubican principalmente en el Golfo de California, el Atlántico Mexicano y costas del Pacífico de Sudamérica (Bokor, 2012). La mayoría crecen en hábitats tropicales y subtropicales, aunque algunos se han adaptado a vivir en ambientes un poco más fríos y se encuentran a más de 10 metros de profundidad (Carreño, 2016). En sus hábitos de alimentación, son por lo general nocturnos y se nutren de poliquetos, moluscos o peces principalmente, aunque algunas especies tienen una dieta mixta (Peters *et al.*, 2013). Durante el día tienden a recorrer zonas de arrecifes y pozas de marea mientras que en las noches se ubican en sustratos arenosos o rocosos (Field *et al.*, 2010).

Estas criaturas de “movimiento lento” evolucionaron a predadores a través de la incorporación de un aparato especializado de envenenamiento, que les permite someter rápidamente a su presa. Este aparato comprende un diente hueco similar a un arpón o aguja conectado a un bulbo venenoso a través de un ducto tubular (Akondi *et al.*, 2014). Se estima que alrededor de 70,000 péptidos son producidos por las especies de *Conus* en su conjunto, pero el veneno de cada especie contiene alrededor de 200

componentes con posibles acciones farmacológicas (Nam *et al.*, 2009), los cuales afectan principalmente a los canales iónicos activados por ligandos o voltaje (Terlau *et al.*, 2004).

### 1.3 *Californiconus californicus*

*Californiconus californicus* es el único miembro del género *Californiconus* y de acuerdo a la clasificación propuesta por Puillandre *et al.* (2014), se le considera así por ser una especie única en sus características moleculares y morfológicas. El tamaño de su concha varía entre 1.5 y 3.5 cm y es endémico de la costa noreste del Pacífico (Elliger *et al.*, 2011). La mayoría de estos caracoles se encuentran distribuidos desde la bahía de San Francisco, California, E.U.A., hasta Cabo San Lucas, Baja California Sur, México, y están adaptados a vivir en aguas un poco frías. Además, poseen una dieta no especializada, ya que consumen más de 56 organismos diferentes, incluyendo una gran variedad de moluscos, poliquetos, peces y crustáceos (Bernaldez *et al.*, 2011), lo cual tiene relación con sus dientes radulares que suelen ser poco usuales (Stewart *et al.*, 2005).



**Figura 4.** Imagen de *C. californicus*. Archivo del Laboratorio de Inmunología y Biotoxinas, CICESE.

### 1.4 Conotoxinas

Los estudios sobre las características del veneno de caracoles de la familia Conidae muestran que está compuesto por una compleja mezcla de elementos, incluyendo una larga colección de péptidos neuroactivos llamados conotoxinas. Este coctel de toxinas producidas en el ducto venenoso se inyecta en la presa a través del diente radular, llevando a la parálisis instantánea para su captura, o para defenderse de sus depredadores (Wang *et al.*, 2004).

Los conopéptidos se pueden clasificar en dos categorías: el primer grupo, comprende los péptidos pobres en enlaces disulfuro y, el segundo grupo, representa la mayoría del repertorio de péptidos venenosos los cuales contienen múltiples enlaces disulfuro (conotoxinas) (Akondi *et al.*, 2014).

Las conotoxinas se componen de 10 a 40 residuos de aminoácidos (Espiritu *et al.*, 2001), y se encuentran genéticamente codificados por pequeñas proteínas que son inicialmente traducidas como precursores pre-pro-péptidos, constituidos por una secuencia señal (pre-región), seguida de una pro-región y una parte carboxilo terminal (C-terminal) que representa la región madura de la toxina. El péptido farmacológicamente activo es generado por un hidrólisis enzimática de la región C-terminal del pre-pro-péptido (Becker *et al.*, 2008).

Otra característica sobresaliente de los péptidos de los caracoles marinos es la presencia de una gran variedad de modificaciones postraduccionales, las cuales incluyen hidroxilación de prolina, carboxilación de glutamato (Buczek *et al.*, 2005), formación de enlaces disulfuro, glucosilación e inversión estereoquímica de aminoácidos específicos (Durek *et al.*, 2015). Existen evidencias que sugieren que los caracoles expresan las enzimas responsables de esas modificaciones en sus ductos venenosos (Bandyopadhyay *et al.*, 1998).

Las conotoxinas se suelen clasificar de acuerdo con características como: superfamilias de genes, marco de cisteínas y por sus efectos farmacológicos. Las superfamilias se representan por medio de una letra mayúscula, el patrón de cisteínas por números romanos y, su blanco molecular se simboliza con letras del alfabeto griego (Prashanth *et al.*, 2014). Actualmente se conocen 27 superfamilias empleadas por *Conoserver* (base de datos de toxinas aisladas de cónidos), cuya clasificación por sus patrones de cisteínas, considera el número de cisteínas en el péptido, su patrón y su conectividad dentro de su estructura (Bokor, 2012).

Los blancos moleculares de las conotoxinas son diversos e incluyen una gama de canales iónicos activados por voltaje o por ligandos, receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y transportadores de neurotransmisores. Por lo tanto, los venenos son una excelente fuente de herramientas potenciales en la investigación biomédica para la producción de nuevos fármacos, debido a que los canales iónicos están involucrados en diversas funciones fisiológicas (Robinson *et al.*, 2014) y, gracias a la variabilidad en las secuencias de los péptidos de caracoles, las conotoxinas se convierten en candidatos importantes para actuar sobre los canales presentes en las células como las T reguladoras y Th17.



## 1.5 Canales iónicos

Los canales iónicos son proteínas transmembranales que facilitan la difusión rápida de iones, como  $K^+$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Na^+$ , conectando el citosol con el exterior de la célula. Algunos canales se abren y cierran de acuerdo con el cambio en el potencial de membrana (canales dependientes de voltaje) o en respuesta a ligandos específicos (canales dependientes de ligandos) (Feske *et al.*, 2013).

Los canales dependientes de voltaje forman parte de una familia de canales que median la conductancia de iones en respuesta a un cambio en el potencial de membrana. La membrana plasmática de toda célula excitable, contiene canales que son muy selectivos para cada ion y son responsables de generar potenciales de acción (Terlau *et al.*, 2004).

Por otro lado, los canales iónicos dependientes de ligando se abren en respuesta a la unión de moléculas o neurotransmisores. Este mecanismo se debe a la interacción de una sustancia química con un receptor y cambia la conformación de la proteína abriendo el canal. Muchos receptores de neurotransmisores funcionan como canales de iones de  $Na^+$ ,  $K^+$  o  $Ca^{+2}$  dependientes de ligandos. Los más estudiados son los receptores nicotínicos de acetilcolina.

Los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) son una familia de canales iónicos de estructura pentamérica, que incluyen subunidades  $\alpha 1$  a  $\alpha 10$ ,  $\beta 1$  a  $\beta 4$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  (Wang *et al.*, 2010), y cuentan con una amplia distribución en las células del sistema nervioso y el sistema inmunológico (Vetter *et al.*, 2012). Este receptor es uno de los canales dependientes de ligando más estudiados, debido a la disponibilidad de un gran número de proteínas y moléculas pequeñas que sirven como sondas específicas para estos canales (Cartier *et al.*, 1996). Su ligando, la acetilcolina (ACh), se une al interior de la estructura a las subunidades alfa, acción que modifica su posición y provoca la dilatación y apertura de los poros. Finalmente, la acetilcolina se disocia con rapidez y se inactiva y con ello el receptor recupera su capacidad funcional (Albuquerque *et al.*, 2009).

Los venenos de los caracoles son una fuente rica en péptidos con gran afinidad a varios canales dependientes de voltaje y ligando, incluyendo los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) (Dutertre *et al.*, 2007). Dada su importancia en diversos procesos biológicos, se ha estudiado la acción de diferentes toxinas sobre estas estructuras membranales.

## 2. Antecedentes

Debido a un proceso evolutivo de selección, los venenos de animales y plantas contienen toxinas que pueden alterar el funcionamiento de diversos canales iónicos, entre otras acciones pueden provocar parálisis, fallas respiratorias y muerte en sus presas y depredadores. Las toxinas derivadas de péptidos de víboras, escorpiones, arañas, anémonas marinas y caracoles han sido utilizadas para investigar la estructura y función de los canales iónicos y para el diseño de medicamentos (Zhao *et al.*, 2015). Los canales iónicos de varios tipos de células, como las del músculo liso o cardiaco y neuronas, son ejemplos claros de blancos potenciales para muchos fármacos utilizados en terapias, como: anestésicos locales, sedantes, agentes antiarrítmicos y vasodilatadores (Krasznai, 2005).

Las células T expresan canales iónicos, objeto de muchas investigaciones, ya que proveen diversas formas de manipular la función de estas células y, por lo tanto, la respuesta inmune. Aunque la importancia de varios canales iónicos y transportadores para la función de las células T efectoras es bien conocido, las formas por las cuales varios mecanismos de transporte iónicos interactúan unos con otros, para generar una respuesta celular de la manera más adecuada en función de su reto antigénico, aun no se comprende del todo. Se sugiere que las interacciones entre varios mecanismos de transporte iónico pueden ayudar a generar rutas de transducción de señales complejas (Feske *et al.*, 2013), lo que repercutiría en distintos procesos como diferenciación, proliferación, producción de citocinas e inclusive apoptosis de las células involucradas en la respuesta inmunológica.

Algunos canales presentes en los linfocitos T importantes para diversas funciones de los mismos, como su homeostasis y activación, son: canales de potasio (Kv1.3 y KCa3.1) y los canales activados por la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  (CRAC), entre otros. Cabe mencionar que los canales de potasio son muy importantes para regular la señalización de  $\text{Ca}^{+2}$  requerida para la activación del linfocito, al mantener el balance entre la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  y salida de  $\text{K}^{+}$  (Chi *et al.*, 2012).

El  $\text{Ca}^{+2}$  se encuentra de forma natural en reservorios intracelulares, sin embargo su concentración algunas veces no es suficiente para llevar a cabo la activación del linfocito, por ello ocurre la despolarización de la membrana para propiciar la entrada de calcio del medio externo (Gallo *et al.*, 2006), seguido de la activación del TCR por el antígeno, permitiendo al factor nuclear de células T activadas (NFAT) translocarse al núcleo e iniciar la transcripción (Cahalan *et al.*, 2009), llevando a la activación y función efectora de las células T (Omilusik *et al.*, 2013).

Se aisló una toxina con posible potencial inmunorregulador del veneno de una anémona del caribe, *Stichodactyla helianthus*, que produce una gran cantidad de proteínas citolíticas y numerosos péptidos que bloquean canales iónicos. El primer péptido bloqueador de canales iónicos aislado fue un bloqueador del canal de sodio ( $\text{Na}^+$ ) (ShN), compuesto por 48 residuos de aminoácidos con tres enlaces disulfuro. Posteriormente otro componente del veneno fue aislado y caracterizado. Este péptido de 35 residuos, la toxina ShK, también contiene tres enlaces disulfuro y fue considerado la primer toxina derivada de una anémona bloqueadora de canales iónicos de  $\text{K}^+$ . La síntesis química de ShK y su caracterización, identificaron una potente actividad bloqueadora del péptido sobre canales Kv1.3, y se le considera el responsable de controlar el potencial de membrana cuando estas células han terminado de diferenciarse en células T efectoras de memoria, además de presentar un importante rol en enfermedades autoinmunes; por ello es considerado un blanco importante en el desarrollo farmacéutico (Pennington *et al.*, 2015).

Por otra parte, se sabe que los linfocitos T tienen otro tipo de canales iónicos activados por ligando, los nAChR, implicados en su activación y en la modulación de la apoptosis (De Rosa *et al.*, 2009); también juegan un papel importante en la secreción de anticuerpos por parte de los linfocitos B, la síntesis de citocinas inflamatorias en macrófagos (Wang *et al.*, 2004) y la endocitosis y expresión de moléculas coestimuladoras en las células dendríticas (Wang *et al.*, 2010).

Con base en lo anterior y dada la importancia que representan, se han llevado a cabo diversas investigaciones con la finalidad de encontrar moléculas moduladoras de los nAChR, principalmente en venenos de distintas especies de caracoles *Conus*. Cartier *et al.* (1996) lograron aislar un péptido de 16 aminoácidos a partir del veneno del caracol *C. magus*, el cual tiene una gran capacidad de bloquear los receptores de acetilcolina, compuestos de subunidades  $\alpha_3\beta_2$ . El péptido fue nombrado como  $\alpha$ -MII, y fue identificado electrofisiológicamente en receptores expresados en ovocitos de ranas. Este trabajo proporciona una muestra de la existencia de toxinas específicas para bloquear nAChR mediante las diferentes subunidades que los componen.

Dutertre *et al.* (2007) descubrieron una nueva conotoxina ( $\alpha$ -conotoxina TxIA) proveniente de la especie *C. textile*; su caracterización demostró que posee una alta afinidad por proteínas de unión a acetilcolina (AChBP) (estas estructuras comparten ciertas similitudes con los dominios de unión a ligando de los nAChR) de diferentes especies, así como cierta selectividad a algunos subtipos de nAChR.  $\alpha$ -TxIA presentaba una gran afinidad por algunos nAChR de mamíferos al observar que, concentraciones nanomolares de dicha conotoxina, eran suficientes para inhibir la subunidad  $\alpha_3\beta_2$  de nAChR. Finalmente,

establecieron que el estudio de esta toxina podría ser utilizada como marco de referencia para el posterior aislamiento de nuevas  $\alpha$ -conotoxinas de algunos venenos.

Gilly *et al.* (2011) aislaron dos nuevas conotoxinas a partir del veneno de *C. californicus*: Cal12a y Cal12b. Ambas conotoxinas fueron identificadas como  $\mu$ -conotoxinas, compuestas por 45 aminoácidos con 8 residuos de cisteínas, en el marco de referencia 12. Se demostró que tanto Cal12a como Cal12b, bloquean reversiblemente los canales de  $\text{Na}^+$  en neuronas, pero no tuvieron ningún efecto en canales de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{K}^+$  (Essack *et al.*, 2012).

Por otro lado, Bernaldez *et al.* (2011) aislaron la toxina CalTx del veneno de *C. californicus*. Esta conotoxina se compone por 13 aminoácidos con un arreglo de cuatro residuos de cisteínas. Al contrario de las toxinas aisladas ese mismo año, Cal12a y Cal12b, las cuales no tuvieron efecto sobre los canales de calcio, CalTx sí presentó un bloqueo reversible en la corriente de  $\text{Ca}^{+2}$  en neuronas de ratas tratadas con 20  $\mu\text{M}$  de CalTx (Essack *et al.*, 2012).

