

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



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

**Efecto inmunomodulador del veneno de dos especies de
escorpión, *Centruroides limpidus* y *Centruroides noxius*, en la
diferenciación de linfocitos T cooperadores**

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

Presenta:

Julián Manuel Cota Arce

Ensenada, Baja California, México
2018

Tesis defendida por
Julián Manuel Cota Arce

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Marco Antonio De León Nava
Director de tesis

Miembros del comité

Dra. Johanna Bernáldez Sarabia

Dra. María del Carmen Maya Sánchez

M. C. Samanta Mireya Jiménez Flores



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

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Julián Manuel Cota Arce © 2018

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

Resumen de la tesis que presenta **Julián Manuel Cota Arce** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología.

Efecto inmunomodulador del veneno de dos especies de escorpión, *Centruroides limpidus* y *Centruroides noxius*, en la diferenciación de linfocitos T cooperadores

Resumen aprobado por:

Dr. Marco Antonio De León Nava
Director de tesis

El sistema inmunológico posee características que indican que puede ser manipulado. Esta ventaja ha sido aprovechada para el desarrollo de vacunas e inmunoterapias. También representa una posibilidad de modularlo de manera específica para favorecer una respuesta en contra de diversos patógenos o para atenuarla cuando causa daño al tejido propio. La exigencia de defender nuestro organismo de infinidad de retos antigénicos, incluyendo toxinas y células malignas, hace necesario el desarrollo de respuestas especializadas, a través de la diferenciación de los linfocitos T cooperadores (Th). Las subpoblaciones Th están involucradas en la coordinación de la respuesta inmune frente a patógenos y en el mantenimiento de la autotolerancia, además desempeñan un papel importante en el desarrollo de enfermedades autoinmunes, alergias y progresión de tumores. Existe evidencia de que los venenos de escorpión son capaces de activar el sistema inmune, mediando la proliferación, diferenciación y expresión de citocinas en diferentes tipos celulares. Los venenos de los escorpiones del género *Centruroides* resultan candidatos importantes para la modulación de la respuesta inmune por su alto contenido de toxinas. Estos péptidos interactúan con los canales iónicos que, en linfocitos Th, intervienen en los procesos de diferenciación. En este trabajo se evaluó el efecto del veneno de las especies *Centruroides limpidus* y *Centruroides noxius*, en la diferenciación de linfocitos Th1, Th2 y Th17, así como en la producción de IL-10, con la finalidad de encontrar moléculas moduladoras con potencial terapéutico. Se realizaron cultivos celulares y se trataron con los venenos fraccionados de *C. limpidus* y *C. noxius* a diferentes concentraciones, para evaluar su efecto en linfocitos T cooperadores. Los resultados indican un incremento de la diferenciación de linfocitos Th1, Th2 y Th17, al igual que la producción de IL-10, evaluada mediante la detección intracelular y secreción de citocinas. Los venenos promovieron un perfil inflamatorio, compuesto por las subpoblaciones Th1 y Th17, y disminuyeron la proporción de linfocitos Th2. Este trabajo muestra el potencial de los venenos de escorpión para modular la diferenciación de linfocitos T cooperadores y los resultados podrían ser utilizados en la búsqueda de agentes terapéuticos.

Palabras clave: inmunomodulación, linfocitos T cooperadores, veneno de escorpión, *Centruroides limpidus*, *Centruroides noxius*.

Abstract of the thesis presented by **Julián Manuel Cota Arce** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Science with orientation in Biomedicine and Bionanotechnology

Immunomodulatory effect of two scorpion species venom, *Centruroides limpidus* and *Centruroides noxius*, in the differentiation of T helper lymphocytes

Abstract approved by:

Dr. Marco Antonio De León Nava
Thesis Director

The immune system has characteristics that indicate it can be manipulated. This advantage has been used for the development of vaccines and immunotherapies. It also represents a possibility to modulate it in a specific way to favor a response against various pathogens or to attenuate it when it causes damage to the tissue itself. Defending our organism from multiple antigenic challenges, including toxins and malignant cells, makes necessary the development of specific responses, through the differentiation of T helper lymphocytes (Th). Th subpopulations are involved in the coordination of the immune response against pathogens and in the maintenance of self-tolerance, they also play an essential role in the development of autoimmune diseases, allergies, and tumor progression. There is evidence that scorpion poisons are capable of activating the immune system, mediating the proliferation, differentiation and expression of cytokines in different cell types. The venoms of the scorpions of the genus *Centruroides* are relevant candidates for the modulation of the immune response due to their high content of toxins. These peptides interact with the ion channels that, in Th lymphocytes, are involved in the processes of differentiation. In this work, we evaluated the effect of the venom of *Centruroides limpidus* and *Centruroides noxius*, in the differentiation of Th1, Th2 and Th17 lymphocytes, as well as in the production of IL-10, to find modulating molecules with therapeutic potential. Cell cultures were performed and treated with the fractionated poisons of *C. limpidus* and *C. noxius* at different concentrations, to evaluate their effect on Th lymphocytes. The results indicate an increase in the differentiation of Th1, Th2 and Th17 lymphocytes, as well as the production of IL-10, evaluated by intracellular detection and secretion of cytokines. The poisons promoted an inflammatory profile, composed by the Th1 and Th17 subpopulations, and decreased the proportion of Th2 lymphocytes. This work shows the potential of scorpion poisons to modulate the differentiation of Th lymphocytes, and the results could be used in the search for therapeutic agents.

Keywords: immunomodulation, T helper lymphocytes, scorpion venom, *Centruroides limpidus*, *Centruroides noxius*.

Dedicatoria

*Al Creador de los linfocitos y
los escorpiones...*

(LUC. 18:27)

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico otorgado para completar mis estudios de maestría, con número de registro 615394.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) por aceptarme en el posgrado y brindarme los apoyos, instalaciones y comodidades necesarias para mi desarrollo académico.

A Marco De León, por compartir conmigo el gusto por la inmunología, por permitirme trabajar bajo tu dirección durante mi estancia en CICESE y otorgarme un lugar dentro del equipo “*Gecoyotes*”, por tus enseñanzas y correcciones, por soportar mis despistes y por siempre exigirme mejorar. Fue muy grato trabajar bajo tu dirección.

A Daniela Zazueta, por instruirme dentro del laboratorio, por tus enseñanzas y consejos, por aguantar mis desobediencias, por preocuparte por mis experimentos como si fueran tuyos, por subirme el ánimo cada vez que pensé que no lo lograría y por todas las veces que me acompañaste en el citómetro.

A Kee Dan, integrante del equipo De León que, junto con Marco y Daniela, compartimos buenos momentos de risas y vino. Sin duda me llevo muy buenos amigos.

A los miembros de mi comité, la Dra. Johanna, la Dra. Carmen y la M. C. Samanta, por sus valiosas aportaciones, su buena disposición y apoyo para la realización de este trabajo.

A Fernando Díaz, por sus invaluable aportaciones en el análisis mediante espectrometría de masas.

Agradecimiento especial, al Dr. Lourival Possani, por proporcionarnos las muestras de veneno, esenciales para la realización de este trabajo.

A mis amigos y compañeros que hicieron de la maestría un período muy agradable: Teresa, Enrique, Mitzu, Clara, Daniel, Manuel, Carmel y, en especial, a Gaby y Arturo.

A mis padres y hermanos, por apoyarme en todo momento y alentarme a seguir adelante con mis sueños.

A Fabiola, por apoyarme desde el principio y por siempre estar al pendiente de mí.

A Dios, por ser mi sustento y fortaleza durante la maestría y por permitirme cumplir un sueño más.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	xi
Lista de acrónimos.....	xii
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Antecedentes.....	4
1.1.1 Sistema inmunológico y sus componentes.....	4
1.1.1.1 Inmunidad innata.....	5
1.1.1.2 Inmunidad adaptativa.....	6
1.1.2 Linfocitos T.....	6
1.1.3 Linfocitos T cooperadores (Th).....	7
1.1.3.1 Linfocitos Th1.....	9
1.1.3.2 Linfocitos Th2.....	10
1.1.3.3 Linfocitos Th17.....	11
1.1.3.4 Interleucina 10.....	11
1.1.4 Inmunomodulación.....	12
1.1.5 Generalidades de los escorpiones y su veneno.....	13
1.1.6 Escorpiones del género <i>Centruroides</i> (Marx, 1890).....	15
1.1.6.1 <i>Centruroides limpidus</i> (Karsch, 1879).....	16
1.1.6.2 <i>Centruroides noxius</i> (Hoffman, 1932).....	17
1.1.7 Papel de los canales iónicos en la activación de linfocitos T.....	18
1.2 Justificación.....	21
1.3 Hipótesis.....	22
1.4 Objetivo.....	22
1.4.1 Objetivo general.....	22
1.4.2 Objetivos específicos.....	22

Capítulo 2. Metodología	23
2.1 Venenos de escorpión.....	23
2.1.1 Obtención de los venenos.....	23
2.1.2 Fraccionamiento de los venenos.....	24
2.2 Animales.....	25
2.2.1 Extracción de ganglios linfáticos.....	25
2.3 Cultivo celular.....	27
2.3.1 Proliferación celular.....	27
2.3.1.1 Evaluación de la proliferación celular mediante el método de la carboxifluoresceína.....	27
2.3.1.2 Evaluación de la proliferación celular mediante el método de la resazurina sódica.....	29
2.3.2 Detección de poblaciones celulares y citocinas intracelulares.....	29
2.4 Detección de citocinas solubles mediante el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA).....	31
2.5 Análisis estadístico.....	31
2.6 Identificación de las toxinas contenidas en las fracciones de interés.....	32
2.6.1 Preparación de las muestras.....	32
2.6.2 Análisis por LC-MS/MS.....	33
 Capítulo 3. Resultados	 35
3.1 Fraccionamiento de los venenos.....	35
3.1.1 Concentración de proteína.....	37
3.2 Proliferación celular.....	38
3.2.1 Evaluación de la proliferación celular mediante el método de la carboxifluoresceína.....	39
3.2.2 Evaluación de la proliferación celular mediante el método de la resazurina sódica.....	40
3.3 Detección de poblaciones celulares y citocinas intracelulares.....	41
3.3.1 Linfocitos Th1.....	42
3.3.2 Linfocitos Th2.....	44
3.3.3 Linfocitos Th17.....	46
3.3.4 Interleucina 10.....	47

3.4 Detección de citocinas solubles mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).....	49
3.4.1 Interferón gamma (IFN- γ).....	50
3.4.2 Interleucina 4 (IL-4).....	51
3.4.3 Interleucina 17 (IL-17).....	52
3.4.4 Interleucina 10 (IL-10).....	53
3.5 Proporciones de poblaciones y citocinas.....	54
3.6 Identificación de toxinas contenidas en las fracciones de interés.....	55
Capítulo 4. Discusión	59
4.1 Proliferación de linfocitos T.....	59
4.2 Diferenciación de linfocitos T cooperadores.....	61
4.3 Función efectora de linfocitos T cooperadores.....	63
4.4 Proporción de las subpoblaciones de linfocitos T cooperadores.....	64
4.5 Identificación de toxinas.....	65
Capítulo 5. Conclusiones	68
Literatura citada	70

Lista de figuras

Figura	Página
1 Resumen conceptual del proyecto.....	3
2 Inmunidad innata y adaptativa.....	4
3 Diferenciación de los linfocitos T cooperadores (Th).....	9
4 Propiedades de las principales subpoblaciones de linfocitos T cooperadores.....	12
5 Respuesta inmunológica a los componentes del veneno de escorpión.....	15
6 <i>Centruroides limpidus</i> (Karsch, 1879).....	17
7 <i>Centruroides noxius</i> (Hoffman, 1932).....	18
8 Entrada de Ca ²⁺ extracelular y salida de K ⁺ intracelular en la estimulación de linfocitos T cooperadores.....	20
9 Esquema general de la metodología.....	23
10 Órganos linfáticos de ratón.....	26
11 Diseño de placa de 24 pozos para el método de la carboxifluoresceína.....	28
12 Diseño de placa de 96 pozos para el método de la resazurina sódica.....	29
13 Perfil cromatográfico del veneno de <i>Centruroides limpidus</i>	35
14 Perfil cromatográfico del veneno de <i>Centruroides noxius</i>	36
15 Efecto de las fracciones de los venenos de <i>C. limpidus</i> y <i>C. noxius</i> en la proliferación de linfocitos T por el método de la carboxifluoresceína.....	39
16 Efecto de las fracciones de <i>Centruroides limpidus</i> en la proliferación de linfocitos T mediante el método de la resazurina sódica.....	40
17 Efecto de las fracciones de <i>Centruroides noxius</i> en la proliferación de linfocitos T mediante el método de resazurina sódica.....	41
18 Efecto de las fracciones de <i>Centruroides limpidus</i> en la diferenciación de linfocitos Th1.....	42
19 Efecto de las fracciones de <i>Centruroides noxius</i> en la diferenciación de linfocitos Th1.....	43

20	Efecto de las fracciones de <i>Centruroides limpidus</i> en la diferenciación de linfocitos Th2.....	44
21	Efecto de las fracciones de <i>Centruroides noxius</i> en la diferenciación de linfocitos Th2.....	45
22	Efecto de las fracciones de <i>Centruroides limpidus</i> en la diferenciación de linfocitos Th17.....	46
23	Efecto de las fracciones de <i>Centruroides noxius</i> en la diferenciación de linfocitos Th17.....	47
24	Efecto de las fracciones de <i>Centruroides limpidus</i> en la producción de IL-10.....	48
25	Efecto de las fracciones de <i>Centruroides noxius</i> en la producción de IL-10.....	49
26	Concentración de IFN- γ en sobrenadantes recuperados.....	50
27	Concentración de IL-4 en sobrenadantes recuperados.....	51
28	Concentración de IL-17 en sobrenadantes recuperados.....	52
29	Concentración de IL-10 en sobrenadantes recuperados.....	53
30	Proporciones de poblaciones y citocinas.....	55
31	Resumen gráfico del proyecto.....	69

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Gradiente de elución utilizado para fraccionar los venenos.....	24
2	Digestión enzimática de las fracciones de los venenos.....	32
3	Gradiente de elución utilizado para el análisis por LC-MS/MS.....	33
4	Fracciones del veneno de <i>Centruroides limpidus</i>	37
5	Fracciones del veneno de <i>Centruroides noxius</i>	38
6	Neurotoxinas identificadas en las fracciones de <i>Centruroides limpidus</i>	56
7	Neurotoxinas identificadas en las fracciones de <i>Centruroides noxius</i>	57

Lista de acrónimos

AF647	Alexa Fluor 647
APC	Célula presentadora de antígeno
APC	Alofocianina
BFA	Brefeldina A
CD	Cúmulo de diferenciación
CFSE	Diacetato de carboxifluoresceína éster succinimidil
Con A	Concanavalina A
CRAC	Canal de calcio activado por la liberación de calcio
Cy	Cianina
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GATA-3	Factor de transcripción maestro asociado a linfocitos Th2
HBSS	Solución de sal equilibrada de Hanks
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IFN-γ	Interferón gamma
IL	Interleucina
KCa	Canal de potasio dependiente de calcio
Kv	Canal de potasio dependiente de voltaje
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
Nav	Canal de sodio dependiente de voltaje
NFAT	Factor nuclear de linfocitos T activados
PE	Ficoeritrina
PFA	Paraformaldehído
RORγt	Factor de transcripción maestro asociado a linfocitos Th17
T-bet	Factor de transcripción maestro asociado a linfocitos Th1

TCR	Receptor de linfocitos T
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
Th	Linfocitos T cooperadores
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
Treg	Linfocitos T reguladores

Capítulo 1. Introducción

Existen diversas especies de animales que han desarrollado un arsenal de sustancias químicas que sirven para atacar o defenderse de otras formas de vida. Los venenos y varios de sus componentes resultan, después de un largo proceso de selección natural, altamente específicos al reconocer a sus blancos moleculares. Históricamente, la importancia de estudiar desde diferentes enfoques a los venenos de diversos animales como escorpiones, serpientes, caracoles, entre otros, ha radicado en la prevención o neutralización de sus efectos en numerosos casos de envenenamiento humano y, a su vez, se han utilizado con distintos propósitos terapéuticos. Su estudio inició hace aproximadamente dos milenios, aunque se desconoce el momento exacto en el cual las personas reconocieron su beneficio y los empezaron a utilizar para tratar diversas patologías (Utkin, 2015). Fue hasta 1940 cuando se comenzó a hacer uso de sus componentes activos, ya que poseen un blanco molecular e inducen procesos biológicos específicos, lo que resulta de mucha importancia para dilucidar la función de moléculas señalizadoras y evaluar posibles nuevos fármacos.

Se han aislado toxinas de plantas como la tubocurarina, utilizada en la actualidad como un analgésico en algunos procedimientos quirúrgicos (Harvey, 2014). Otro ejemplo de moléculas con importancia médica, es una toxina extraída de la serpiente *Bothrops jararaca*, capaz de inhibir la síntesis de la angiotensina y, de esta manera, se promueve una disminución de la presión arterial en pacientes que sufren de hipertensión. También se han aislado toxinas de otros grupos animales como cnidarios, moluscos y artrópodos (Oldrati *et al.*, 2016).

Los venenos son fluidos extremadamente complejos, compuestos de cientos de diferentes moléculas incluidos péptidos, enzimas y otros compuestos de bajo peso molecular (Oldrati *et al.*, 2016). Como resultado de un largo proceso evolutivo, el veneno de los artrópodos ha desarrollado un repertorio muy amplio y complejo de toxinas. Se ha observado que la inoculación de estas toxinas en células de mamíferos induce un amplio rango de efectos sistémicos, ya que inhiben o estimulan con gran afinidad y especificidad estructuras como canales iónicos, receptores de neurotransmisores y transportadores. En la actualidad muchos venenos están siendo evaluados como posibles tratamientos contra padecimientos como la epilepsia, cáncer y enfermedades autoinmunes (Mortari y Cunha, 2013; Harvey, 2014).

Los artrópodos son el grupo de animales más antiguo y diverso, además son considerados como uno de los *phylum* de animales con más éxito ecológico y constituyen aproximadamente el 75-85% de

todas las especies descritas. Muchos artrópodos poseen veneno, el cual les ha servido como medio de defensa frente a sus depredadores, así como recurso para neutralizar a sus presas (Daly y Wilson, 2018).

Uno de los grupos de artrópodos más distintivos son los escorpiones (Orden: Scorpiones), pertenecen a la clase Arachnida y, en algunas zonas geográficas, destacan por poseer venenos mortales para los humanos (Cao *et al.*, 2014). Se han descrito más de 2200 especies de escorpiones alrededor del mundo y, una gran cantidad de péptidos bioactivos ya han sido purificados y caracterizados a partir de sus venenos (Hmed *et al.*, 2013; Santibáñez-López *et al.*, 2016). Algunas de las aplicaciones terapéuticas en las que se han evaluado las toxinas de escorpión son: actividad antimicrobiana, tratamientos para enfermedades cardíacas, enfermedades neurológicas, cáncer, osteoporosis y la modulación del sistema inmune (Attarde y Pandit, 2016; Jiménez *et al.*, 2018). Se sabe que los venenos de escorpión y sus compuestos derivados son capaces de activar o inhibir la respuesta inmune, modulando la secreción de citocinas, proliferación y diferenciación de ciertos tipos celulares (Mohanty *et al.*, 2016; Jiménez *et al.*, 2018).

El sistema inmune emplea numerosos mecanismos capaces de eliminar una amplia diversidad de microorganismos patógenos además de neutralizar sustancias tóxicas y alérgicas (Chaplin, 2010). En respuesta a la alta diversidad de patógenos y sus procesos adaptativos, como su reproducción y, en algunos casos, alta tasa de mutación, las células del sistema inmune se han especializado para responder de manera coordinada y específica para contrarrestar las estrategias de los microorganismos para establecerse. Los linfocitos T cooperadores (Th) son un tipo celular del sistema inmune cuya función es la producción y secreción de citocinas; que resultan importantes en la activación de otros tipos de células o en la coordinación de los mecanismos celulares implicados en la respuesta inmune (Zygmunt y Veldhoen, 2011). De acuerdo con la citocina que secretan y las actividades efectoras que promueven, pueden clasificarse en diversas subpoblaciones, entre las que resaltan: los linfocitos Th1, Th2, Th17 y T reguladores.

En los últimos años se han realizado muchos esfuerzos para tener un mejor entendimiento del sistema inmunológico y cómo protege la integridad de nuestro cuerpo ante agentes externos. Debido a la complejidad que representa y del beneficio que produciría su estudio, es necesario desarrollar nuevas líneas de investigación para tener una visión más amplia e integral de su funcionamiento y, de esta manera, aprovechar las características del sistema inmune con la finalidad de modular su función y desarrollar nuevos tratamientos para contrarrestar diversas condiciones patofisiológicas. Por lo anterior, en este trabajo se pretende evaluar el efecto del veneno de dos especies de escorpión (*Centruroides limpidus* y

Centruroides noxius) en la diferenciación de linfocitos T cooperadores con la finalidad de encontrar posibles moléculas moduladoras que contribuyan a entender los mecanismos moleculares de la inmunidad, o bien, para el desarrollo de nuevos fármacos que favorezcan una respuesta más dirigida y especializada. El resumen conceptual de este proyecto se puede apreciar en la Figura 1.

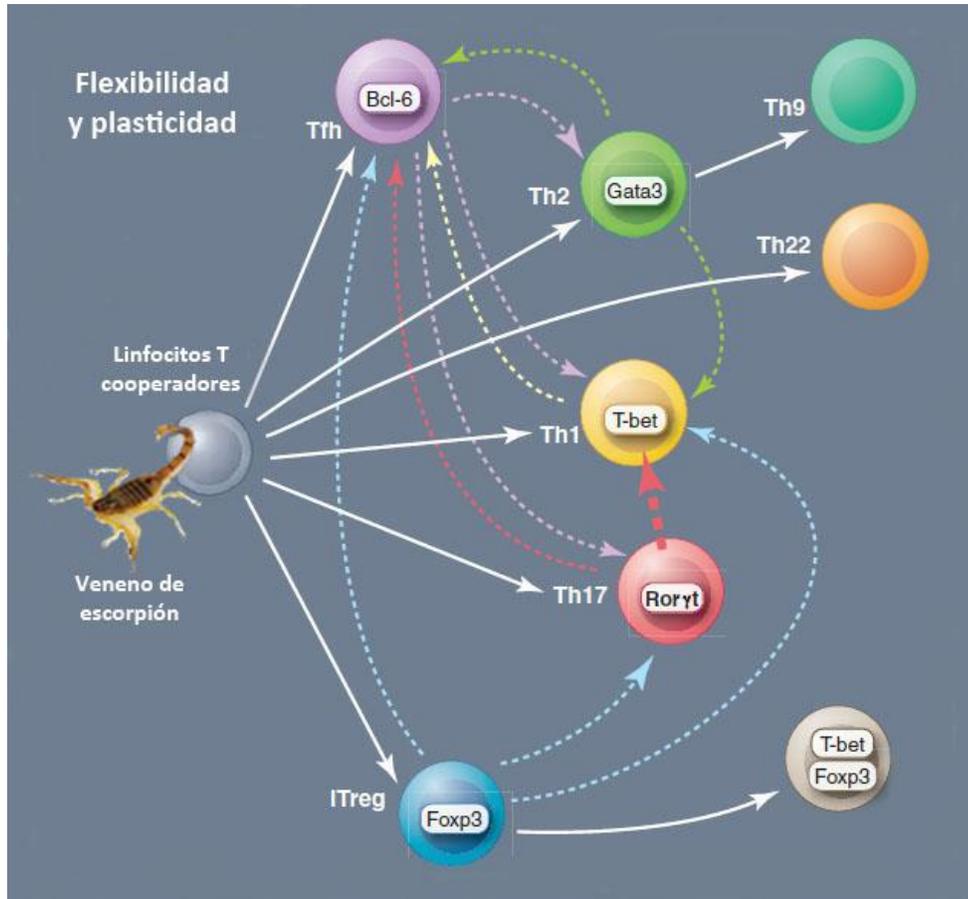


Figura 1. Resumen conceptual del proyecto. Ciertas toxinas de escorpión son capaces de activar o inhibir la respuesta inmune, modulando la secreción de citocinas, proliferación y diferenciación de diversos tipos celulares. Debido a la importancia y a las funciones específicas de cada subpoblación de linfocitos T cooperadores, en este trabajo se pretende evaluar el efecto del veneno de dos especies de escorpión (*Centruroides limpidus* y *Centruroides noxius*) en la diferenciación de las subpoblaciones Th1, Th2 y Th17 por sus implicaciones en diversas patologías. Modificado de: O'Shea y Paul, 2010; Oldrati *et al.*, 2016.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Sistema inmunológico y sus componentes

El sistema inmunológico de los mamíferos es el conjunto de células y proteínas que protegen de manera coordinada todos los tejidos del cuerpo contra antígenos externos como: microorganismos, virus, toxinas e incluso células cancerosas (Abbas *et al.*, 2017). Puede ser dividido en dos vertientes principales: inmunidad innata e inmunidad adaptativa (Figura 2). La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra un patógeno y depende de receptores que reconocen y marcan componentes estructurales compartidos por la mayoría de los microorganismos (Turvey y Broide, 2010). Este tipo de inmunidad también participa en la activación y regulación del sistema inmune adaptativo (Riera-Romo *et al.*, 2016). Por otro lado, la inmunidad adaptativa se caracteriza por poseer una mayor especificidad por antígenos microbianos y no-microbianos, desarrollar memoria inmunológica que le permite al organismo presentar respuestas más rápidas contra patógenos a los cuales se ha visto expuesto con anterioridad y producir proteínas que discriminan entre lo propio y lo ajeno, los anticuerpos (Lanier y Sun, 2009; Warrington *et al.*, 2011).

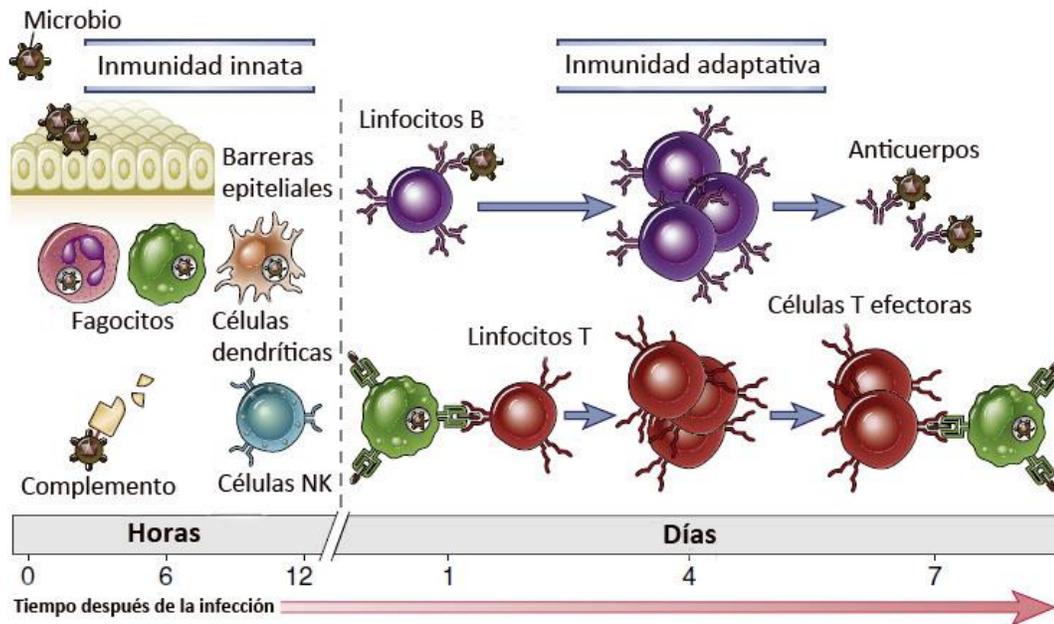


Figura 2. Inmunidad innata y adaptativa. La inmunidad innata representa los primeros mecanismos de defensa frente a agentes infecciosos. La respuesta adaptativa se desarrolla más tarde y requiere de la activación de linfocitos. Ambas líneas de defensa protegen de manera coordinada los tejidos del cuerpo. Modificado de: Abbas *et al.*, 2017.

1.1.1.1 Inmunidad innata

El sistema inmune innato se encarga de reconocer estructuras conservadas por la mayoría de los patógenos y de promover condiciones proinflamatorias mediante la secreción de citocinas y otras moléculas señalizadoras que van a reclutar células a las zonas de infección o inflamación (Mogensen, 2009; Riera-Romo *et al.*, 2016). Las citocinas son proteínas que regulan y coordinan las actividades celulares del sistema inmune innato y adaptativo, promoviendo diversos procesos como la liberación de anticuerpos, proteínas y glucoproteínas que van a formar parte de la cascada de la respuesta inmune, así como la secreción de otras citocinas (Lee y Margolin, 2011). La inmunidad innata también se encarga de remover las células muertas y sustancias extrañas presentes en órganos y tejidos; asimismo, participa en la presentación de antígenos, proceso necesario para la activación del sistema inmune adaptativo (Warrington *et al.*, 2011).

Además del complemento y las barreras físicas externas, el sistema inmune innato se compone de una gran cantidad de tipos celulares como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, mastocitos, basófilos, eosinófilos y células asesinas naturales (NK). Los macrófagos y neutrófilos tienen la principal función de fagocitar células externas, y participar en la presentación de antígenos. Las células dendríticas también son células fagocitarias y presentadoras de antígeno especializadas (APC); capturan los antígenos que provienen del medio externo, los transportan a los órganos linfáticos, y los presentan a los linfocitos T vírgenes para iniciar respuestas inmunológicas (Worbs *et al.*, 2016). Los mastocitos y basófilos se caracterizan por presentar gránulos en su citoplasma con mediadores inflamatorios y antimicrobianos, que se liberan después de ser activados, por lo que están implicados en el inicio de la respuesta inflamatoria. Los eosinófilos son granulocitos fagocíticos y tienen un papel muy importante en la eliminación de parásitos que resultan muy grandes para ser eliminados por los macrófagos. Las células NK se encargan de la destrucción de células cancerosas e infectadas por virus y, su mecanismo de acción es a través de la secreción de enzimas líticas (granzimas y perforinas), las cuales inducen apoptosis en las células malignas (Turvey y Broide, 2010; Warrington *et al.*, 2011). Buena parte de estos procesos de protección en contra de lo ajeno están vinculados con células del sistema inmune adaptativo, como los linfocitos T cooperadores.

1.1.1.2 Inmunidad adaptativa

Debido a la alta tasa de mutaciones que presentan los organismos patógenos, la evolución del sistema inmune y sus receptores derivó en el desarrollo de la respuesta adaptativa. Esta última, a diferencia de la respuesta innata, presenta mayor especificidad y diversidad, permitiéndole reconocer diferentes antígenos e incluso porciones distintas de un mismo complejo proteínico (Bonilla y Oettgen, 2010). Las principales células efectoras de la inmunidad adaptativa son los linfocitos y, se dividen en dos grandes poblaciones: los linfocitos T y B (Boehm y Swann, 2014).

Los linfocitos B median la respuesta humoral caracterizada por la producción de anticuerpos que protegen los órganos y tejidos, neutralizando agentes infecciosos o sustancias tóxicas (Hoffman *et al.*, 2016). En las últimas dos décadas, se les han atribuido otras funciones adicionales, incluyendo la presentación de antígenos, producción de citocinas y capacidad supresora de la respuesta inmune (Mauri y Bosma, 2012). Se ha visto que defectos en el desarrollo, selección y función de los linfocitos B conducen a padecimientos de autoinmunidad, inmunodeficiencias y alergias. El desarrollo y maduración de estas células se lleva a cabo en la médula ósea y se caracterizan por presentar un receptor específico conocido como BCR (receptor de linfocitos B). Cuando el receptor entra en contacto con el antígeno, se generan diversas señales intracelulares promoviendo la diferenciación y desarrollo de las células de memoria y células plasmáticas, siendo estas últimas las encargadas de producir y secretar los anticuerpos (Pieper *et al.*, 2013; Tobón *et al.*, 2013).

1.1.2 Linfocitos T

Los linfocitos T se originan en la médula ósea como parte de la estirpe linfoide y posteriormente migran al timo donde completan su maduración. Las células T, como también se les conocen, intervienen en el mantenimiento de la memoria inmunológica y la autotolerancia y, presentan un receptor específico de membrana (TCR) con potencial para reconocer diversos antígenos provenientes de patógenos y tumores (Kumar *et al.*, 2018).

Los linfocitos T reconocen un complejo formado por péptidos derivados de posibles patógenos y un conjunto proteínico conocido como el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), el cual se encuentra en todos los tipos celulares. El MHC en células presentadoras de antígenos, además de expresar

péptidos endógenos, presenta antígenos de proteínas exógenas para desencadenar una respuesta inmunológica en contra de patógenos (Wieczorek *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2018). El reconocimiento de antígenos en linfocitos T se da a través del TCR; esta interacción entre el TCR y el MHC se conoce como sinapsis inmunológica y culmina en la activación de los linfocitos, llevando a una respuesta contra los antígenos provenientes de células infectadas, cancerosas y patógenos extracelulares. Los linfocitos T se dividen funcionalmente en dos grandes poblaciones: los linfocitos T cooperadores (CD4⁺) y los linfocitos T citotóxicos (CD8⁺) (Masopust y Schenkel, 2013).

Las células T citotóxicas o citolíticas (CD8⁺) responden a diversos estímulos, mediante la presentación vía MHC, como antígenos proteínicos derivados de virus, bacterias y parásitos (Ito y Seishima, 2010). Existen al menos tres mecanismos de acción de los linfocitos T citotóxicos; dos de ellos implican el contacto célula-célula y el tercero es a través de la secreción de citocinas. El primer mecanismo promueve la activación y proliferación de los linfocitos citotóxicos a través de la exposición a antígenos específicos y a su vez van a secretar los mediadores citolíticos esenciales (perforina, granzimas y granulisina) e inducir a apoptosis en las células infectadas o cancerosas (Chávez-Galán *et al.*, 2009). El segundo mecanismo célula-célula implica la unión del ligando Fas, expresados en los linfocitos citotóxicos, al receptor Fas (CD95) en las células diana; esta unión promueve la apoptosis de las células infectadas o cancerosas (Andersen *et al.*, 2006). Por último, la tercera vía es mediada por citocinas como interferón gamma (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), los cuales serán producidos y secretados mientras la estimulación del TCR se lleve a cabo y, promoverán la presentación de antígenos y la actividad fagocítica (Andersen *et al.*, 2006; Ito y Seishima, 2010). Después de un evento infeccioso la mayoría de las células citotóxicas mueren y son fagocitadas y algunas otras permanecen disponibles como células de memoria para responder a nuevas exposiciones a patógenos (Warrington *et al.*, 2011).

1.1.3 Linfocitos T cooperadores (Th)

Los linfocitos T cooperadores (Th), tienen un papel fundamental en la inmunidad adaptativa, regulando un amplio espectro de funciones biológicas: coordinan la respuesta citotóxica y dependiente de anticuerpos, interactúan con los componentes de la inmunidad innata y responden a los estímulos de la presentación de antígenos (Ivanova y Orekhov, 2015). De manera específica, los linfocitos T cooperadores promueven la producción de anticuerpos en los linfocitos B; median la proliferación y formación de células de memoria en linfocitos T citotóxicos; activan macrófagos, aumentando la actividad antimicrobiana; reclutan

neutrófilos, basófilos y eosinófilos a los sitios de infección e inflamación y, producen una gran cantidad de citocinas y quimiocinas para orquestar mecanismos dentro de las respuestas inmunológicas (Zhu y Paul, 2008). El reconocimiento de antígenos en linfocitos T cooperadores se da a través del TCR y la proteína de superficie CD4, la cual interviene en el reconocimiento de péptidos presentados en el MHC y en la transmisión de señales intracelulares, además de ser un marcador específico para identificar las poblaciones de linfocitos Th (Taniuchi, 2018).

Después del encuentro con los antígenos, los linfocitos T cooperadores se activan y se diferencian en células efectoras y de memoria. Dependiendo de la intensidad de la estimulación, la presencia de citocinas y otros factores, los linfocitos CD4⁺ se pueden diferenciar en varias subpoblaciones con funciones y propiedades específicas (Figura 3) (Ivanova y Orekhov, 2015). Esta especialización es regulada por un gran número de factores de transcripción que son activados en respuesta a estímulos específicos, y que promueven la expresión de moléculas de superficie y factores solubles (Zhu *et al.*, 2010). Estudios recientes indican que algunas subpoblaciones de linfocitos Th tienen cierta plasticidad, lo que les permite compartir algunas características típicas de otras poblaciones e incluso perder sus cualidades originales y diferenciarse en otras subpoblaciones (Baranovski *et al.*, 2015). La plasticidad de los linfocitos T permite al sistema inmune responder rápidamente a los cambios del ambiente y adaptar los mecanismos de defensa en presencia de agentes infecciosos y parásitos cambiantes (Ivanova y Orekhov, 2015).

Se reconocen al menos siete subpoblaciones de linfocitos Th, incluyendo los linfocitos T reguladores (Treg), de las cuales se han descrito las vías de señalización para su desarrollo y las respuestas en las que intervienen (Luckheeram *et al.*, 2012; Baranovski *et al.*, 2015). En este trabajo nos enfocaremos en los linfocitos Th1, Th2 y Th17, por sus implicaciones en diversas patologías, además de evaluar la producción de la interleucina (IL) 10, por su papel en la inmunorregulación.

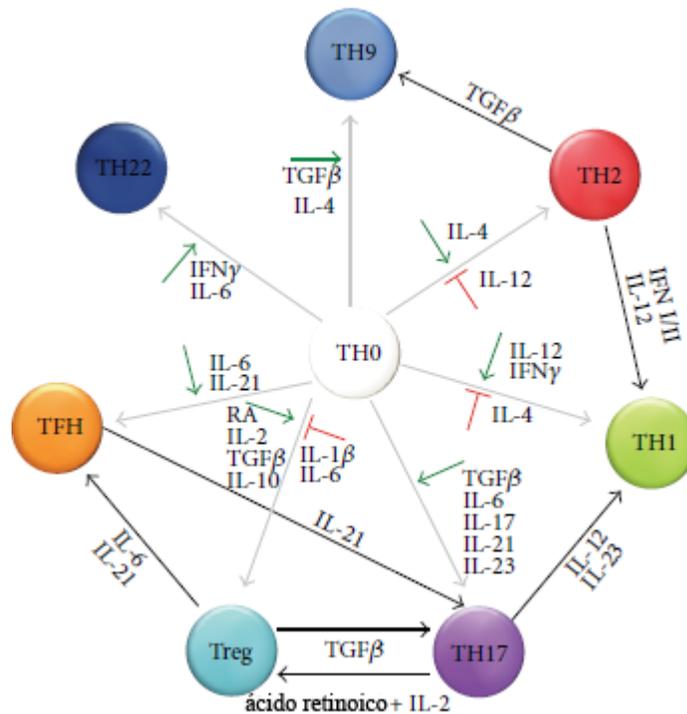


Figura 3. Diferenciación de los linfocitos T cooperadores (Th). Los linfocitos T cooperadores vírgenes (Th0) pueden diferenciarse en subpoblaciones Th específicas (flechas grises) bajo la influencia de estímulos, citocinas y otros factores. Por un lado, la presencia de ciertas citocinas en el medio puede promover la diferenciación a una subpoblación específica (flechas verdes), y por otro lado, puede bloquear la diferenciación de una subpoblación funcionalmente opuesta (flechas rojas). Además, los linfocitos Th diferenciados pueden transdiferenciarse en otras subpoblaciones. IL, interleucina; IFN, interferón; RA, ácido retinoico; Tfh, linfocitos T cooperadores foliculares; TGF-β, factor de crecimiento transformante beta; Treg, linfocitos T reguladores. Modificado de: Baranovski *et al.*, 2015.

1.1.3.1 Linfocitos Th1

La diferenciación al perfil Th1 es promovida en respuesta a la IL-12 e IFN-γ, dos citocinas que son producidas en un inicio por las células presentadoras de antígeno y tienen un papel muy importante en la conexión de la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. La IL-12 induce a las células NK para que produzcan y secreten más IFN-γ, lo que amplifica la expresión de los factores de transcripción involucrados en la diferenciación de los linfocitos Th1 (Ivanova y Orekhov, 2015). Existen varios factores de transcripción implicados en la diferenciación del perfil Th1, sin embargo, el regulador maestro es T-bet, el cual se caracteriza, no sólo por promover la transcripción de genes implicados en la diferenciación de los linfocitos Th1, sino también por inhibir el desarrollo de otras subpoblaciones de linfocitos cooperadores (Luckheeram *et al.*, 2012).

Las células Th1 están involucradas en la eliminación de patógenos intracelulares y en la autoinmunidad órgano-específica. Secretan IFN- γ principalmente, citocina esencial para la activación de células fagocíticas como macrófagos, aumentando así la actividad fagocítica y antimicrobiana (Gagliani y Huber, 2017). Asimismo, el IFN- γ es responsable de activar la transcripción de genes involucrados en la eliminación de patógenos intracelulares, promover un estado antivírico, estimular la expresión de proteínas que aumentan la presentación de antígenos y activar linfocitos (Chesler y Reiss, 2002; Walter, 2010). Las células Th1 también secretan factor de necrosis tumoral beta (TNF- β), citocina relacionada con el desarrollo de algunas enfermedades autoinmunes y la eliminación de células cancerígenas. Por último, promueven la proliferación de linfocitos T a través de la secreción de IL-2, citocina involucrada en la generación de linfocitos T citotóxicos de memoria y en la supervivencia de los linfocitos Treg (Luckheeram *et al.*, 2012).

1.1.3.2 Linfocitos Th2

La diferenciación de linfocitos Th2 ocurre en respuesta a helmintos y alérgenos, y aumenta por acción de la IL-4. Esta proteína es producida principalmente por mastocitos y células Th2, y activa el factor de transcripción STAT6 para aumentar la expresión del regulador maestro GATA-3 (Walker y McKenzie, 2017). Se han propuesto tres mecanismos de acción de GATA-3 en la diferenciación de linfocitos Th2, incluyendo el aumento de la producción de citocinas específicas del perfil Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13), proliferación selectiva de células Th2 y la inhibición de los linfocitos Th1 (Luckheeram *et al.*, 2012).

Los linfocitos Th2 son responsables de los mecanismos implicados en la inmunidad contra parásitos extracelulares y también en el desarrollo de alergias y asma. Se caracterizan por secretar IL-4, la cual participa en la producción de inmunoglobulinas (Ig) por parte de los linfocitos B; promueve el cambio de clase de Ig y aumenta la afinidad de las mismas en mastocitos y basófilos, provocando su desgranulación y liberación de histamina y serotonina (Luckheeram *et al.*, 2012). Los linfocitos Th2 también actúan en el proceso de homeostasis inmunológica por medio de la secreción de IL-10; aumentan la mucosidad en el intestino, activan eosinófilos y promueven la vía de activación alterna de macrófagos implicada en la reparación de tejidos (Zhu y Paul, 2008; Walker y McKenzie, 2017).

1.1.3.3 Linfocitos Th17

La interacción entre las células dendríticas con algunas bacterias y hongos estimula la producción de citocinas como IL-6, IL-1 e IL-23, las cuales están involucradas en el desarrollo de los linfocitos Th17. Otra citocina implicada en la diferenciación del perfil Th17 es TGF- β , una citocina antiinflamatoria que promueve el desarrollo de las células Th17, es decir, un perfil proinflamatorio (Luckheeram *et al.*, 2012). Este grupo de citocinas trabajan en conjunto para promover la transcripción del regulador maestro ROR γ t, implicado en la respuesta de los linfocitos Th17. Esta subpoblación parece ser abundante en el tracto gastrointestinal porque provee suficiente TGF- β y citocinas proinflamatorias (Muranski y Restifo, 2013).

Estas células se encargan de reclutar leucocitos, principalmente neutrófilos, a los sitios infectados por hongos y bacterias extracelulares. Se caracterizan por producir IL-17, citocina importante en el vínculo de la inmunidad adaptativa y la respuesta inflamatoria aguda, que contribuye a la secreción de quimiocinas y citocinas para reclutar a los neutrófilos y otras células a los sitios de infección, además de promover la secreción de péptidos antimicrobianos como defensinas de muchos tipos celulares (Muranski y Restifo, 2013). Las células Th17 también producen IL-21, implicada en la diferenciación de linfocitos B y en la activación de linfocitos T y células NK, e IL-22, citocina esencial en la inmunidad de epitelios para inducir la secreción péptidos antimicrobianos e incrementar la proliferación celular (Luckheeram *et al.*, 2012).

1.1.3.4 Interleucina 10

La IL-10 es una citocina producida por diversos tipos celulares, incluyendo células de la inmunidad innata (macrófagos y células dendríticas). Es capaz de inhibir la secreción de citocinas proinflamatoria e incluso es producida por células ajenas al sistema inmunológico, como los queratinocitos (Abbas *et al.*, 2017). En relación con los linfocitos T cooperadores, la IL-10 es producida por los linfocitos Th1, Th2, Th17 y Treg (Ng *et al.*, 2013).

La función biológica de la IL-10 es actuar como un inhibidor de macrófagos activados y células dendríticas. Debido a que la actividad de estas células es fundamental para la producción de IL-12, estímulo crítico para la producción de IFN- γ , la IL-10 controla la actividad de los linfocitos Th1. Esta citocina también está implicada en la inhibición de la expresión de coestimuladores y moléculas del MHC en células dendríticas y macrófagos, por lo que inhibe indirectamente la activación de linfocitos T. Se cree que tiene

un papel muy importante en el control de respuestas inflamatorias en mucosas, principalmente en el tracto digestivo (Couper *et al.*, 2008).

En la Figura 4 se resumen las propiedades de las subpoblaciones de estudio como las principales reacciones inmunes en las que intervienen, las citocinas que secretan y su papel en el desarrollo de enfermedades. Debido a las funciones específicas que desempeñan cada una de las subpoblaciones de linfocitos T cooperadores y las implicaciones que presentan en la progresión de ciertas enfermedades, es necesario el estudio de los mecanismos involucrados en la diferenciación y acción de estas poblaciones.

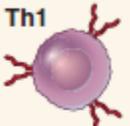
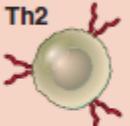
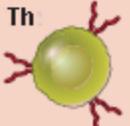
Linfocitos T efectores	Citocinas	Célula diana principal	Principales reacciones inmunes	Defensa del huésped	Papel en enfermedades
 Th1	IFN- γ	 Macrófagos	Activación de macrófagos	Patógenos intracelulares	Autoinmunidad, inflamación crónica
 Th2	IL-4 IL-5 IL-13	 Eosinófilos	Activación de eosinófilos y mastocitos	Helminetos	Alergia
 Th17	IL-17 IL-22	 Neutrófilos	Reclutamiento y activación de neutrófilos	Hongos y bacterias extracelulares	Autoinmunidad, inflamación
 Th	IL-10	 Macrófagos	Inhibición de macrófagos y células dendríticas	Reacciones inflamatorias	Progresión de tumores

Figura 4. Propiedades de las principales subpoblaciones de linfocitos T cooperadores. Los linfocitos Th vírgenes pueden diferenciarse en distintas subpoblaciones en respuesta al tipo de estímulo y a las citocinas presentes en el medio. Se resumen las funciones principales de las subpoblaciones, así como sus células diana y papel en el desarrollo de enfermedades. Modificado de: Abbas *et al.*, 2017.

1.1.4 Inmunomodulación

La evolución del sistema inmune ha dirigido el desarrollo de mecanismos de defensa frente a agentes causantes de enfermedad; sin embargo, su mal funcionamiento genera algunas de las enfermedades con

mayor prevalencia en humanos (Fallon y Alcami, 2006). El término inmunomodulación se refiere a la habilidad para regular el sistema inmune, ya sea potenciando o atenuando su actividad, con el fin de mejorar la eficiencia de protección (Dhama *et al.*, 2015).

Un inmunomodulador puede ser definido como cualquier sustancia biológica o sintética que afecta el funcionamiento del sistema inmune y mejora la resistencia del huésped a agentes patógenos y tumores (Saxena *et al.*, 2012). Pueden ser específicos como las vacunas, e inespecíficos, los cuales generan cambios en la respuesta inmune innata y adaptativa alterando la reactividad del huésped a diferentes antígenos (Dhama *et al.*, 2015).

Por otro lado, con la producción de anticuerpos neutralizantes de venenos letales, la comunidad científica ha sido consciente de que los componentes del veneno animal interactúan con el sistema inmune humano. Existe evidencia de que los venenos animales poseen componentes proinflamatorios o que promueven la producción de mediadores proinflamatorios como histamina, prostaglandinas, fosfolipasas, quimiocinas y citocinas (Inserra y Lewis, 2011). Por lo tanto, el estudio sistemático de los venenos animales y su interacción con el sistema inmune podría revelar novedosos inmunomoduladores para una plétora de condiciones patofisiológicas (Jiménez *et al.*, 2018).

1.1.5 Generalidades de los escorpiones y su veneno

Los escorpiones (Orden: Scorpiones) han vivido en la tierra alrededor de 400 millones de años y, durante su proceso evolutivo, desarrollaron venenos complejos que les han servido para defenderse de los depredadores y para cazar a sus presas (Ye *et al.*, 2016). Son animales nocturnos, con distribución cosmopolita y depredadores de invertebrados como insectos, arácnidos y artrópodos, e incluso son capaces de alimentarse de pequeños vertebrados (Ponce-Saavedra y Francke, 2013; Cao *et al.*, 2014). Se cree que existen alrededor de 2,200 especies de escorpiones distribuidas en 20 familias; poseen un plan corporal muy conservado, compuesto de un tronco y una región anterior o abdomen (Ponce-Saavedra y Francke, 2013; Santibáñez-López *et al.*, 2016). En el tronco o cefalotórax, se encuentran los órganos de los sentidos como la vista, el gusto y el olfato; los quelíceros o colmillos utilizados para comer y las patas ambulatorias y los pedipalpos (Ponce-Saavedra y Francke, 2013). La región anterior o abdomen está conformada por segmentos de quitina y sus últimos segmentos dan lugar al metasoma. Este último,

también conocido como cola, es una región estrecha y cilíndrica que termina en el telson, zona donde se encuentran las glándulas de veneno y el aguijón que utilizan para atacar (Ponce-Saavedra y Francke, 2013).

En México se han descrito 281 especies de escorpión, lo que equivale a más del 10% de la diversidad mundial, y se considera uno de los países con mayor índice de mortalidad por picadura de escorpión (escorpionismo) (Chávez-Haro y Ortiz, 2015; Santibáñez-López *et al.*, 2016). Se reportan más de 250,000 casos de escorpionismo por año, de los cuales 1,000 corresponden a casos de fallecimiento (Chávez-Haro y Ortiz, 2015; Cheng *et al.*, 2017). En la actualidad se sabe que sólo algunas especies de la familia Buthidae son los escorpiones más tóxicos y de importancia médica en México por representar un peligro para la salud humana (Ponce-Saavedra y Francke, 2013; Al-Asmari *et al.*, 2016).

De manera general, los venenos de escorpión están compuestos de: agua, mucosa, oligopéptidos, nucleótidos, aminoácidos, iones, neurotransmisores, sales, péptidos de bajo peso molecular, metales, mucopéptidos, mucopolisacáridos, hialuronidasa, fosfolipasa, serotonina, histamina, aminas biogénicas y una gran cantidad de sustancias no conocidas (Al-Asmari *et al.*, 2016). Son una fuente rica en biomoléculas, en su mayoría péptidos y neurotoxinas, las cuales pueden alterar la actividad fisiológica de la víctima tras la picadura. Las neurotoxinas son las responsables del desarrollo, en los humanos, de síntomas como dolor, estimulación del sistema nervioso periférico y excitación neuromuscular por liberación de neurotransmisores (Casella-Martins *et al.*, 2015; Mohanty *et al.*, 2016). Los venenos de escorpión también son responsables de la respuesta masiva del sistema inmune al reclutar las células que intervienen en los procesos de inflamación y promueven un aumento en los niveles de óxido nítrico (NO) en sangre, citocinas (antiinflamatorias y proinflamatorias) y quimiocinas (Figura 5). Existe una correlación entre la severidad del envenenamiento y la activación del sistema inmune (Adi-Bessalem *et al.*, 2015; Casella-Martins *et al.*, 2015). Estas biomoléculas también han demostrado tener un efecto terapéutico asociado con enfermedades cardiacas, neurológicas, cáncer, leucemia, glioma y osteoporosis (Al-Asmari *et al.*, 2016; Attarde y Pandit, 2016; Jiménez *et al.*, 2018).

Una de las familias de escorpiones que destacan por su veneno altamente tóxico para mamíferos, y por ser responsable de la mayoría de los envenenamientos por picaduras alrededor del mundo, es la familia Buthidae (Casella-Martins *et al.*, 2015; Corzo y Espino-Solis, 2017). Los síntomas asociados con sus picaduras pueden variar, desde dolor o inflamación local hasta complicaciones clínicas severas incluyendo la muerte. La severidad de su picadura se debe a la presencia de neurotoxinas que actúan sobre canales iónicos, lo que causa diferentes manifestaciones inmunológicas y toxicológicas (Corzo y Espino-Solis, 2017).

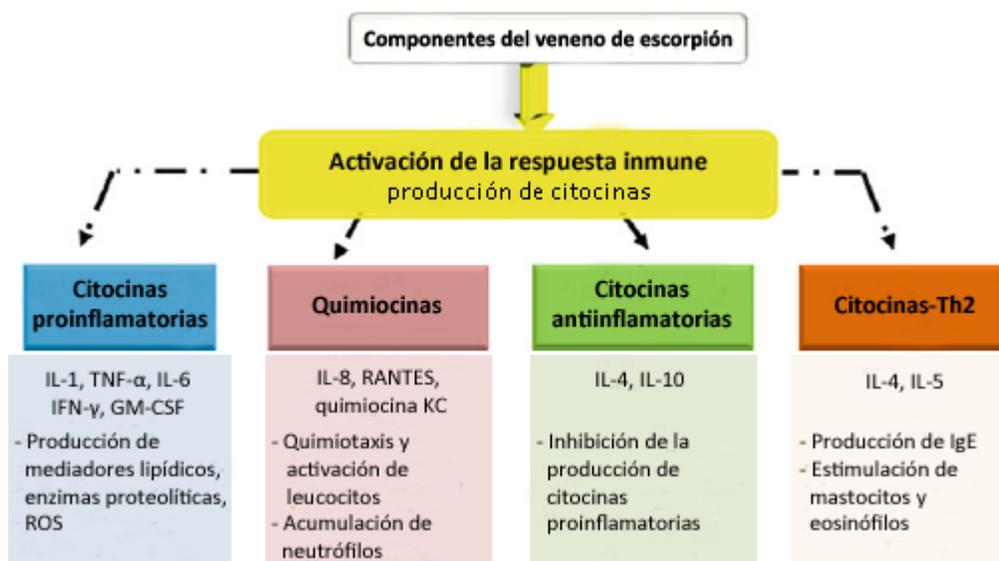


Figura 5. Respuesta inmunológica a los componentes del veneno de escorpión. Los venenos de escorpión ejercen un efecto en el sistema inmune, promoviendo la producción y secreción de citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos y otras moléculas señalizadoras. Se resumen los mediadores secretados por las células del sistema inmune y sus funciones específicas. GM-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos; KC, quimioatrayente de queratinocitos; RANTES, quimioatrayente de monocitos y linfocitos T; ROS, especies reactivas de oxígeno. Modificado de: Adi-Bessalem *et al.*, 2015.

1.1.6 Escorpiones del género *Centruroides* (Marx, 1890)

Dentro de la familia Buthidae se encuentran los escorpiones del género *Centruroides*, conocidos comúnmente como escorpiones de balsas o de corteza. Es uno de los géneros de escorpiones más diversos y de más amplia distribución geográfica en México (de Armas y Martín-Frías, 2008). Se han descrito aproximadamente 66 especies, de las cuales 37 se encuentran en México y su distribución abarca desde Estados Unidos hasta el norte de América del Sur (Ponce-Saavedra y Francke, 2011). Juegan un papel importante como depredadores de plagas y fauna nociva. Algunas de las especies son muy tóxicas para los humanos y pueden poner en riesgo la vida de las personas que sufren las picaduras, por lo que son consideradas como especies de importancia médica (Ponce-Saavedra y Francke, 2013).

El veneno de los escorpiones *Centruroides*, está compuesto principalmente de mucopolisacáridos, hialuronidasa, fosfolipasa, serotonina, histamina, inhibidores de enzimas y una gran cantidad de toxinas, la mayoría péptidos y neurotoxinas (Petricevich, 2010; Casella-Martins *et al.*, 2015). Los péptidos neurotóxicos son los responsables del desarrollo de los síntomas como dolor, desregulación del sistema nervioso y cardiaco, vómito, dolor abdominal, excitación neuromuscular, entre otros efectos deletéreos

(Casella-Martins *et al.*, 2015). Los síntomas surgen por la interacción que tienen las neurotoxinas con los canales iónicos de sodio (Na^+) principalmente y, en menor medida, con los canales de potasio (K^+), calcio (Ca^{2+}) y cloro (Cl^-) (Osnaya-Romero *et al.*, 2016). Los canales iónicos son poros transmembranales que están involucrados en diversos procesos fisiológicos como la excitación nerviosa y muscular, secreción de hormonas, proliferación celular, transducción de señales celulares, osmorregulación y la activación de linfocitos (Batista *et al.*, 2002; Petricevich, 2010).