La presencia de los nAChR ha sido reportada en macrófagos, células del sistema nervioso y en linfocitos T, por lo que Cervantes-Luévano (2013) realizó estudios en macrófagos utilizando toxinas aisladas del veneno de *C. californicus* y encontró que ccj4 (cal14.2b) y ccj5 (cal14.2c) favorecen la producción de citocinas proinflamatorias, mientras que ccj2 (cal14.1b) presentó efectos antiinflamatorios, lo cual la hace un potencial candidato en el tratamiento de dolor y otras enfermedades inflamatorias. Es importante mencionar que el bloqueo de un nAChR podría tener distintas consecuencias a partir de la célula inmune que se trate y de la subunidad del receptor que se encuentre implicada.

Se ha descrito que los receptores nicotínicos, al mediar la entrada y salida de iones, tienen fuertes implicaciones en la activación y diferenciación de las células T, favoreciendo la polarización de los linfocitos  $\text{CD4}^+$  hacia los linajes Th1, Th2, Th17 (Qian *et al.*, 2011) y se ha comprobado que los nAChR también forman parte de los linfocitos T reguladores (Wang *et al.*, 2010).

De acuerdo con lo anterior es importante mencionar que gracias a la plasticidad de las células T, en especial de los linfocitos Th17 y Treg, es importante buscar inmunorreguladores que actúen a través de canales iónicos para moldear estos fenotipos y adaptar sus funciones en distintos ambientes, inflamatorios como reguladores y, por lo tanto, combatir diversos padecimientos.

### 3. Justificación

La diversidad de vida en los océanos ofrece una de las más grandes colecciones de productos naturales que pueden ser explotados como agentes terapéuticos, sin embargo esa fuente sigue sin ser explorada. Con un estimado de más de 200,000 especies de animales y plantas y millones de microorganismos, los productos naturales marinos son casi ilimitados (National Research Council, Committee on the Ocean's Role in Human Health, 1999).

Debido a que las conotoxinas poseen características como la especificidad por sus blancos moleculares y facilidad de síntesis química, han sido utilizadas como herramientas para modular la función de distintas células animales, lo que las convierte en moléculas prometedoras para llevar a cabo intervenciones terapéuticas en distintas patologías.

Los linfocitos T representan factores flexibles importantes para la regulación de la respuesta inmunológica. Por lo tanto, encontrar moléculas inmunomoduladoras capaces de aprovechar esta plasticidad celular resulta relevante para tratar diferentes patologías. Las conotoxinas son moléculas candidatas para este propósito al regular canales iónicos presentes en las células T, acción que tiene importantes implicaciones en su diferenciación y proliferación.

## 4. Hipótesis

Las toxinas de *Californiconus californicus* de la superfamilia J<sub>2</sub> afectan la polarización de los linfocitos T reguladores y Th17.

## 5. Objetivos

### 5.1 Objetivo General

- Evaluar el efecto de las toxinas de *Californiconus californicus* de la superfamilia J<sub>2</sub> en la diferenciación de los linfocitos T reguladores y Th17.

### 5.2. Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de toxinas de *C. californicus* en la proliferación de linfocitos T.
2. Evaluar el efecto de toxinas de *C. californicus* en la polarización de los linfocitos T reguladores y Th17, mediante la expresión de citocinas y proteínas membranales.
3. Establecer el efecto de las toxinas de *C. californicus* en relación con el tiempo de incubación de los linfocitos.

## Capítulo II

---

### 6. Metodología

El trabajo experimental para cumplir con los objetivos planteados se llevó a cabo de la siguiente manera (Figura 5):

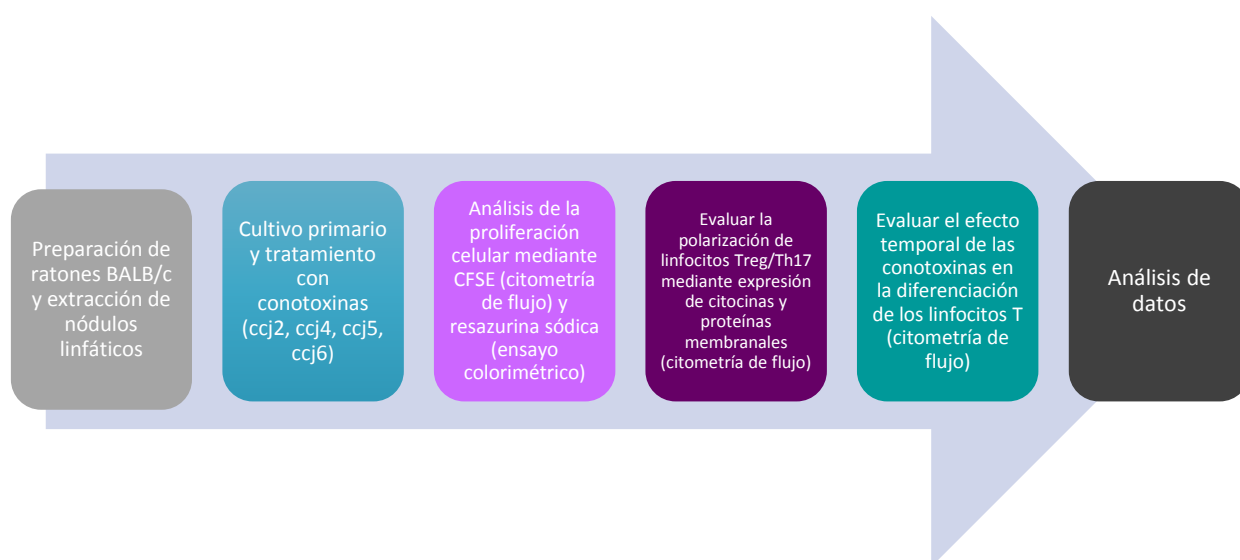


Figura 5. Esquema general de la metodología del proyecto.

#### 6.1 Toxinas

Se utilizaron cuatro toxinas de la especie *Californiconus californicus* (Tabla 1) para llevar a cabo los experimentos correspondientes a los objetivos propuestos. De acuerdo con la clasificación de las conotoxinas por su patrón de cisteínas y blancos moleculares, éstas pertenecen a la superfamilia J<sub>2</sub> y presentan el marco de cisteínas #XIV, con los receptores nicotínicos de acetilcolina como blancos moleculares. Esas toxinas fueron sintetizadas por el laboratorio “pepMic” en China. Se conservaron liofilizadas a una temperatura de -80°C, o a -20°C cuando su manipulación era constante. Para su utilización en el tratamiento de células cultivadas se resuspendieron en agua destilada estéril. El rango de concentración utilizado fue entre 0.5 µM y 5.5 µM de acuerdo con un trabajo previo en el que se evaluó la acción de otras conotoxinas sobre la respuesta pro y anti inflamatoria de una línea celular tipo macrófago (Cervantes-Luévano, 2013). En este trabajo se utilizaron toxinas del mismo laboratorio y con

las mismas características fisicoquímicas, pero de dos lotes diferentes (1 y 2) que se adquirieron en diferentes fechas, aspecto relevante en la secciones de resultados y discusión.

**Tabla 1.** Características de toxinas de *Californiconus californicus*: nombre, secuencia de aminoácidos y masa molecular.

Nombre de laboratorio	Conotoxina	Secuencia de aminoácidos	Masa molecular
ccj2	cal14.1b	GDCPPWCVGARCRAKGC	1775.10
ccj4	cal14.2b	RECPPTSHCNAGTC	1828.07
ccj5	cal14.2c	RDCPPWCPTSHCNAGTC	1844.07
ccj6	cal14b	RQCPPWCSGEPCKGTC	1904.22

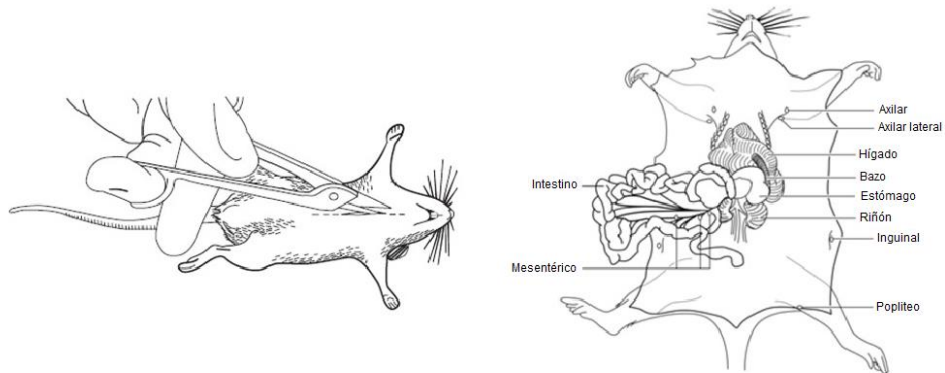
## 6.2 Animales

Se utilizaron ratones macho de la cepa BALB/c de entre 6-8 semanas de edad. Se mantuvieron en jaulas, en una habitación especializada, en condiciones controladas de temperatura (24°C), periodos de luz/oscuridad de 12 horas cada uno y se les proporcionó alimento y agua *ad libitum*. Los ratones se sacrificaron de la siguiente manera: se administró una dosis de pentobarbital sódico (Dohéthal) (40-70 mg/Kg) y, después de que el anestésico hizo efecto, se sacrificaron mediante dislocación cervical, de acuerdo con los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

## 6.3 Extracción de órganos y cultivo celular

Para realizar el cultivo celular se extrajeron los ganglios linfáticos inguinales, axilares y mesentéricos de los ratones.



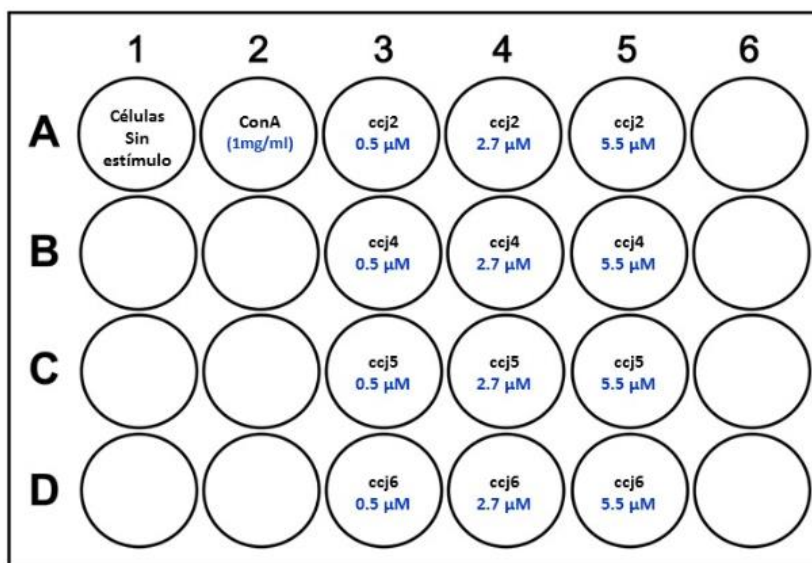


**Figura 6.** Disección del ratón para extracción de ganglios linfáticos inguinales, axilares y mesentéricos (Modificado de Coligan *et al.*, 2011).

Una vez sacrificado el ratón, se colocó sobre su espalda en un lugar seco y limpio para realizar la disección y se roció con alcohol al 70% para esterilizar y reducir la posibilidad de contaminación. Se hizo una incisión en la línea media con ayuda de unas tijeras, y se removió la piel hacia los costados para remover los ganglios linfáticos (**Figura 6**). Éstos fueron colocados en 0.5 ml de colagenasa (370 ul/ml) (enzima utilizada para degradar el tejido celular y obtener el mayor número de células posible) (Anexo A.3) durante una hora a una temperatura 37 °C, y una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Para completar la disgregación de los ganglios, se realizó un proceso de maceración de los mismos a través de un método mecánico: con una jeringa de 3 ml se obtuvo la solución de colagenasa con los ganglios y se virtió a través de la aguja (calibre 20G) en un tubo de 2 ml, esta acción se repitió tres veces. Posteriormente la solución se filtró (Falcon con poros de 70 µm). El filtro se lavó con 1 ml de solución de Hanks 1x y con otro mililitro se resuspendió el contenido del tubo con la mezcla de colagenasa y células. El procedimiento de maceración con la aguja se realizó dos veces; la mezcla se centrifugó a 302 g (Centrífuga Haraeus Multifuge 1 S-R) durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se decantó, se resuspendió y se agregó 1 ml de solución de Hanks 1x para hacer una tinción con azul de tripán (0.4%) (Sigma-Aldrich) a una dilución 1:10. Las células se contaron con la ayuda de un hematocitómetro y un microscopio compuesto, con esos datos y la dilución se estimó el número de células por ml.

En una placa de 24 pozos se distribuyeron 2.5 millones de células en cada pozo y se les añadió 1 ml de medio RPMI 1640 (Corning) suplementado con antibiótico y antimicótico al 1% y con suero fetal bovino al 5% (Gibco). Finalmente se añadieron las conotoxinas a evaluar: cal14.1b (ccj2), cal14.2b (ccj4),

cal14.2c (ccj5), cal14b (ccj6), cada una a tres concentraciones distintas (0.5  $\mu\text{M}$ , 2.7  $\mu\text{M}$  y 5.5  $\mu\text{M}$ ). Al mismo tiempo, se utilizaron otras células tratadas con 5  $\mu\text{l}$  de Concanavalina A (1 mg/ml) (Sigma-Aldrich) como control positivo. Otro grupo de células que no recibió ningún estímulo, se utilizó como control negativo. La placa se incubó durante 4 días a una temperatura de 37  $^{\circ}\text{C}$  y una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$  (Figura 7).



**Figura 7.** Diseño experimental de cultivo de células de ganglios de ratón en placa de 24 pozos. Células sin estimular, concanavalina A (Con A), toxinas ccj2, ccj4, ccj5 y ccj6 a concentraciones de 0.5, 2.7 y 5.5  $\mu\text{M}$ .

Dado que las citocinas se detectan en el interior de la célula, se realizó un proceso importante para retener la mayor cantidad de estas proteínas en el retículo endoplásmico. Para tal efecto, cuatro horas antes de finalizar el periodo de incubación, se añadieron 5  $\mu\text{l}$  de Brefeldina A (1 mg/ml) (Sigma-Aldrich) (Anexo A.3) a cada pozo.