Las neurotoxinas de escorpión se clasifican de acuerdo con su estructura, mecanismo de acción y el canal con el cual interactúan (Petricevich, 2010). Se reconocen 4 clases de neurotoxinas de escorpión: dos que presentan los canales de sodio como su blanco molecular, las α y β -toxinas; las toxinas KTx, asociadas a canales de potasio y, aquellas que interactúan con los canales de calcio (Olamendi-Portugal *et al.*, 2005; Petricevich, 2010).

Estudios previos han reportado neurotoxinas de escorpión con potencial para modular la respuesta inmune por medio de mecanismos como: a) estimulación del sistema inmune innato a través de receptores tipo Toll o TLRs (Zoccal *et al.*, 2011); b) secreción de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias (Mohanty *et al.*, 2016; Jiménez *et al.*, 2018); c) inhibición de la activación de linfocitos a través del bloqueo de canales iónicos (Mohanty *et al.*, 2016; Ye *et al.*, 2016); d) secreción de IL-12 en macrófagos (Corzo y Espino-Solis, 2017; Jiménez *et al.*, 2018) y e) inhibición de la proliferación de linfocitos T (Casella-Martins *et al.*, 2015).

Las neurotoxinas de escorpión presentan como blanco molecular los canales iónicos, los cuales son esenciales en la activación de linfocitos T cooperadores y en procesos posteriores como su diferenciación, secreción de citocinas y proliferación. Por lo tanto, los venenos de los escorpiones *Centruroides* resultan candidatos para estudiar la diferenciación en linfocitos T cooperadores, por ser una fuente rica en neurotoxinas.

1.1.6.1 *Centruroides limpidus* (Karsch, 1879)

El escorpión *Centruroides limpidus* es una de las especies más peligrosas en México y su distribución abarca los estados de Querétaro, Michoacán, Morelos, México, Puebla, Guerrero y Veracruz (Martín-Frías *et al.*, 2010). También conocido como el escorpión de Morelos, son escorpiones de talla mediana (5-7 cm) y

presentan una coloración amarilla con variación pardo-rojiza (Ponce-Saavedra y Francke, 2013). Pueden encontrarse en distintos ecosistemas como bosque de encinos, pastizales, bosque tropical caducifolio, matorral xerófilo y en zonas urbanas (Figura 6).

Existen diversos estudios que reportan la caracterización de diferentes componentes del veneno de *C. limpidus*; la mayoría son péptidos que afectan los canales iónicos de mamíferos, tales como canales de Na^+ y canales de K^+ ; también se han reportado toxinas específicas que afectan a crustáceos, así como péptidos neurodepresores y antimicrobianos (Cid-Urbe *et al.*, 2017).



Figura 6. *Centruroides limpidus* (Karsch, 1879). Escorpión de la izquierda, corresponde a un espécimen hembra; escorpión de la derecha, espécimen macho. Se aprecian diferencias en la longitud y grosor del metasoma y tronco. Tomado de: Cid-Urbe *et al.*, 2017.

1.1.6.2 *Centruroides noxius* (Hoffman, 1932)

Comúnmente conocido como el escorpión de Nayarit, *Centruroides noxius* es una especie muy tóxica para los humanos y es causante de muchos de los casos de fallecimiento en la población adulta. Su distribución abarca los estados de Nayarit, Sinaloa y Jalisco, principalmente. Presenta una coloración marrón-amarilla, con pedipalpos relativamente cortos y delgados y un metasoma alargado que se hace más estrecho

conforme se aleja del tronco. Habita generalmente en zonas cálidas y bajas, no obstante, aún se desconoce mucho de su ecología (Figura 7) (Teruel *et al.*, 2015).

Estudios previos con veneno de *C. noxius* han reportado su capacidad para promover la secreción sistémica de IL-1 en humanos, citocina implicada en la producción y liberación de otras citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias incluidas: IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ (Petricevich, 2006; Jiménez *et al.*, 2018). También se han aislado algunos péptidos que interactúan con canales iónicos, e incluso se han aislado neurotoxinas que bloquean específicamente canales de K⁺ en linfocitos (Gáspár *et al.*, 1995; Santibáñez-López *et al.*, 2015).



Figura 7. *Centruroides noxius* (Hoffman, 1932). Escorpión de la izquierda, corresponde a un espécimen hembra; escorpión de la derecha, espécimen macho. Se aprecian diferencias en la longitud y grosor del metasoma y tronco. Tomado de: Teruel *et al.*, 2015.

1.1.7 Papel de los canales iónicos en la activación de linfocitos T

Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana que permiten el flujo pasivo de iones a través de la membrana plasmática o de los organelos intracelulares. Las células del sistema inmune presentan una gran variedad de canales iónicos y el flujo de iones a través de ellos puede ser controlado de varias maneras, incluyendo cambios en el potencial de membrana, unión de ligandos y modificaciones postraduccionales (Jentsch *et al.*, 2004; Feske *et al.*, 2015).

Los canales dependientes de voltaje son expresados en una gran cantidad de células excitables y no excitables y se caracterizan por responder a cambios en el potencial de membrana con modificaciones conformacionales que permiten la apertura o cierre del canal (Rasband y Trimmer, 2010). Presentan una estructura general compuesta por una asociación tetramérica, donde cada subunidad consta de seis hélices α (S1-S6), conectadas por loops intracelulares y extracelulares (Li y Xiong, 2011). Estos canales se dividen, a su vez, en cuatro grandes grupos de acuerdo con el ion al que dan paso: canales de potasio, sodio, calcio y cloro.

Se sabe que los canales iónicos están implicados en muchas respuestas celulares, entre las que destaca la activación de linfocitos T. El flujo de Ca^{2+} hacia el interior de la célula promueve este proceso mediante la regulación de enzimas y factores de transcripción (Cahalan y Chandy, 2009). La despolarización de la membrana, a consecuencia de la entrada de Ca^{2+} a favor del gradiente electroquímico, hace necesario el flujo de K^+ hacia el exterior de la célula para mantener hiperpolarizada la membrana. De manera específica, los canales de K^+ están involucrados en gran variedad de funciones como la regulación de la actividad eléctrica cardíaca y neuronal, contracción muscular, secreción de hormonas, liberación de neurotransmisores y la modulación de la función de las células T (Olamendi-Portugal *et al.*, 2005). Dos tipos de canales de potasio dominan la conductancia en linfocitos T: los canales Kv1.3 y los canales activados por calcio KCa3.1, un canal independiente de voltaje que se activa por acción de la calmodulina (Feske *et al.*, 2015).

El canal dependiente de voltaje Kv1.3 es un homotetrámero de cuatro subunidades α , cada una compuesta de seis segmentos (S1-S6) y un loop entre los segmentos S5 y S6. Cuando ocurre la despolarización de la membrana, los residuos de arginina que se encuentran en el segmento S4 actúan como sensores de voltaje que permiten la apertura del canal. El canal de K^+ se encarga de regular el potencial de membrana en linfocitos T y activar los canales activados por liberación de Ca^{2+} (CRAC), canales esenciales para mantener la entrada de Ca^{2+} extracelular y la activación de las células T (Zhao *et al.*, 2015; Fung-Leung *et al.*, 2017).

En la Figura 8 se describe el papel de los canales Kv1.3 y CRAC en la activación de linfocitos T. Después de que las APC realizan la presentación de antígeno a los linfocitos T, se produce IP_3 (inositol trifosfato) que se une a su receptor para promover la liberación del calcio contenido en el retículo endoplasmático. Por otra parte, las moléculas de interacción estromal (STIM1 o STIM2) son secretadas por el retículo endoplasmático para inducir la apertura de los canales CRAC y permitir la entrada de Ca^{2+}

extracelular. Este último promueve la activación del factor de transcripción NFAT (factor nuclear de linfocitos T activados), que está implicado en la diferenciación, proliferación y expresión de citocinas en los linfocitos T. La polarización de la membrana provoca la apertura de los canales Kv1.3 para expulsar K^+ intracelular y balancear el aumento de Ca^{2+} en el citoplasma (Zhao *et al.*, 2015).

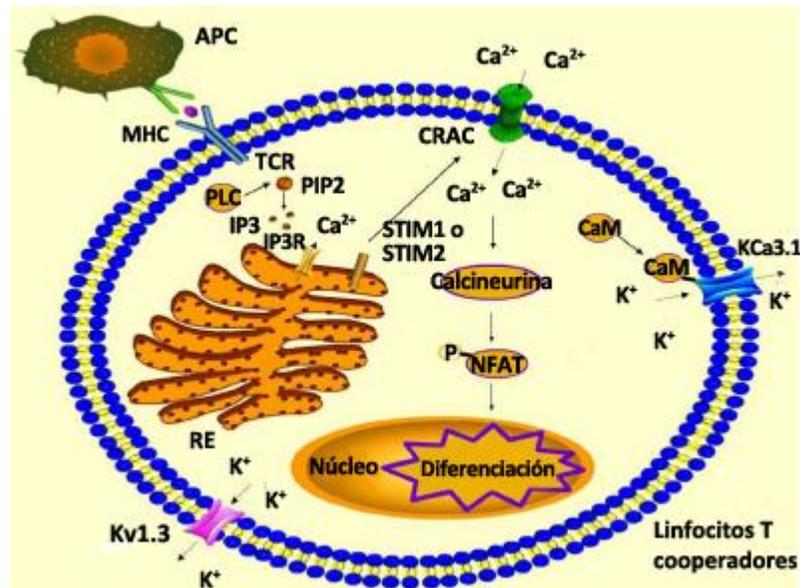


Figura 8. Entrada de Ca^{2+} extracelular y salida de K^+ intracelular en la estimulación de linfocitos T cooperadores. Después de que las APC presentan un antígeno a los linfocitos Th, se genera el segundo mensajero IP3, el cual promueve la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplasmático. La alta concentración de Ca^{2+} en el citoplasma provoca la apertura de los canales Kv1.3 y KCa3.1, lo que permite la salida de K^+ intracelular y la entrada de Ca^{2+} extracelular, para que la activación del factor de transcripción NFAT continúe. CRAC, canales activados por liberación de calcio; IP3, inositol trifosfato; IP3R, receptor de inositol trifosfato; PIP2, fosfatidilinositol bifosfato; PLC, fosfolipasa C; RE, retículo endoplasmático. Modificado de: Zhao *et al.*, 2015.

Estudios recientes han reportado toxinas aisladas de diferentes animales venenosos capaces de inhibir la activación de linfocitos T a través del bloqueo de los canales Kv1.3. Estos bloqueadores han demostrado ser eficaces en modelos animales de reacciones de hipersensibilidad retardada, encefalomiелitis autoinmune, artritis, diabetes autoinmune, trasplantes, dermatitis alérgica y psoriasis. Lo cual establece la posibilidad de que las toxinas podrían funcionar, por su actividad inmunosupresora, en el tratamiento de padecimientos autoinmunes en humanos (Ye *et al.*, 2016; Fung-Leung *et al.*, 2017). Sin embargo, el efecto de los bloqueadores depende en su mayoría de la naturaleza del estímulo y de las

subpoblaciones de linfocitos T que se pretenda modular, por lo que aún se desconoce mucho sobre su potencial como moléculas moduladoras (Fung-Leung *et al.*, 2017).

1.2 Justificación

Los venenos de escorpión son una fuente rica en toxinas y biomoléculas con potencial terapéutico, y en México se encuentra más del 10% de la diversidad mundial de estos arácnidos. Estas toxinas han demostrado ser eficaces en diversas actividades, entre las que destaca la modulación del sistema inmunológico. Estudios recientes han reportado que ciertas toxinas de escorpión son capaces de activar el sistema inmune mediando, entre otros mecanismos, la proliferación, diferenciación y expresión de citocinas en diferentes tipos celulares. Los venenos obtenidos de especies del género *Centruroides* resultan candidatos importantes para la modulación de la respuesta inmune por su alto contenido de neurotoxinas. Los péptidos neurotóxicos interactúan con los canales iónicos que, en linfocitos T cooperadores, intervienen en los procesos de diferenciación.

Los linfocitos T cooperadores están involucrados en la coordinación de la respuesta inmune frente patógenos intracelulares y extracelulares, así como en la autotolerancia. Además, alteraciones en su fisiología desempeñan un papel importante en la progresión de ciertas enfermedades autoinmunes, alergias, desarrollo de tumores e inflamación crónica. Por ello, encontrar moléculas que modulen las funciones de estas células, ya sea aumentando o atenuando sus funciones efectoras, resulta importante en el tratamiento de diversas patologías.

Por lo anterior, se evaluó el efecto del veneno de los escorpiones, *Centruroides limpidus* y *Centruroides noxius*, en la diferenciación de linfocitos Th1, Th2 y Th17, así como en la producción de IL-10, con la finalidad de encontrar moléculas moduladoras.

1.3 Hipótesis

El veneno de los escorpiones, *Centruroides limpidus* y *Centruroides noxius*, posee toxinas que ejercen un efecto *in vitro* asociado a la diferenciación de linfocitos Th1, Th2 y Th17, y la producción de IL-10, en células mononucleares de ratón.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto *in vitro* del veneno de las especies *Centruroides limpidus* y *Centruroides noxius* en la diferenciación de linfocitos Th1, Th2 y Th17, y en la producción de IL-10.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de los venenos de escorpión en la proliferación de linfocitos T.
2. Determinar el efecto de los venenos en la expresión de citocinas intracelulares específicas para cada subpoblación.
3. Evaluar la secreción de citocinas distintivas de cada subpoblación, IFN- γ , IL-4, IL-17 e IL-10
4. Identificar moléculas contenidas en las fracciones de veneno que hayan demostrado un efecto.

Capítulo 2. Metodología

En la Figura 9 se presenta el esquema general de la metodología llevada a cabo para la realización de este proyecto.



Figura 9. Esquema general de la metodología. El trabajo experimental que se realizó para alcanzar los objetivos planteados se encuentra resumido. CFSE, carboxifluoresceína; ELISA, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas; LC-MS/MS cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem.

2.1 Venenos de escorpión

2.1.1 Obtención de los venenos

Las muestras liofilizadas de veneno, de *Centruroides limpidus* y *Centruroides noxius* fueron proporcionadas por el equipo de investigación de Lourival Possani, del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). El laboratorio de Possani se ha dedicado los últimos 35 años a la investigación de los componentes del veneno de escorpión, por ser de importancia médica y de interés científico por la gran variedad de ligandos moleculares que poseen.

Los venenos liofilizados fueron almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y protegidos de la luz con ayuda de papel aluminio, hasta su fraccionamiento.

El procedimiento básico de ordeño de escorpiones se describe a continuación. La extracción de veneno se lleva a cabo mediante la estimulación eléctrica del telson (15 V), con la ayuda de un electrodo, para promover la expulsión del veneno. Éste se recupera con ayuda de un capilar, se solubiliza en agua destilada y se centrifuga a 14,000 rpm durante 15 minutos. Por último, se liofiliza el sobrenadante y se almacena a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Valdez-Velazquéz *et al.*, 2016).

2.1.2 Fraccionamiento de los venenos

La separación de los venenos totales se realizó mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución en fase reversa (HPLC-RP). Se utilizó un cromatógrafo LC System 1100A de Agilent Technologies y una columna analítica Zorbax-300SB C_{18} (Agilent Technologies, 4.6 x 250 mm, 5 μm). La columna fue equilibrada con solución A (ácido trifluoroacético al 0.12% en agua) durante 30 minutos y el volumen de inyección fue de 200 μL , con un flujo binario de 1 mL/min. El gradiente de elución utilizado se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Gradiente de elución utilizado para fraccionar los venenos. Solución A: ácido trifluoroacético al 0.12% en agua; solución B: ácido trifluoroacético al 0.1% en acetonitrilo.

Condiciones cromatográficas		
Tiempo (min)	A %	B%
0	100	0
5	100	0
65	40	60
65.1	0	100
70	0	100

Los venenos liofilizados de *C. limpidus* y *C. noxius* (2.5 mg aprox. de cada uno) se resuspendieron en 200 μL de la solución A y se inyectaron en el cromatógrafo. Los venenos eluyeron a temperatura ambiente durante 70 minutos y la detección de los picos se llevó a cabo en un detector de UV-Vis a 230 nm. La estrategia, que se siguió para fraccionar los venenos consistió en coleccionar los picos que eluían cada

5 minutos durante la corrida. Posteriormente, se determinó la concentración de proteína para cada fracción mediante lecturas de absorbancias a 280 nm, por medio de un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) (Casella-Martins *et al.*, 2015). Solamente se consideraron las fracciones con mayor concentración de proteína para los ensayos biológicos. Por último, las fracciones fueron congeladas a -80 °C, liofilizadas y se resuspendieron en agua destilada estéril a la concentración de 1 µg/µL para facilitar su manipulación durante los ensayos celulares.

2.2 Animales

Para el desarrollo de este proyecto se utilizaron ratones macho de la cepa BALB/c, de entre 6 a 8 semanas de edad. Los ratones se mantuvieron en jaulas de un sistema Optimice (AnimalCare Systems, 484 cm²), con un fotoperíodo de 12 h (12 h luz: 12 h oscuridad) y una temperatura de 24 °C. Se les proporcionó alimento (Teklad Global Diets-Envigo) y agua *ad libitum* y se utilizó aserrín como cama de contacto (Teklad-Envigo).

Para la realización de los ensayos biológicos, los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical después de ser anestesiados con pentobarbital sódico (Dolethal-Vetoquinol) a una concentración de 40 – 70 mg por kg del animal. Se siguieron los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

2.2.1 Extracción de ganglios linfáticos

Se extrajeron los ganglios linfáticos inguinales, axilares, maxilares y mesentéricos de los ratones para llevar a cabo los cultivos celulares (Figura 10).

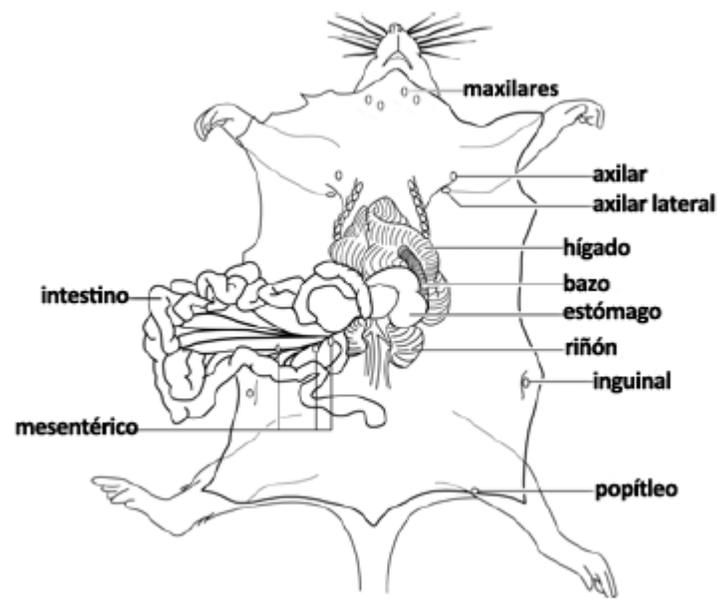


Figura 10. Órganos linfáticos de ratón. Los ganglios linfáticos principales se encuentran en la región axilar, maxilar, inguinal y mesentérica. El tamaño de los ganglios varía en función de los retos antigénicos a los que se expone el animal. Modificado de: Reeves y Reeves, 2001.

Después de que el ratón es sacrificado, se coloca sobre su espalda en una tabla de disección y se rocía con alcohol al 70% para esterilizar el área. Para la extracción de los órganos linfáticos, se realizó una línea media en la parte ventral del animal con ayuda de unas tijeras iris y se removió la piel para extraer los ganglios inguinales, axilares y maxilares. Para los ganglios mesentéricos se realizó una segunda incisión en la zona del peritoneo y así separar los ganglios del intestino con ayuda de unas pinzas quirúrgicas (Reeves y Reeves, 2001). Los órganos colectados fueron incubados en 0.5 mL de colagenasa (370 $\mu\text{L}/\text{mL}$) (Gibco) durante 1 h, con una atmósfera de 5% de CO_2 a 37 $^{\circ}\text{C}$, con la finalidad de degradar la matriz extracelular. Las muestras celulares se homogenizaron con ayuda de una jeringa de 3 mL a través de un proceso mecánico de maceración; se filtraron (Falcon, 70 μm) y se agregaron a un tubo de 15 mL. Se realizó un lavado del filtro y la jeringa con 2 mL de HBSS 1X (Gibco) y se centrifugó el tubo a 302 g (Haraeus Multifuge 1 S-R-Thermo Fisher Scientific) durante 10 min a 4 $^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante se decantó, se resuspendió el pellet y se agregó 1 mL de HBSS 1X para realizar una tinción con azul tripán (0.4%) (Sigma-Aldrich) a una dilución 1:10. Por último, se realizó un conteo celular con ayuda de un hematocitómetro y un microscopio y se estimó el número de células por mililitro.

2.3 Cultivo celular

Los ensayos biológicos de proliferación y detección de poblaciones y citocinas se realizaron mediante cultivos celulares. Después del conteo celular, las células se distribuyeron en microplacas (Corning) con medio RPMI 1640 (Corning), suplementado con antibiótico y antimicótico al 1%, y suero fetal bovino al 5% (Gibco). Finalmente se añadieron las fracciones de los venenos de *C. limpidus* y *C. noxius* a diferentes concentraciones (6.25 – 80 µg/mL), cabe mencionar que la selección de concentraciones utilizadas se realizó conforme a la cantidad de proteína de cada fracción. Como control positivo se utilizó concanavalina A (5 µg/mL) (Sigma-Aldrich), y células sin ningún estímulo como control negativo (Coligan y Bierer, 2011). El tiempo de incubación para los ensayos de proliferación fue de 96 h, y de 24 h para los ensayos de detección de poblaciones y citocinas, con una atmósfera de 5% de CO₂ a 37 °C (Coligan y Bierer, 2011).

2.3.1 Proliferación celular

La proliferación celular se evaluó mediante dos técnicas diferentes. El primer método se basa en la utilización del diacetato de carboxifluoresceína (CFSE), un colorante fluorescente capaz de permear la membrana celular y de unirse covalentemente a los grupos amino libres de las proteínas citoplasmáticas. Al llevarse a cabo la división celular, la CFSE se distribuye en las células hijas y disminuye su intensidad de fluorescencia en las generaciones sucesivas; estos cambios en los niveles de fluorescencia se interpretan con ayuda de un citómetro de flujo (Quah y Parish, 2010). Asimismo, se evaluó la proliferación a través del método de la resazurina sódica. Se trata de una técnica colorimétrica cuyo fundamento es la reducción de la resazurina sódica (compuesto azul no fluorescente) a resorufina (compuesto rojizo-púrpura fluorescente) por acción del metabolismo celular (O'Brien *et al.*, 2000).

2.3.1.1 Evaluación de la proliferación celular mediante el método de la carboxifluoresceína

Los ensayos con carboxifluoresceína se realizaron en microplacas de 24 pozos; se distribuyeron 700,000 células/pozo en 500 µL de medio RPMI y se evaluaron las condiciones establecidas en el apartado 2.3 (Figura 11).

Para llevar a cabo la tinción con CFSE, las células se resuspendieron en un tubo con 1 mL de HBSS 1X; se mezcló 1 μ L de CFSE (5 mM) (Life Technologies) con 100 μ L de HBSS 1X, se agregó al tubo que contenía las células y se incubó a temperatura ambiente, durante 15 minutos, con agitación para homogenizar la tinción. Posteriormente, el tubo se centrifugó a 302 *g* durante 5 minutos, se decantó y se lavó con 1 mL de medio RPMI; este procedimiento se realizó tres veces (Quah y Parish, 2010).

Finalizado el tiempo de incubación (96 h), se hizo una tinción con un anticuerpo anti-CD3 (PE-Cy5) (Biolegend), específico para linfocitos T de ratón; se agregaron 25 μ L del anticuerpo (dilución 1:400) y se analizó mediante citometría de flujo.

Los procedimientos para llevar a cabo las tinciones de marcadores fenotípicos y el análisis por citometría de flujo se describirán a detalle en el apartado 2.3.2. Solamente se evaluaron las fracciones C1F8, C1F9, CnF11, CnF12 y CnF13 a una concentración de 35 μ g/mL.

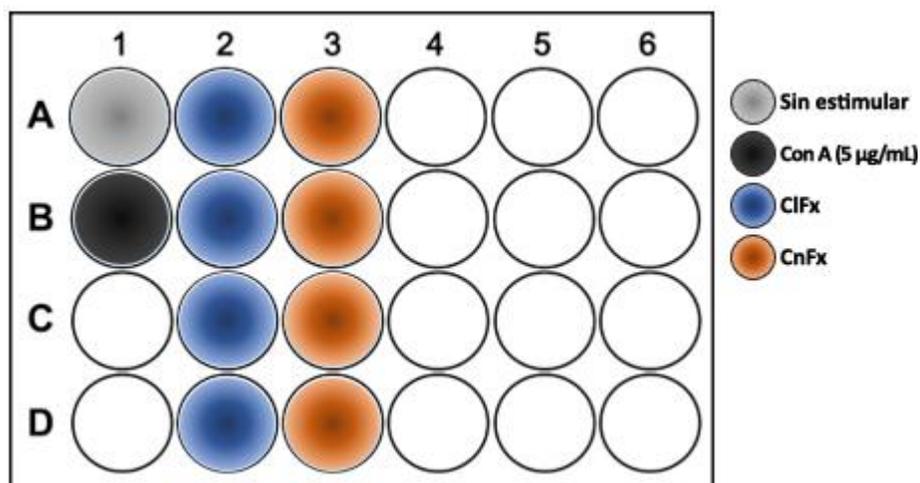


Figura 11. Diseño de placa de 24 pozos para el método de la carboxifluoresceína. Se distribuyeron 700,000 células/pozo en 500 μ L de medio RPMI. Se evaluaron las condiciones: células sin estimular como control negativo; con A (5 μ g/mL) como control positivo; C1Fx, fracciones de *C. limpidus*; CnFx, fracciones de *C. noxius*.

2.3.1.2 Evaluación de la proliferación celular mediante el método de la resazurina sódica

Para los ensayos con resazurina sódica se utilizaron microplacas de 96 pozos en las que se cultivaron 200,000 células/pozo en un volumen final de 200 μ L. Se agregaron 20 μ L (dilución 1:64) de resazurina sódica (Sigma-Aldrich) a todos los pozos (O'Brien *et al.*, 2000) y se evaluaron las fracciones CIF2, CIF7, CIF8, CIF9, CnF11, CnF12 y CnF13 de los venenos, a diferentes concentraciones (6.25 – 80 μ g/mL). Cada parámetro se evaluó por triplicado, como se muestra en la Figura 12. Después del período de incubación (96 h) se realizaron lecturas de absorbancia en un lector de placas (Epoch, BioTek) a 570 y 600 nm.

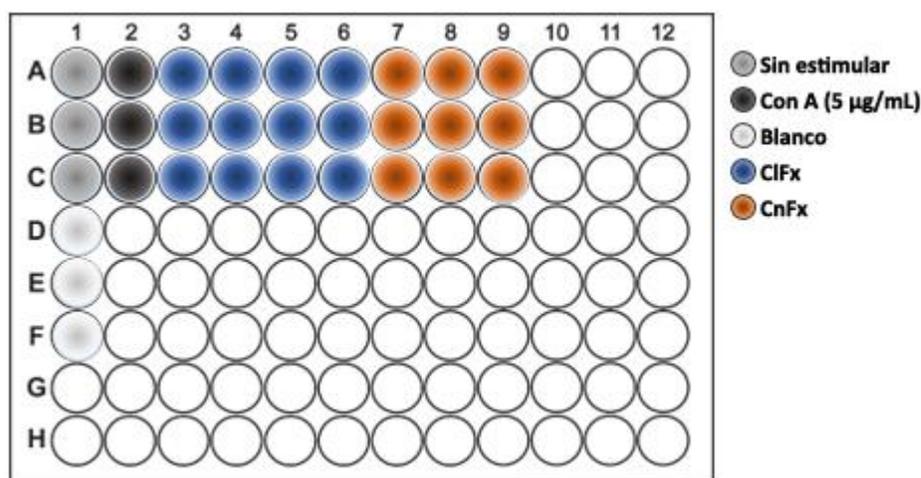


Figura 12. Diseño de placa de 96 pozos para el método de la resazurina sódica. Se distribuyeron 200,000 células/pozo en 200 μ L de medio RPMI. Se evaluaron las condiciones: células sin estimular como control negativo; con A (5 μ g/mL), concanavalina A como control positivo; blanco, para determinar la absorbancia del medio RPMI; CIFx, fracciones de *C. limpidus*; CnFx, fracciones de *C. noxius*.