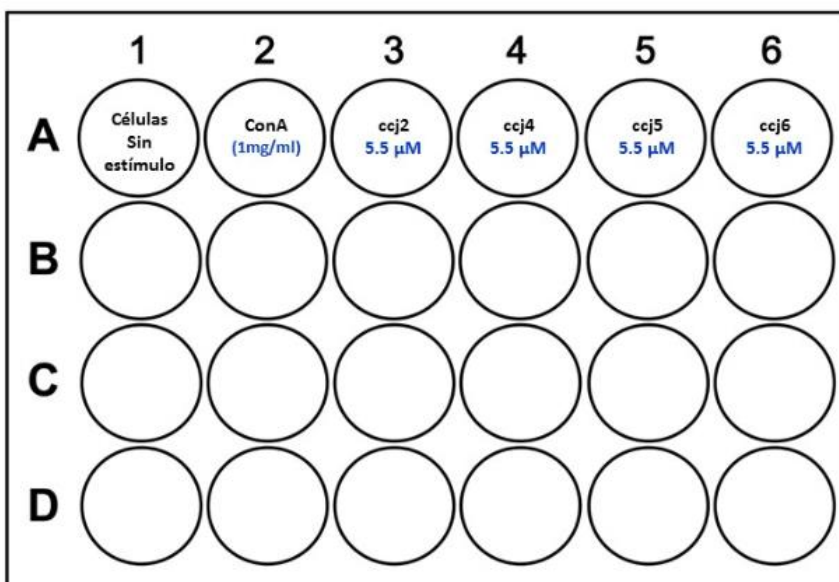
#### 6.4 Proliferación celular

La evaluación de la proliferación celular se llevó a cabo mediante dos técnicas diferentes: la primera, utilizando un colorante fluorescente, la carboxifluoresceína (CFSE) (Life Technologies) (Anexo A.3), que atraviesa la membrana celular y se adhiere a las proteínas citoplasmáticas, en cada división celular la fluorescencia se reparte en las células hijas, disminuyendo la intensidad en las generaciones sucesivas, dicha fluorescencia se evalúa con un citómetro de flujo. La segunda a través de un ensayo colorimétrico

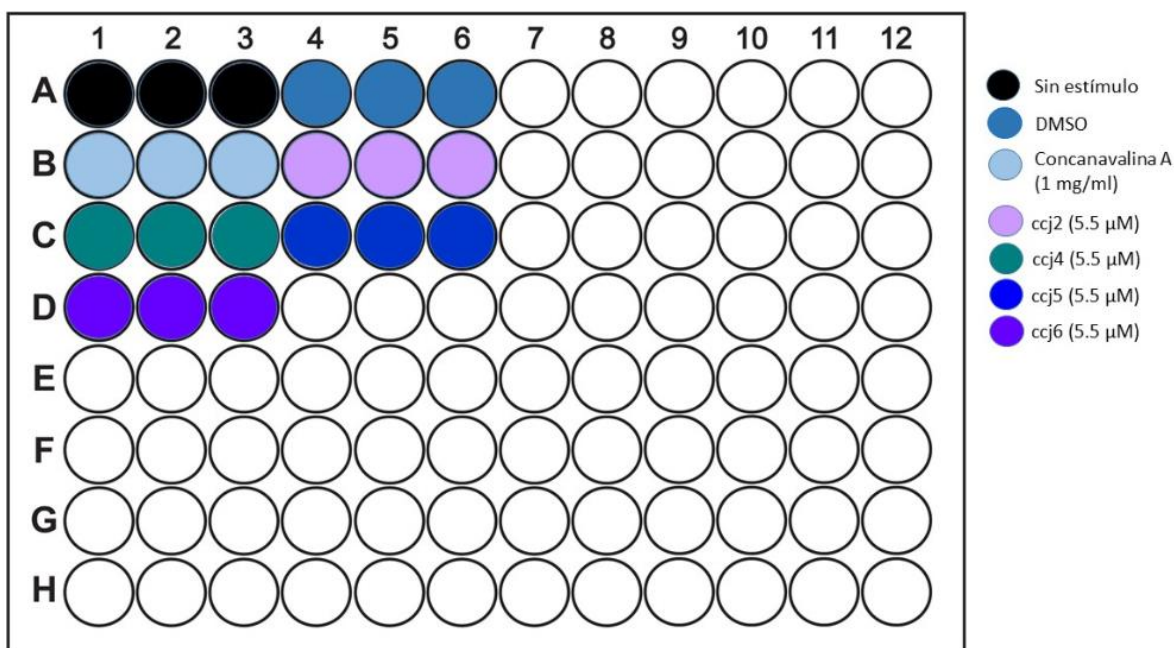
con una sal, la resazurina sódica (Sigma-Aldrich) (Anexo A.3), que experimenta un cambio de color por las reacciones óxido-reducción, derivadas del metabolismo celular.

Para el ensayo de proliferación con CFSE, se colocó una placa de 24 pozos adicional con las condiciones de cultivo señaladas en la **Figura 8**, pero añadiendo a cada pozo 0.5  $\mu$ l de CFSE (dilución 1:10) por cada millón de células y se incubó a una temperatura de 37°C y una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante cuatro días. Finalizado el tiempo de incubación se hizo una tinción con anticuerpos correspondientes a las poblaciones de linfocitos T de interés y la proliferación se evaluó de acuerdo con la fluorescencia del CFSE mediante citometría de flujo (Anexo A.2).

El ensayo colorimétrico para determinar la proliferación con resazurina sódica se realizó en una placa de 96 pozos en la cual se cultivaron 200,000 células/pozo en un volumen final de 200  $\mu$ l y con las siguientes condiciones: células sin ningún estímulo como control, células con concanavalina A (Con A) (1 mg/ml) como control positivo, células con dimetilsulfóxido (DMSO) (20  $\mu$ l por pozo) (Sigma-Aldrich) como control de muerte celular y células con las cuatro conotoxinas a evaluar, es decir, cal14.1b (ccj2), cal14.2b (ccj4), cal14.2c (ccj5), cal14b (ccj6) a una concentración de 5.5  $\mu$ M cada una y se añadieron 20  $\mu$ l (dilución 1:64) de resazurina sódica a todos los pozos. Cada parámetro a evaluar se hizo por triplicado como se muestra en la **Figura 9**. La placa se incubó por un periodo de cuatro días y se evaluó la absorbancia en un lector de placas (Epoch, BioTek) a 570 y 600 nm.



**Figura 8.** Diseño experimental de cultivo de células de ganglios de ratón en placa de 24 pozos para evaluar proliferación celular por tinción con CFSE. Células sin estimular, concanavalina A (Con A), toxinas ccj2, ccj4, ccj5 y ccj6 a una concentración de 5.5  $\mu$ M.



**Figura 9.** Diseño experimental para evaluar la proliferación celular con la sal resazurina sódica en placa de 96 pozos. Células sin estimular, dimetilsulfóxido (DMSO), concanavalina A (Con A) y toxinas ccj2, ccj4, ccj5 y ccj6 a una concentración de 5.5  $\mu$ M; cada estímulo fue analizado por triplicado.

### **6.5 Detección de poblaciones celulares (linfocitos Treg/Th17) por citometría de flujo**

Los linfocitos T tienen características fenotípicas particulares que se pueden evaluar mediante citometría de flujo. Esta técnica se utilizó para detectar la presencia de las poblaciones celulares de linfocitos T CD4<sup>+</sup> del subtipo Th17 y Treg en las células obtenidas de ganglios de ratón, tratadas con conotoxinas. Se utilizó un kit fenotípico de ratón para detección de Treg (MACS Miltenyi Biotec) que contiene un coctel de anticuerpos fluorescentes específicos para CD4 y Foxp3, además de la utilización de otros anticuerpos necesarios como anti-IL10 (BioLegend) y anti-CD3, anti-IL17 (BioSciences) para la identificación de Th17.

Una vez concluido el tiempo de incubación, el sobrenadante se retiró de cada pozo y se centrifugó a 302 *g* durante 10 minutos para conservarlo y almacenarlo a -80°C. A continuación las células fueron cosechadas. El proceso se realizó raspando el fondo de cada pozo con una punta de una micropipeta de forma vertical, horizontal, diagonal y por las paredes del mismo, de tal manera que se desprendiera el mayor número de células posible; cada pozo se lavó con 1 ml de solución salina de Hanks 1x (Gibco) y se repitió el procedimiento. Una vez cosechadas las células se centrifugaron a 302 *g* por 10 minutos.

Al finalizar la centrifugación, se decantó cada uno de los tubos, se resuspendió y se midió el volumen restante para repartirlo en dos tubos: un negativo y otro para tinción con anticuerpos. A los tubos para tinción se les añadieron los anticuerpos extracelulares: 25 µl de anti-CD3 (dilución 1:400) y 2 µl de anti-CD4; se incubó durante 15 minutos en la oscuridad. Se lavó cada tubo con 500 µl de solución de Hanks 1x y se centrifugaron a 250 *g* por cinco minutos. Posteriormente se decantaron, se resuspendió el volumen restante, se agregaron 100 µl de solución fijación/permeabilización del kit para detección de Treg y se incubó durante 30 minutos en la oscuridad.

Se llevó a cabo un lavado de los tubos con solución amortiguadora de permeabilización 1x (kit para detección de Treg) y se centrifugaron a 250 *g* durante cinco minutos, y cada uno se decantó, resuspendió y se le añadieron los siguientes anticuerpos intracelulares: anti-Foxp3 (2 µl), anti-IL10 (25 µl a partir de una dilución 1:400) y anti-IL17 (25 µl de una dilución 1:400). Se incubaron por 25 minutos en la oscuridad. Posteriormente se hizo un lavado con 500 µl de solución permwash a todos los tubos y se centrifugaron a 250 *g* durante cinco minutos; se decantaron los tubos, se resuspendieron y se les adicionaron 500 µl de paraformaldehído al 4% (PFA) (Sigma-Aldrich) (Anexo A.3) para fijar las células y proceder a su análisis con el citómetro de flujo (Attune<sup>®</sup> Acoustic Focusing Cytometer).

### **6.6 Detección de poblaciones celulares (Th17/Treg) con respecto al tiempo**

A través de la técnica de citometría de flujo se analizaron los marcadores de membrana, factores de transcripción y citocinas correspondientes a linfocitos Treg y Th17 para determinar el efecto de las toxinas en la polarización de dichas poblaciones celulares con respecto al tiempo de incubación, es decir, a los 0, 1, 2, 3 y 4 días.

### **6.7 Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados por medio de una prueba de ANOVA de una vía con post test de Dunnett. Se consideró el valor de  $P < 0.05$  como significativo. El análisis se llevó a cabo con ayuda del software GraphPad Prism 5.01.

## Capítulo III

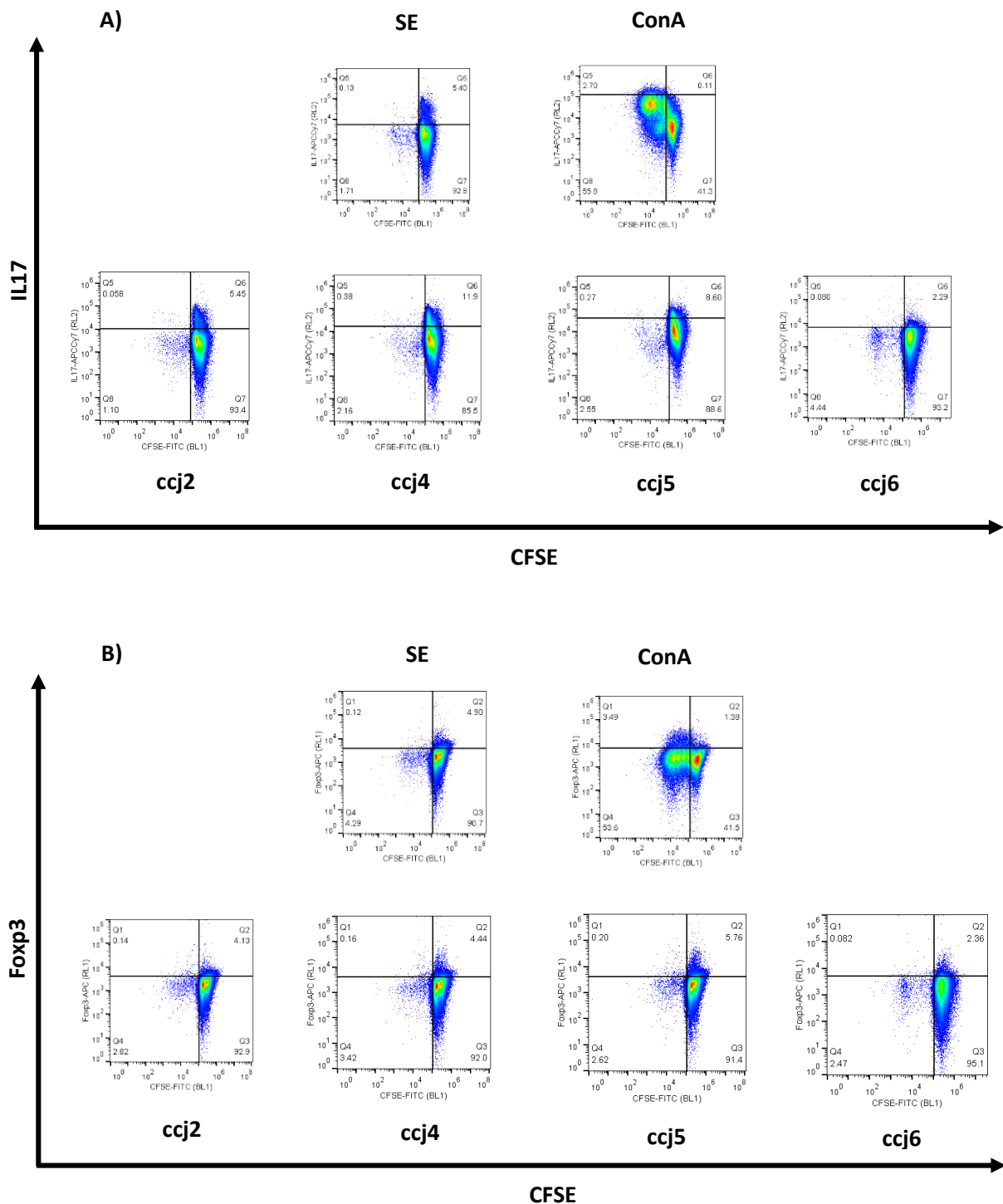
---

### 7. Resultados

En este trabajo se evaluó la acción de cuatro toxinas sintéticas de la familia  $J_2$  del caracol marino *Californiconus californicus* en algunas funciones fisiológicas como la proliferación y la diferenciación de los linfocitos T reguladores y Th17, dos poblaciones celulares involucradas en varios aspectos de la inmunidad innata y adaptativa. La intención de este trabajo es encontrar potenciales moléculas inmunomoduladoras para contrarrestar diversas patologías asociadas al sistema inmunológico.