2.3.2 Detección de poblaciones celulares y citocinas intracelulares

La citometría de flujo es una técnica capaz de medir las características físicas y químicas de partículas en suspensión, tales como tamaño, granularidad y número de partículas o células. Además, permite la utilización de anticuerpos acoplados con fluorocromos para detectar moléculas de interés, lo que representa una ventaja para estudios de caracterización fenotípica o para marcar componentes estructurales: marcadores específicos de una población celular, citocinas, proteínas, así como ácidos nucleicos (Adan *et al.*, 2017).

Para detectar las subpoblaciones Th1, Th2 y T17, al igual que la IL-10, se emplearon microplacas de 24 pozos con el diseño antes mencionado (Figura 11); se evaluaron las fracciones CIF2, CIF6, CIF7, CIF8, CIF9, CnF11, CnF12, CnF13 y CnF14 de los venenos, a diferentes concentraciones (15 – 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y las células fueron tratadas con brefeldina A (BFA) (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 4 h antes de su cosecha.

Se realizó una tinción extracelular para los marcadores de superficie CD3 y CD4 para delimitar la población de linfocitos T cooperadores, así como una tinción intracelular con anticuerpos anti-IFN- γ , anti-IL-4, anti-IL-17 y anti-IL-17 para detectar las subpoblaciones Th1, Th2 y Th17 respectivamente, además de anti-IL-10 para delimitar los linfocitos CD4⁺ productores de esta citocina (Coligan y Bierer, 2011).

Una vez concluido el tiempo de incubación (24 h), se retiró el medio de los pozos y se transfirió a tubos de 5 mL (Falcon), para centrifugarlos a 302 *g* durante 10 minutos. Se recuperaron los sobrenadantes (450 μL aprox.) con el objetivo de cuantificar las citocinas secretadas y se preservaron a -80 °C hasta su análisis. Las células contenidas en cada tubo se resuspendieron en 100 μL de HBSS 1X y se repartieron en dos tubos de 1.2 mL (Corning): (-) sin tinción y (+) con tinción con anticuerpos. A los tubos (+) se les añadieron 25 μL de una dilución de anticuerpos extracelulares (Biolegend) en HBSS 1X (1:400): anti-CD3 (PE-Cy5) y anti-CD4 (FITC), y se incubaron durante 15 minutos protegidos de la luz. Se lavaron los tubos con 500 μL de HBSS 1X y se centrifugaron a 250 *g* durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en el volumen restante, se agregaron 50 μL de la solución de fijación/permeabilización (Kit) (BD Biosciencias) a todos los tubos y se incubaron durante 30 minutos en oscuridad.

Posteriormente, se realizó un lavado con 500 μL de Perm/Wash Buffer 1X (BD Biosciencias) a cada tubo y se centrifugaron a 250 *g* durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y la solución con el sobrenadante restante se tiñó (+) con 25 μL de una dilución de anticuerpos (Biolegend) en Perm/Wash 1X (1:400): anti-IFN- γ (AF647), anti-IL-4 (PE-Cy7), anti-IL-17 (APC-Cy7) y anti-IL-10 (PE), y se incubaron durante 25 minutos protegidos de la luz. Después del tiempo de incubación, todos los tubos se lavaron con 500 μL de Perm/Wash 1X y se centrifugaron a 250 *g* durante 5 minutos. Finalmente, se decantaron los tubos y se resuspendieron con 500 μL de paraformaldehído (PFA) al 1% (Sigma-Aldrich) para fijar las células. El análisis posterior se llevó a cabo mediante un citómetro de flujo (Attune Acoustic Focusing Cytometer) y los datos generados se analizaron a través del software FlowJo 10.

2.4 Detección de citocinas solubles mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

La cuantificación de citocinas secretadas (IFN- γ , IL-4, IL-17 e IL-10) se efectuó mediante kits de ELISA (eBioscience) específicos para cada citocina, a partir de los sobrenadantes recuperados en los ensayos de detección de poblaciones y citocinas (apartado 2.3.2). Con ayuda de estándares de referencia, se realizaron curvas de calibración (1.56 – 200 pg/mL) para determinar la cantidad de citocinas contenidas en las muestras.

El procedimiento general se describe a continuación. Se recubrió una microplaca de 96 pozos con 100 μ L del anticuerpo de captura (1:250), se envolvió la placa con papel plástico y se incubó durante la noche a 4 °C. Al día siguiente se realizaron 3 lavados con 250 μ L/pozo de wash buffer (Tween-20 al 0.05% en PBS 1X), se bloqueó cada uno de los pozos con 200 μ L de ELISA/ELISPOT 1X y se incubó la placa por 1 h a temperatura ambiente. Se añadieron 100 μ L de las muestras a los pozos apropiados y 100 μ L de ELISA/ELISPOT 1X para los blancos de la placa; se cubrió la placa y se incubó toda la noche a 4 °C. Después del tiempo de incubación, se lavó 5 veces con 250 μ L de wash buffer, se agregó el anticuerpo de detección (1:250) y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Se realizaron 5 lavados más, se agregaron 100 μ L de la enzima Avidin-HRP (1:250) y se incubó durante 30 minutos. Finalmente se realizaron 7 lavados, se agregaron 100 μ L de la solución sustrato (TMB 1X), se incubó por 15 minutos y se añadieron 50 μ L de la solución Stop (H_3PO_4 1M). Para concluir se realizaron lecturas de la absorbancia mediante un lector de placas a 450 y 570 nm.

2.5 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico y la elaboración de las gráficas se utilizó el software GraphPad Prism 7. Todos los datos se expresaron como media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, considerando el valor de $P < 0.03$ como significativo, seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett.

2.6 Identificación de las toxinas contenidas en las fracciones de interés

La identificación de toxinas se realizó mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). La espectrometría de masas permite la identificación, caracterización y cuantificación de compuestos químicos basados en las masas moleculares y patrones de fragmentación (Vogeser y Parhofer, 2007). Solamente se analizaron las fracciones CIF8, CIF9, CnF12 y CnF13 de los venenos, por ser aquellas que presentaron efecto en los ensayos de detección de poblaciones y citocinas. La fracción CnF11 se utilizó como control negativo por ser una muestra con poca actividad y la fracción CnF14, a pesar de haber tenido efectos relevantes en los cultivos celulares, no fue posible analizarla a causa de la baja concentración de proteína de la muestra.

2.6.1 Preparación de las muestras

Los protocolos de digestión enzimática se ajustaron para cada fracción de acuerdo con la concentración de proteína. Las cantidades utilizadas de cada fracción, así como el volumen de los reactivos, se encuentran expresados en la Tabla 2.

Tabla 2. Digestión enzimática de las fracciones de los venenos. Se muestran las cantidades utilizadas en el proceso de digestión para cada una de las fracciones. NH_4HCO_3 , bicarbonato de amonio; DTT, ditioneitol; CIFx, fracciones de *C. limpidus*; CnFx, fracciones de *C. noxius*.

Fracción	Digestión enzimática				
	Muestra 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (μL)	NH_4HCO_3 100 mM (μL)	DTT 10 mM (μL)	Iodoacetamida 20 mM (μL)	Tripsina 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (μL)
CIF8	6	80.5	4	4	0.5
CIF9	20	62	4.5	4.7	3
CnF12	40	44.5	4.5	4.5	2.5
CnF13	60	110	8.7	9	4
CnF11	15	71.2	4.5	4.5	0.8

El proceso general de digestión enzimática se describe a continuación. En un tubo de 1 mL se diluyeron las muestras en bicarbonato de amonio (100 mM) (Sigma-Aldrich), se añadieron 2 μL de

ProteaseMAX 1% (Promega) y ditiotretitol (DTT) a la concentración de 10 mM (Promega). Se incubaron las muestras a 37 °C durante 1 h y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Después del periodo de enfriamiento se agregó iodoacetamida (20 mM) (Sigma-Aldrich) y se incubó durante 30 minutos en oscuridad. Posteriormente, se agregó tripsina (0.2 µg/µL) (Promega) y 1 µL de ProteaseMAX 1%, para después incubar durante 3 h a 37 °C. Finalmente las muestras se desalaron mediante una columna Sep-Pak C18 Plus Light Cartridge (Waters), se congelaron a -80 °C y se concentraron en un SpeedVac (Thermo Fisher Scientific).

2.6.2 Análisis por LC-MS/MS

La cromatografía líquida se realizó por medio de un HPLC (Ekspert nanoLC 400) en fase reversa. Se utilizó una columna HALO fused-core C18 (SCIEX, 0.3 x 150 mm, 2.7 µm) con un flujo de 5 µL/min y fue equilibrada con solución A (ácido fórmico al 0.1% en agua) durante 30 minutos. El volumen de inyección fue de 10 µL y el horno de columna se ajustó a 45 °C. El gradiente de elución utilizado se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Gradiente de elución utilizado para el análisis por LC-MS/MS. Solución A: ácido fórmico al 0.1% en agua; solución B: ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo.

Condiciones cromatográficas		
Tiempo (min)	A%	B%
0	95	5
3	95	5
90	70	30
117	0	100
120	0	100

El análisis por LC-MS/MS se realizó mediante un sistema Triple TOF 5600 con una fuente Duo Spray en modo de ionización positiva (AB SCIEX). Se ajustaron las condiciones de operación del espectrómetro de la siguiente manera: 5500 V para el voltaje de ion spray, 500 °C para la fuente de iones, 25 psi de gas curtain (CUR), 25 psi de gas nebulizador (GS 1), 35 psi de gas calentador (GS 2) y 100 V para el potencial desintegrador. Los rangos de masas se establecieron en m/z 250 – 1800 para los scan TOF MS y 50 – 2000 para los experimentos TOF MS/MS. Se utilizó “*Rolling collision energy*” para promover la fragmentación y

la energía de colisión fue de 15 eV para MS/MS. Los 20 iones más intensos de cada exploración por MS se seleccionaron como iones precursores para la fragmentación de MS/MS.

Con la finalidad de identificar las toxinas, se analizaron los espectros obtenidos con ayuda del software ProteinPilot 4.5 (algoritmo Paragon) y los resultados se compararon contra la base de datos de UniProtKB para *C. limpidus*, *C. noxius* y *Centruroides*. Las búsquedas se realizaron con un nivel de confianza $\geq 95\%$ y se consideraron como identificaciones fidedignas si el número de secuencias únicas era ≥ 2 .

Capítulo 3. Resultados

3.1 Fraccionamiento de los venenos

Las fracciones de los venenos se obtuvieron mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se realizó una corrida de 70 minutos para cada veneno de escorpión a temperatura ambiente, se inyectaron 2.5 mg de cada veneno y se recuperaron las fracciones cada 5 minutos. Durante la corrida se presentaron problemas con la presión en la precolumna, lo que afectó la separación y el tiempo de retención de los picos en ambas muestras. En las Figuras 13 y 14 se muestran los cromatogramas obtenidos en la separación de los venenos de *Centruroides limpidus* y *Centruroides noxius*, respectivamente.

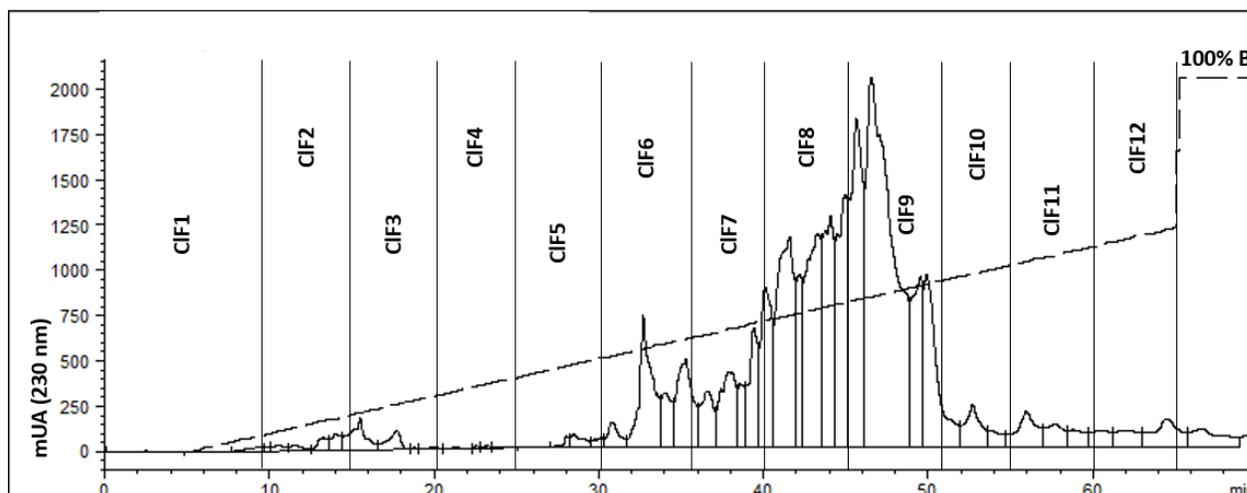


Figura 13. Perfil cromatográfico del veneno de *Centruroides limpidus*. Se inyectaron 2.5 mg del veneno de *C. limpidus* y se colectaron 12 fracciones en una corrida de 70 minutos.

Al inicio de la corrida del veneno de *C. limpidus*, la línea directa se desacopló de la precolumna debido a la alta presión en el sistema, lo que derivó en pérdida de muestra. Sin embargo, al transcurrir el tiempo de corrida, se detectó que los picos empezaban a eluir y se continuó con el procedimiento de colecta de fracciones.

Se registraron 45 picos, o componentes en el veneno a 230 nm, de los cuales la mayoría eluyeron entre el minuto 32 al 52. Se colectaron 12 fracciones y se etiquetaron con las iniciales de la especie, seguido

del número de fracción en orden del tiempo de corrida, de tal forma que la fracción 1 se etiquetó como CnF1 y así sucesivamente las demás fracciones.

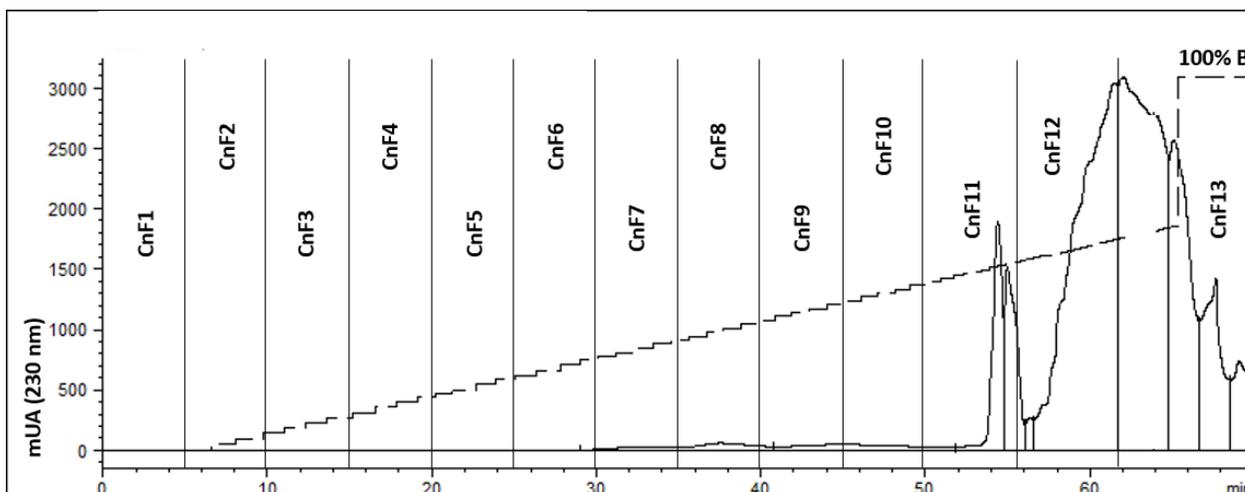


Figura 14. Perfil cromatográfico del veneno de *Centruroides noxius*. Se inyectaron 2.5 mg del veneno de *C. noxius* y se colectaron 14 fracciones en una corrida de 75 minutos.

Durante la separación del veneno de *C. noxius*, las altas presiones del sistema provocaron que no eluyeran picos al principio de la corrida. Fue hasta que los niveles de la solución B (ácido trifluoroacético al 1% en acetonitrilo) alcanzaron el 50% que los picos empezaron a eluir, pero a causa del corto tiempo de elución y al cambio rápido del porcentaje de la solución B, los picos no alcanzaron a separarse ni a eluir, por lo que fue necesario aumentar el tiempo de corrida a 75 minutos con 100% de la solución B.

Se colectaron 14 fracciones y se aplicaron los mismos criterios de etiquetado de las fracciones del veneno de *C. limpidus*. La fracción CnF14 (no se muestra en Figura 14) se colectó en tiempo extra de corrida con 100% de la solución B.

3.1.1 Concentración de proteína

La concentración de proteína para cada una de las fracciones se determinó a través de lecturas de absorbancia a 280 nm en un nanodrop 2000 (Casella-Martins *et al.*, 2015). Posteriormente, las fracciones fueron preservadas a -80 °C para luego liofilizarlas y resuspenderlas en agua destilada estéril y obtener una concentración final de 1 µg/µL.

En las Tablas 4 y 5 se muestran las concentraciones de proteína registradas a 280 nm de las fracciones de los venenos de *C. limpidus* y *C. noxius*, respectivamente. También se incluyen los tiempos de elución de las fracciones.

Tabla 4. Fracciones del veneno de *Centruroides limpidus*. Se expresan los tiempos de elución, así como las concentraciones de proteína para cada fracción.

Veneno de <i>Centruroides limpidus</i>			
Fracción	Tiempo de elución (min)	Concentración de proteína (mg/mL)	Cantidad total (µg)
CIF1	0 - 9.8	0.016	16
CIF2	9.8 - 15.4	0.114	114
CIF3	15.4 - 20	0.024	24
CIF4	20 - 25	0.016	16
CIF5	25 - 30.5	0.012	12
CIF6	30.5 - 35.5	0.09	90
CIF7	35.5 - 40.8	0.246	246
CIF8	40.8 - 45.4	0.432	432
CIF9	45.4 - 51.6	0.6	600
CIF10	51.6 - 55	0	0
CIF11	55 - 60	0.038	38
CIF12	60 - 65.4	0.012	12

Con base en la concentración de proteína registrada por fracción, se seleccionaron las fracciones CIF2, CIF6, CIF7, CIF8 y CIF9 para los ensayos biológicos. Asimismo, las concentraciones evaluadas de cada fracción estuvieron en función de la cantidad de proteína cuantificada.

Tabla 5. Fracciones del veneno de *Centruroides noxius*. Se expresan los tiempos de elución, así como las concentraciones de proteína para cada fracción.

Veneno de <i>Centruroides noxius</i>			
Fracción	Tiempo de elución (min)	Concentración de proteína (mg/mL)	Cantidad total (µg)
CnF1	0 - 5	-	-
CnF2	5 - 10	-	-
CnF3	10 - 15	-	-
CnF4	15 - 20	-	-
CnF5	20 - 25	-	-
CnF6	25 - 30	-	-
CnF7	30 - 35	-	-
CnF8	35 - 40	-	-
CnF9	40 - 45	-	-
CnF10	45 - 50	-	-
CnF11	50 - 56.2	0.496	496
CnF12	56.2 - 61.9	0.648	648
CnF13	61.9 - 70	1.592	1592
CnF14	70 - 75	0.076	76

A consecuencia de los problemas antes mencionados (apartado 3.1), no se registró contenido de proteína de las primeras fracciones de *C. noxius* (CnF1 – CnF10), por lo tanto, se utilizaron las fracciones CnF11, CnF12, CnF13 y CnF14 para la realización de los ensayos biológicos. Esta última sólo se evaluó en los ensayos de detección de poblaciones y citocinas, a causa de la baja concentración de proteína registrada.

3.2 Proliferación celular

Se evaluó el efecto de las fracciones seleccionadas previamente en la proliferación de linfocitos T mediante dos metodologías, con un tiempo de incubación de 96 h.

3.2.1 Evaluación de la proliferación celular mediante el método de la carboxifluoresceína

La técnica de la carboxifluoresceína se utilizó para evaluar únicamente el efecto de las fracciones CIF8, CIF9, CnF11, CnF12 y CnF13 a 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 15).

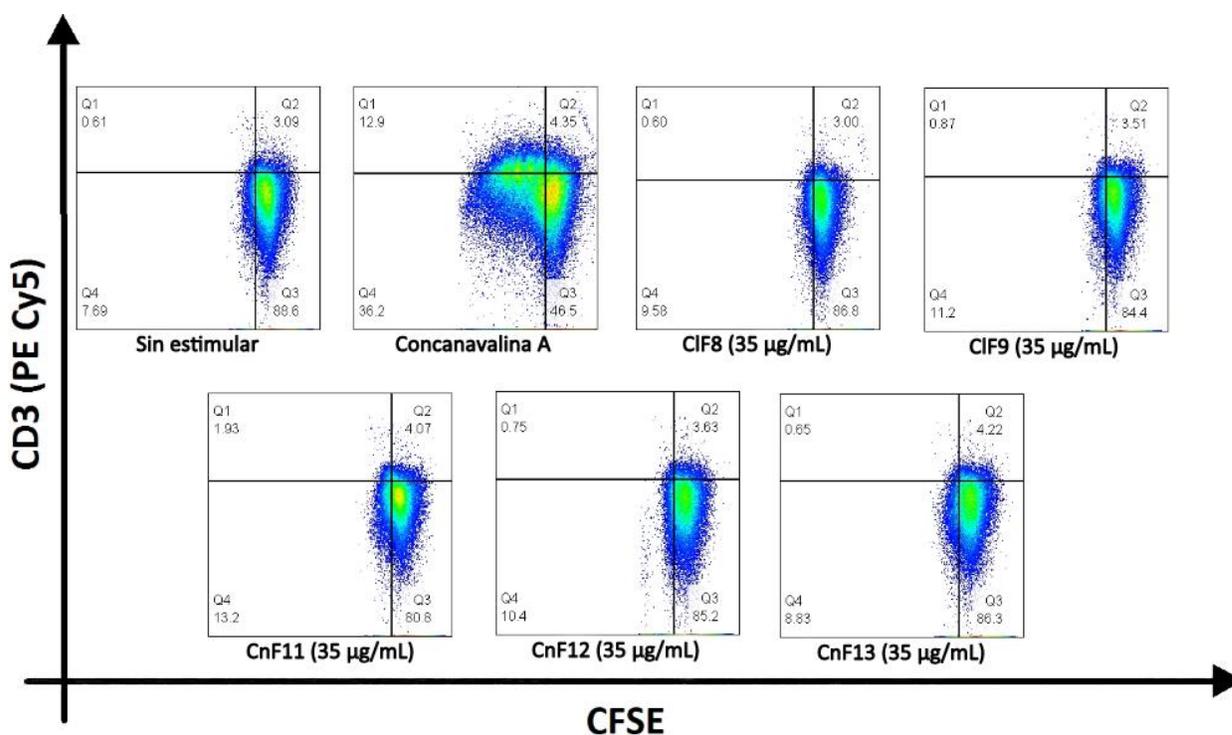


Figura 15. Efecto de las fracciones de los venenos de *C. limpidus* y *C. noxius* en la proliferación de linfocitos T por el método de la carboxifluoresceína. El análisis indica el efecto de los venenos en la expresión del marcador CD3 respecto a la CFSE. Se muestra un citograma representativo de cada condición evaluada.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los tres experimentos independientes con CFSE, las fracciones de los venenos de *C. limpidus* y *C. noxius* no ejercen ningún efecto en la proliferación de linfocitos T a la concentración evaluada, ya que no se detectaron rondas de división celular en las muestras tratadas con fracciones de veneno; no obstante, el control positivo (células tratadas con concanavalina A [5 $\mu\text{g}/\text{mL}$]) resultó con 5 rondas o generaciones celulares, lo que valida el método y confirma que las fracciones no tienen efecto en la proliferación de linfocitos T.

3.2.2 Evaluación de la proliferación celular mediante el método de la resazurina sódica

El método colorimétrico de la resazurina sódica fue utilizado para evaluar todas las fracciones seleccionadas a diferentes concentraciones (6.25 – 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$). En las Figuras 16 y 17 se muestra el efecto de las fracciones de *C. limpidus* y *C. noxius* en la proliferación de linfocitos T.

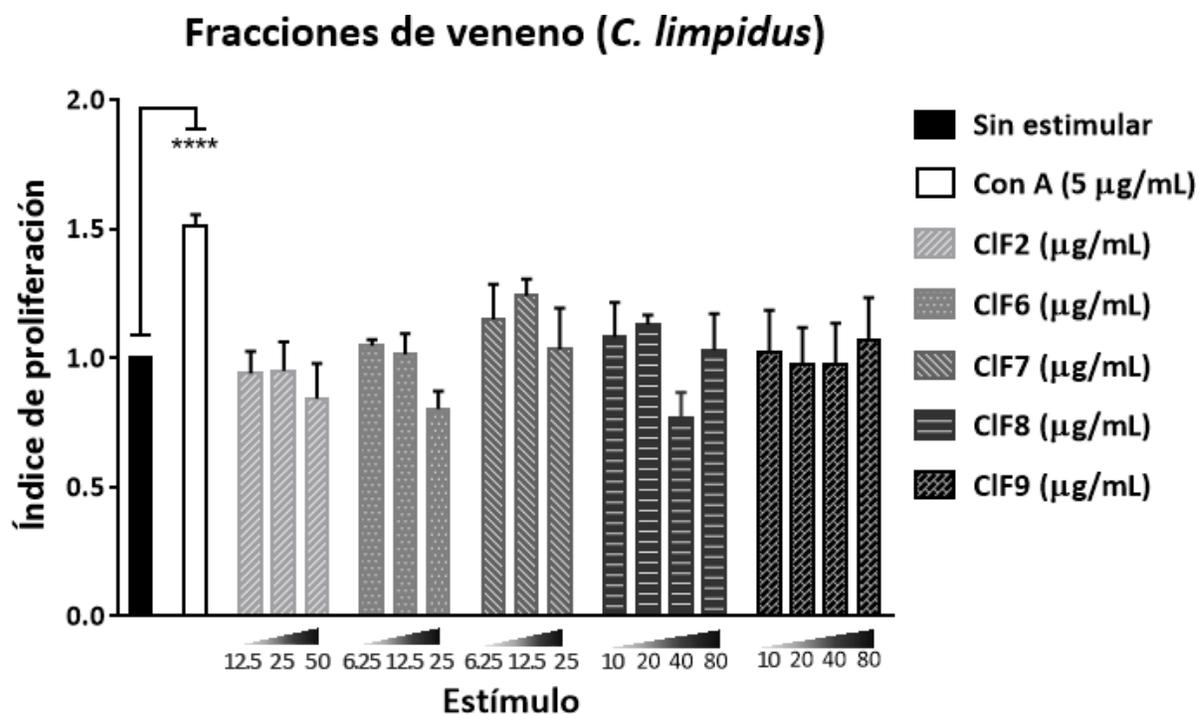


Figura 16. Efecto de las fracciones de *Centruroides limpidus* en la proliferación de linfocitos T mediante el método de la resazurina sódica. Los valores se expresan como índice de proliferación y representan la media \pm la desviación estándar ($n=3$). Las barras con asteriscos indican diferencia significativa ($P<0.03$) respecto al grupo sin estimular. (*) $P<0.03$; (**) $P<0.0021$; (***) $P<0.0002$; (****) $P<0.0001$. Con A, concanavalina A; CIF, fracción de *C. limpidus*.

De acuerdo con los resultados obtenidos, las fracciones de *C. limpidus* no ejercen efecto en la proliferación de linfocitos T a las concentraciones evaluadas.

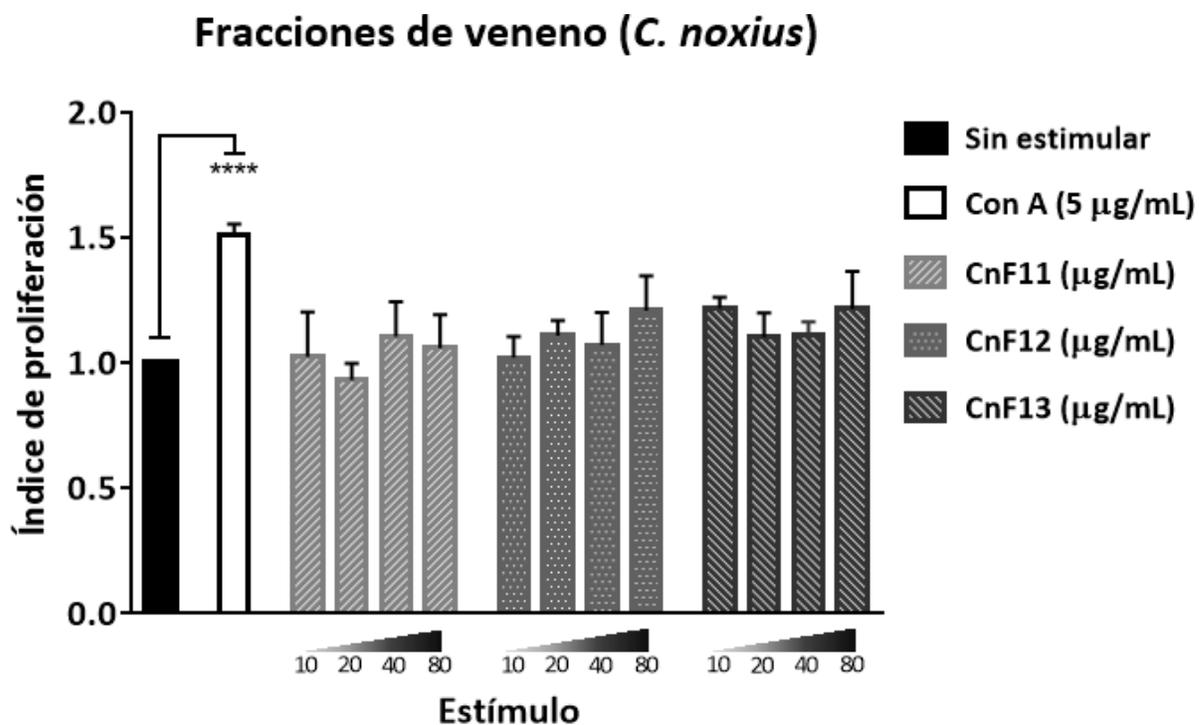


Figura 17. Efecto de las fracciones de *Centruroides noxius* en la proliferación de linfocitos T mediante el método de la resazurina sódica. Los valores se expresan como índice de proliferación y representan la media \pm la desviación estándar ($n=3$). Las barras con asteriscos indican diferencia significativa ($P<0.03$) respecto al grupo sin estimular. (*) $P<0.03$; (**) $P<0.0021$; (***) $P<0.0002$; (****) $P<0.0001$. Con A, concanavalina A; CnF, fracción de *C. noxius*.

De igual manera, no se encontró diferencia significativa en los grupos tratados con fracciones del veneno *C. noxius* a diferentes concentraciones respecto al grupo sin estimular. Por otra parte, las células tratadas con concanavalina A presentaron mayor índice de proliferación, comparadas con las células que no recibieron estímulo.

En conjunto, los datos obtenidos a través de ambas metodologías indican que las fracciones del veneno de *C. limpidus* y *C. noxius* no afectan la proliferación de linfocitos T.

3.3 Detección de poblaciones celulares y citocinas intracelulares

Se realizaron cultivos celulares para evaluar el efecto de las fracciones de los venenos de *C. limpidus* y *C. noxius* en la diferenciación de los linfocitos Th1, Th2 y Th17, así como en la producción de IL-10. El tiempo

de incubación para los ensayos fue de 24 h. Se evaluó la expresión de los marcadores de superficie (CD3 y CD4) para identificar la población de linfocitos T cooperadores y citocinas intracelulares, tales como: IFN- γ , IL-4, IL-17 e IL-10. Se probaron todas las fracciones seleccionadas a diferentes concentraciones (15 – 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se utilizó concanavalina A (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como control positivo.

3.3.1 Linfocitos Th1

Para la detección de los linfocitos Th1, las células tratadas con las fracciones de veneno (*C. limpidus* y *C. noxius*) se tiñeron con anti-IFN- γ (AF647) y se evaluó la expresión del IFN- γ mediante citometría de flujo. En las Figuras 18 y 19 se resumen los resultados del efecto de las fracciones en la diferenciación de linfocitos Th1.

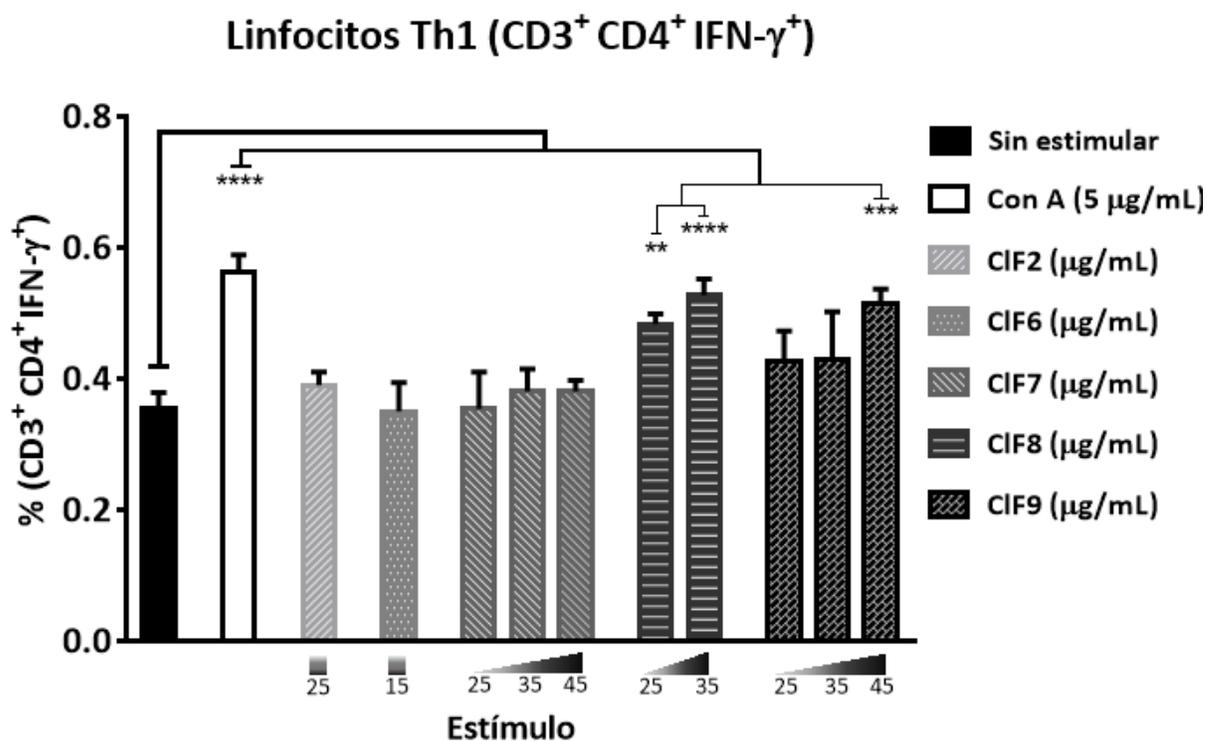


Figura 18. Efecto de las fracciones de *Centruroides limpidus* en la diferenciación de linfocitos Th1. El análisis se llevó a cabo mediante citometría de flujo. Los valores se expresan como % y representan la media \pm la desviación estándar ($n=3$). Las barras con asteriscos indican diferencia significativa ($P<0.03$) respecto al grupo sin estimular. (*) $P<0.03$; (**) $P<0.0021$; (***) $P<0.0002$; (****) $P<0.0001$. Con A, concanavalina A; CIF, fracción de *C. limpidus*.

Los resultados indican que la fracción CIF8 promovió la diferenciación de los linfocitos T cooperadores hacia el perfil Th1, de manera dependiente de la concentración (Figura 18). De igual manera, el grupo de células tratadas con la fracción CIF9 (45 $\mu\text{g}/\text{mL}$) presentó diferencia significativa en la diferenciación de linfocitos Th1 con respecto al grupo sin estimular.

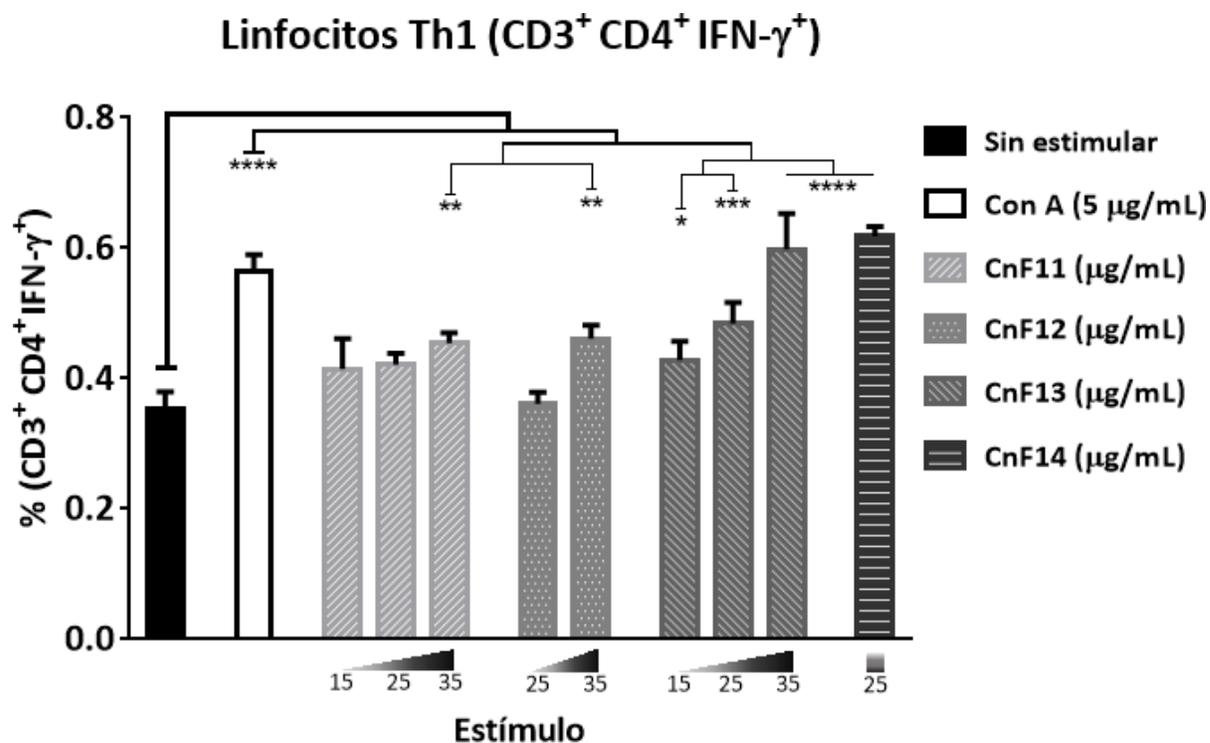


Figura 19. Efecto de las fracciones de *Centruroides noxius* en la diferenciación de linfocitos Th1. El análisis se llevó a cabo mediante citometría de flujo. Los valores se expresan como % y representan la media \pm la desviación estándar ($n=3$). Las barras con asteriscos indican diferencia significativa ($P<0.03$) respecto al grupo sin estimular. (*) $P<0.03$; (**) $P<0.0021$; (***) $P<0.0002$; (****) $P<0.0001$. Con A, concanavalina A; CnF, fracción de *C. noxius*.

En relación con las fracciones del veneno de *C. noxius*, se observó que CnF11 y CnF12, a la concentración de 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y CnF14 (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) aumentaron la diferenciación al perfil Th1 significativamente. Asimismo, se observa una tendencia de incremento del porcentaje de células Th1 dependiente de concentración por efecto de la fracción CnF13 (Figura 19).

En resumen, las fracciones CIF8, CIF9, CnF11, CnF12, CnF13 y CnF14 poseen componentes capaces de modular la diferenciación de linfocitos T cooperadores al perfil Th1, mientras que las fracciones CIF8 y CnF13 incrementaron el porcentaje de células conforme se aumentaba su concentración.

3.3.2 Linfocitos Th2

El análisis de la diferenciación de linfocitos Th2 se llevó a cabo a través de la detección de las células CD3⁺ CD4⁺ IL-4⁺, mediante citometría de flujo.

En la Figura 20 se muestra que solamente la fracción CIF8, a una concentración de 25 µg/mL incrementó la diferenciación al perfil Th2 significativamente.

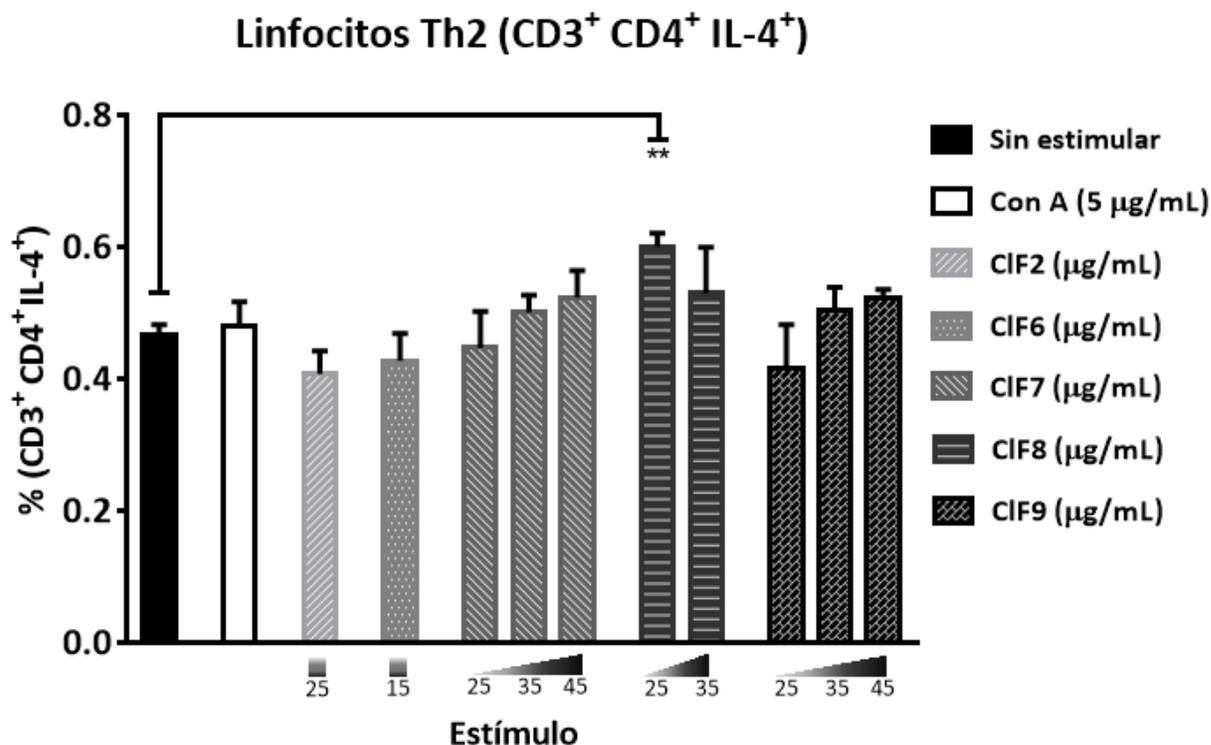


Figura 20. Efecto de las fracciones de *Centruroides limpidus* en la diferenciación de linfocitos Th2. El análisis se llevó a cabo mediante citometría de flujo. Los valores se expresan como % y representan la media \pm la desviación estándar (n=3). Las barras con asteriscos indican diferencia significativa (P<0.03) respecto al grupo sin estimular. (*) P<0.03; (**) P<0.0021; (***) P<0.0002; (****) P<0.0001. Con A, concanavalina A; CIF, fracción de *C. limpidus*.

El efecto de las fracciones de *Centruroides noxius* en la diferenciación de los linfocitos Th2 se expresa en la Figura 21. Las fracciones CnF13 (35 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y CnF14 (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) modularon el perfil significativamente. De igual manera, la fracción CnF12 promovió el incremento del porcentaje de las células Th2, de forma proporcional al aumento de concentración.

Los datos obtenidos en la evaluación de las fracciones de *C. limpidus* y *C. noxius* sugieren que ciertas fracciones (CnF8, CnF12, CnF13 y CnF14) tienen la capacidad de inducir la diferenciación al perfil Th2 en linfocitos T cooperadores. Es necesario señalar que no se encontró diferencia significativa en las células tratadas con concanavalina A (control positivo) respecto al control sin estimular.

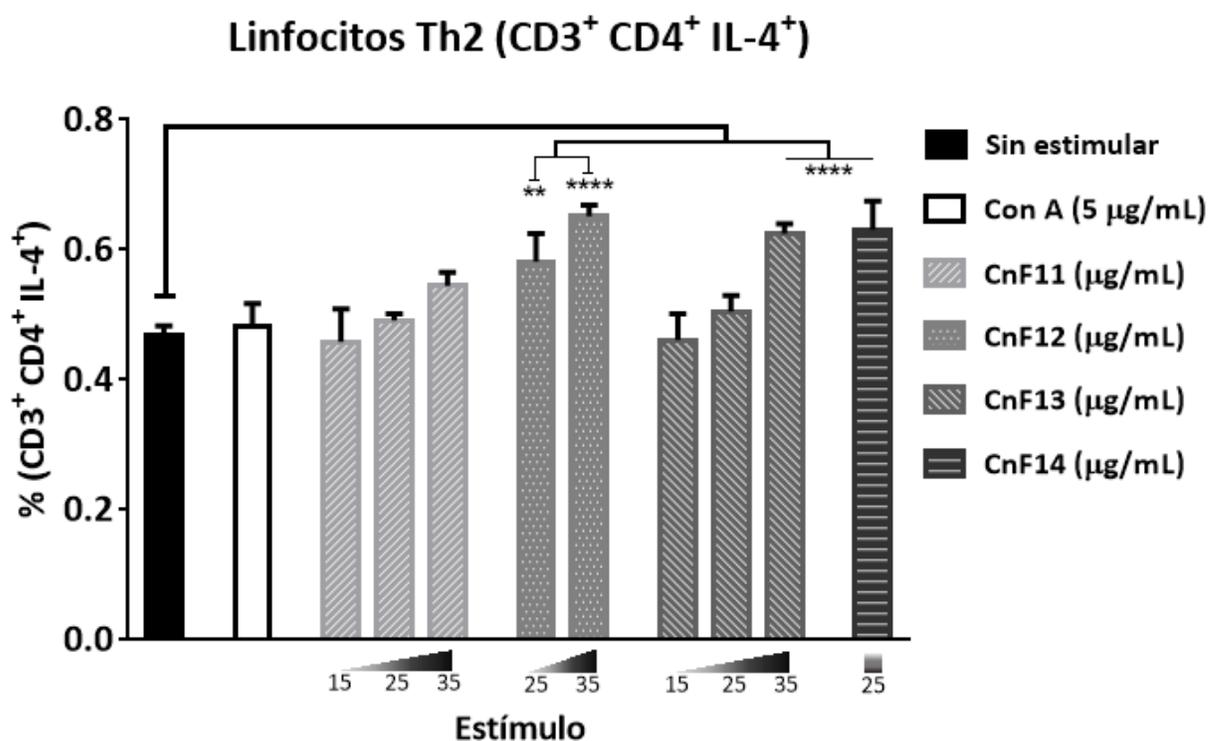


Figura 21. Efecto de las fracciones de *Centruroides noxius* en la diferenciación de linfocitos Th2. El análisis se llevó a cabo mediante citometría de flujo. Los valores se expresan como % y representan la media \pm la desviación estándar ($n=3$). Las barras con asteriscos indican diferencia significativa ($P<0.03$) respecto al grupo sin estimular. (*) $P<0.03$; (**) $P<0.0021$; (***) $P<0.0002$; (****) $P<0.0001$. Con A, concanavalina A; CnF, fracción de *C. noxius*.

3.3.3 Linfocitos Th17

Se realizaron tinciones intracelulares específicas para la detección de IL-17 y se evaluó su expresión mediante citometría de flujo.

En la Figura 22 se muestran los resultados obtenidos en los ensayos de detección de linfocitos Th17 con fracciones del veneno de *C. limpidus*. Las fracciones CIF7 y CIF9, a su máxima concentración (45 $\mu\text{g}/\text{mL}$), promovieron la diferenciación significativamente. De la misma manera, el grupo de células tratadas con la fracción CIF8 (35 $\mu\text{g}/\text{mL}$) resultó con un porcentaje mayor de linfocitos Th17, comparadas con el control sin estimular.

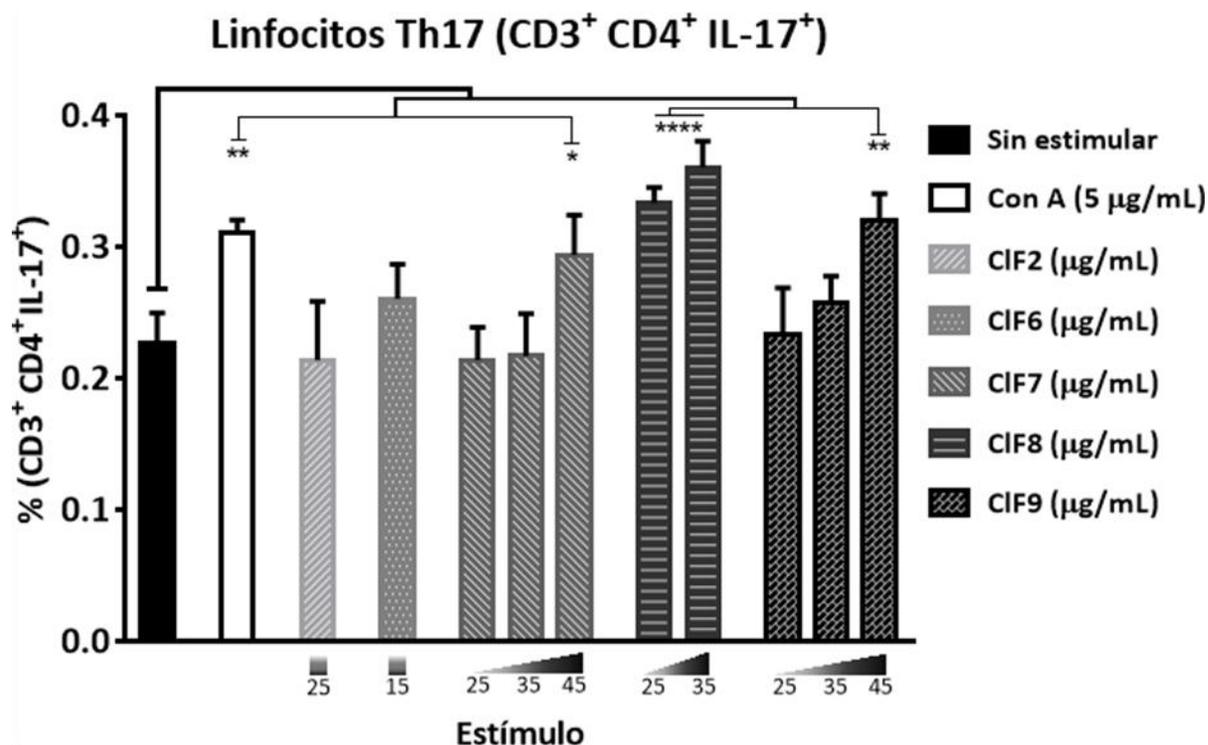


Figura 22. Efecto de las fracciones de *Centruroides limpidus* en la diferenciación de linfocitos Th17. El análisis se llevó a cabo mediante citometría de flujo. Los valores se expresan como % y representan la media \pm la desviación estándar (n=3). Las barras con asteriscos indican diferencia significativa ($P < 0.03$) respecto al grupo sin estimular. (*) $P < 0.03$; (**) $P < 0.0021$; (***) $P < 0.0002$; (****) $P < 0.0001$. Con A, concanavalina A; CIF, fracción de *C. limpidus*.

En relación con las fracciones de *C. noxius* (Figura 23), las fracciones CnF12 y CnF13, a las concentraciones de 25 y 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$, promovieron un aumento en el porcentaje de linfocitos Th17.

Con base en los resultados obtenidos, se concluye que las fracciones CIF7, CIF8, CIF9, CnF12 y CnF13 presentaron cambios significativos en la diferenciación de los linfocitos Th17.

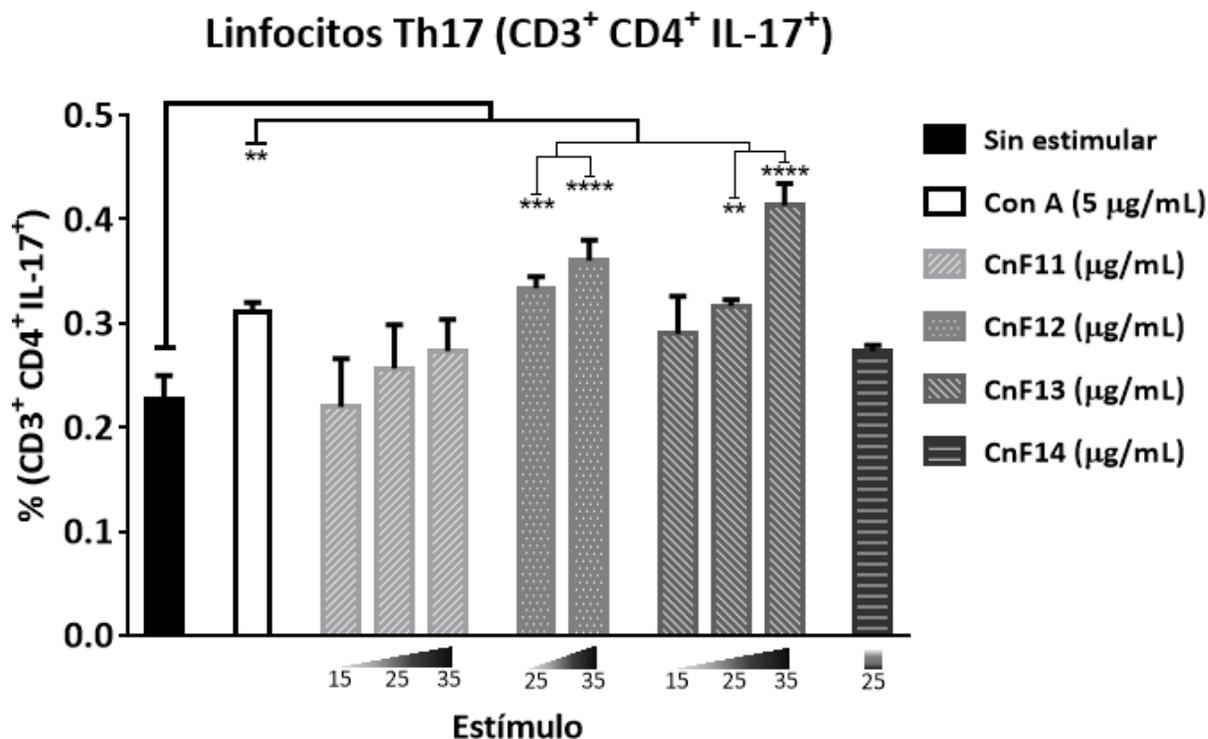


Figura 23. Efecto de las fracciones de *Centruroides noxius* en la diferenciación de linfocitos Th17. El análisis se llevó a cabo mediante citometría de flujo. Los valores se expresan como % y representan la media \pm la desviación estándar ($n=3$). Las barras con asteriscos indican diferencia significativa ($P<0.03$) respecto al grupo sin estimular. (*) $P<0.03$; (**) $P<0.0021$; (***) $P<0.0002$; (****) $P<0.0001$. Con A, concanavalina A; CnF, fracción de *C. noxius*.

3.3.4 Interleucina 10

Para analizar la expresión de la IL-10 en linfocitos T cooperadores, las células se cultivaron con las fracciones de los venenos de *C. limpidus* y *C. noxius* y se tiñeron con anti-IL-10 (PE). En las Figuras 24 y 25 se muestra el efecto de las fracciones de los venenos en la producción de IL-10.