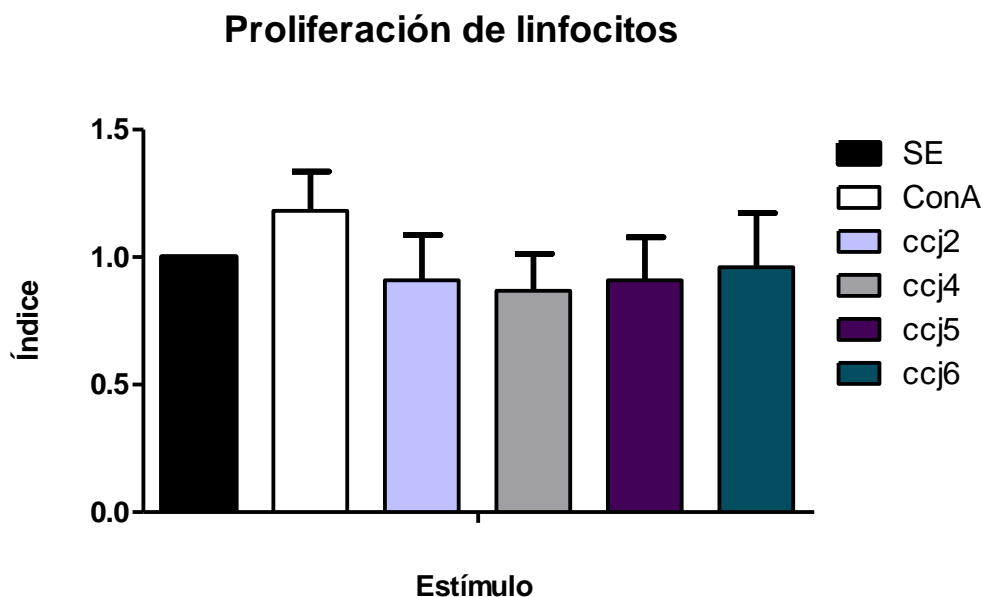
#### 7.1 Efecto de las toxinas de *C. californicus* en la proliferación de linfocitos Treg/Th17

En primera instancia se evaluó la acción de estas conotoxinas en la proliferación de linfocitos mediante dos metodologías. La primera consistió en teñir las células con carboxifluoresceína (CFSE) y la segunda, mediante cambios de coloración de la sal resazurina sódica, inducidas por reacciones óxido-reducción. Las células se trataron con una concentración de 5.5  $\mu$ M de las toxinas ccj2, ccj4, ccj5 y ccj6. De acuerdo con la evidencia que arroja la CFSE en tres experimentos independientes, las toxinas no afectaron la proliferación de ninguna de las dos poblaciones evaluadas (**Figura 10**), ya que al analizar la fluorescencia mediante citometría de flujo no se detectó división de células tratadas con las toxinas en el cuarto día de cultivo, mientras que para el caso de las células tratadas con el control positivo (Con A) sí se presentaron varias generaciones celulares, lo que confirma que las toxinas no afectaron la proliferación. En el caso de la tinción con resazurina sódica tampoco se observaron efectos de las toxinas en la proliferación de los linfocitos como se muestra en la **Figura 11**. Ambas estrategias experimentales indican que las conotoxinas no afectan la proliferación celular de los linfocitos Th17 y Treg.



**Figura 10.** Efecto de cuatro toxinas de *C. californicus* en la proliferación de linfocitos Th17 y Treg, evaluado por la incorporación de CFSE. Análisis mediante citometría de flujo de la proliferación de linfocitos. A) Expresión de Foxp3 respecto a la CFSE. B) Expresión de IL17 respecto a la CFSE. Citograma representativo de tres experimentos individuales. Células sin estímulo (SE), concanavalina A (Con A) y conotoxinas: ccj2, ccj4, ccj5 y ccj6 a una concentración de 5.5  $\mu$ M.



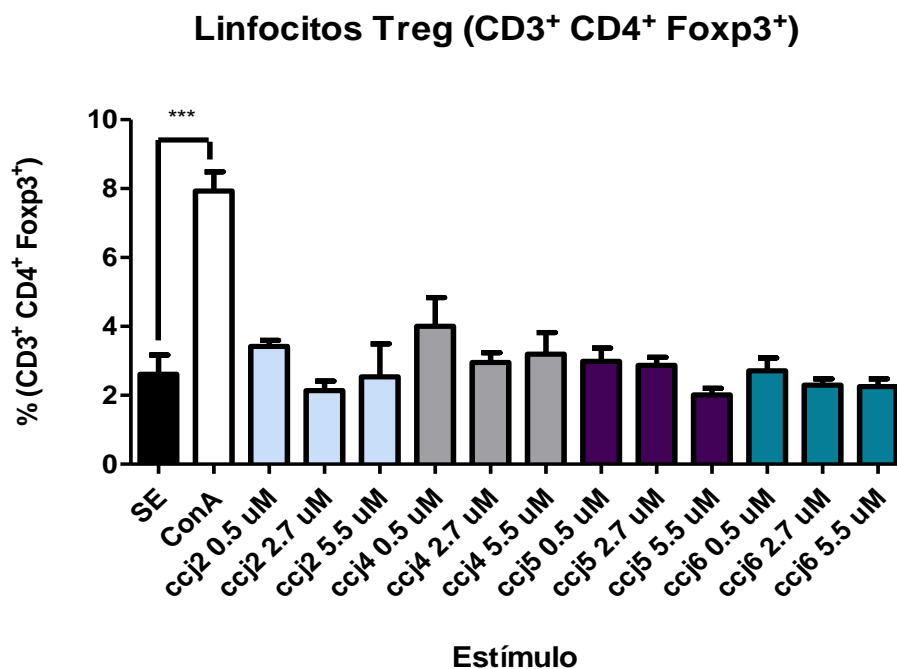


**Figura 11.** Efecto de cuatro toxinas de *C. californicus* en la proliferación de linfocitos mediante reacciones de óxido-reducción. Ensayo colorimétrico evaluado mediante espectrofotometría a 570 y 600 nm. Los resultados se muestran como índice de proliferación y representan la media de tres experimentos independientes. Células sin estímulo (SE), concanavalina A (Con A) y toxinas: ccj2, ccj4, ccj5 y ccj6 a una concentración de 5.5  $\mu$ M.

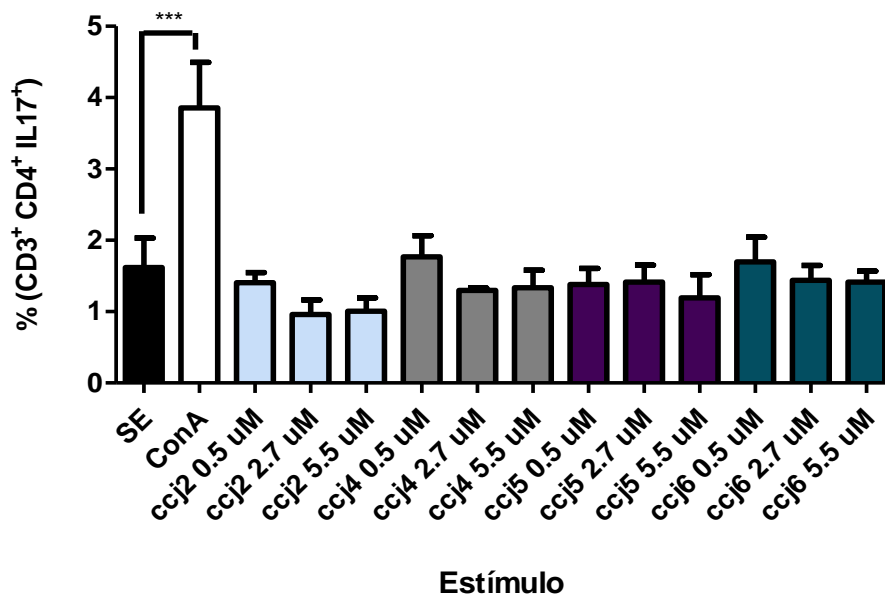
## 7.2 Efecto de las toxinas de *C. californicus* en la diferenciación de linfocitos Treg/Th17

Para cumplir el objetivo de evaluar el efecto de las toxinas de *C. californiconus* en la polarización de los linfocitos Treg/Th17, se realizaron cultivos primarios con células de ganglios linfáticos, tratadas con cuatro conotoxinas (ccj2, ccj4, ccj5 y ccj6) durante periodos de incubación de tres y cuatro días para identificar mediante citometría de flujo la expresión de proteínas membranales (CD3 y CD4) y citoplasmáticas (Foxp3 para identificar linfocitos Treg e IL17 para identificar linfocitos Th17).

Se realizaron tres experimentos independientes para determinar el efecto de las conotoxinas a tres concentraciones distintas (0.5, 2.7, 5.5  $\mu$ M) en la diferenciación de los linfocitos Treg y Th17. Se incubaron las células durante tres días con las condiciones antes mencionadas (**Figura 7**) añadiendo concanavalina A (Con A) como control positivo y células sin estimular como control negativo. Los resultados indican que, en estos periodos de incubación y con el tratamiento de conotoxinas del lote 1, no hubo ningún cambio significativo asociado al tratamiento con conotoxinas para Treg (**Figura 12A**) o para Th17 (**Figura 12B**).



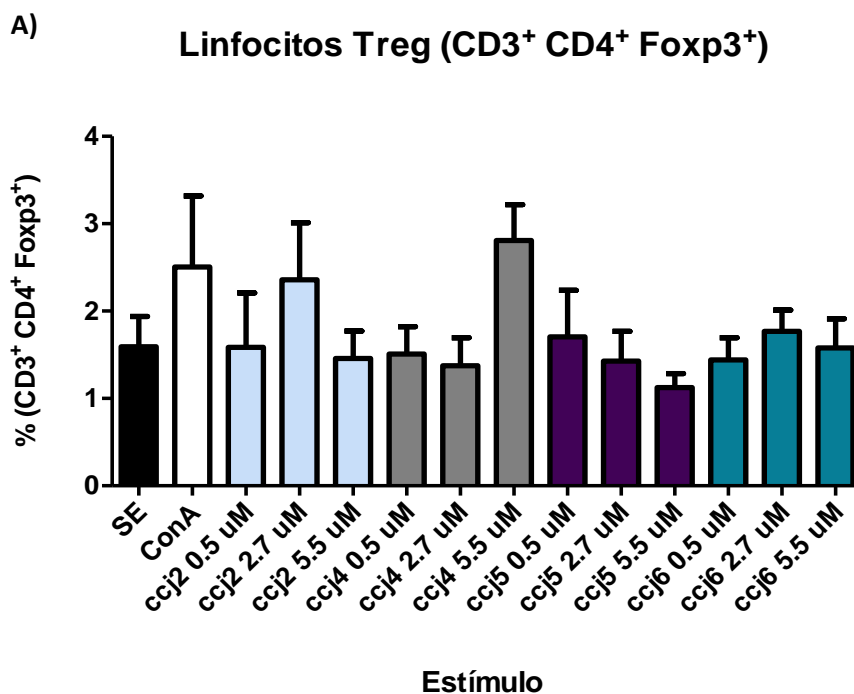
**B) Linfocitos Th17 (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> IL17<sup>+</sup>)**

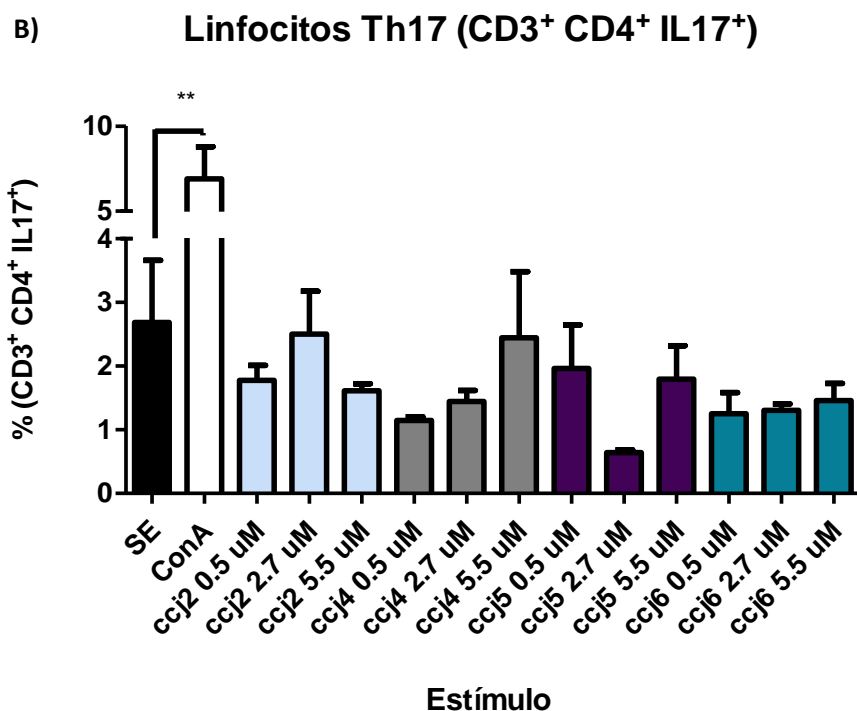


**Figura 12.** Efecto de conotoxinas de *C. californicus* en la diferenciación de linfocitos al tercer día de cultivo, evaluado mediante citometría de flujo. A) Diferenciación de linfocitos Treg. B) Diferenciación de linfocitos Th17. Gráficas de barras representativas de tres experimentos independientes. Células sin estímulo (SE), concanavalina A (Con A) y toxinas (ccj2, ccj4, ccj5, ccj6) a tres concentraciones (0.5  $\mu$ M, 2.7  $\mu$ M, 5.5  $\mu$ M). Prueba estadística ANOVA, post test Dunnett. Los cambios estadísticamente significativos se muestran con asterisco (\*\*\*) ( $p < 0.05$ ).

Posteriormente se realizaron otros tres experimentos que consistieron en cultivar las células tratadas con las mismas concentraciones de conotoxinas, pero en esta ocasión durante cuatro días. Los resultados indican que, como en las células tratadas y cultivadas tres días, en este caso tampoco hubo cambios significativos en la diferenciación de las poblaciones celulares evaluadas (**Figura13**).

Los resultados antes mencionados indican que las toxinas correspondientes al lote 1, no tienen ningún efecto en la diferenciación de linfocitos Treg y Th17 en el tercer y cuarto día de cultivo.