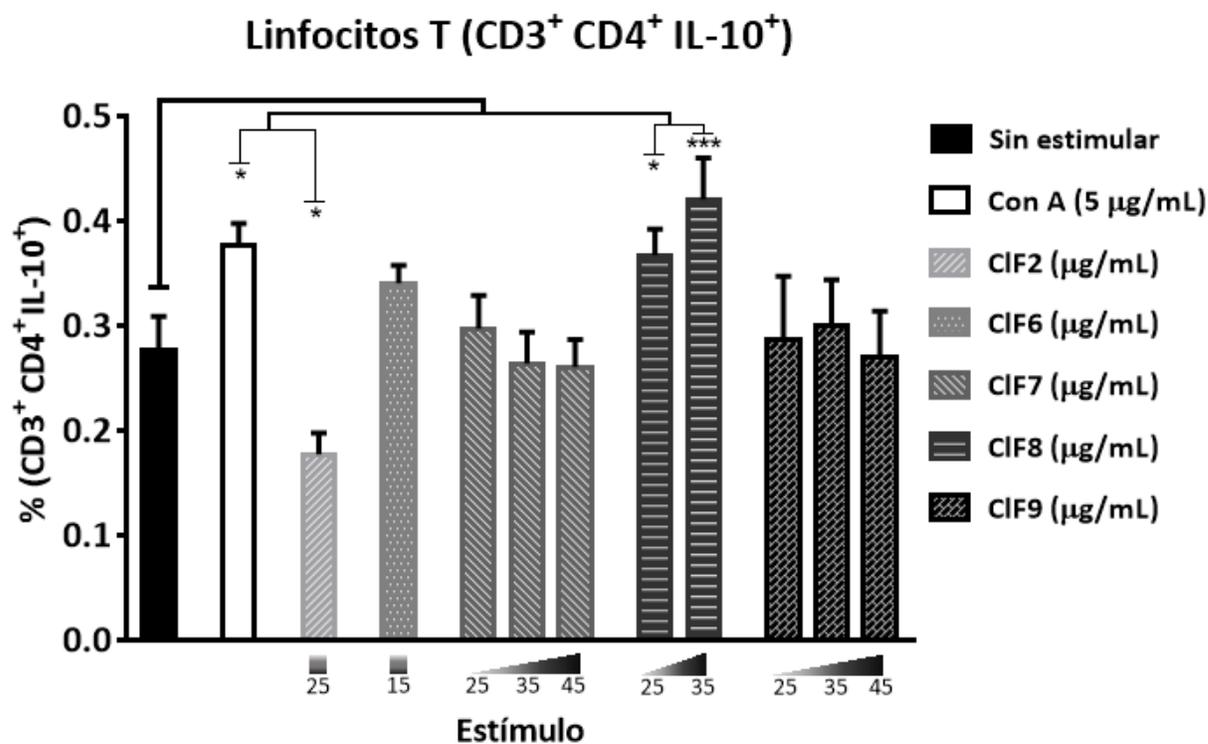


Figura 24. Efecto de las fracciones de *Centruroides limpidus* en la producción de IL-10. El análisis se llevó a cabo mediante citometría de flujo. Los valores se expresan como % y representan la media \pm la desviación estándar (n=3). Las barras con asteriscos indican diferencia significativa ($P < 0.03$) respecto al grupo sin estimular. (*) $P < 0.03$; (**) $P < 0.0021$; (***) $P < 0.0002$; (****) $P < 0.0001$. Con A, concanavalina A; CIF, fracción de *C. limpidus*.

El análisis efectuado por citometría de flujo indica que la fracción CIF2 disminuyó significativamente el porcentaje de IL-10 en linfocitos T cooperadores. De igual forma, la fracción CIF8 produjo un aumento en la expresión de la citocina, en ambas concentraciones.

Por otro lado, el cultivo con las fracciones del veneno de *C. noxius* no promovió ningún efecto en la producción de IL-10, a diferencia de la concanavalina A, la cual sí estimuló el incremento de la IL-10 por parte de los linfocitos T cooperadores.

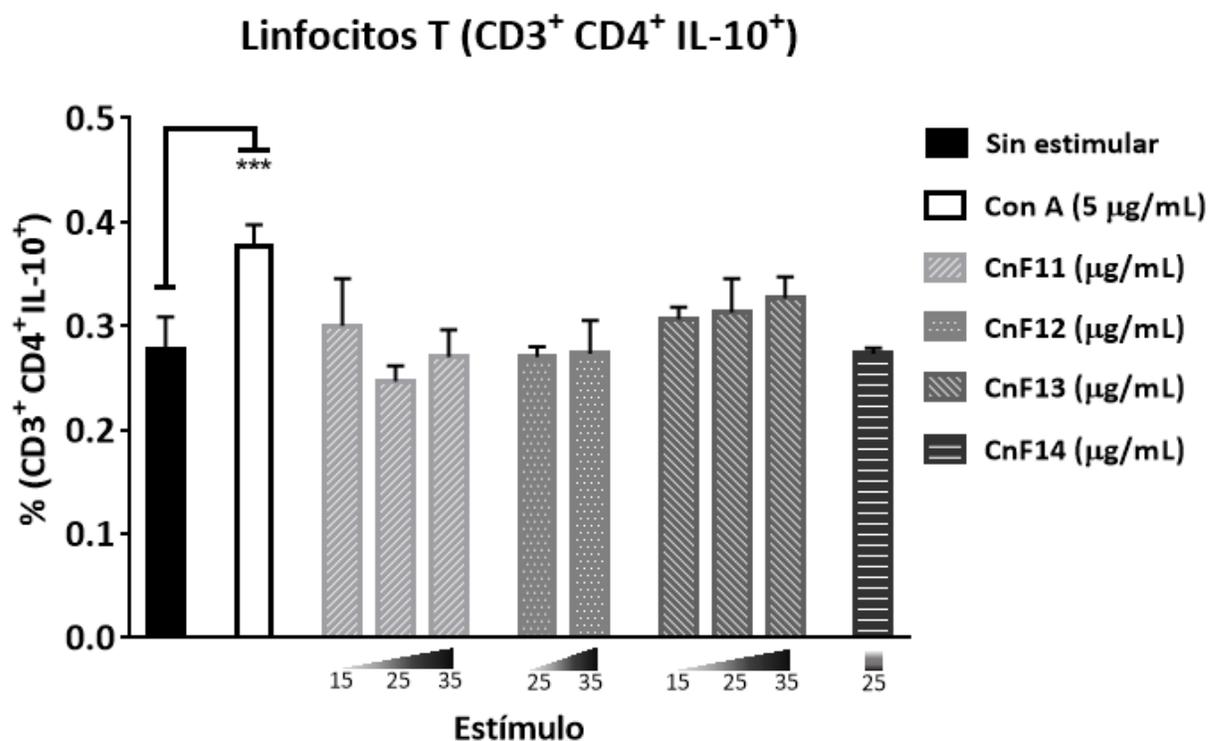


Figura 25. Efecto de las fracciones de *Centruroides noxius* en la producción de IL-10. El análisis se llevó a cabo mediante citometría de flujo. Los valores se expresan como % y representan la media \pm la desviación estándar (n=3). Las barras con asteriscos indican diferencia significativa ($P < 0.03$) respecto al grupo sin estimular. (*) $P < 0.03$; (**) $P < 0.0021$; (***) $P < 0.0002$; (****) $P < 0.0001$. Con A, concanavalina A; CnF, fracción de *C. noxius*.

3.4 Detección de citocinas solubles mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Con la finalidad de validar los resultados obtenidos en los ensayos de detección de poblaciones y citocinas, se evaluó la actividad efectora de las células mediante la cuantificación de citocinas (IFN- γ , IL-4, IL-17, IL-10) presentes en los sobrenadantes.

Para llevar a cabo este objetivo, se decidió medir la concentración de citocinas únicamente de los sobrenadantes provenientes de las muestras que presentaron cambios significativos al ser analizadas por la técnica de citometría de flujo, es decir, aquellas tratadas con las siguientes fracciones: CnF8 (35 $\mu\text{g/mL}$), CnF9 (45 $\mu\text{g/mL}$), CnF12 (35 $\mu\text{g/mL}$), CnF13 (35 $\mu\text{g/mL}$) y CnF14 (25 $\mu\text{g/mL}$). Solamente se consideró la concentración más alta de cada una para maximizar la detección de citocinas, puesto que de manera general los efectos resultaron dependientes de concentración; también se evaluaron los controles sin

estimular y las células tratadas con concanavalina A (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Cabe mencionar que se consideró la fracción CIF2 (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como control negativo del ensayo de detección de poblaciones y citocinas.

3.4.1 Interferón gamma (IFN- γ)

La Figura 26 muestra los resultados obtenidos de la cuantificación de IFN- γ en los sobrenadantes recuperados.

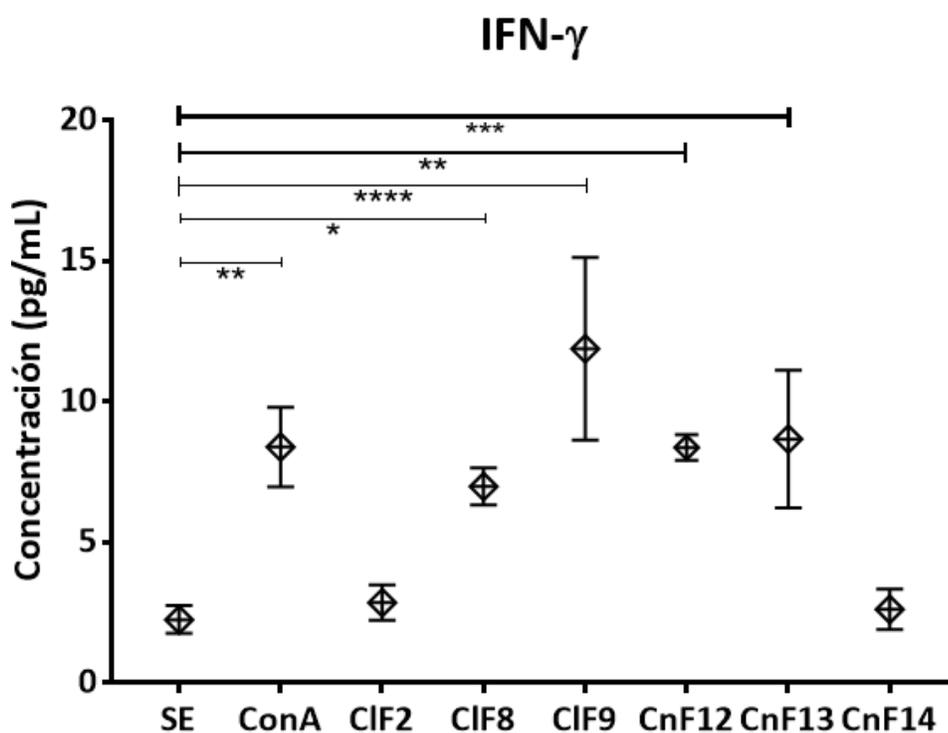


Figura 26. Concentración de IFN- γ en sobrenadantes recuperados. Los valores se expresan como pg/mL y representan la media \pm la desviación estándar ($n=3$). Las barras con asteriscos indican diferencia significativa ($P<0.03$) respecto al grupo sin estimular. (*) $P<0.03$; (**) $P<0.0021$; (***) $P<0.0002$; (****) $P<0.0001$. SE, sin estimular; Con A, concanavalina A; CIF, fracción de *C. limpidus*; CnF, fracción de *C. noxius*.

Los resultados obtenidos indican que las fracciones CIF8, CIF9, CnF12 y CnF13, en su máxima concentración, aumentaron la producción y secreción de IFN- γ en los cultivos celulares. Por otro lado, no se encontró efecto significativo de la fracción CnF14 en la secreción de IFN- γ .

En conjunto, los datos referentes al IFN- γ intracelular y secretado, sugieren que las fracciones CIF8, CIF9, CnF12 y CnF13 promueven la diferenciación de los linfocitos Th1.

3.4.2 Interleucina 4 (IL-4)

El efecto de las fracciones de veneno en la secreción de IL-4 (Figura 27) se resume a continuación. Las células cultivadas con las fracciones CIF8, CIF9 y CnF13, presentaron cambios significativos en la expresión de IL-4. Contrario a lo esperado, las fracciones CnF12 y CnF14 no aumentaron los niveles de IL-4 secretada, como sucedió con la IL-4 detectada mediante citometría de flujo.

Los resultados obtenidos mediante citometría de flujo y ELISA indican que las fracciones CIF8 y CnF13 incrementan la diferenciación y actividad de linfocitos Th2.

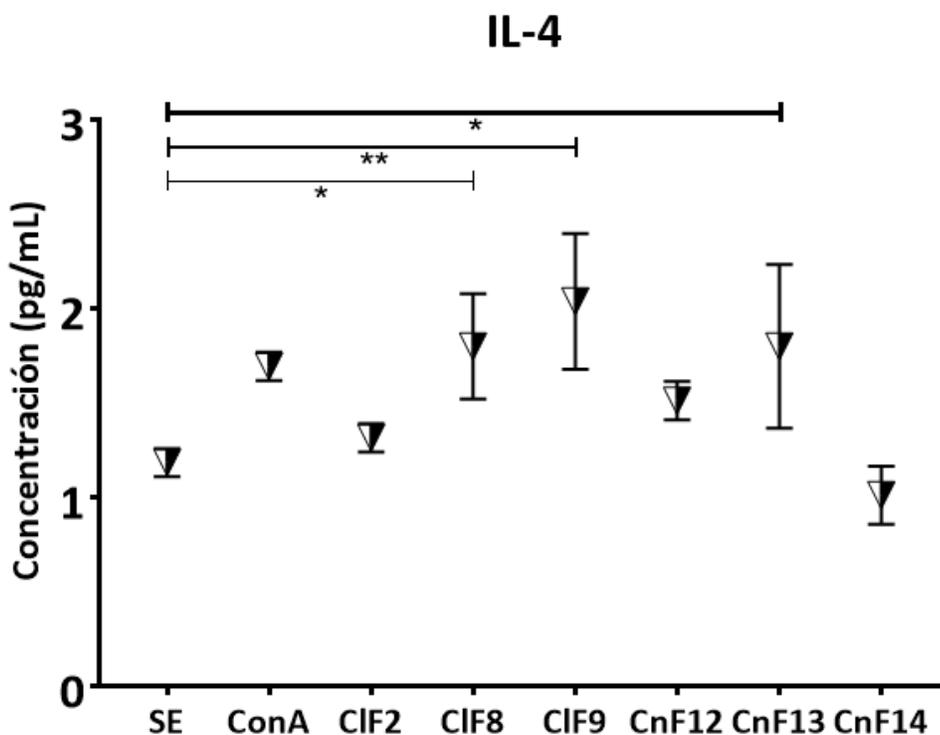


Figura 27. Concentración de IL-4 en sobrenadantes recuperados. Los valores se expresan como pg/mL y representan la media \pm la desviación estándar (n=3). Las barras con asteriscos indican diferencia significativa ($P < 0.03$) respecto al grupo sin estimular. (*) $P < 0.03$; (**) $P < 0.0021$; (***) $P < 0.0002$; (****) $P < 0.0001$. SE, sin estimular; Con A, concanavalina A; CIF, fracción de *C. limpidus*; CnF, fracción de *C. noxius*.

3.4.3 Interleucina 17 (IL-17)

En la Figura 28 se muestran los resultados de la cuantificación de IL-17 en los sobrenadantes recuperados. De acuerdo con los datos obtenidos, las fracciones CIF9, CnF12 y CnF14 incrementaron la secreción de la IL-17 en los cultivos celulares. Asimismo, no se encontró diferencia significativa en los sobrenadantes de las muestras tratadas con las fracciones CIF8 y CnF13 con respecto al grupo sin estimular.

La cuantificación de IL-17 en los sobrenadantes confirma que se promueve la diferenciación de linfocitos T hacia el perfil Th17 por acción de las fracciones CIF9, CnF12 y CnF14. Sin embargo, a pesar de que ésta última aumentó los niveles de citocina en los sobrenadantes, esos resultados difieren con los obtenidos mediante citometría de flujo, los cuales no reflejan efecto alguno.

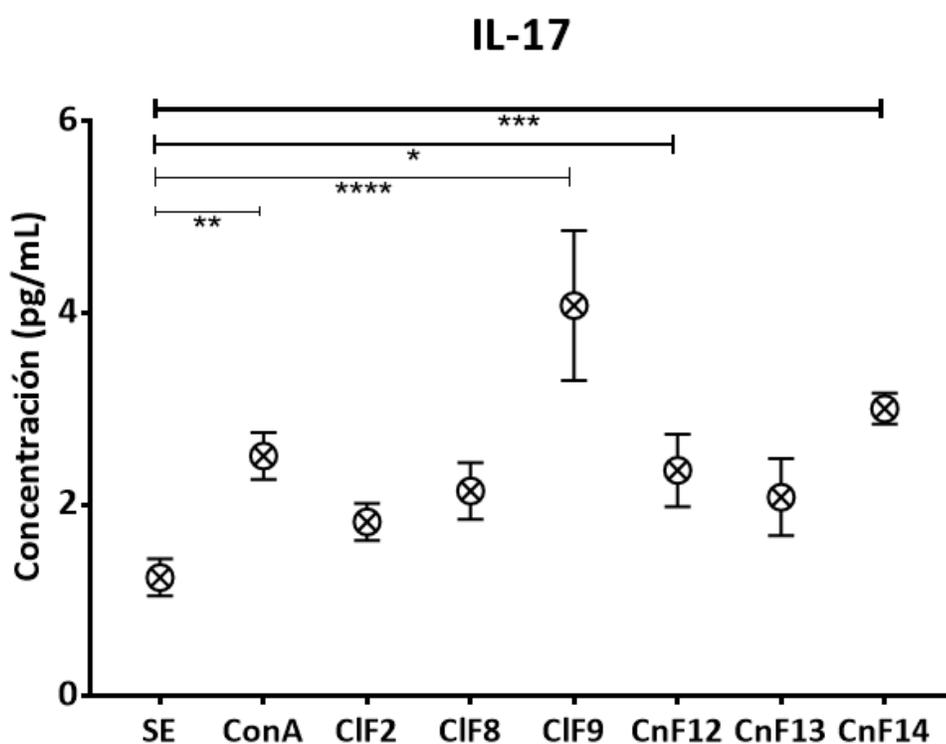


Figura 28. Concentración de IL-17 en sobrenadantes recuperados. Los valores se expresan como pg/mL y representan la media \pm la desviación estándar ($n=3$). Las barras con asteriscos indican diferencia significativa ($P<0.03$) respecto al grupo sin estimular. (*) $P<0.03$; (**) $P<0.0021$; (***) $P<0.0002$; (****) $P<0.0001$. SE, sin estimular; Con A, concanavalina A; CIF, fracción de *C. limpidus*; CnF, fracción de *C. noxius*.

3.4.4 Interleucina 10 (IL-10)

Los resultados obtenidos de la cuantificación de IL-10 en los sobrenadantes recuperados se describen a continuación.

De acuerdo con la Figura 29, se percibe que el control positivo, es decir, las células tratadas con concanavalina A, promovieron la secreción de IL-10 en los cultivos celulares; sin embargo, no se encontraron cambios significativos en los sobrenadantes expuestos a la fracción CIF2, resultado que difiere los obtenidos mediante citometría de flujo.

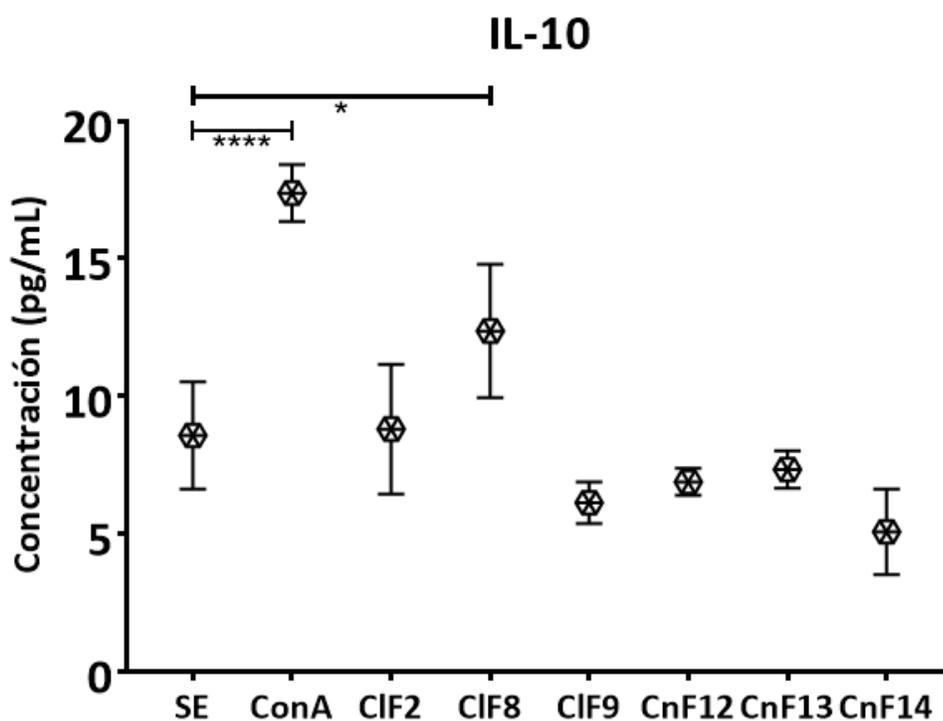


Figura 29. Concentración de IL-10 en sobrenadantes recuperados. Los valores se expresan como pg/mL y representan la media \pm la desviación estándar ($n=3$). Las barras con asteriscos indican diferencia significativa ($P < 0.03$) respecto al grupo sin estimular. (*, $P < 0.03$; (**) $P < 0.0021$; (***) $P < 0.0002$; (****) $P < 0.0001$. SE, sin estimular; Con A, concanavalina A; CIF, fracción de *C. limpidus*; CnF, fracción de *C. noxius*.

En resumen, los resultados obtenidos en la detección de citocinas por citometría de flujo y ELISA sugieren que en las fracciones CIF8, CIF9, CnF12, CnF13 y CnF14 existen componentes capaces de modular la diferenciación de los linfocitos T cooperadores.

3.5 Proporciones de poblaciones y citocinas

Debido a que la diferenciación y la función efectora de los linfocitos T cooperadores se encuentran reguladas por la actividad de otras subpoblaciones Th (Abbas *et al.*, 2017), se realizó un análisis para determinar la proporción de las citocinas específicas de cada subpoblación y, se expresa a continuación como la perspectiva global del efecto de los venenos en la diferenciación de linfocitos T cooperadores.

El análisis se realizó con los resultados obtenidos por citometría de flujo y se evaluaron solamente las fracciones que presentaron actividad significativa en más de una subpoblación (en su concentración más alta) y el grupo sin estimular, con el objetivo de establecer las proporciones basales. Se determinó la proporción de las 4 citocinas (IFN- γ , IL-4, IL-17 e IL-10) en las condiciones de interés, considerando el valor de la media de los tres experimentos como valor absoluto.

En la Figura 30 se muestran las proporciones de linfocitos T cooperadores por cada fracción. El análisis indica que en el control sin estimular hay una predominancia de la subpoblación Th2, mientras que las citocinas distintivas de los linfocitos Th1 y Th17 disminuyeron. Por otro lado, se observa que el perfil Th17 presenta un porcentaje mayor en los cultivos celulares tratados con las fracciones CIF8, CnF12 y CnF13, comparado con el grupo sin estimular. Y finalmente, se muestra que las fracciones CIF9 y CnF14, incrementaron las proporciones de linfocitos Th1 y Th17.

En conjunto, los resultados sugieren que los venenos de *Centruroides limpidus* y *Centruroides noxius* modulan el aumento en las proporciones de los perfiles Th1 y Th17, comparados con el grupo sin estimular.

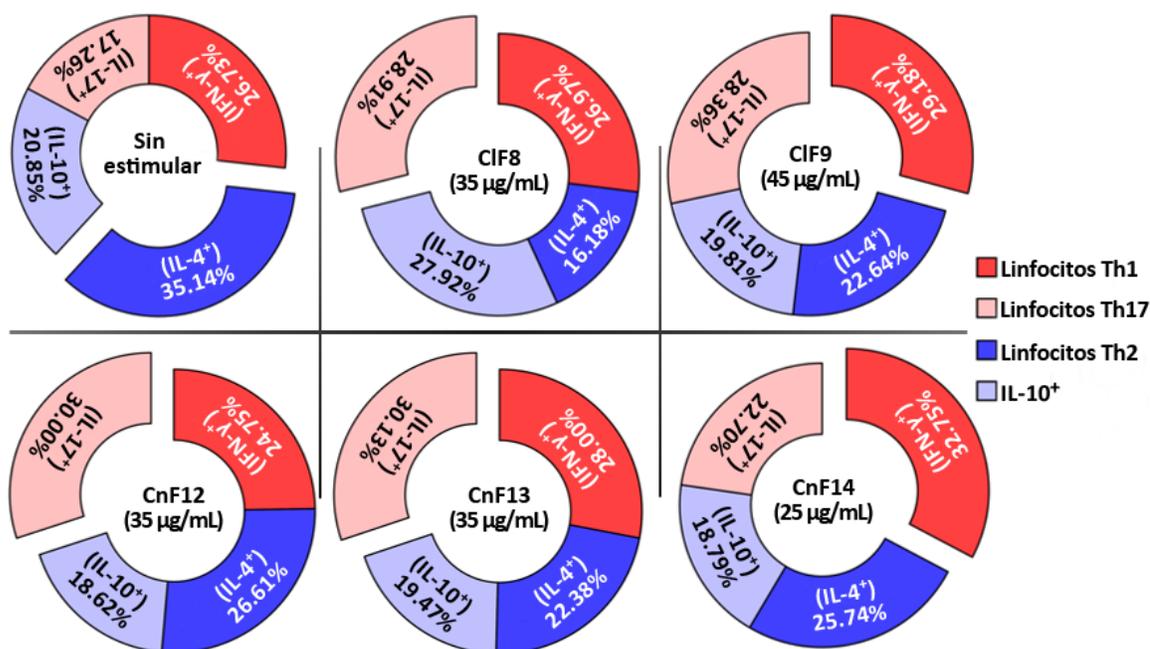


Figura 30. Proporciones de poblaciones y citocinas. El análisis se realizó con los resultados obtenidos por citometría de flujo y se consideró el valor de la media de los tres experimentos como valor absoluto. Solamente se analizaron las fracciones que presentaron efecto significativo en más de una subpoblación. CIF, fracción de *C. limpidus*; CnF, fracción de *C. noxius*.

3.6 Identificación de toxinas contenidas en las fracciones de interés

La identificación de toxinas se llevó a cabo mediante el análisis de los espectros, con ayuda del software ProteinPilot (algoritmo Paragon), seguido de la comparación de los resultados con la base de datos de UniProtKB. Se analizaron las fracciones CIF8, CIF9, CnF12 y CnF13 debido a que fueron aquellas con actividad relevante y la fracción CnF11 como control negativo.

En las Tablas 6 y 7 se muestran las toxinas identificadas en las fracciones de los venenos de *C. limpidus* y *C. noxius*, respectivamente. Además, se incluyen la masa de las toxinas, su blanco molecular, el número de secuencias únicas identificadas (95%) y su porcentaje de cobertura al 95%.

Tabla 6. Neurotoxinas identificadas en las fracciones de *Centruroides limpidus*. Se indican las toxinas identificadas en las fracciones de *C. limpidus*, así como sus masas y blancos moleculares. (# aa), número de aminoácidos; (Cov %), porcentaje de cobertura; (-) no determinado.

Fracción	Toxinas identificadas					
	Péptidos (95%)	Cov % (95%)	Toxina	# aa	Masa (Da)	Blanco molecular
CIF8	13	81.3	Alpha-like toxin CsEv5	59	6,305	Canales Nav
	2	34.3	Beta-toxin CII8	64	7,459	Canales Nav
	7	45.4	Beta-toxin CII1m	66	7,550	Canales Nav
	6	45.4	Beta-toxin CII2	66	7,584	Canales Nav
	4	40.9	Beta-toxin CI13	66	7,854	Canales Nav
	6	34.4	Toxin CII4	87	9,934	Canales Nav
	2	18.3	Toxin CII5b	87	9,600	Canales Nav
	2	48.2	Toxin II.9	29	3,416	Canales Nav
	12	85.7	Toxin Cn11	63	6,982	Canales Nav
	4	33.3	Toxin CsEv4	66	7,306	Canales Nav
	8	93.1	Orphan peptide CII Ntx	29	3,393	-
	5	48.6	Potassium channel toxin alpha-KTx 1.11	37	4,092	Canal KCa1.1
	7	57.8	Potassium channel toxin alpha-KTx 2.4	38	4,189	Canales Kv
	2	57.8	Potassium channel toxin alpha-KTx 2.13	38	4,007	Canales Kv1.2 y Kv1.3
	7	64.2	Potassium channel toxin gamma-KTx 1.5	42	4,768	Canal Kv11
	5	58.1	Potassium channel toxin gamma-KTx 3.1	43	4,791	Canal Kv11
4	48.8	Potassium channel toxin gamma-KTx 4.1	43	4,840	Canal Kv11	
CIF9	7	47.7	Alpha-toxin Cn12	67	7,148	Canales Nav
	6	45.4	Beta-toxin CII2	66	7,584	Canales Nav
	2	33.3	Beta-toxin CI13	66	7,854	Canales Nav
	3	25.2	Toxin CII3	87	9,940	Canales Nav
	12	64.3	Toxin CII5b	87	9,600	Canales Nav

Se identificaron 17 toxinas en la fracción CIF8 y 5 toxinas en la fracción CIF9, con un rango de masas entre 3,393 a 9,940 daltons (Da). La mayoría de las toxinas identificadas pertenecen a la familia de neurotoxinas que presentan como blanco molecular los canales de sodio dependientes de voltaje (Nav). Asimismo, se encontraron toxinas que interactúan con los canales de potasio dependientes de voltaje, incluidos los canales Kv1.3.

Tabla 7. Neurotoxinas identificadas en las fracciones de *Centruroides noxius*. Se indican las toxinas identificadas en las fracciones de *C. noxius*, así como sus masas y blancos moleculares. (# aa), número de aminoácidos; (Cov %), porcentaje de cobertura; (No ID), no identificado; (-) no determinado.

Fracción	Toxinas identificadas					
	Péptidos (95%)	Cov % (95%)	Toxina	# aa	Masa (Da)	Blanco molecular
CnF12	7	55.9	Alpha-like toxin CsEv5	59	6,305	Canales Nav
	18	65.6	Alpha-toxin Cn12	67	7,148	Canales Nav
	10	69.8	Alpha-toxin CsES	63	7,076	Canales Nav
	7	48.2	Beta-toxin Cn5	87	9,480	Canales Nav
	2	92.8	Beta-toxin Cn9	14	1,643	Canales Nav
	8	77.7	Insect-toxin Cn10	81	8,812	Canales Nav
	5	75.8	Toxin II.9	29	3,416	Canales Nav
	4	40.4	Toxin CII9	84	9,198	Canales Nav
	6	55.8	Toxin Cn1	86	9,568	Canales Nav
	13	85.7	Toxin Cn11	63	6,982	Canales Nav
	5	84.8	Toxin CsEv4	66	7,306	Canales Nav
	10	93.1	Orphan peptide CII Ntx	29	3,393	-
	10	72.9	Potassium channel toxin alpha-KTx 1.11	37	4,092	Canal KCa1.1
	5	43.5	Potassium channel toxin alpha-KTx 2.1	39	4,202	Canales Kv y KCa
	11	57.8	Potassium channel toxin alpha-KTx 2.4	38	4,189	Canales Kv
	4	76.3	Potassium channel toxin alpha-KTx 2.13	38	4,007	Canales Kv1.2 y Kv1.3
	5	58.1	Potassium channel toxin gamma-KTx 3.1	43	4,791	Canal Kv11
3	48.8	Potassium channel toxin gamma-KTx 4.13	43	4,813	Canal Kv11	
CnF13	3	74.5	Alpha-like toxin CsEv5	59	6,305	Canales Nav
	19	100	Alpha-toxin Cn12	67	7,148	Canales Nav
	5	68.7	Beta-toxin Cell8	64	7,459	Canales Nav
	4	35.3	Beta-neurotoxin Ccs9	82	9,388	Canales Nav
	11	34.4	Beta-toxin Cn4	87	9,788	Canales Nav
	16	57.4	Beta-toxin Cn5	87	9,480	Canales Nav
	10	54.5	Beta-toxin Cn7	55	6,373	Canales Nav
	6	67.9	Insect-toxin Cn10	81	8,812	Canales Nav
	3	29.4	Toxin CII5c	85	9,649	Canales Nav
	3	54.6	Toxin Cn1	86	9,586	Canales Nav
	14	100	Toxin Cn11	63	6,982	Canales Nav
	16	57.4	Toxin CngtIII	87	9,587	Canales Nav
	6	58.1	Toxin CngtIV	86	9,560	Canales Nav
	6	58.6	Toxin CsEv3	87	9,480	Canales Nav
	2	93.1	Orphan peptide CII Ntx	29	3,393	-
12	64.3	Potassium channel toxin gamma-KTx 1.5	42	4,768	Canales Kv11	
CnF11	-	-	No ID	-	-	-

En relación con las fracciones de *C. noxius*, se identificaron 18 toxinas en la fracción CnF12 y 16 toxinas en la fracción CnF13 (1,643 – 9,788 Da). De manera general, se identificaron más neurotoxinas con acción en los canales Nav y en menor medida, toxinas que interactúan con canales de potasio. Cabe destacar que se detectaron toxinas en la fracción CnF12 específicas para los canales de potasio dependientes de calcio (KCa). En contraste, no se encontraron toxinas en la fracción CnF11 considerada como control negativo, por lo menos comparando los resultados del análisis con la base de datos de *C. limpidus*, *C. noxius* y *Centruroides*.

En resumen, la identificación mediante LC-MS/MS confirmó la presencia de neurotoxinas con acción en canales Nav, Kv y KCa en las fracciones ClF8, ClF9, CnF12 y CnF13 y reveló diferencias en la composición de dichas fracciones comparadas con la fracción CnF11.

Capítulo 4. Discusión

Los venenos de escorpión han demostrado ser una fuente rica en biomoléculas con diversos efectos terapéuticos, entre los que destaca la modulación del sistema inmune (Attarde y Pandit, 2016). Las toxinas de escorpión y sus componentes derivados son capaces de activar o inhibir la respuesta inmune, modulando la secreción de citocinas, proliferación y diferenciación de ciertos tipos celulares (Jiménez *et al.*, 2018). La importancia del estudio de los venenos de escorpión y su interacción con el sistema inmune radica en el desarrollo de nuevos fármacos con potencial inmunomodulador y terapéutico en diversas patologías (Jiménez *et al.*, 2018).

Los escorpiones del género *Centruroides* resultan candidatos relevantes en la búsqueda de toxinas con actividad inmunomoduladora debido a que poseen venenos con alto contenido de neurotoxinas. Los péptidos neurotóxicos presentan como blanco molecular los canales iónicos de K^+ , Na^+ , Ca^{2+} y Cl^- en células excitables y no excitables (Petricevich, 2010; Jiménez *et al.*, 2018). Por otro lado, la actividad de las células del sistema inmune está regulada por la activación e inhibición de canales iónicos, los cuales intervienen en los procesos de diferenciación, proliferación y secreción de citocinas en linfocitos T cooperadores (Feske *et al.*, 2012).

Por lo anterior, en este trabajo se evaluó el efecto de los venenos de *Centruroides limpidus* y *Centruroides noxius* en la diferenciación de linfocitos Th1, Th2 y Th17, así como en la producción de IL-10 y en la proliferación de linfocitos T. Los resultados obtenidos revelan efectos significativos en la modulación de los procesos de diferenciación y secreción de citocinas de linfocitos T cooperadores.

4.1 Proliferación de linfocitos T

El reconocimiento de antígenos, en conjunto con otros estímulos de activación, induce los procesos de proliferación, diferenciación y secreción de citocinas en linfocitos T (Smith-Garvin *et al.*, 2009). La proliferación celular es un proceso esencial en el desarrollo de la respuesta inmune, particularmente en linfocitos T; permite efectuar respuestas rápidas mediante el incremento del número de células capaces de responder a un mismo antígeno (Bocharov *et al.*, 2011).

La proliferación en linfocitos T, en respuesta al reconocimiento del antígeno, es mediada por una combinación de señales del receptor específico de linfocitos T (TCR), moléculas co-estimuladoras (CD3 y CD4) y factores de crecimiento autocrinos, principalmente IL-2 (Abbas *et al.*, 2017).

En la primera fase del trabajo se evaluó el efecto de las fracciones de los venenos de *C. limpidus* y *C. noxius* en la proliferación de linfocitos T, a través de los métodos de tinción con carboxifluoresceína (Figura 15) y el ensayo colorimétrico de resazurina sódica (Figuras 16 y 17). Los resultados obtenidos, por ambas metodologías, indican que las fracciones de los venenos no afectan la proliferación de linfocitos T; sin embargo, las células tratadas con concanavalina A (control positivo) proliferaron significativamente. Lo anterior puede deberse a que las toxinas de los venenos y la concanavalina A presentan distintos blancos moleculares. La concanavalina A, por su parte, es un mitógeno comúnmente utilizado para inducir la proliferación de linfocitos T, interactúa con la cadena zeta de la proteína CD3 en la superficie celular, la cual forma un complejo con el TCR y promueve la transducción de señales intracelulares implicadas en la activación y proliferación de linfocitos T (Coligan y Bierer, 2011). Por otro lado, las toxinas de los venenos de *C. limpidus* y *C. noxius* presentan especificidad por canales iónicos que están involucrados en la generación de patrones de transducción y favorecen ciertas vías de señalización (Feske *et al.*, 2012). Por lo tanto, el efecto de los venenos, en linfocitos T, puede variar según el tipo de canal iónico con el que interactúen.

En el trabajo elaborado por Casella-Martins *et al.* (2015) se evaluó el efecto del veneno de *Tityus serrulatus* (25 – 100 µg/mL), escorpión de la familia Buthidae, en la proliferación de linfocitos T por el método de carboxifluoresceína. Los autores reportaron un efecto nulo en la proliferación de linfocitos T; no obstante, el veneno inhibió la proliferación celular en los grupos tratados con mitógeno (fitohemaglutinina), sin afectar la viabilidad celular. Los miembros de la familia Buthidae, como los escorpiones del género *Centruroides*, no poseen componentes líticos o necróticos en sus venenos, lo que los hace candidatos relevantes en la búsqueda de fármacos (Hmed *et al.*, 2013). Asimismo, Corzo y Espino-Solis (2017) evaluaron tres toxinas de dos especies de *Centruroides* (*C. suffusus* y *C. noxius*) en la secreción de citocinas de células mononucleares de humano. Los resultados del estudio indicaron que la toxina Cn5 (0.2 µg/mL) de *C. noxius* aumentó los niveles de citocinas intermediarias en la diferenciación de linfocitos T cooperadores (IL-1, IL-6 e IL-12); sin embargo, no presentó efecto significativo en la secreción de IL-2, factor de crecimiento de linfocitos T. Lo anterior sugiere que las toxinas de los venenos de *Centruroides* pueden promover diferenciación, a través de la secreción de citocinas específicas, sin alterar el proceso de proliferación en linfocitos T. Fenómeno que se confirma en el trabajo de esta tesis.

Por último, es importante señalar que los venenos de *Centruroides limpidus* y *Centruroides noxius* podrían inhibir la proliferación de linfocitos T activados, por lo cual resultaría relevante evaluar el efecto de los venenos en la proliferación de células tratadas con mitógenos.

4.2 Diferenciación de linfocitos T cooperadores

La exigencia de mantener la integridad de nuestro organismo en contra de la alta diversidad de patógenos, toxinas y células malignas, hace necesario el desarrollo de respuestas especializadas por parte del sistema inmune, con el fin de vencer los agentes causantes de enfermedades mientras se mantiene la autotolerancia en los tejidos y órganos (Baranovski *et al.*, 2015). El proceso de diferenciación en linfocitos T cooperadores ocurre en respuesta a las citocinas presentes en el medio, tipo de estímulo y factores de transcripción específicos. Estos últimos pueden ser activados mediante señales del TCR, moléculas co-estimuladoras y receptores de citocinas (Luckheeram *et al.*, 2012).

Como parte experimental del proyecto, otro de los objetivos fue evaluar el efecto de los venenos en la diferenciación de los linfocitos T cooperadores (Th1, Th2 y Th17), así como en la producción de IL-10 a partir de los mismos, mediante la expresión de citocinas específicas de cada subpoblación. Para ello, se realizaron cultivos celulares tratados con las fracciones de *C. limpidus* y *C. noxius* (15 – 45 µg/mL) y se tiñeron con anticuerpos monoclonales para IFN- γ , IL-4, IL-17 e IL-10; el porcentaje de las subpoblaciones se determinó por medio de un análisis multiparamétrico seleccionando las células positivas para el marcaje específico de cada población de interés.

Los resultados obtenidos indicaron que los venenos de *C. limpidus* y *C. noxius* poseen componentes que promueven la diferenciación de linfocitos Th1, Th2 y Th17 (Figuras 18 – 23). Cabe destacar que las fracciones ClF8, ClF9, CnF12, CnF13 y CnF14 aumentaron la diferenciación en más de una subpoblación. Lo anterior puede deberse a que las fracciones antes mencionadas poseen diferentes clases de toxinas, las cuales interactúan con más de un canal iónico en linfocitos T cooperadores. En el artículo de revisión de Feske *et al.* (2012) se describe el papel de los canales iónicos y transportadores en los procesos de activación y diferenciación en linfocitos T cooperadores. Los autores señalan que los canales KCa3.1 están implicados en la diferenciación y actividad de linfocitos Th1 y Th2, mientras que los canales Kv1.3 intervienen en la diferenciación de linfocitos Th17. Ya se han reportado toxinas en los venenos de *C. limpidus* y *C. noxius* que interactúan con dichos canales, las cuales posiblemente se vean involucradas en

los efectos observados (Valdivia *et al.*, 1988; Martin *et al.*, 1994). Asimismo, los canales Kv1.3 y KCa3.1 desempeñan un papel esencial en las vías de señalización mediadas por Ca^{2+} , favoreciendo la entrada de calcio extracelular. En el trabajo de Kircher *et al.* (2018) se analizaron los niveles de Ca^{2+} , liberado tras la activación de linfocitos T cooperadores y los autores reportaron diferencias en los perfiles de Ca^{2+} intracelular para las subpoblaciones Th1, Th2 y Th17. Es importante mencionar que los venenos de las especies evaluadas en este proyecto también presentan toxinas que interactúan con los canales de sodio, los cuales intervienen en la actividad de linfocitos Th2 (Vazquez *et al.*, 1995; Feske *et al.*, 2012; Cid-Uribe *et al.*, 2017). En conjunto, sería posible afirmar que los efectos observados son consecuencia de la acción combinada de varias toxinas, debido a la alta complejidad de los venenos (en diversidad de toxinas y blancos moleculares).

Es importante mencionar que, hasta la fecha, no hay trabajos registrados en los que se hayan evaluado los venenos de escorpión en la diferenciación de linfocitos T cooperadores. Sin embargo, se ha reportado que los venenos de escorpión y sus derivados aumentan la secreción de citocinas intermediarias en la diferenciación de linfocitos T (CD4^+). Estudios previos han señalado la capacidad de los venenos y toxinas de escorpión para promover la secreción de IL-12 en células mononucleares (Hadaddezfuli *et al.*, 2015; Saadi *et al.*, 2015; Corzo y Espino-Solis, 2017). La IL-12 es una citocina esencial en el proceso de diferenciación de linfocitos Th1, ya que promueve la secreción de IFN- γ por parte de células NK y, a su vez, amplifica las señales que intervienen en la diferenciación del perfil Th1 (Ivanova y Orekhov, 2015). De igual forma, los venenos de ciertos escorpiones (incluido *C. noxius*) incrementan la secreción de citocinas inflamatorias (IL-1 e IL-6), implicadas en la diferenciación de linfocitos Th17 (Jiménez *et al.*, 2018). Por lo anterior, es importante considerar la posibilidad de que el efecto observado en la diferenciación de linfocitos Th1 y Th17 sea indirecto o mediante la interacción con otros tipos celulares, principalmente de la inmunidad innata. Con respecto al perfil Th2, en el estudio realizado por Adi-Bessalem *et al.* (2012) se evaluó el veneno del escorpión *Androctonus australis* (Buthidae) en la respuesta inflamatoria en ratones y los autores concluyeron que hubo un aumento en la secreción de citocinas específicas de linfocitos Th2.

Con respecto a la producción de la IL-10, solamente las células tratadas con las fracciones CIF2 y CIF8 presentaron cambios significativos (Figura 24). Por un lado, la fracción CIF2 inhibió la producción de IL-10, mientras que la fracción CIF8 aumentó su expresión en linfocitos T cooperadores. En ese sentido, los resultados obtenidos para la fracción CIF8 coinciden con los reportados por Petricevich (2006) y Corzo y Espino-Solis (2017), quienes observaron un aumento de IL-10 en células mononucleares tratadas con toxinas de *Centruroides noxius*. La función biológica de esta citocina radica en efectos antiinflamatorios, al

inhibir la actividad de macrófagos y células dendríticas, además está involucrada en el control de respuestas inflamatorias en mucosas (Couper *et al.*, 2008). Debido a sus efectos supresores, diversos estudios proponen a la IL-10 como tratamiento en enfermedades autoinmunes: psoriasis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple y colitis (Pérez-Fernández y Kaski, 2002). Una de las limitantes del trabajo fue determinar la subpoblación específica responsable de la producción de IL-10, debido a que dentro de los linfocitos T cooperadores, puede ser producida por los perfiles Th1, Th2, Th17 y T reguladoras (Ng *et al.*, 2013). En cuanto a la fracción CIF2, es importante destacar su potencial inmunosupresor, puesto que sólo tuvo efecto en la producción de IL-10 y no en la diferenciación de linfocitos Th1, Th2 y Th17.

Para complementar el trabajo, resultaría relevante evaluar el efecto de los venenos de escorpión en la diferenciación de los linfocitos T reguladores (Treg), población implicada en la regulación de la respuesta inmunológica y en la autotolerancia (Baranovski *et al.*, 2015). De igual forma, es necesario realizar ensayos con toxinas específicas de *C. limpidus* y *C. noxius* en la diferenciación de linfocitos T cooperadores, con el fin de encontrar efectos particulares.

4.3 Función efectora de linfocitos T cooperadores

Los linfocitos T cooperadores no eliminan patógenos por sí solos, sino que, a través de la secreción de citocinas, coordinan las funciones de otros grupos celulares en las respuestas contra: patógenos intracelulares, helmintos, hongos y bacterias extracelulares (Baranovski *et al.*, 2015). De igual modo, desempeñan un papel importante en el funcionamiento de barreras, secreción de mucosidad y reparación de tejidos (Abbas *et al.*, 2017).

Para asociar los resultados obtenidos por citometría de flujo, que detectan citocinas en el interior de la célula, se determinaron las concentraciones de IFN- γ , IL-4, IL-17 e IL-10 en los sobrenadantes recuperados (Figuras 26 – 29). Se encontraron efectos significativos en la secreción de citocinas específicas de cada subpoblación (Th1, Th2 y Th17), así como en la secreción de IL-10, en las muestras tratadas con las fracciones CIF8, CIF9, CnF12, CnF13 y CnF14. Basados en estos resultados se propone que las fracciones antes mencionadas modulan la diferenciación en linfocitos T cooperadores y, particularmente, la fracción CIF8 aumenta la producción de IL-10. Los niveles detectados de citocinas intracelulares, como de aquellas secretadas, no se relacionan en todos los casos. Esta disparidad puede deberse a varios factores, entre ellos destaca la detección puntual en el tiempo (a las 24 horas de cultivo) de las citocinas intracelulares y,

por otro lado, la detección de las citocinas secretadas que pudieron acumularse durante las mismas 24 horas. En ese sentido, existen factores que podrían afectar la estabilidad de las citocinas, como los procesos de descongelación y el tiempo de almacenamiento de las muestras (Ozbey *et al.*, 2014).

Para complementar los resultados obtenidos por ELISA, sería adecuado evaluar la expresión de los genes que codifican para las citocinas y factores de transcripción, de cada subpoblación, en cultivos celulares tratados con las fracciones ClF8, ClF9, CnF12, CnF13 y CnF14.

4.4 Proporción de las subpoblaciones de linfocitos T cooperadores

Además de orquestar distintos mecanismos celulares, los linfocitos T cooperadores están implicados en el desarrollo de enfermedades autoinmunes, alergias e inflamación crónica. La progresión de estas condiciones, así como la función efectora de las subpoblaciones Th, está en función de la asociación y el balance de todas las subpoblaciones de linfocitos T cooperadores (Hirahara y Nakayama, 2016).

En el análisis de proporción de subpoblaciones (Figura 30) se determinó que en la condición sin estimular existe una predominancia del perfil Th2 en comparación con los linfocitos Th1 y Th17. La literatura indica que la diferenciación y función efectora de los linfocitos Th2 inhiben la diferenciación de los perfiles Th1 y Th17, lo cual se corresponde con lo observado previamente (Ivanova y Orekhov, 2015). Por otro lado, todas las fracciones analizadas (ClF8, ClF9, CnF12, CnF13 y CnF14) promovieron un perfil inflamatorio, conformado por los linfocitos Th17 y Th1; este último inhibe la diferenciación de los linfocitos Th2 (Peck y Mellins, 2010). En el artículo de revisión de Hirahara y Nakayama (2016) se describe el papel de las subpoblaciones Th1, Th2 y Th17 en el desarrollo de alergias y enfermedades autoinmunes. Los autores indican que la predominancia de linfocitos Th1 y Th17 favorece el desarrollo de enfermedades autoinmunes, mientras que los linfocitos Th2 están implicados en alergias.

En conjunto, este trabajo sugiere que las toxinas de los venenos de *Centruroides limpidus* y *Centruroides noxius* podrían tener un efecto terapéutico en condiciones de alergia, modulando un aumento en las proporciones de linfocitos Th1 y Th17. Sin embargo, es necesario realizar otros experimentos que complementen los resultados, al igual que analizar las proporciones de las subpoblaciones con respecto al tiempo.

4.5 Identificación de toxinas

Dentro de la familia Buthidae, el género *Centruroides* es considerado el más importante debido a que contiene especies venenosas para los humanos, incluidas las especies más tóxicas del mundo (Valdez-Velázquez *et al.*, 2013). Generalmente los componentes del veneno de escorpión se pueden clasificar en: péptidos con enlaces disulfuro y péptidos sin enlaces disulfuro (McElroy *et al.*, 2017). Estudios recientes de caracterización bioquímica del veneno del género *Centruroides* han identificado varias proteínas con enlaces disulfuro, incluyendo péptidos neurotóxicos. Las neurotoxinas, como las que interactúan con los canales de sodio y potasio, constituyen un gran porcentaje del veneno total de *Centruroides* y son componentes tóxicos con un amplio rango de actividades biológicas (McElroy *et al.*, 2017).

Con la finalidad de sustentar la hipótesis de que la actividad de las fracciones ClF8, ClF9, CnF12 y CnF13 en la diferenciación de linfocitos T cooperadores fue promovida por la presencia de neurotoxinas, se realizó un análisis de los espectros de dichas fracciones para determinar la naturaleza de los componentes (Tablas 6 y 7). Por otro lado, se analizó la fracción CnF11 (control negativo) para establecer diferencias en la composición entre las fracciones antes mencionadas.

De manera general, se identificaron mayormente neurotoxinas (NaTxS) que presentan como blanco molecular los canales de sodio dependientes de voltaje (Nav), las cuales modifican los mecanismos de apertura del canal; prolongando la cinética del cierre del canal (alpha-scorpion toxin) o abriendo los canales a potenciales menos despolarizados (beta-scorpion toxin) (Valdez-Velázquez *et al.*, 2013). Una de las características distintivas de los escorpiones de la familia Buthidae es el alto contenido de toxinas NaTxS que expresan en sus venenos (alrededor del 10%) (Rendón-Anaya *et al.*, 2012). En este estudio se reportaron 25 toxinas NaTxS, con un tamaño entre 14 y 87 aminoácidos. Por otro lado, se ha reportado que los canales de sodio se expresan en linfocitos T; no obstante, aún se desconoce mucho sobre los isotipos que se expresan y las funciones que estos desempeñan en linfocitos T (Huang *et al.*, 2015). En el estudio realizado por Lo *et al.* (2012) se determinó que la inhibición farmacológica de los canales Nav en linfocitos T cooperadores inhibe el flujo sostenido de Ca^{2+} al interior de las células, inducido por la selección de ligandos y la selección positiva *in vitro* de células $CD4^{+}$. En conjunto, se propone que las toxinas NaTxS identificadas en las fracciones ClF8, ClF9, CnF12 y CnF13 podrían afectar la diferenciación de linfocitos T cooperadores a través de la interacción con los canales Nav, estos canales modifican el flujo de Ca^{2+} en las células y de esta manera se modula la diferenciación de ciertos perfiles Th.

Por otro lado, sólo se identificaron 8 neurotoxinas KTx en las fracciones con actividad, las cuales presentan como mecanismo de acción el bloqueo de los canales de potasio (Valdez-Velázquez *et al.*, 2013). Es importante mencionar que solamente la neurotoxina Potassium channel toxin alpha-KTx 2.13 se identificó en ambos venenos, y que dicha toxina interactúa con los canales Kv1.3. De igual forma, se encontró una toxina en la fracción CnF12 (Potassium channel toxin alpha-toxin-KTx 2.1) capaz de bloquear los canales KCa3.1. Ambos canales (Kv1.3 y KCa3.1) están involucrados en el flujo de Ca^{2+} y en el proceso de diferenciación en linfocitos T cooperadores (Feske *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2015). Por lo anterior, es posible referir que la interacción de las neurotoxinas KTx identificadas en las fracciones de *C. limpidus* y *C. noxius* afectan la diferenciación a través de la interacción con los canales Kv1.3 y KCa3.1 en linfocitos T cooperadores.

No se identificó ninguna neurotoxina en la fracción CnF11 (control negativo) bajo los parámetros de búsqueda utilizados. La diferencia en la composición de la fracción CnF11 comparada con las fracciones ClF8, ClF9, CnF12 y CnF13 indica que probablemente la actividad observada se deba a la presencia de las neurotoxinas identificadas.

En relación con las limitantes del análisis por LC-MS/MS, se podría señalar que probablemente a causa de las distintas cantidades disponibles de cada una de las fracciones (Tabla 2), se obtuvieron diferencias notables en los porcentajes de cobertura (95%) y la cantidad de toxinas identificadas entre las fracciones de *C. limpidus* y *C. noxius*, ya que de las fracciones CnF12 y CnF13 se analizaron 20 y 30 μg , respectivamente, mientras que de las fracciones ClF8 y ClF9 se analizaron 3 y 10 μg , respectivamente. Los resultados del análisis indican que mismas toxinas fueron encontradas en las fracciones CnF12 y CnF13, fenómeno que puede ser atribuido a los problemas que se presentaron durante el fraccionamiento del veneno de *C. noxius*, hecho que impidió la correcta separación de los componentes (Figura 14).

En conjunto, las toxinas identificadas en las fracciones ClF8, ClF9, CnF12 y CnF13 podrían relacionarse con los efectos observados en los ensayos de detección de poblaciones y citocinas, debido a que interactúan con los canales Nav, Kv y KCa implicados en el flujo de Ca^{2+} intracelular, siendo este ion indispensable para la diferenciación de linfocitos T cooperadores. Por otro lado, es importante considerar que no se identificaron otros grupos de toxinas que podrían estar implicados en dichos efectos. Existe evidencia de que el veneno de *Centruroides* presenta neurotoxinas que interactúan con los canales iónicos de Ca^{2+} y Cl^- que, en linfocitos T cooperadores, forman parte de los procesos de proliferación y producción de citocinas (Feske *et al.*, 2012; Osnaya-Romero *et al.*, 2016). Por lo tanto, sería relevante comparar los

resultados del análisis con *taxa* superiores como familia y orden, con el fin de identificar otros componentes genéricos en los venenos de *Centruroides limpidus* y *Centruroides noxius*.

Capítulo 5. Conclusiones

A continuación, se resumen las principales conclusiones del proyecto, asimismo el resumen gráfico se puede apreciar en la Figura 31.

- ❖ Los venenos de *Centruroides limpidus* y *Centruroides noxius* no afectaron la proliferación de linfocitos T, evaluada mediante los métodos de la carboxifluoresceína y la resazurina sódica.
- ❖ Los venenos de *C. limpidus* y *C. noxius* promovieron la diferenciación de linfocitos T cooperadores, así como la producción de IL-10.
 - Las fracciones ClF8, ClF9, CnF11, CnF12, CnF13 y CnF14 aumentaron la diferenciación de linfocitos Th1.
 - Las fracciones ClF8, CnF12, CnF13 y CnF14 incrementaron la diferenciación de linfocitos Th2.
 - Las fracciones ClF7, ClF8, ClF9, CnF12 y CnF13 indujeron la diferenciación de linfocitos Th17.
 - La fracción ClF2 disminuyó la producción de IL-10, mientras que la fracción ClF8 la incrementó.
- ❖ La cuantificación de citocinas secretadas confirmó que las fracciones ClF8, ClF9, CnF12, CnF13 y CnF14 ejercen un efecto en la diferenciación de linfocitos T cooperadores y, específicamente, la fracción ClF8 incrementó la producción de IL-10.
- ❖ Las fracciones ClF8, ClF9, CnF12, CnF13 y CnF14 promovieron un perfil inflamatorio (conformado por linfocitos Th1 y Th17) y disminuyeron la proporción de linfocitos Th2.
- ❖ Las fracciones ClF8, ClF9, CnF12 y CnF13 contienen toxinas que interactúan con canales iónicos (Nav, Kv y KCa) implicados en el proceso de diferenciación en linfocitos T cooperadores.
- ❖ Existen toxinas de origen peptídico en los venenos de *Centruroides limpidus* y *Centruroides noxius* con potencial inmunomodulador para la diferenciación de linfocitos T cooperadores, así como en su actividad efectora.