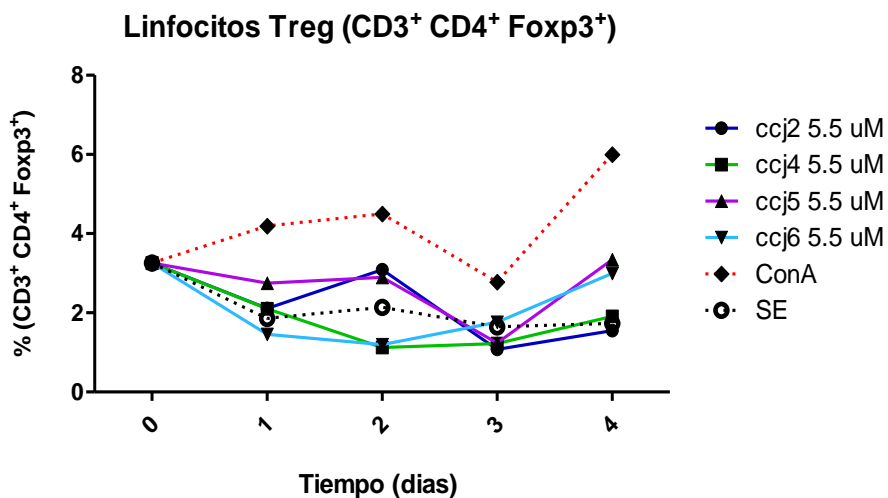




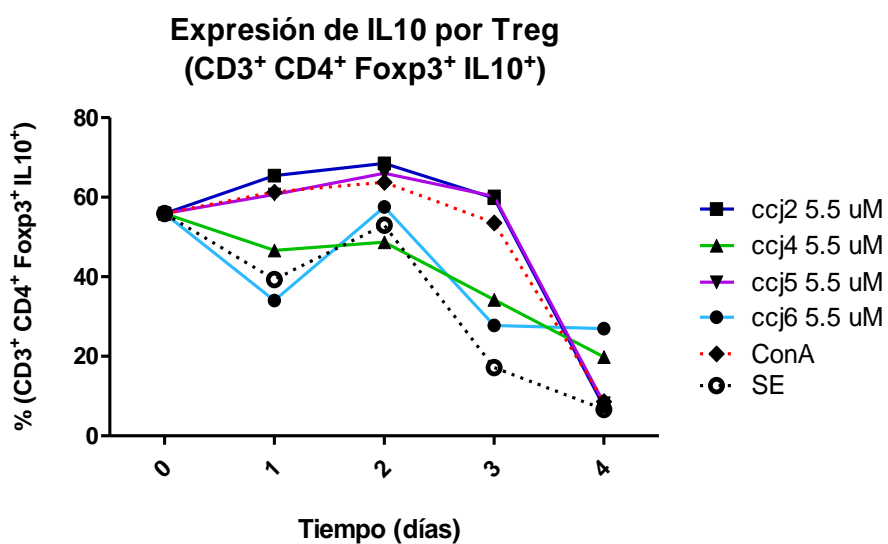
**Figura13.** Efecto de conotoxinas de *C. californicus* en la diferenciación de linfocitos al cuarto día de cultivo, evaluado mediante citometría de flujo. A) Diferenciación de linfocitos Treg. B) Diferenciación de linfocitos Th17. Gráficas de barras representativas de tres experimentos independientes. Células sin estímulo (SE), concanavalina A (Con A) y toxinas (ccj2, ccj4, ccj5, ccj6) a tres concentraciones (0.5  $\mu$ M, 2.7  $\mu$ M, 5.5  $\mu$ M). Prueba estadística ANOVA, post test Dunnett. Los cambios estadísticamente significativos se muestran con asterisco (\*\* $p < 0.05$ ).

### 7.3 Efecto de las toxinas de *C. californicus* en la diferenciación de linfocitos Treg/Th17 con respecto al tiempo

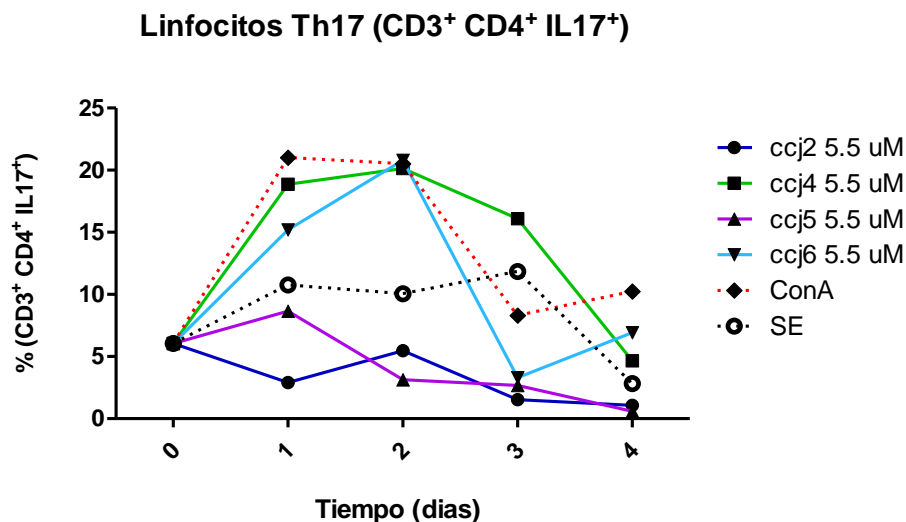
Para cumplir con el tercer objetivo, se realizaron tres experimentos independientes para determinar, mediante citometría de flujo, el efecto de las conotoxinas (ccj2, ccj4, ccj5, ccj6 a una concentración de 5.5  $\mu$ M cada una) a los 0, 1, 2, 3 y 4 días de incubación en la polarización de los linfocitos T reguladores y Th17. En las figuras 11, 12 y 13, se muestran las gráficas que expresan el porcentaje de Treg (**Figura 14**), la expresión de IL10 por parte de los linfocitos Treg (**Figura 15**) y Th17 (**Figura 16**) de células tratadas y no tratadas durante los cuatro días de cultivo. Es importante mencionar que en estos experimentos se utilizaron las toxinas del lote 2.



**Figura 14.** Efecto de conotoxinas de *C. californicus* en la diferenciación de linfocitos Treg, evaluada mediante citometría de flujo. Cinética de expresión de proteínas asociadas a Treg (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>) durante cuatro días de cultivo. Los datos representan la media de tres experimentos independientes. Células sin estímulo (SE), concanavalina A, toxinas ccj2, ccj4, ccj5 y ccj6 a una concentración de 5.5  $\mu$ M.

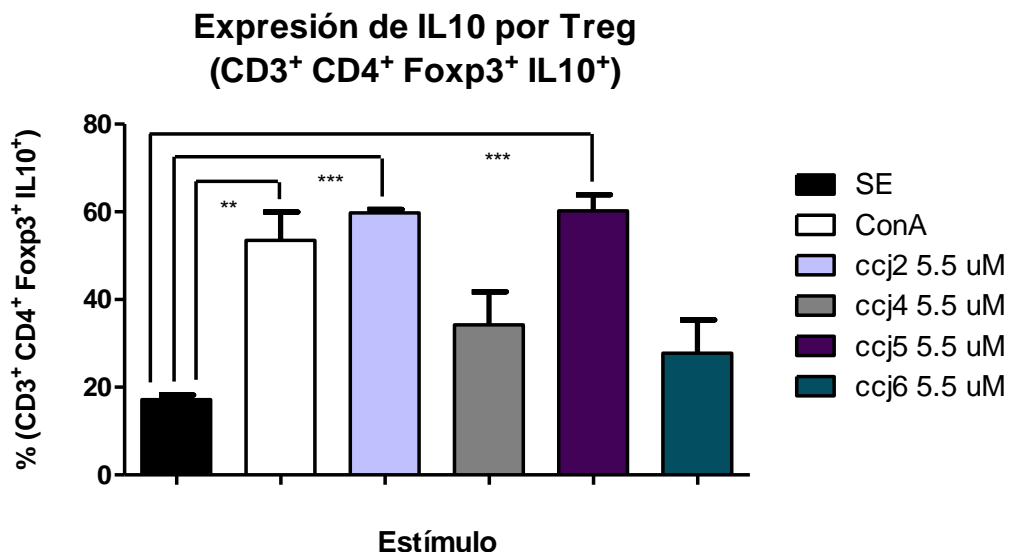


**Figura 15.** Efecto de conotoxinas de *C. californicus* en la expresión de IL10 por parte de los linfocitos Treg, evaluada mediante citometría de flujo. Cinética de expresión de IL10 por parte de los linfocitos Treg (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup>) durante cuatro días de cultivo. Los datos representan la media de tres experimentos independientes. Células sin estímulo (SE), concanavalina A, toxinas ccj2, ccj4, ccj5 y ccj6 a una concentración de 5.5  $\mu$ M.

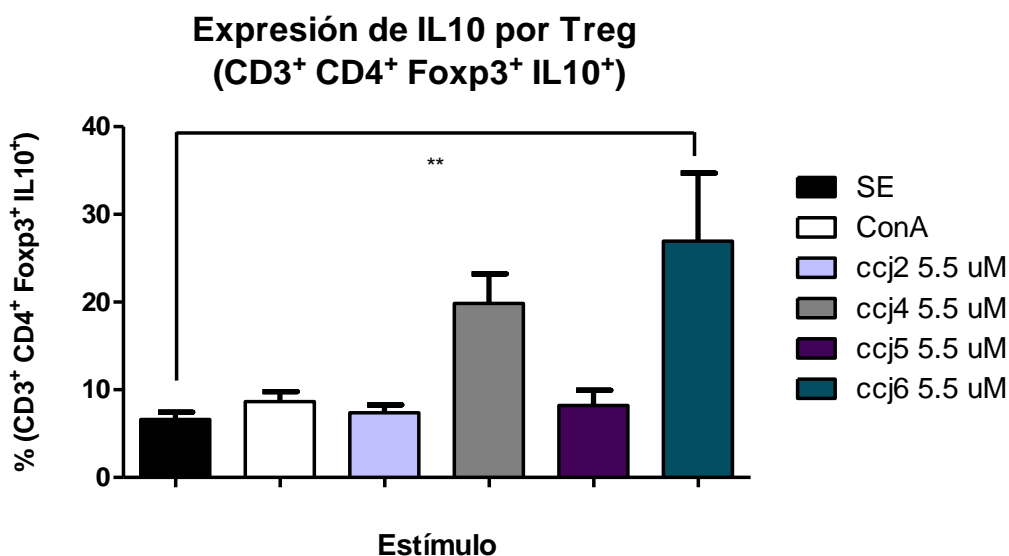


**Figura 16.** Efecto de conotoxinas de *C. californicus* en la diferenciación de linfocitos Th17, evaluada mediante citometría de flujo. Cinética de expresión de proteínas asociadas a Th17 (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> IL17<sup>+</sup>) durante cuatro días de cultivo. Los datos representan la media de tres experimentos independientes. Células sin estímulo (SE), concanavalina A (Con A), toxinas ccj2, ccj4, ccj5 y ccj6 a una concentración de 5.5  $\mu$ M.

Después del análisis estadístico de los datos generados en cada día de cultivo durante la cinética, no hubo ningún cambio significativo en la diferenciación de linfocitos Treg en las células tratadas. Al analizar la expresión de IL10 por parte de los linfocitos Treg, se encontró que durante el tercer día de cultivo hubo un incremento en la expresión de IL10 en células tratadas con ccj2 y ccj5 (**Figura 17**), mientras que durante el cuarto día, se obtuvo un aumento en la expresión de esta citocina por efecto de ccj6 (**Figura 18**). Durante el primer y segundo día de cultivo no se observaron cambios.

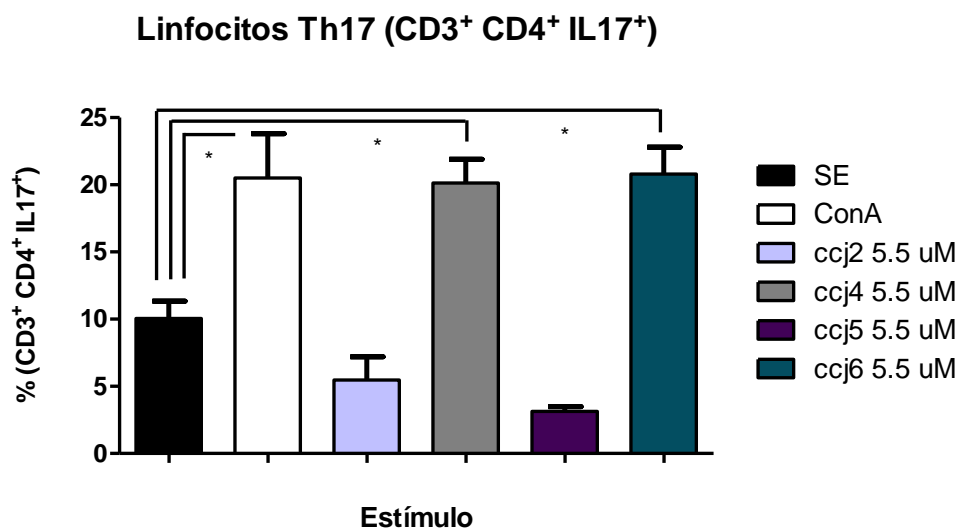


**Figura 17.** Efecto de conotoxinas de *C. californicus* en la expresión de IL10 por parte de linfocitos Treg al tercer día de cultivo, evaluada mediante citometría de flujo. Gráficas de barras representativas de tres experimentos independientes. Células sin estímulo (SE), concanavalina A (Con A), toxinas ccj2, ccj4, ccj5 y ccj6 a una concentración de 5.5  $\mu$ M. Prueba estadística ANOVA, post test Dunnett. Los cambios estadísticamente significativos se muestran con asterisco (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).



**Figura 18.** Efecto de conotoxinas de *C. californicus* en la expresión de IL10 por parte de los linfocitos Treg al cuarto día de cultivo, evaluada mediante citometría de flujo. Gráficas de barras representativas de tres experimentos independientes. Células sin estímulo (SE), concanavalina A (Con A), toxinas ccj2, ccj4, ccj5 y ccj6 a una concentración de 5.5  $\mu$ M. Prueba estadística ANOVA, post test Dunnett. Los cambios estadísticamente significativos se muestran con asterisco (\*\* $p < 0.01$ ).

El efecto del tratamiento de las células con las conotoxinas en la diferenciación de los linfocitos Th17 indicó que, durante el segundo día, el porcentaje de esa población celular se incrementa de forma significativa al ser incubada con las toxinas ccj4 y ccj6. Los resultados se muestran en la **Figura 19**. Durante los demás días de cultivo, no se encontraron cambios significativos.