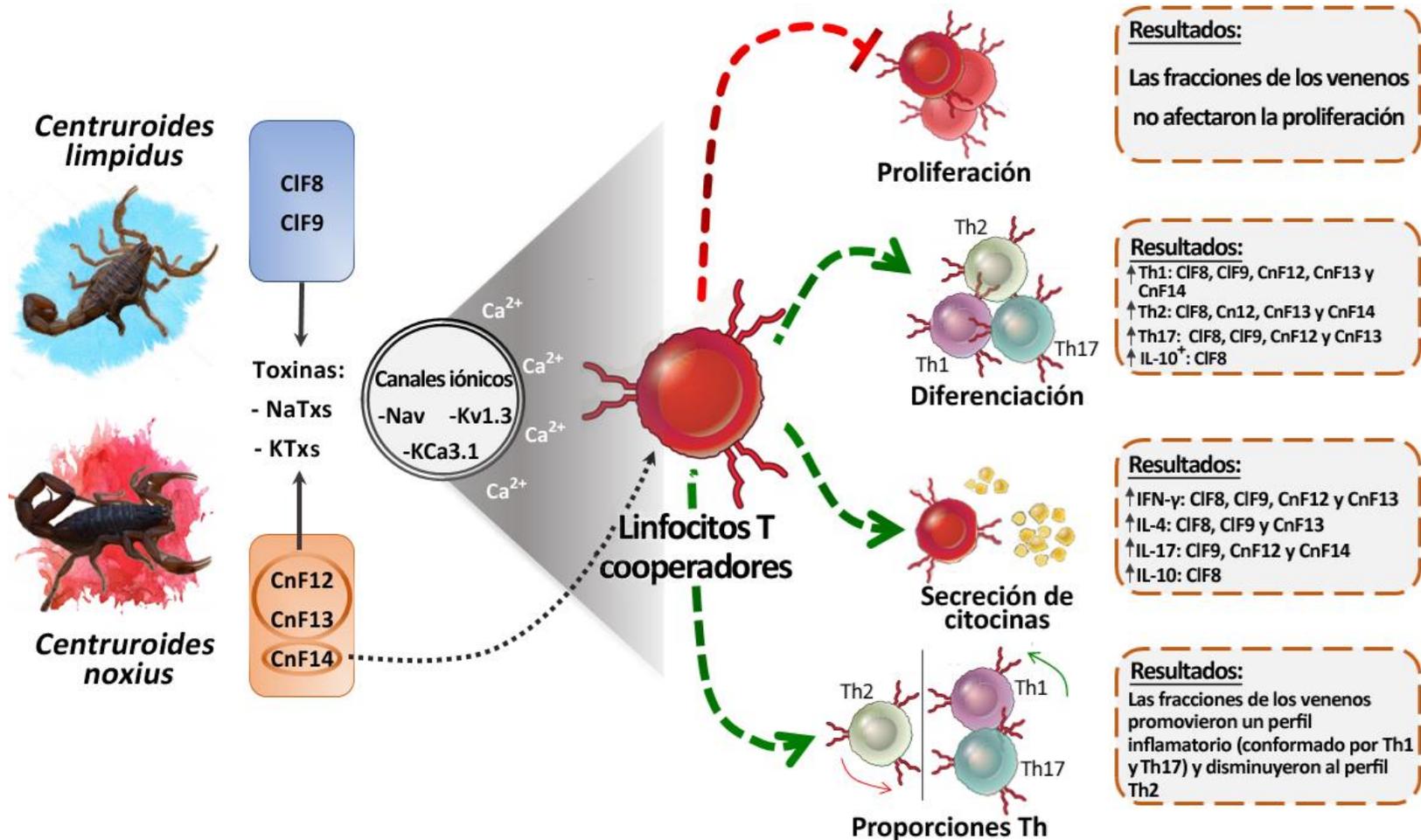


Figura 31. Resumen gráfico del proyecto. Se identificaron toxinas de las familias NaTxS y KTxs en las fracciones CIF8 y CIF9 del veneno de *Centruroides limpidus* y, CnF12 y CnF13 del veneno de *Centruroides noxius*. Dichas toxinas interactúan con los canales Nav, Kv1.3 y KCa3.1 que, en linfocitos T cooperadores, están implicados en el flujo de Ca²⁺ intracelular y, por lo tanto, en los procesos de proliferación, diferenciación y secreción de citocinas. Las fracciones de veneno antes mencionadas, además de la fracción CnF14, promovieron la diferenciación de linfocitos Th1, Th2 y Th17, así como la producción de la IL-10; aumentaron la secreción de citocinas específicas (IFN-γ, IL-4, IL-17 e IL-10) y promovieron un perfil inflamatorio (conformado por los perfiles Th1 y Th17). Por otro lado, no se encontró efecto significativo en la proliferación celular evaluada mediante los métodos de la carboxifluoresceína y la resazurina sódica.

Literatura citada

- Abbas, A., Lichtman, A. H., y Pillai, S. (2017). *Cellular and Molecular Immunology*. (Elsevier, Ed.) (9th editio). Elsevier.
- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., y Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 163–176. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>
- Adi-Bessalem, S., Hammoudi-Triki, D., y Laraba-Djebari, F. (2015). Scorpion Venom Interactions with the Immune System. In Springer (Ed.), *Scorpion Venoms* (pp. 87–107). Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6404-0>
- Adi-Bessalem, S., Mendil, A., Hammoudi-Triki, D., y Laraba-Djebari, F. (2012). Lung Immunoreactivity and Airway Inflammation: Their Assessment After Scorpion Envenomation. *Inflammation*, 35(2), 501–508. <https://doi.org/10.1007/s10753-011-9338-0>
- Al-Asmari, A. K., Kunnathodi, F., Saadon, K. Al, e Idris, M. M. (2016). Elemental analysis of scorpion venoms. *Journal of Venom Research*, 7(7), 16–20. Retrieved from <http://jvenomres.co.uk/wp-content/uploads/2016/09/AlAsmari.pdf>
- Andersen, M. H., Schrama, D., Straten, P. thor, y Becker, J. C. (2006). Cytotoxic T Cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(1), 32–41.
- Attarde, S. S., y Pandit, S. V. (2016). Scorpion Venom as Therapeutic Agent - Current Perspective. *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research*, 7(2), 59–72.
- Baranovski, B. M., Freixo-Lima, G. S., Lewis, E. C., y Rider, P. (2015). T Helper Subsets, Peripheral Plasticity, and the Acute Phase Protein, α 1-Antitrypsin. *BioMed Research International*, 2015, 14. <https://doi.org/10.1155/2015/184574>
- Batista, C. V. F., Gómez-Lagunas, F., Rodríguez De La Vega, R. C., Hajdu, P., Panyi, G., Gáspár, R., y Possani, L. D. (2002). Two novel toxins from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* that block Kv1.3 and Shaker B K⁺-channels with distinctly different affinities. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1601(2), 123–131. [https://doi.org/10.1016/S1570-9639\(02\)00458-2](https://doi.org/10.1016/S1570-9639(02)00458-2)
- Bocharov, G., Quiel, J., Luzyanina, T., Alon, H., Chiglintsev, E., Chereshev, V., Meier-Schellersheim, M., Paul, W. E., y Grossman, Z. (2011). Feedback regulation of proliferation vs. differentiation rates explains the dependence of CD4 T-cell expansion on precursor number. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(8), 3318–3323. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019706108>

- Boehm, T., y Swann, J. B. (2014). Origin and Evolution of Adaptive Immunity. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2(1), 259–283. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022513-114201>
- Bonilla, F. A., y Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S33–S40. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017>
- Cahalan, M. D., y Chandy, K. G. (2009). The functional network of ion channels in T lymphocytes. *Immunological Reviews*, 231(1), 59–87. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00816.x>
- Cao, Z., Di, Z., Wu, Y., y Li, W. (2014). Overview of Scorpion Species from China and Their Toxins. *Toxins*, 6(3), 796–815. <https://doi.org/10.3390/toxins6030796>
- Casella-Martins, A., Ayres, L. R., Burin, S. M., Morais, F. R., Pereira, J. C., Faccioli, L. H., Sampaio, S. V., Arantes, E. C., Castro, F. A., y Pereira-Crott, L. S. (2015). Immunomodulatory activity of *Tityus serrulatus* scorpion venom on human T lymphocytes. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 21(1), 4–11. <https://doi.org/10.1186/s40409-015-0046-3>
- Chaplin, D. D. (2010). Overview of the Immune Response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), 41. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980.Overview>
- Chávez-Galán, L., Arenas-Del Angel, M., Zenteno, E., Chávez, R., y Lascurain, R. (2009). Cell Death Mechanisms Induced by Cytotoxic Lymphocytes. *Cellular & Molecular Immunology*, 6(1), 15.
- Chávez-Haro, A. L., y Ortiz, E. (2015). Scorpionism and Dangerous Species of Mexico. In Springer (Ed.), *Scorpion Venoms* (pp. 201–213). Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6404-0>
- Cheng, D., Dattaro, J. A., Yakobi, R., Bush, S. P., Gerardo, C. J., Talavera, F., y Alcock, J. (2017). Scorpion Envenomation. *Medscape Reference*. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1410354#SA3>
- Chesler, D. A., y Reiss, C. S. (2002). The role of IFN- γ in immune responses to viral infections of the central nervous system. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 13(6), 441–454. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(02\)00044-8](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(02)00044-8)
- Cid-Uribe, J. I., Jiménez-Vargas, J. M., Ferreira-Batista, C. V., Zamudio-Zuñiga, F., y Possani, L. D. (2017). Comparative proteomic analysis of female and male venoms from the Mexican scorpion *Centruroides limpidus*: Novel components found. *Toxicon*, 125, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.11.256>
- Coligan, J. E., y Bierer, B. E. (2011). *Current Protocols in Immunology*. (Wiley, Ed.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/0471142735>

- Corzo, G., y Espino-Solis, G. P. (2017). Selected scorpion toxin exposures induce cytokine release in human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicon*, 127, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.01.007>
- Couper, K. N., Blount, D. G., y Riley, E. M. (2008). IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *The Journal of Immunology*, 180(9), 5771–5777. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.9.5771>
- Daly, N. L., y Wilson, D. (2018). Structural diversity of arthropod venom toxins. *Toxicon*, 152, 46–56. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.07.018>
- de Armas, L. F., y Martín-Frías, E. (2008). El Género Centruroides Marx, 1890 (Scorpiones: Buthidae) en el Estado de Veracruz, México. *Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa*, 43, 7–22.
- Dhama, K., Saminathanm, M., Jacob, S. S., Singh, M., Karthik, K., Amarpal, Tiwari, R., Sunkara, L. T., Malik, Y. S., y Singh, R. K. (2015). Effect of immunomodulation and immunomodulatory agents on health with some bioactive principles, modes of action and potent biomedical applications. *International Journal of Pharmacology*, 11(4), 253–290.
- Fallon, P. G., y Alcamí, A. (2006). Pathogen-derived immunomodulatory molecules: future immunotherapeutics? *Trends in Immunology*, 27(10), 470–476. <https://doi.org/10.1016/j.it.2006.08.002>
- Feske, S., Skolnik, E. Y., y Prakriya, M. (2012). Ion channels and transporters in lymphocyte function and immunity. *Nature Reviews Immunology*, 12(7), 532–547. <https://doi.org/10.1038/nri3233>
- Feske, S., Wulff, H., y Skolnik, E. Y. (2015). Ion Channels in Innate and Adaptive Immunity. *Annual Review of Immunology*, 33(1), 291–353. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112212>
- Fung-Leung, W. P., Edwards, W., Liu, Y., Ngo, K., Angsana, J., Castro, G., Wu, N., Liu, X., Swanson, R. V., y Wickenden, A. D. (2017). T cell subset and stimulation strength-dependent modulation of T cell activation by Kv1.3 blockers. *PLoS ONE*, 12(1), 3–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170102>
- Gagliani, N., y Huber, S. (2017). Basic aspects of T helper cell differentiation. In *T-Cell Differentiation* (pp. 19–30). New York: Humana Press. [https://doi.org/10.1016/0923-2494\(89\)90126-0](https://doi.org/10.1016/0923-2494(89)90126-0)
- Gáspár, R., Bene, L., Damjanovich, S., Muñoz-Garay, C., Calderon-Aranda, E. S., y Possani, L. D. (1995). β -Scorpion Toxin 2 From *Centruroides noxius* Blocks Voltage-gated K⁺ Channels in Human Lymphocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 213, 419–423.
- Hadaddezfúli, R., Khodadadi, A., Assarehzadegan, M. A., Pipelzadeh, M. H., y Saadi, S. (2015). Hemiscorpius lepturus venom induces expression and production of interleukin-12 in human monocytes. *Toxicon*, 100, 27–31. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.04.007>

- Harvey, A. L. (2014). Toxins and drug discovery. *Toxicon*, 92, 193–200. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.10.020>
- Hirahara, K., y Nakayama, T. (2016). CD4+T-cell subsets in inflammatory diseases: Beyond the Th1/Th2 paradigm. *International Immunology*, 28(4), 163–171. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxw006>
- Hmed, B., Serria, H. T., y Mounir, Z. K. (2013). Scorpion Peptides: Potential Use for New Drug Development. *Journal of Toxicology*, 2013, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2013/958797>
- Hoffman, W., Lakkis, F. G., y Chalasani, G. (2016). B cells, Antibodies, and More. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 11(1), 137–154. <https://doi.org/10.2215/CJN.09430915>
- Huang, W., Lu, C., Wu, Y., Ouyang, S., y Chen, Y. (2015). Identification and functional characterization of voltage-gated sodium channels in lymphocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 458(2), 294–299. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.103>
- Insera, M. C., y Lewis, R. J. (2011). Venom Peptide modulators of the immune system. *Inflammation & Allergy-Drug Targets*, 10(5), 399–410. <https://doi.org/10.2174/187152811797200687>
- Ito, H., y Seishima, M. (2010). Regulation of the Induction and Function of Cytotoxic T Lymphocytes by Natural Killer T Cell. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 8. <https://doi.org/10.1155/2010/641757>
- Ivanova, E. A., y Orekhov, A. N. (2015). T Helper lymphocyte Subsets and Plasticity in Autoimmunity and Cancer: An overview. *BioMed Research International*, 2015, 9. <https://doi.org/10.1155/2015/327470>
- Jentsch, T. J., Hübner, C. A., y Fuhrmann, J. C. (2004). Ion channels: Function unravelled by dysfunction. *Nature Cell Biology*, 6(11), 1039–1047. <https://doi.org/10.1038/ncb1104-1039>
- Jiménez, R., Ikonopoulou, M. P., Lopez, J. A., y Miles, J. J. (2018). Immune drug discovery from venoms. *Toxicon*, 141, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.11.006>
- Kircher, S., Merino-Wong, M., Niemeyer, B. A., y Alansary, D. (2018). Profiling calcium signals of in vitro polarized human effector CD4+T cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1865(6), 932–943. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.04.001>
- Kumar, B. V., Connors, T. J., y Farber, D. L. (2018). Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity*, 48(2), 202–213. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.007>
- Lanier, L. L., y Sun, J. C. (2009). Do the terms innate and adaptive immunity create conceptual barriers? *Nature Reviews Immunology*, 9(5), 302–303. <https://doi.org/10.1038/nri2547>

- Lee, S., y Margolin, K. (2011). Cytokines in cancer immunotherapy. *Cancers*, 3(4), 3856–3893. <https://doi.org/10.3390/cancers3043856>
- Li, M., y Xiong, Z. (2011). Ion channels as targets for cancer therapy. *International Journal*, 3(2), 156–166.
- Lo, W. L., Donermeyer, D. L., y Allen, P. M. (2012). A voltage-gated sodium channel is essential for the positive selection of CD4 + T cells. *Nature Immunology*, 13(9), 880–887. <https://doi.org/10.1038/ni.2379>
- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., y Xia, B. (2012). CD4+ T Cells: Differentiation and Functions. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 12. <https://doi.org/10.1155/2012/925135>
- Martín-Frías, E., de Armas, L. F., y Olguín, L. (2010). Nuevos datos taxonómicos sobre *Centruroides limpidus* (Karsch, 1879) (Scorpiones: Buthidae) del estado de Veracruz, México. *Boletín de La Sociedad Entomológica Aragonesa*, 46, 188.
- Martin, B. M., Ramirez, A. N., Gurrola, G. B., Nobile, M., Prestipino, G., y Possani, L. D. (1994). Novel K + - channel-blocking toxins from the *Centruroides limpidus limpidus* Karsch venom scorpion. *Biochemical Journal*, 304(1994), 51–56. <https://doi.org/10.1042/bj3040051>
- Masopust, D., y Schenkel, J. M. (2013). The integration of T cell migration, differentiation and function. *Nature Reviews Immunology*, 13(5), 309–320. <https://doi.org/10.1038/nri3442>
- Mauri, C., y Bosma, A. (2012). Immune Regulatory Function of B Cells. *Annual Review of Immunology*, 30(1), 221–241. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074934>
- McElroy, T., McReynolds, C. N., Gullledge, A., Knight, K. R., Smith, W. E., y Albrecht, E. A. (2017). Differential toxicity and venom gland gene expression in *Centruroides vittatus*. *PLoS ONE*, 12(10), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184695>
- Mogensen, T. H. (2009). Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(2), 240–273. <https://doi.org/10.1128/CMR.00046-08>
- Mohanty, I., Arunvikram, K., Behera, D., Arun Prince Milton, A., Elaiyaraja, G., Rajesh, G., y Dhama, K. (2016). Immunomodulatory and Therapeutic Potential of Zootoxins (Venom and Toxins) on the Way Towards Designing and Developing Novel Drugs/Medicines: An Overview. *International Journal of Pharmacology*, 12(2), 126–135. <https://doi.org/10.3923/ijp.2016.126.135>
- Mortari, M. R., y Cunha, A. O. S. (2013). New Perspectives in Drug Discovery Using Neuroactive Molecules From the Venom of Arthropods. In Intech (Ed.), *An Integrated View of the Molecular Recognition and Toxicology - From Analytical Procedures to Biomedical Applications* (pp. 91–117). Intech. <https://doi.org/dx.doi.org/10.5772/52382>

- Muranski, P., y Restifo, N. P. (2013). Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood*, 121(13), 2402–2414. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-378653>
- Ng, T. H. S., Britton, G. J., Hill, E. V., Verhagen, J., Burton, B. R., y Wraith, D. C. (2013). Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. *Frontiers in Immunology*, 4, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00129>
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., y Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267(17), 5421–5426. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>
- O'Shea, J. J., y Paul, W. E. (2010). Mechanisms Underlying Lineage Commitment and Plasticity of Helper CD4+ T Cells. *Science*, 327(5969), 1098–1102. <https://doi.org/10.1126/science.1178334>
- Olamendi-Portugal, T., Somodi, S., Fernández, J. A., Zamudio, F. Z., Becerril, B., Varga, Z., Panyi, G., Gáspár, R., y Possani, L. D. (2005). Novel α -KTx peptides from the venom of the scorpion *Centruroides elegans* selectively blockade Kv1.3 over IKCa1 K⁺ channels of T cells. *Toxicon*, 46(4), 418–429. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.06.001>
- Oldrati, V., Arrell, M., Violette, A., Perret, F., Sprüngli, X., Wolfender, J. L., y Stöcklin, R. (2016). Advances in venomics. *Molecular BioSystems*, 12(12), 3530–3543. <https://doi.org/10.1039/c6mb00516k>
- Osnaya-Romero, N., Acosta-Saavedra, L. C., Goytia-Acevedo, R., Lares-Asseff, I., Basurto-Celaya, G., Perez-Guille, G., Possani, L. D., y Calderón-Aranda, E. S. (2016). Serum level of scorpion toxins, electrolytes and electrocardiogram alterations in Mexican children envenomed by scorpion sting. *Toxicon*, 122, 103–108. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.09.018>
- Ozbey, G., Gorczynski, R., y Erin, N. (2014). Stability of cytokines in supernatants of stimulated mouse immune cells. *European Cytokine Network*, 25(2), 30–34. <https://doi.org/10.1684/ecn.2014.0353>
- Peck, A., y Mellins, E. D. (2010). Plasticity of T-cell phenotype and function: The T helper type 17 example. *Immunology*, 129(2), 147–153. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03189.x>
- Pérez-Fernández, R., y Kaski, J. C. (2002). Interleucina-10 y enfermedad coronaria. *Revista Española de Cardiología*, 55(7), 64–76.
- Petricevich, V. L. (2006). Balance Between Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in Mice Treated With *Centruroides noxius* Scorpion Venom. *Mediators of Inflammation*, 2006(6), 1–11. <https://doi.org/10.1155/MI/2006/54273>
- Petricevich, V. L. (2010). Scorpion Venom and the Inflammatory Response. *Mediators of Inflammation*, 2010, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2010/903295>

- Pieper, K., Grimbacher, B., y Eibel, H. (2013). B-cell biology and development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(4), 959–971. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.046>
- Ponce-Saavedra, J., y Francke, O. F. (2013). Clave para la identificación de especies de alacranes del género Centruroides Marx 1890 (Scorpiones: Buthidae) en el Centro Occidente de México. *Biológicas*, 15(1), 52–62.
- Quah, B. J. C., y Parish, C. R. (2010). The Use of Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE) to Monitor Lymphocyte Proliferation. *Journal of Visualized Experiments*, (44), 4–7. <https://doi.org/10.3791/2259>
- Rasband, M. N., y Trimmer, J. S. (2010). Ion Channel Localization in Axons. In *Encyclopedia of Neuroscience* (pp. 229–235). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1385/1592591183>
- Reeves, J., y Reeves, P. (2001). Removal of lymphoid organs. *Immunology*, 1–3. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0109s01>
- Rendón-Anaya, M., Delaye, L., Possani, L. D., y Herrera-Estrella, A. (2012). Global Transcriptome Analysis of the Scorpion *Centruroides noxius*: New toxin Families and Evolutionary Insights from an Ancestral Scorpion Species. *PLoS ONE*, 7(8), e43331. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043331>
- Riera-Romo, M., Pérez-Martínez, D., y Castillo-Ferrer, C. (2016). Innate immunity in vertebrates: an overview. *Immunology*, 148(2), 125–139. <https://doi.org/10.1111/imm.12597>
- Saadi, S., Assarehzadegan, M. A., Pipelzadeh, M. H., y Hadaddezfuli, R. (2015). Induction of IL-12 from human monocytes after stimulation with *Androctonus crassicauda* scorpion venom. *Toxicon*, 106, 117–121. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.09.029>
- Santibáñez-López, C. E., Cid-Urbe, J. I., Batista, C. V. F., Ortiz, E., y Possani, L. D. (2016). Venom Gland Transcriptomic and Proteomic Analyses of the Enigmatic Scorpion *Superstitionia donensis* (Scorpiones: Superstitioniidae), with Insights on the Evolution of its Venom Components. *Toxins*, 8(12), 3–6. <https://doi.org/10.3390/toxins8120367>
- Saxena, R., Sharma, A., Bharti, M., y Rathore, M. (2012). Immunomodulator A New Horizon : An overview. *Journal of Pharmacy Research*, 5(4), 2306–2310. <https://doi.org/doi:10.1186/1471-2164-7-96>
- Smith-Garvin, J. E., Koretzky, G. A., y Jordan, M. S. (2009). T Cell Activation. *Annual Review of Immunology*, 27(1), 591–619. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132706>
- Taniuchi, I. (2018). CD4 Helper and CD8 Cytotoxic T Cell Differentiation. *Annual Review of Immunology*, 36(1), 579–601. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053411>

- Teruel, R., Ponce-Saavedra, J., y Quijano-Ravell, A. F. (2015). Redescription of *Centruroides noxius* and description of a closely related new species from western Mexico (Scorpiones: Buthidae). *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86(4), 896–911. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2015.09.010>
- Tobón, G. J., Izquierdo, J. H., y Cañas, C. A. (2013). B lymphocytes: Development, Tolerance, and Their Role in Autoimmunity - Focus on Systemic Lupus Erythematosus. *Autoimmune Diseases*, 2013, 17. <https://doi.org/10.1155/2013/827254>
- Turvey, S. E., y Broide, D. H. (2010). Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S24–S32. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.016>
- Utkin, Y. N. (2015). Animal venom studies: Current benefits and future developments. *World Journal of Biological Chemistry*, 6(2), 28–33. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v6.i2.28>
- Valdez-Velázquez, L. L., Quintero-Hernández, V., Romero-Gutiérrez, M. T., Coronas, F. I. V., y Possani, L. D. (2013). Mass Fingerprinting of the Venom and Transcriptome of Venom Gland of Scorpion *Centruroides tecomanus*. *PLoS ONE*, 8(6), e66486. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066486>
- Valdez-Velazquéz, L. L., Romero-Gutierrez, M. T., Delgado-Enciso, I., Dobrovinskaya, O., Melnikov, V., Quintero-Hernández, V., Ceballos-Magaña, S. G., Gaitan-Hinojosa M. A., Coronas, F. I., Puebla-Perez, A. M., Zamudio, F., De la Cruz-García, I., Vázquez-Vuelvas, O. F., Soriano-Hernandez, A. D., y Possani, L. D. (2016). Comprehensive analysis of venom from the scorpion *Centruroides tecomanus* reveals compounds with antimicrobial, cytotoxic, and insecticidal activities. *Toxicon*, 118, 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.04.046>
- Valdivia, H. H., Smith, J. S., Martin, B. M., Coronado, R., y Possani, L. D. (1988). Charybdotoxin and noxiustoxin, two homologous peptide inhibitors of the $K^+(Ca^{2+})$ channel. *FEBS Letters*, 226(2), 280–284. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)81439-X](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)81439-X)
- Vazquez, A., Tapia, J. V., Eliason, W. K., Martin, B. M., Lebreton, F., Delepierre, M., Possani L. D., y Becerril, B. (1995). Cloning and characterization of the cDNAs encoding Na^+ channel-specific toxins 1 and 2 of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon*, 33(9), 1161–1170. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(95\)00058-T](https://doi.org/10.1016/0041-0101(95)00058-T)
- Vogeser, M., y Parhofer, K. G. (2007). Liquid Chromatography Tandem-mass Spectrometry (LC-MS/MS) - Technique and Applications in Endocrinology. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, 115(9), 559–570. <https://doi.org/10.1055/s-2007-981458>
- Walker, J. A., y McKenzie, A. N. J. (2017). TH2 cell development and function. *Nature Reviews Immunology*, 18(2), 121–133. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.118>

- Walter, M. R. (2010). Structure of IFN γ and its receptors. In Elsevier (Ed.), *Handbook of Cell Signaling* (2 ed, Vol. 1, pp. 261–263). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374145-5.00039-5>
- Warrington, R., Watson, W., Kim, H. L., y Antonetti, F. R. (2011). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, *14*, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1>
- Wieczorek, M., Abualrous, E. T., Sticht, J., Álvaro-Benito, M., Stolzenberg, S., Noé, F., y Freund, C. (2017). Major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II proteins: Conformational plasticity in antigen presentation. *Frontiers in Immunology*, *8*, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00292>
- Worbs, T., Hammerschmidt, S. I., y Förster, R. (2016). Dendritic cell migration in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, *17*(1), 30–48. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.116>
- Ye, F., Hu, Y., Yu, W., Xie, Z., Hu, J., Cao, Z., Li, W., y Wu, Y. (2016). The Scorpion Toxin Analogue BmKTX-D33H as a Potential Kv1.3 Channel-Selective Immunomodulator for Autoimmune Diseases. *Toxins*, *8*(4), 1–12. <https://doi.org/10.3390/toxins8040115>
- Zhao, Y., Huang, J., Yuan, X., Peng, B., Liu, W., Han, S., y He, X. (2015). Toxins Targeting the Kv1.3 Channel: Potential Immunomodulators for Autoimmune Diseases. *Toxins*, *7*(5), 1749–1764. <https://doi.org/10.3390/toxins7051749>
- Zhu, J., y Paul, W. E. (2008). CD4 T cells: Fates, functions, and faults. *Blood*, *112*(5), 1557–1569. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-078154>
- Zhu, J., Yamane, H., y Paul, W. E. (2010). Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annual Review of Immunology*, *28*(1), 445–489. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101212>
- Zoccal, K. F., Bitencourt, C. da S., Secatto, A., Sorgi, C. A., Bordon, K. de C. F., Sampaio, S. V., Arantes, E. C., y Faccioli, L. H. (2011). Tityus serrulatus venom and toxins Ts1, Ts2 and Ts6 induce macrophage activation and production of immune mediators. *Toxicon*, *57*(7–8), 1101–1108. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.04.017>
- Zygmunt, B., y Veldhoen, M. (2011). *T Helper Cell Differentiation: More than Just Cytokines. Advances in Immunology* (1st ed., Vol. 109). Elsevier inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387664-5.00005-4>