**Figura 19.** Efecto de conotoxinas de *C. californicus* en la diferenciación de linfocitos Th17 en el segundo día de cultivo, evaluado mediante citometría de flujo. Gráficas de barras representativas de tres experimentos independientes. Células sin estímulo (SE), concanavalina A (Con A), toxinas ccj2, ccj4, ccj5 y ccj6 a una concentración de 5.5  $\mu$ M. Prueba estadística ANOVA, post test Dunnett. Los cambios estadísticamente significativos se muestran con asterisco (\* $p < 0.05$ ).



## Capítulo IV

---

### 8. Discusión

La búsqueda de moléculas inmunomoduladoras es un campo de actividad científica intensa. Recurrir a organismos como escorpiones, anémonas y caracoles es una estrategia que pretende aprovechar la evolución de estos organismos en un entorno en el que presas y predadores compiten por los recursos mediante diversas estrategias de defensa y ataque. Esta interacción ha generado una extensa gama de productos biológicos con posibles aplicaciones en la biomedicina. Sus venenos, por ejemplo, son una fuente de posibles fármacos dada su versatilidad y especificidad en el reconocimiento de blancos moleculares. En este trabajo se evaluó el efecto de cuatro toxinas sintéticas del caracol marino *Californiconus californicus* en la diferenciación de linfocitos T reguladores y Th17, así como la proliferación de los mismos. Los hallazgos resultan relevantes para una posible modulación de aspectos particulares de la respuesta inmunológica.

La proliferación celular es un proceso importante en el desarrollo de los linfocitos T e implica cambios en la expresión de diversas moléculas en la superficie y la secreción de citocinas. Los procesos de proliferación y diferenciación pueden presentarse simultáneamente o puede predominar uno sobre el otro, en función de factores en el microambiente como la presencia de otras células, la cantidad de antígenos y de citocinas. La proliferación de los linfocitos T está mediada principalmente por señales provenientes del receptor del antígeno, señales coestimuladoras y factores de crecimiento como la IL2. En la primera fase del trabajo que consistió en evaluar la proliferación celular, el resultado de ambas estrategias experimentales indicó que ninguna de las cuatro conotoxinas afectan la proliferación de estas subpoblaciones celulares (**Figura 10 y Figura 11**). Este efecto nulo puede deberse a que las subunidades de las que se compone el blanco farmacológico probable de estas conotoxinas, los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR), no estén presentes en la mayoría de las células tratadas. En un trabajo en el que la proliferación tampoco se alteró, De Rosa *et al.* (2005) realizaron un ensayo colorimétrico para determinar si el ligando de los nAChR, la nicotina, tendría un efecto mitogénico en linfocitos T y no encontraron cambios significativos en el número de células expuestas a concentraciones de 10 y 100  $\mu\text{M}$  de nicotina. Otra posibilidad que explica el efecto de las toxinas en la proliferación, es que los linfocitos Treg estén estimulados por las mismas toxinas para que lleven a cabo acciones supresoras que impidan la división celular de otros linfocitos. En ese sentido, existen distintas evidencias de que los nAChR, canales iónicos activados por ligandos que permiten el flujo de iones como el calcio, están implicados en procesos

como activación, apoptosis, producción de citocinas y proliferación de diversas células como los linfocitos B, macrófagos, dendríticas, neutrófilos y linfocitos T (De Jonge y Ulloa, 2007); también se ha reportado que las células Treg expresan la subunidad  $\alpha 7$  en los nAChR y que la estimulación con su ligando potencia la actividad supresora de estas células, evitando la proliferación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> *in vitro* (Wang *et al.*, 2010). Por lo anterior, y considerando la posibilidad de que las conotoxinas estimulen específicamente la subunidad  $\alpha 7$  del nAChR, cabe la suposición de que los linfocitos Treg inhiban la proliferación de los linfocitos Th17 y, por esta razón, no se observe ningún cambio en la proliferación de las poblaciones celulares evaluadas.

Después de evaluar la proliferación, se procedió a analizar el efecto de las conotoxinas en la polarización de los linfocitos T reguladores y Th17. En un inicio se propuso realizar estos ensayos a los tres y cuatro días de cultivo, tiempo que requieren los linfocitos para activarse y diferenciarse, con tres concentraciones diferentes: 0.5, 2.7 y 5.5  $\mu$ M. Una vez finalizado el tiempo de cultivo, se realizó un marcaje con anticuerpos monoclonales de las células tratadas para identificar a los linfocitos Treg (anti-CD3, anti-CD4, anti-Foxp3), la expresión de IL10 por linfocitos Treg (anti-CD3, anti-CD4, anti-Foxp3, anti-IL10) y a los linfocitos Th17 (anti-CD3, anti-CD4, anti-IL17). Para determinar el porcentaje de las células Treg y Th17, se hizo el análisis multiparamétrico correspondiente y se seleccionaron los eventos (células) positivos para el marcaje específico de cada población (Anexo A.2). De acuerdo con los resultados, estas conotoxinas (pertenecientes al lote 1), a las concentraciones utilizadas, no tuvieron efecto en la polarización de estas subpoblaciones de linfocitos (**Figura 12 y Figura13**).

Ante este panorama, se buscaron posibles explicaciones. En primer lugar se pensó en la velocidad de acción del veneno de los caracoles en su presas y, por ende, en la rapidez del reconocimiento entre el receptor y su ligando, interacciones que suelen darse en unos cuantos segundos. En segundo lugar, se consideraron experiencias del grupo de trabajo que realiza otros proyectos con conotoxinas en los que se presentaron resultados dispares en función de la fecha de adquisición de estos péptidos sintéticos. Se coincide en que los procesos de manejo y almacenaje de las toxinas podrían influir en su estructura y estabilidad en diferentes ensayos biológicos. Tomando juntos estos factores, se decidió llevar a cabo dos acciones. La primera fue la utilización de toxinas de reciente adquisición (lote 2) para su evaluación en el cultivo celular. Y la segunda, fue la realización de una cinética para determinar el efecto de las conotoxinas desde el tiempo cero hasta los cuatro días de cultivo, haciendo un análisis cada 24 horas. En estos experimentos se encontraron dos fenómenos interesantes: dos de las toxinas, ccj2 y ccj5, indujeron la expresión de IL10, una citocina con funciones supresoras y antiinflamatorias por parte de los linfocitos

Treg al tercer día (**Figura 17**), y ccj6 al cuarto día (**Figura 18**); mientras que las toxinas ccj4 y ccj6 indujeron la expresión de la IL17 en el segundo día de cultivo (**Figura 19**), citocina con la capacidad de reclutar otros leucocitos, lo que le da propiedades proinflamatorias. Llama la atención que, de acuerdo con los resultados, la conotoxina ccj6 induce la expresión de las dos citocinas con funciones opuestas. Este hallazgo coincide con un trabajo previo en el que utilizaron una línea celular de macrófagos, y se demostró que ccj2 induce la producción de citocinas antiinflamatorias, mientras que ccj4 y ccj5 promueve un perfil proinflamatorio (Cervantes-Luévano, 2013). Esta coincidencia puede sugerir programas compartidos de señalización intracelular y genéticos en macrófagos y linfocitos que, a su vez, sugieren la acción de las conotoxinas en un posible blanco molecular compartido.

Otro hallazgo importante en este trabajo fue que las conotoxinas (ccj2, ccj5 y ccj6) indujeron la producción de IL10 por parte de los linfocitos Treg, sin embargo no afectaron su diferenciación, lo que indica que la unión de la toxina a los nAChR presentes en estas células, afecta vías de señalización que contribuyen a que los linfocitos lleven a cabo sus acciones antiinflamatorias y de regulación a través de la secreción de citocinas. La importancia de la IL10 radica en que actúa inhibiendo la activación de células dendríticas, monocitos, macrófagos y linfocitos T cooperadores, así como la producción de citocinas inflamatorias por parte de estas poblaciones celulares. A su vez, induce el reclutamiento, proliferación y actividad citotóxica de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, y también estimula la viabilidad y sobrevivencia de los linfocitos B (Li y He, 2004), contribuyendo así al equilibrio del sistema inmune del hospedero. Debido a sus efectos antiinflamatorios, el tratamiento con IL10 es estudiada como posible terapia contra enfermedades como psoriasis, esclerosis múltiple, artritis reumatoide y colitis (Pérez-Fernández y Kaski, 2002); además, presenta propiedades antitumorales por su capacidad para disminuir la síntesis del VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), una proteína importante en la vasculogénesis y angiogénesis asociadas con células cancerosas. La IL10 resulta así una molécula candidata cuyos efectos pueden contribuir a la eliminación de células malignas (Bhattacharjee *et al.*, 2016).

Por otro lado, gracias a sus propiedades proinflamatorias, los linfocitos Th17 promueven la defensa contra agentes infecciosos, incluyendo algunas bacterias, hongos, virus y protozoarios, y son particularmente importantes en mantener la barrera inmunitaria en las superficies mucosas, como el intestino, los pulmones y la piel. Se considera que esta población celular también presenta acciones antitumorales y el efecto de la IL17 se ha asociado con la producción de quimiocinas como CXCL9 y CXCL10 por parte de las células cancerosas, lo que promueve la migración de células T efectoras al microambiente tumoral para suprimir el desarrollo de las células malignas (Zou y Restifo, 2010).

Los resultados del efecto de las conotoxinas indican que no afectan la proliferación de los linfocitos, pero sí inducen la producción de IL10, por parte de las Treg, y favorecen la diferenciación de los linfocitos Th17. Estos hallazgos duales pueden indicar que las subunidades que forman los blancos moleculares de las conotoxinas, los nAChR, pueden variar en relación con el estado ontogénico de los linfocitos. Es decir, que algunas subunidades, importantes para la interacción con las conotoxinas, están presentes en los linfocitos antes de que adquieran un compromiso fenotípico particular, pero ausentes en un estado pre-proliferativo. Es importante resaltar que los linfocitos Treg y Th17 comparten un origen común, sin embargo, en algunos escenarios sus funciones efectoras resultan antagonistas. Su modulación es importante para mantener la homeostasis del organismo y, a su vez, combatir patologías que se caractericen por un desequilibrio en estas funciones recíprocas.

En conjunto, este trabajo sugiere que algunas conotoxinas pueden modular funciones efectoras de los linfocitos T, fenómeno que, de confirmarse con otros experimentos que complementen los resultados aquí presentados, señalaría a estos péptidos de origen marino como candidatos farmacológicos que regulen procesos fundamentales de la respuesta inmunológica.

## Capítulo V

---

### 9. Conclusiones

- Las cuatro conotoxinas de la superfamilia J<sub>2</sub> de *Californiconus californicus* no tuvieron efecto en la proliferación de linfocitos T reguladores ni en los linfocitos Th17 evaluados mediante dos estrategias experimentales.
- Las conotoxinas ccj4 (cal14.2b) y ccj6 (cal14b) indujeron la diferenciación de linfocitos Th17 durante el segundo día de cultivo.
- Las conotoxinas ccj2 (cal14.1b) y ccj5 (cal14.2c) incrementaron la expresión de IL10 por parte de los linfocitos T reguladores durante el tercer día de cultivo, mientras que ccj6 (cal14b) incrementó la expresión de IL10 durante el cuarto día de cultivo.
- Las conotoxinas son moléculas candidatas para modular las funciones efectoras de los linfocitos T en particular y de la respuesta inmunológica en general.

### 10. Perspectivas

- Realizar experimentos *in vitro* para comprobar el efecto de las conotoxinas en otras poblaciones celulares (ej: Linfocitos T CD8<sup>+</sup>, linfocitos B, macrófagos).
- Corroborar la presencia de los nAChR en los linfocitos T reguladores y Th17.
- Realizar ensayos *in vivo* para determinar el efecto de las conotoxinas.

## Literatura citada

- Abbas, A., Litchman, A., Pillal, S. (2012). *Cellular and molecular immunology*. Philadelphia, PA. USA: Elsevier.
- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., Nalbant, A. (2016). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 8551(January), 1–14. <http://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>
- Akondi, K. B., Muttenthaler, M., Kaas, Q., Craik, D. J., Lewis, R. J., Alewood, P. F. (2014). Discovery , Synthesis , and Structure – Activity Relationships of Conotoxins. *Chemical Reviews*, (114), 5815–5847.
- Albuquerque, E. X., Pereira, E. F. R., Alkondon, M., Rogers, S. W. (2009). Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function. *Physiology Reviews*, 89(1), 73–120. <http://doi.org/10.1152/physrev.00015.2008>.
- Arnold, K. B., Szeto, G. L., Alter, G., Irvine, D. J., Lauffenburger, D. a. (2015). CD4+ T Cell-Dependent and -Independent Cytokine/Chemokine Network Changes in Immune Responses of HIV-infected Individuals, 8(399), 1–15.
- Awasthi, A., Murugaiyan, G., Kuchroo, V. K. (2008). Interplay between effector Th17 and regulatory T cells. *Journal of Clinical Immunology*, 28(6), 660–670. <http://doi.org/10.1007/s10875-008-9239-7>
- Bandyopadhyay, P. K., Colledge, C. J., Walker, C. S., Zhou, L. M., Hillyard, D. R., Olivera, B. M. (1998). Conantokin-G precursor and its role in gamma-carboxylation by a vitamin K-dependent carboxylase from a *Conus* snail. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(10), 5447–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9488665>
- Barrera Ramírez, L., Drago Serrano, M., Zamora, A., Gómez Arroyo, F., Sainz Espuñes, T., Mendoza Pérez, F. (2004). Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 42-55.
- Becker, S., Terlau, H. (2008). Toxins from cone snails: Properties, applications and biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(1), 1–9. <http://doi.org/10.1007/s00253-008-1385-6>
- Bernaldez, J., López, O., Licea, A., Salceda, E., Arellano, R. O., Vega, R., Soto, E. (2011). Electrophysiological characterization of a novel small peptide from the venom of *Conus californicus* that targets voltage-gated neuronal Ca<sup>2+</sup> channels. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, 57(1), 60–7. <http://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.09.015>
- Beyer, M., Schultze, J. L. (2006). Review article Regulatory T cells in cancer. *Blood*, 108(3), 804–811. <http://doi.org/10.1182/blood-2006-02-002774>.Supported
- Bhattacharjee, H. K., Bansal, V. K., Nepal, B., Srivastava, S., Dinda, A. K., Misra, M. C. (2016). Is Interleukin 10 (IL10) Expression in Breast Cancer a Marker of Poor Prognosis? *Indian Journal of Surgical Oncology*, 7(3), 320–325. <http://doi.org/10.1007/s13193-016-0512-6>
- Bi, Y., Liu, G., Yang, R. (2006). Th17 Cell Induction and Immune Regulatory Effects. *Journal of Cellular Physiology*, 211, 273–278. <http://doi.org/10.1002/JCP>
- Bokor, G. (2012). Conotoxins: Potential Weapons from the Sea. *Journal of Bioterrorism & Biodefense*, 3(3), 3–6. <http://doi.org/10.4172/2157-2526.1000120>

- Bonilla, F. a., Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 SUPPL. 2), S33–S40. <http://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017>
- Buczek, O., Bulaj, G., Olivera, B. M. (2005). Conotoxins and the posttranslational modification of secreted gene products. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(24), 3067–3079. <http://doi.org/10.1007/s00018-005-5283-0>
- Cahalan, M. D., Chandy, K. G. (2009). The functional network of ion channels in T lymphocytes. *Immunol Rev*, 231(1), 59–87. <http://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00816.x>
- Carreño Hernández, Y. K. (2016). *Propiedades moduladoras del veneno de Conus ximenes y C. californicus en la respuesta inflamatoria de fibroblastos dérmicos en un modelo in vitro de fotoenvejecimiento*. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.
- Carroll, M. C. (2004). The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nature Immunology*, 5(10), 981–986. <http://doi.org/10.1038/ni1113>
- Cartier, G. E., Yoshikami, D., Gray, W. R., Luo, S., Olivera, B. M., McIntosh, J. M. (1996). A new alpha-conotoxin which targets alpha3beta2 nicotinic acetylcholine receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(13), 7522–7528. <http://doi.org/10.1074/jbc.271.13.7522>
- Cervantes-Luévano, K. (2013). *Aislamiento y caracterización de péptidos inmunomoduladores presentes en el veneno de caracoles marinos del género Conus*. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.
- Chen, J., Li, J., Gao, H., Wang, C., Luo, J., Lv, Z., Li, X. (2012). Comprehensive evaluation of different t-helper cell subsets differentiation and function in rheumatoid arthritis. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012. <http://doi.org/10.1155/2012/535361>
- Chen, X., Oppenheim, J. J. (2014). Th17 cells and Tregs: unlikely allies. *Journal of Leukocyte Biology*, 95(May), 723–731. <http://doi.org/10.1189/jlb.1213633>
- Chen, Z., Lin, F., Gao, Y., Li, Z., Zhang, J., Xing, Y., Li, B. (2011). FOXP3 and RORyt: Transcriptional regulation of Treg and Th17. *International Immunopharmacology*, 11(5), 536–542. <http://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.11.008>
- Chi, V., Pennington, M. W., Norton, R. S., Tarcha, E. J., Londono, L. M., Sims-Fahey, B., Chandy, K. G. (2012). Development of a sea anemone toxin as an immunomodulator for therapy of autoimmune diseases. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 59(4), 529–46. <http://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.07.016>
- Coligan, J., Bierer, B., Margulies, D., Shevach, E. M., Strober, W. (2011). *Current Protocols in Immunology*. *Current Protocols in Immunology*. John Wiley & Sons, Inc. <http://doi.org/10.1002/0471142735>
- Dang, E. V., Barbi, J., Yang, H. Y., Jinasena, D., Yu, H., Zheng, Y., Pan, F. (2011). Control of TH17/Treg balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell*, 146(5), 772–784. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.033>
- De Jonge, W. J., Ulloa, L. (2007). The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. *British Journal of Pharmacology*, 151(7), 915–29. <http://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707264>
- De Rosa, M. J., Dionisio, L., Agriello, E., Bouzat, C., Esandi, M. D. C. (2009). Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor modulates lymphocyte activation. *Life Sciences*, 85(11–12), 444–449. <http://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.07.010>
- Dranoff, G. (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 4(1), 11–

22. <http://doi.org/10.1038/nrc1252>
- DuPage, M., Bluestone, J. a. (2016). Harnessing the plasticity of CD4(+) T cells to treat immune-mediated disease. *Nat Rev Immunol*, 16(3), 149–163. <http://doi.org/10.1038/nri.2015.18>
- Durek, T., Craik, D. J. (2015). Therapeutic conotoxins: a US patent literature survey. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 3776(February), 1–15. <http://doi.org/10.1517/13543776.2015.1054095>
- Dutertre, S., Ulens, C., Büttner, R., Fish, A., van Elk, R., Kendel, Y., Lewis, R. J. (2007). AChBP-targeted alpha-conotoxin correlates distinct binding orientations with nAChR subtype selectivity. *The EMBO Journal*, 26(16), 3858–67. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601785>
- Elliger, C. a., Richmond, T. a., Lebaric, Z. N., Pierce, N. T., Sweedler, J. V., Gilly, W. F. (2011). Diversity of conotoxin types from *Conus californicus* reflects a diversity of prey types and a novel evolutionary history. *Toxicon*, 57(2), 311–322. <http://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.12.008>
- Espiritu, D. J. D., Watkins, M., Dia-Monje, V., Cartier, G. E., Cruz, L. J., Olivera, B. M. (2001). Venomous cone snails: Molecular phylogeny and the generation of toxin diversity. *Toxicon*, 39(12), 1899–1916. [http://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00175-1](http://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00175-1)
- Essack, M., Bajic, V. B., & Archer, J. a C. (2012). Conotoxins that confer therapeutic possibilities. *Marine Drugs*, 10(6), 1244–1265. <http://doi.org/10.3390/md10061244>
- Feske, S., Skolnik, E., Prakriya, M. (2013). Ion channels and transporters in lymphocyte function and immunity, 18(9), 1199–1216. <http://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.07.011>.Innate
- Field, J., Calderón, R. (2010). Picadura por Caracol *Conus*., 27(2), 137–141.
- Gallo, E. M., Cante-Barrett, K., Crabtree, G. R. (2006). Lymphocyte calcium signaling from membrane to nucleus. *Nat Immunol*, 7(1), 25–32. <http://doi.org/10.1038/ni1295>
- Gnerlich, J. L., Mitchem, J. B., Weir, J. S., Sankpal, N. V., Kashiwagi, H., Belt, B. a, Linehan, D. C. (2010). Induction of Th17 cells in the tumor microenvironment improves survival in a murine model of pancreatic cancer. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 185(7), 4063–4071. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.0902609>
- Guzmán, J. M., Portales, D. P. (2013). Mecanismos de supresión de las células T reguladoras ( Treg ). *Gaceta Médica de México*, 149, 630–638.
- Hoebe, K., Janssen, E., Beutler, B. (2004). The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol*, 5(10), 971–974. <http://doi.org/10.1038/ni1004-971>
- Jayat, C., Ratinaud, M.-H. (1993). Cell cycle analysis by flow cytometry: Principles and applications. *Biol cell*, 15-25.
- Ji, Y., Zhang, W. (2010). Th17 cells: Positive or negative role in tumor? *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 59(7), 979–987. <http://doi.org/10.1007/s00262-010-0849-6>
- Kleinewietfeld, M., Hafler, D. a. (2013). The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Seminars in Immunology*, 25(4), 305–312. <http://doi.org/10.1016/j.smim.2013.10.009>
- Knutson, K. L., Disis, M. L., Salazar, L. G. (2007). CD4 regulatory T cells in human cancer pathogenesis. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 56(3), 271–285. <http://doi.org/10.1007/s00262-006-0194-y>
- Krasznai, Z. (2005). Ion channels in T cells: from molecular pharmacology to therapy. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 53(2), 127–135.



- Lai, Y., Jeng, C., Chen, S. (2011). The Roles of CD 4 + T Cells in Tumor Immunity. *International Scholarly Research Network Immunology*, 2011. <http://doi.org/10.5402/2011/497397>
- Li, M. C., He, S. H. (2004). IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 10(5), 620–625. <http://doi.org/10.3748/wjg.v10.i5.620>
- Li, Q., Li, Q., Chen, J., Liu, Y., Zhao, X., Tan, B., Shan, B. (2013). Prevalence of Th17 and Treg cells in gastric cancer patients and its correlation with clinical parameters. *Oncology Reports*, 30(3), 1215–1222. <http://doi.org/10.3892/or.2013.2570>
- Linehan, D. C., Goedegebuure, P. S. (2005). CD25+ CD4+ regulatory T-cells in cancer. *Immunologic Research*, 32(1–3), 155–168. <http://doi.org/10.1385/IR:32:1-3:155>
- Luckheeram, R., Zhou, R., Verma, a, Xia, B. (2012). CD4+T Cells: Differentiation and Functions. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 1–12. <http://doi.org/10.1155/2012/925135>
- Medzhitov, R., Janeway, C. a J. (1997). Innate immunity: Minireview the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, 91, 295–298. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.05.022>. Toll-like
- Miyara, M., Gorochov, G., Ehrenstein, M., Musset, L., Sakaguchi, S., Amoura, Z. (2011). Human FoxP3 + regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*, 10(12), 744–755. <http://doi.org/10.1016/j.autrev.2011.05.004>
- Nakayamada, S., Takahashi, H., Kanno, Y., O’Shea, J. J. (2012). Helper T cell diversity and plasticity. *Current Opinion in Immunology*, 24(3), 297–302. <http://doi.org/10.1016/j.coi.2012.01.014>
- Nam, H. H., Corneli, P. S., Watkins, M., Olivera, B., Bandyopadhyay, P. (2009). Multiple genes elucidate the evolution of venomous snail-hunting *Conus* species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53(3), 645–652. <http://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.07.013>
- National Research Council, Committee on the Ocean’s Role in Human Health. (1999). *From Monsoons to Microbes: Understanding the Ocean’s Role in Human Health* (Vol. 144). Retrieved from <http://www.nap.edu/catalog/6368.html>
- O’Shea, J. J., Paul, W. E. (2010). Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science*, 327(5969), 1098–1102. <http://doi.org/10.1126/science.1178334>
- O’Shea, J. J., Steward-Tharp, S. M., Laurence, A., Watford, W. T., Wei, L., Adamson, A. S., Fan, S. (2009). Signal transduction and Th17 cell differentiation. *Microbes and Infection*, 11(5), 599–611. <http://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.04.007>
- Omilusik, K. D., Nohara, L. L., Stanwood, S., Jefferies, W. a. (2013). Weft, warp, and weave: the intricate tapestry of calcium channels regulating T lymphocyte function. *Frontiers in Immunology*, 4(June), 164. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00164>
- Ormerod, M. (2000). *Flow Cytometry*. Great Britain: Oxford University Press.
- Paul, W. (2013). *Fundamental Immunology*. Philadelphia, PA. USA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Pennington, M., Chang, S., Chauhan, S., Huq, R., Tajhya, R., Chhabra, S., Beeton, C. (2015). Development of Highly Selective Kv1.3-Blocking Peptides Based on the Sea Anemone Peptide ShK. *Marine Drugs*, 13(1), 529–542. <http://doi.org/10.3390/md13010529>
- Pérez-Fernández, R., Kaski, J. C. (2002). Interleucina-10 y enfermedad coronaria. 55(7). *Rev Esp Cardiol*, 55(Cml), 738–50.
- Peters, H., O’Leary, B. C., Hawkins, J. P., Carpenter, K. E., Roberts, C. M. (2013). *Conus: First Comprehensive*

- Conservation Red List Assessment of a Marine Gastropod Mollusc Genus. *PLoS ONE*, 8(12), e83353. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0083353>
- Prashanth, J. R., Brust, A., Jin, A.-H., Alewood, P. F., Dutertre, S., Lewis, R. J. (2014). Cone snail venomics: from novel biology to novel therapeutics. *Future Medicinal Chemistry*, 6(15), 1659–1675. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Puillandre, N., Duda, T. F., Meyer, C., Olivera, B. M., Bouchet, P. (2014). One, four or 100 genera? A new classification of the cone snails. *Journal of Molluscan Studies*, 81(1), 1–23. <http://doi.org/10.1093/mollus/eyu055>
- Qian, J., Galitovskiy, V., Chernyavsky, A. I., Marchenko, S., Grando, S. A. (2011). Plasticity of the murine spleen T-cell cholinergic receptors and their role in in vitro differentiation of naïve CD4 T cells toward the Th1, Th2 and Th17 lineages. *Genes and Immunity*, 12(3), 222–230. <http://doi.org/10.1038/gene.2010.72>
- Quesniaux, V., Ryffel, B., Di Padova, F. (2006). *IL-17, IL-22 and their producing cells: Role in inflammation and autoimmunity*. Researchgate.Net (2nd editio). Springer. <http://doi.org/10.1007/9783034805223>
- Robinson, S. D., Safavi-Hemami, H., McIntosh, L. D., Purcell, A. W., Norton, R. S., Papenfuss, A. T. (2014). Diversity of Conotoxin Gene Superfamilies in the Venomous Snail, *Conus victoriae*. *PLoS ONE*, 9(2), e87648. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0087648>
- Shapiro, H. (2003). *Flow Cytometry*. United States of America: Wiley-Liss. ISBN: 0-471-41125-6.
- Stewart, J., Gilly, W. F. (2005). Piscivorous behavior of a temperate cone snail, *Conus californicus*. *Marine Biological Laboratory*, 209(2), 146–153.
- Terlau, H., Olivera, B. M. (2004). *Conus* venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiological Reviews*, 84(1), 41–68. <http://doi.org/10.3109/15569548509014416>
- Tortora, G., Funke, B., Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana S.A. ISBN: 978-950-06-0740-7.
- Turvey, S. E., Broide, D. H. (2010). Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 SUPPL. 2), S24–S32. <http://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.016>
- Uribe, J. E., Puillandre, N., Zardoya, R. (2017). Beyond *Conus*: Phylogenetic relationships of Conidae based on complete mitochondrial genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 107, 142–151. <http://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.10.008>
- Vetter, I., Lewis, R. J., Lewis, R. (2012). Therapeutic Potential of Cone Snail Venom Peptides (Conopeptides). *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 12(14), 1546–1552. <http://doi.org/10.2174/156802612802652457>
- Wang, C., Chi, C. (2004). *Conus* Peptides — A Rich Pharmaceutical Treasure The Biology of Cone Snails Classification and Nomenclature of *Conus* Peptides. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 36(11), 713–723.
- Wang, D., Zhou, R., Yao, Y., Zhu, X., Yin, Y., Zhao, G. (2010). Stimulation of  $\alpha$ -7 Nicotinic Acetylcholine Receptor by Nicotine Increases Suppressive Capacity of Naturally Occurring CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells in Mice In Vitro. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 335(3). <http://doi.org/10.1124/jpet.110.169961>
- Wang, H., Liao, H., Ochani, M., Justiniani, M., Lin, X., Yang, L., Ulloa, L. (2004). Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nature Medicine*, 10(11), 1216–21.

<http://doi.org/10.1038/nm1124>

- Wang, Y.-H., Voo, K. S., Liu, B., Chen, C.-Y., Uygungil, B., Spoede, W., Liu, Y.-J. (2010). A novel subset of CD4(+) T(H)2 memory/effector cells that produce inflammatory IL-17 cytokine and promote the exacerbation of chronic allergic asthma. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(11), 2479–91. <http://doi.org/10.1084/jem.20101376>
- Weaver, C. T., Hatton, R. D. (2009). Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co-)evolutionary perspective. *Nature Reviews. Immunology*, 9(12), 883–9. <http://doi.org/10.1038/nri2660>
- Yang, X. O., Nurieva, R., Martinez, G. J., Kang, H. S., Chung, Y., Pappu, B. P., Dong, C. (2008). Molecular Antagonism and Plasticity of Regulatory and Inflammatory T Cell Programs. *Immunity*, 29(1), 44–56. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.05.007>
- Zhao, Y., Huang, J., Yuan, X., Peng, B., Liu, W., Han, S., He, X. (2015). Toxins Targeting the KV1.3 Channel: Potential Immunomodulators for Autoimmune Diseases. *Toxins*, 7(5), 1749–1764. <http://doi.org/10.3390/toxins7051749>
- Zhou, L., Lopes, J. E., Chong, M. M. W., Ivanov, I. I., Min, R., Victora, G. D., Littman, D. R. (2008). TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function. *Nature*, 453(7192), 236–40. <http://doi.org/10.1038/nature06878>
- Zhu, J., Paul, W. E. (2008). CD4 T cells: Fates, functions, and faults. *Blood*, 112(5), 1557–1569. <http://doi.org/10.1182/blood-2008-05-078154>
- Zhu, J., Paul, W. E. (2010). Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Research*, 20(1), 4–12. <http://doi.org/10.1038/cr.2009.138>
- Zou, W., Restifo, N. P. (2010). T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nature Reviews. Immunology*, 10(4), 248–56. <http://doi.org/10.1038/nri2742>

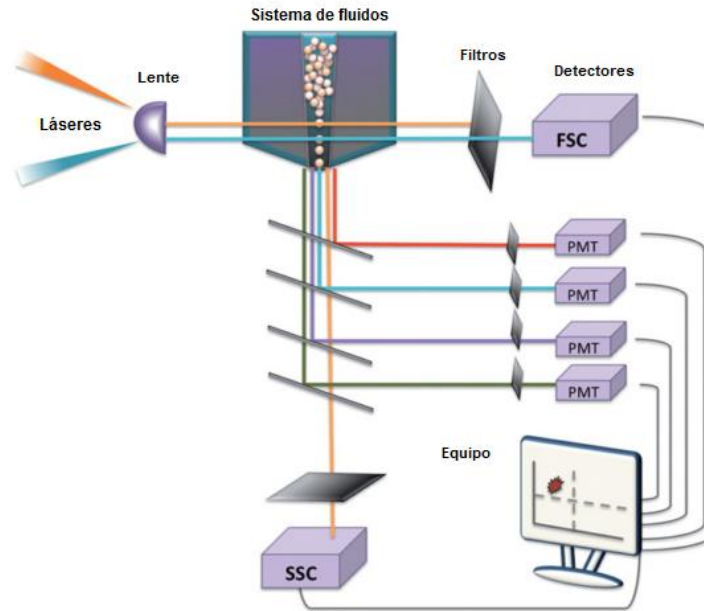
## **Anexos**

### **A.1 Citometría de flujo**

La citometría es un proceso analítico con el cual, características físicas y químicas de células individuales o partículas en suspensión, son medidas por una luz láser que incide en ellas mientras que pasan una a una por un punto de detección a través de un citómetro de flujo (Shapiro, 2003).

Con esta técnica se puede determinar múltiples parámetros celulares como el tamaño, forma, complejidad; puede establecer cuántas células están presentes en un espécimen, qué tipo de células se encuentran en la muestra y que características funcionales tienen (viabilidad, actividad enzimática). (Shapiro, 2003). Además ha sido adaptada para el análisis de varios componentes celulares, como ácidos nucleicos, lípidos, proteínas, así como organelos (lisosomas, mitocondrias) (Jayat y Ratinaud, 1993). La conjugación de colorantes fluorescentes a ligandos y anticuerpos mono y policlonales ha permitido que pueda estudiarse la densidad, receptores, moléculas en la superficie celular y en citoplasma. Además, muchos de los colorantes fluorescentes pueden combinarse para generar mediciones múltiples (Ormerod, 2000).

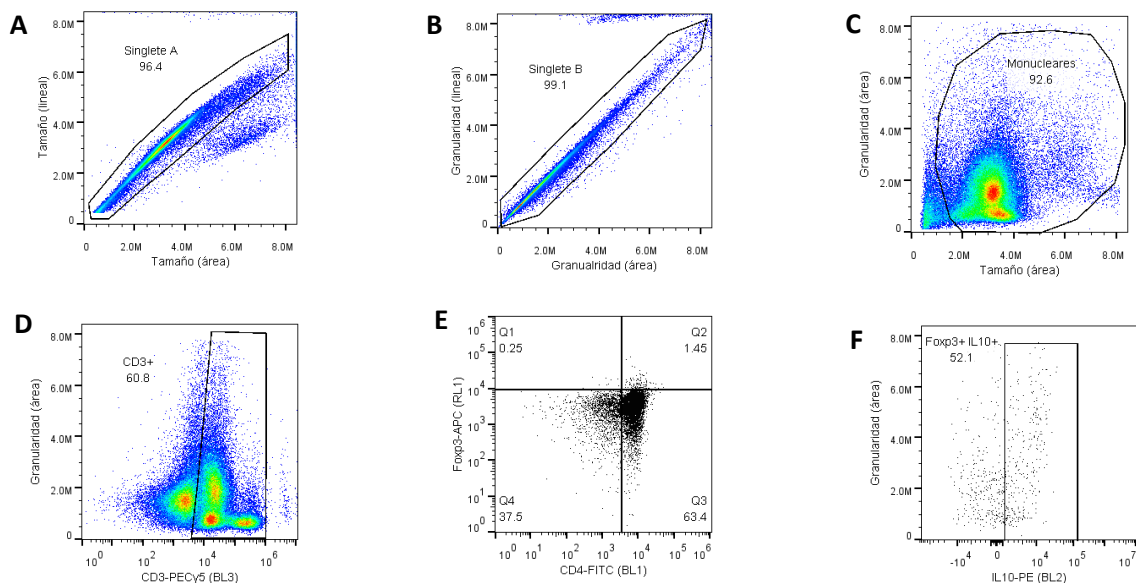
Una importante característica de esta técnica es que las mediciones se realizan de manera independiente en cada partícula de la suspensión en turno y no es un promedio de valores de toda la población. La habilidad del láser de los citómetros de flujo para medir múltiples parámetros celulares basados en fluorescencia y dispersión de la luz, ha llevado al uso de este instrumento a estudios en biología y medicina (Ormerod, 2000).



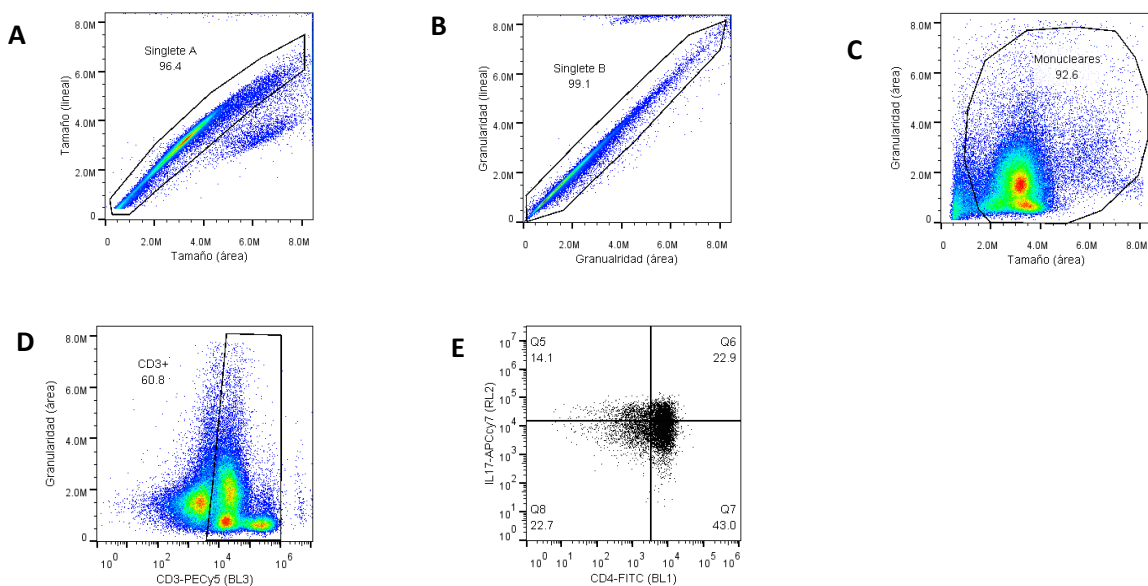
**Figura 20.** Componentes generales del citómetro de flujo. Las células pasan por un sistema de fluidos y se dirigen a un punto de interrogación pasando por los distintos láseres que determinan su tamaño, complejidad y algún otro parámetro deseado. Los lentes y prismas colaboran dirigiendo la luz a los detectores correspondientes para la recopilación de datos en el sistema informático (Modificado de Adan *et al.*, 2016).

Las aplicaciones de la citometría de flujo son numerosas. En el campo médico, las aplicaciones más relevantes de citometría se han relacionado con hematología e inmunología, midiendo parámetros como número y clasificación de células sanguíneas. Con esta técnica ha sido posible también el conteo de subpoblaciones de linfocitos en pacientes con el virus de inmunodeficiencia humana, así como la caracterización de leucemias agudas, entre otros padecimientos (Barrera Ramírez *et al.*, 2004).

## A.2 Análisis multiparamétrico de linfocitos T reguladores y Th17 por citometría de flujo



**Figura 21.** Citogramas de puntos del análisis multiparamétrico de linfocitos T reguladores y expresión de IL10 por parte de Treg. **A:** Selección de eventos únicos en relación con el tamaño. **B:** Selección de eventos únicos en relación con la granularidad. **C:** Selección de células mononucleares. **D:** Selección de células CD3<sup>+</sup>. **E:** Selección de células CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> en el cuadrante Q2. **F:** Selección de células Foxp3<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup>.



**Figura 22.** Citogramas de puntos del análisis multiparamétrico de linfocitos Th17. **A:** Selección de eventos únicos en relación con el tamaño. **B:** Selección de eventos únicos en relación con la granularidad. **C:** Selección de células mononucleares. **D:** Selección de células CD3<sup>+</sup>. **E:** Selección de células CD4<sup>+</sup> IL17<sup>+</sup> en el cuadrante Q6.

### A.3 Especificaciones de reactivos

#### Azul de tripán

Es un colorante aniónico derivado de la toluidina y su nombre deriva de su capacidad para matar tripanosomas y parásitos; es utilizado en tinciones histológicas para realizar ensayos de viabilidad celular y por tanto ayuda a diferenciar células vivas de las muertas. Las células vivas no adoptan el color azul porque la membrana es selectiva y no permite el paso del colorante, sin embargo en aquellas que están muertas, el colorante permeabiliza la membrana y se tiñen, por ello se le puede llamar método de tinción por exclusión.

#### Brefeldina A

La brefeldina A (BFA) es una lactona macrocíclica sintetizada a partir de palmitato por una variedad de hongos (ej: *Eupenicillium brefeldianum*) y en un inicio se caracterizó como un antibiótico antiviral. El tratamiento de células con BFA ha sido utilizado para estudiar la inhibición de la secreción de proteínas, lo cual sucede con la ruptura del aparato de Golgi y su redistribución en el retículo endoplásmico, reteniendo las proteínas en este organelo celular (Klausner *et al.*, 1992).

#### CFSE

El éster de carboxifluoresceína diacetato succinimidil (CFSE) es un reactivo que se ha utilizado para el estudio de las células en proliferación, especialmente en linfocitos. Es un colorante que permeabiliza la membrana celular y se une covalentemente a los grupos amino libres en las proteínas citoplasmáticas convirtiendo al CFSE en fluorescente; durante el proceso de división celular el CFSE se distribuye en las células hijas por lo que en cada periodo de división, la intensidad de la fluorescencia se va reduciendo a la mitad en cada generación y dichos cambios se detectan mediante un análisis por citometría de flujo (Lyons, 1999; Quah *et al.*, 2010).

#### Colagenasa

La colagenasa es una enzima aislada de *Clostridium histolyticum* y es una proteasa con la capacidad de degradar las fibrillas de colágeno nativo de triple hélice que se encuentran en tejidos conectivos, como la piel, los tendones, los vasos sanguíneos y los huesos. Con su actividad proteolítica provee una gentil digestión de la matriz extracelular generando muy poco daño a las células y evitando que pierdan su

viabilidad. La degradación por colagenasa es adecuada para el cultivo de diversos tejidos humanos y/o de ratón.

### **Concanavalina A (ConA)**

Los mitógenos son lectinas vegetales que se unen a los carbohidratos de las glicoproteínas de la superficie de los linfocitos y activan vías de señalización intracelular, dando lugar al incremento de actividad metabólica y a la división celular (Bonilla, 2008).

La ConA es una proteína que se obtiene a partir del frijol *Canavalia ensiformis* y se le considera un excelente inductor de mitosis en los linfocitos. Sus efectos mitogénicos se asocian a un incremento en la concentración de calcio intracelular generado por la transducción de señales producidas por la unión de ConA a la cadena zeta de la proteína CD3 de los linfocitos T, la cual forma un complejo con el receptor de célula T (TCR), que al ser estimulado, lleva a la activación y proliferación del linfocito T.

### **Paraformaldehído (PFA)**

El PFA es un compuesto químico utilizado en la mayoría de técnicas histológicas como fijador. Se le da este uso ya que es capaz de inhibir la degradación celular dada por la hidrólisis de enzimas y la replicación bacteriana, por lo tanto se utiliza para preservación de muestras. También es utilizado como desinfectante o fungicida.

### **Resazurina sódica**

El ensayo colorimétrico con resazurina sódica (alamar blue) ha sido diseñado para medir cuantitativamente la proliferación celular y se basa en la detección de la actividad metabólica, especialmente por reacciones óxido-reducción (REDOX); el crecimiento continuo mantiene un ambiente reductor, mientras que la inhibición del mismo genera un ambiente oxidativo. El proceso de crecimiento causa que el indicador REDOX se modifique de un color azul no fluorescente a su forma reducida de color rosa fluorescente; la cuantificación del proceso se verifica midiendo la absorbancia a 570 y 600 nm.